

Farmacopea Argentina

VOLUMEN III



**FARMACOPEA
ARGENTINA**

SÉPTIMA EDICIÓN



Farmacopea Argentina

VOLUMEN
III

FARMACOPEA ARGENTINA

SÉPTIMA EDICIÓN



Ministerio de Salud de la Nación

Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos

ANMAT

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

INAME

Instituto Nacional de Medicamentos

FARMACOPEA ARGENTINA

SÉPTIMA EDICIÓN

Presidente de la Nación

Dra. Cristina Fernández de Kirchner

Jefe de Gabinete de Ministros

Dr. Juan Manuel Abal Medina

Ministro de Salud de la Nación

Dr. Juan Luís Manzur

Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos

Dr. Gabriel Eduardo Yedlin

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

Dr. Carlos A. Chiale

Instituto Nacional de Medicamentos

Farm. Rodolfo H. Mocchetto

**FARMACOPEA
ARGENTINA**

SÉPTIMA EDICIÓN

VOLUMEN
III

COMISIÓN PERMANENTE
FARMACOPEA ARGENTINA

Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina

PRESIDENTE: Dr. Carlos A. Chiale

DIRECTOR EJECUTIVO: Bioq. y Farm. Héctor Giuliani

SECRETARÍA TÉCNICA:

Farm. Melina I. Assalone

Farm. Melina A. Dal Mas

Farm. María Celeste De Angelis

VOCALES:

Dr. Sem M. Albónico

Dr. Daniel Allemandi

Dr. Arnaldo Luis Bandoni

Dr. Pablo Bazerque

Dra. Clyde Carducci

Dr. Mario A. Copello (†)

Dr. Miguel D'Aquino

Dr. Juan M. Dellacha

Dra. Graciela Ferraro

Dr. Teodoro S. Kaufman

Dra. Marcela Longhi

Dr. Eloy Mandrile (†)

Dr. Rubén Manzo

Dra. Eugenia Olivera

Dra. Cristina Ortiz

Dra. María Teresa Pizzorno

Dr. Edgardo Poskus

Dra. Maria Praturlon

Dr. Modesto Rubio

Dr. Norberto A. Terragno

Dra. María Guillermina Volonté

COMPOSICIÓN DE LAS SUBCOMISIONES TÉCNICAS DE LA FARMACOPEA ARGENTINA

Aguas y Soluciones Parenterales de Gran Volumen

Achilli, Estela; Bichman, Mario; Colombari, Daniel; Cravzov Alicia; Duda, Guillermo; Fiore, Esteban; Menéndez Viviana; Neder, Jorge; Nista, Liliana; Petracca, Antonia; Ploder, Peter; Silvetti, Omar Alfredo; Szyszkowsky, Juiz Rubén; Vedoya, Gabriela Silvia.

Biodisponibilidad, Bioequivalencia y Equivalencia Farmacéutica

Bignone, Inés; Bolaños, Ricardo; Bramuglia, Guillermo; Abalos, Ivana; Debattista, Gabriela; De Leone, Héctor (†); Giarcovich, Silvia; Granero, Gladys; Niselman, Ada Viviana; Pano, Viviana; Pesce, Graciela; Pesce, Guido; Peretti Mariana; Rey, Andrea; Romañuk Carolina; Seoane, Martín; Sperandeo, Norma; Steeman, Gabriela; Torres, Adriana; Viñas, María Alicia.

Colorantes, Excipientes y Aditivos

Brunet, Noemí; Bustos, Mónica; Ciura, Juan M. Emilio; Corseti, Héctor; Dabbene, Viviana; Dobrecky, José; Ferrari, Jorge; Jacobi, Carlos; Rivas, Viviana; Rubio García, Rodolfo; Taschetti, Mabel; Trokán, Francisco; Vallese, María Cristina.

Controles Toxicológicos

Araldi, Héctor (†); Bindstein, Edith; Bulgach, Delia; Cereceto Marina, Fulginiti, Ana Susana; Gruñeiro, Elena; López, Clara; Pazos, Liliana; Pico, José Carlos; Quiroga, Pablo; Rodriguez Carolina, Rodriguez Yanina; Roses, Otmaro; Salseduc, Marta; Santiesteban, Raquel.

Estabilidad y Envases

Ariosti, Alejandro; Blanco, Mirta; Briñon, Margarita; Gorisknik, Adriana; Gruc, Olga; Alejandra; Mandrile, Alejandra; Nudelman, Norma; Pico, Guillermo; Pilatti, Carina; Riera, Mónica; Spinetto, Marta; Sandrone, Ariel; Sánchez, Eduardo; Tamasi, Diego.

Farmacia Hospitalaria

Bernal Castro, Federico; Bernavei, Alicia; Buontempo, Fabian; Elías, Mónica; Fernandez, María Cristina; Drunday, Fabian; Fernández, Fillinger, Ester, María Laura; García, Angélica;

Hermida, Miguel; Iglesias, Fabiana; Lagomarsino, Eduardo; Mato, Gabriel; Melero, Marcia; Menéndez, Ana María; Montemerlo, Hugo; Pita Martin de Portela, María Luz; Raviolo, Rodolfo; Rodríguez, Luis A.; Slobodianik de Gurevich, Haydeé; Soifer, Graciela.

Farmacia Oficial

Alvárez, Jorgelina; Andiñach, Guido; Callegari, Fernando; Ferrero, Horacio; Fitanovich, Nora; Fridman, Gerardo; Garcia, Roberto; Gatica, Karina; Gomez, Juan; Gonzalez, Ana María; Julián, Silvia; Kleinlein, Patricia; López de Souza, María del Carmen; Lopez, Guillermo; Maino, Héctor; Mollardo, María Teresa; Mendez, Raquel; Moreno, Patricia; Nadal, Ana María; Paura, Andrea; Perez González, Rocio; Policelli, Gabriela; Quijano, Rubén Darío; Quiroga, Eduardo; Rencoret, María Mercedes; Ruggieri, José; Salas, Vivian; Tokumoto, Fernanda; Torres, Hugo; Uema, Sonia; Valverde, Javier.

Gases Medicinales

Arcos, Marcelo; Bernaus, Carlos; Cordera, Mónica; Elgadbán, Javier; Fischer, Alfredo; Marceca, Ernesto; Mildenberger, Maria Amalia; Sturtz Nelson; Testa, Graciela; Tourville, Antonio; Zavala, Estela.

Ingredientes Farmacéuticos Activos y Productos Terminados

Abelaira, Sara; Acevedo, Maria Eugenia; Alarcon, Gabriela; Alassia de Torres, Liliana; Avancini Noceti, Constanza; Barredo, Silvia; Barros, Carmen; Bava, Adriana; Berndt, Sandra; Bianchi, Dario; Bianchini, Romina; Blanc, José; Boggian, Dora; Brandolini, Andres; Bruno, Claudia; Cancio, Julieta; Capellino, Víctor; Castellano, Patricia; Centrone, Claudio; Constanza; Ceresole, Rita; Chiarelli, Silvia; Circón de Vidal, Noemí; Calandri, Daniela; Carro, Vanesa; Castaña, Eduardo; Cereijo, María Inés (†); Chiamonte, Eduardo; Chiarelli, Silvia; Ciccio, Enrique; Diez, María Ester; Dominguez, Silvia; Ercolano, Irma; Fariña, Mirta; Faroppa, María; Fasanella, Marta; Fernández Otero, Germán; Ferrari, Maria; Gabor, Juliana; Garcia, Marcela; Garnero, Claudia; Giornelli, Gabriela; Gonzalez Cecilia; González, Soledad; Gonzalez

Vidal, Noelia; Greco, Olga; Herr, Victoria; Hoyos de Rossi, María; Irurtia, Lucila; Jimenez Kairuz, Alvaro; Lamas, Maria Celina; Larrinaga, Alicia; Larghi Enrique; Luque, Graciela; Laba, Raul; Lavaselli, Susana; Lloret, M. Antonia; Lopez, Marcelo; Lucangioli, Silvia; Luna, Julio; Lynch, Josefina; Maggio, Rubén; Manghi, Marcela; Marinaro, Bautista; Martinez, Juan L.; Meneghini, Alejandro; Milazzo, Cecilia; Montes de Oca, Federico; Nacucchio, Marcelo; Ortega, Claudia; Palacios, Marcelo Luis; Palacios de Ortiz, Sara; Perez, Vanina; Pinet, Ana María; Piñeyro, Luisa; Ponce, Claudia; Porta, Raúl; Pozzo, María del Carmen; Prado, Hector; Quatrocchi, Oscar; Quijano, Ruben; Quiroga, Gladys; Raviolo, Mónica; Rivas, Raúl; Robles, Juan; Ricchiuti, Andrea; Roberto, Mónica; Rosasco, María Ana; Saavedra, Abel; Saint Martin, Eduardo; Sakson, Mario; Salomon, Claudio; Sanpedro, Pura; Safierowicz, Rosa; Scala, Mariela; Sedeño, Cristina; Segall, Adriana; Serrao, Rosa; Simionato, Laura; Soto, Pablo; Sproviero, Jorge; Suarez, Marcelo; Szeliga, Maria; María; Tombari, Dora; Valente, Gladys; Vazquez, Ana; Vega, Julio César; Varela López, Ramón; Vessuri, María; Vidal, Noelia; Yapur, Gustavo; Zan, Mercedes; Zinni, Elvira; Zoppi, Ariana; Zubata, Patricia.

Medicamentos Herbarios

Agnese, Alicia; Amat, Aníbal; Bucciarelli, Alejandro; Cabrera, José Luis; Chico, Sandra; Debenedetti, Silvia; Del Vitto, Luis Angel; Flores, María Luján; Gattuso, Martha; Gattuso, Susana; Gurni, Alberto; Lopez, Paula; Nadinic, Elena; Padula, Laura Z.; Petenatti, Elisa; Rizzo, Inés; Rondina, Rubén; Schvarzberg, Nora; Skliar, Mario; Spegazzini, Etile; Wagner, Marcelo; Wilson, Erica; Zeichen, Rita.

Microbiología

Albesa de Eraso, Inés; Arakaki, Regina; Balanian, Silvia Gladys; Belixán, Norma; Calvete, Javier; Cerra, Hector; Frade, Horacio; Franco, Mirta; Garcia, Carolina; Giraudo, Federico; Gutkin, Gabriel; Lagomarsino, Monica; Magariños Maria del Carmen, Pietrasanta, Beatriz; Raffo Palma, Martha; Salazar, Germán; Sordelli, Daniel; Stagnaro, Stella Maris; Telli, Herminia; Teves, Sergio; Torno, Graciela; Vivas, Ariel.

Productos Biológicos y Biotecnológicos

Albertengo, María Elisa (†); Aprea, Patricia; Barravecchia de Dehó, Martha; Brero, María Luisa; Caminos, Andrea; Copello, Cecilia; Dabsys,

Susana; Dokmetjian, José; Drucaroff, María Alejandra; Cascone; Corley, Esteban; Criscuolo, Marcelo; Esnaola, María Margarita; Fraga, Griselda; Francinelli, Luisa; García, Salvador; García Franco, Susana; Giampaolo, Beatriz; Gorzalczany, Susana; Goyogana, Francisco; Iglesias, Sergio; Mammarella, Carlos; Mondelo, Nélide; Nisenbaum, Isaac; Oliva, Liliana; Ostrowski, Héctor; Pardo, Verónica; Perez, Analia (†); Pombo, María Luz; Rodríguez, María Eugenia; Rossi, Marina; Seigelchifer, Mauricio; Sobrero, Cecilia; Yantorno, Osvaldo. Zarzur, Jorge.

Productos Médicos

Benitez, Sergio; Carbone, Nora; Costanzo, Ricardo; De Rose, Maria; Gago, Daniel; Gonzalez, María Celeste; Graña, Nora; Graziano, Maria Del Carmen; Herrera, Fanny; Iervasi, Liliana; Metz, Rita; Mosconi, Andrea; Peralta, Laura; Saba, Fernando; Sager de Agostini, Helga; Sialino, Rodolfo; Staravijosky, Alejandra; Tarletta, Patricia; Olivera de O' Connell, Lucía.

Radiofármacos

Aletti, Sabrina; Baigorria, Sergio; Bergoc, Rosa; Boccio, José; Cañelas, Carlos; Caro, Ricardo; Duran, Adrián; Fraga de Suarez, Amanda; Furnari, Juan Carlos; Nicolini, Jorge; Ruty Solá, Gisela; Samson, José Cembal; Zubillaga, Marcela.

Secretaría Técnica

Assalone, Melina Isabel; Dal Mas, Melina Andrea; De Angelis, María Celeste.

Revisores Técnicos

Compagnucci, María Eugenia; Gear, Jorgelina; Martinez, Andrea Verónica; Martinez, Valeria Soledad.

Agradecimientos

Silvia Boni, Patricia Zubata, Silvia Lavaselli, Soledad Risso Patrón y Giovanna Sibay Nughes por su colaboración en el capítulo 1050. *Formas Farmacéuticas*.

Ana María Chan y María José Arrechea por su colaboración en el capítulo 345. *Ensayo de Salmonella/fracción microsomal (Test de Ames) para detección de mutagenicidad*.

A los Laboratorios que colaboraron en la presente Edición.

NUEVAS CONSIDERACIONES GENERALES

NUEVAS CONSIDERACIONES GENERALES

La Farmacopea es el texto oficial que codifica los principios activos, excipientes y productos farmacéuticos y contiene las especificaciones que éstos deben cumplir para demostrar su calidad y resguardar la salud de la población.

Generalidades

Estas consideraciones generales se aplicarán a las monografías, capítulos generales u otros textos incluidos en esta Farmacopea.

La expresión “*Oficial*” significa “*de la Farmacopea Argentina*” y se refiere a cualquier título, sustancia, preparación o ensayo incluido en las monografías y capítulos.

Las iniciales *FA*, acompañando al nombre oficial en el rótulo de un producto, indica que el mismo cumple con las especificaciones de la Farmacopea Argentina, aunque esto no constituye una certificación por parte de la misma.

El uso del título de una monografía supone que la sustancia, preparación o producto así designado se ajusta a las especificaciones de la monografía correspondiente. Tales referencias en los textos de la Farmacopea se indican mediante el título de la monografía en letra cursiva.

Tanto las monografías como los capítulos generales pueden contener excepciones a estas Consideraciones Generales, las mismas serán señaladas explícitamente, al igual que el procedimiento a seguir en cada caso. Para destacar la existencia de excepciones, se agregará la expresión: “*A menos que se especifique de otro modo*”. Asimismo, en caso de ausencia de una excepción explícita, las expresiones deberán interpretarse como se indica en este documento.

Los ensayos y valoraciones descriptos son los métodos oficiales sobre los cuales se fundamentan las especificaciones de la Farmacopea.

Para evitar repetir instrucciones comunes a un ensayo determinado, en las monografías, se establecen los requisitos en forma abreviada, indicando el nombre del capítulo correspondiente con un número de orden asignado entre los símbolos <y>, como por ej. <100>. *Cromatografía*, que luego es apropiadamente desarrollado en la sección *Métodos Generales de Análisis*.

Todas las declaraciones contenidas en las monografías, con las excepciones dadas más adelante, constituyen normas para las sustancias oficiales. Una sustancia es de calidad Farmacopea

Argentina cuando cumple con todos los requisitos establecidos en la monografía respectiva.

Los ensayos elegidos se han ideado para detectar o determinar las impurezas más significativas y para fijar el contenido límite de aquellas.

Definiciones

Medicamento: toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra.

Principio activo o droga farmacéutica: toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana.

Especialidad medicinal o farmacéutica: todo medicamento, designado por un nombre convencional, sea o no una marca de fábrica o comercial, o por el nombre genérico que corresponda a su composición y contenido, preparado y envasado uniformemente para su distribución y expendio, de composición cuantitativa definida declarada y verificable, de forma farmacéutica estable y acción terapéutica comprobable.

Nombre genérico: denominación de un principio activo o droga farmacéutica o, cuando corresponda, de una asociación o combinación de principios activos a dosis fijas, adoptada por la Autoridad Sanitaria Nacional o, en su defecto, la denominación común internacional de un principio activo recomendada por la Organización Mundial de la Salud.

Excipiente: es toda sustancia de origen natural o sintética presente en una preparación farmacéutica incorporada sin propósito terapéutico.

Producto farmacéutico: es un preparado que contiene uno o varios principios activos y excipientes, formulados bajo una determinada forma farmacéutica. Suele emplearse “preparación farmacéutica” como sinónimo de “producto farmacéutico”, para referirse tanto al producto a granel como al producto terminado.

Forma Farmacéutica: Es el producto proveniente de la transformación de un principio activo o de una asociación de los mismos mediante procedimientos fármacotécnicos, a fin de conferirles características físicas y morfológicas particulares para su adecuada dosificación y

conservación, y que faciliten su administración y acción farmacológica.

Interpretación de los requisitos

Las normas farmacopeicas definen las características de un producto y establecen los ensayos que permiten demostrar que el mismo satisface los requisitos elementales de calidad, exigidos por la Autoridad Sanitaria.

Estas normas se aplican en cualquier momento de la vida útil del producto, desde la elaboración hasta su fecha de vencimiento.

No debe entenderse que el cumplimiento de las especificaciones establecidas en la monografía a muestras de un lote de producción asegure el cumplimiento de las normas farmacopeicas de todos los componentes del lote.

Los datos obtenidos a partir de estudios de validación del proceso de fabricación y de controles efectuados durante el proceso pueden dar mayores garantías del cumplimiento de los requisitos de una monografía en particular, que la información obtenida a partir del examen de un número determinado de unidades de ese lote.

Las tolerancias y límites expresados en las definiciones de las monografías son para compensar las variaciones inevitables durante la preparación del producto y el deterioro normal que se produce durante la vida útil del mismo.

Cuando se expresan límites en forma numérica, los límites superior e inferior de un intervalo incluyen esos dos valores y todos los valores intermedios.

Es recomendable para la liberación de lotes, establecer especificaciones más estrictas que las contempladas bajo el título *Definición*, a fin de que el contenido del producto se encuentre siempre dentro de los límites establecidos pese a la caída de título normal que puede ocurrir durante la vida útil del producto. Dichas especificaciones para la liberación deberían surgir a partir de los datos obtenidos durante el estudio de estabilidad del producto (ver 1040. *Estudios de estabilidad*).

Los límites expresados en las definiciones de las monografías y en las especificaciones de los ensayos, independientemente de que éstos estén expresados en porcentajes o valores absolutos, son valores significativos hasta el último dígito.

En los procedimientos volumétricos, se establece el peso de la sustancia analizada que equivale a cada mililitro del valorante estandarizado. En estos casos, se entiende que el número de cifras significativas en la concentración del valorante corresponde al número de cifras significativas en el peso de la sustancia analizada. Se deberán hacer las correcciones con respecto al

blanco para todas las valoraciones volumétricas según corresponda (ver 780. *Volumetría*).

Cuando el resultado deba calcularse con referencia a la *sustancia seca*, se hará uso de las condiciones de secado que se indiquen en el ensayo *Pérdida por secado* en la monografía. Cuando el resultado se calcule con referencia a la *sustancia anhidra*, el contenido de agua será determinado por el método descrito en la monografía bajo el subtítulo *Agua*.

Actualizaciones

Se considera una *actualización total* cuando todo el texto reemplaza al de la edición anterior; por ej., <590>. *Límite de metales pesados*, identificándose con un asterisco en el índice alfabético (*) y, en el título del texto actualizado, se encontrará la leyenda “*Actualización total*”. Se considera una *actualización parcial* cuando sólo una parte del texto ha sido modificada, identificándose con un asterisco en el índice alfabético (*) y, en el título del texto actualizado, se encontrará la leyenda “*Actualización parcial*”. En este último caso se encontrará subrayado el fragmento del texto que ha sido actualizado.

Expresión de concentraciones

Los porcentajes de concentración se expresan de la siguiente manera:

Porcentaje peso en peso (% p/p): expresa el número de gramos de un soluto en 100 g de solución o mezcla.

Porcentaje peso en volumen (% p/v): expresa el número de gramos de un soluto en 100 ml de solución, y se utiliza prescindiendo de que el diluyente en cuestión sea agua u otro líquido.

Porcentaje volumen en volumen (% v/v): expresa el número de mililitros de un soluto en 100 ml de solución.

La expresión *porcentaje* empleada sin otro calificativo significa: porcentaje peso en peso para mezclas de sólidos y semisólidos, porcentaje peso en volumen para soluciones o suspensiones de sólidos en líquidos, porcentaje volumen en volumen para soluciones de líquidos en líquidos y porcentaje peso en volumen para soluciones de gases en líquidos.

Sustancias de Referencia

Sustancia de Referencia Farmacopea Argentina [SR-FA] - Material de uniformidad comprobada, cuya monografía ha sido incluida en la *Farmacopea Argentina*, desarrollado a través de ensayos colaborativos avalados por esta Farmacopea y A.N.M.A.T – I.N.A.M.E, cuyo empleo se reserva a ensayos químicos y físicos específicos en los que se

comparan sus propiedades con las de un producto problema y que posee un grado de pureza adecuado para el uso al que se destina.

Cuando una *Sustancia de Referencia Farmacopea Argentina* no esté disponible, deberá emplearse aquélla equivalente reconocida por esta Farmacopea.

Sustancias auxiliares

Se denomina *Sustancia auxiliar* a cualquier sustancia incorporada a las preparaciones oficiales, tales como colorantes, conservantes saborizantes. La misma deberá ser inocua o agregada en una proporción que garantice la inocuidad, no tener influencia adversa sobre la seguridad y eficacia terapéutica de los principios activos y no interferir en los ensayos y valoraciones.

Sustancia oficial es aquella que no contiene sustancias auxiliares agregadas salvo que se permita específicamente en la monografía correspondiente. En este caso, el rótulo deberá indicar los nombres y las cantidades de las sustancias auxiliares agregadas.

Colorantes: son sustancias auxiliares incorporadas a las preparaciones oficiales exclusivamente para dar color. Deberán satisfacer las especificaciones establecidas (ver 50. *Colorantes de uso farmacéutico*).

Conservantes: son sustancias auxiliares que se agregan a las preparaciones oficiales para protegerlas de la contaminación microbiana. La expresión “*conservante antimicrobiano apropiado*” implica que puede agregarse al preparado una sustancia auxiliar, siempre que cumplan con las especificaciones establecidas (ver 80. *Conservantes*).

Reactivos

La realización correcta de ensayos y valoraciones de esta Farmacopea, así como la obtención de resultados reproducibles y confiables, depende de la calidad de los reactivos empleados.

Todos los reactivos requeridos para los ensayos y valoraciones se definen en *Reactivos* y *Soluciones*.

Abreviaturas

La sigla *SR-FA* corresponde a *Sustancia de referencia de la FA*.

Las siglas (*SC*) y (*SR*) corresponden a *Solución Colorimétrica* y *Solución de Reactivo*, respectivamente indicadas en *Reactivos* y *Soluciones*.

La sigla (*SV*) corresponde a *Solución Volumétrica* e indica que tal solución está estandarizada de acuerdo con las instrucciones

dadas en la monografía respectiva o bajo el título *Soluciones volumétricas en Reactivos y Soluciones*.

La sigla (*SL*) corresponde a *Solución Límite* e indica que dicha solución es empleada para ensayos límite.

Agua

La expresión agua, empleada sin otra calificación significa *Agua purificada* y agua libre de dióxido de carbono, es *Agua purificada* que ha sido calentada a ebullición durante al menos 5 minutos y enfriada en forma tal de evitar la absorción de dióxido de carbono atmosférico.

Agua purificada estéril - Es el *Agua purificada* esterilizada. Se emplea en la preparación de formas farmacéuticas líquidas no parenterales en las que se requiera una forma estéril de *Agua purificada*.

Agua para inyectables - La fuente de agua es agua potable, previamente purificada y sometida a destilación u ósmosis reversa de doble paso. Debe cumplir con todos los requisitos de *Agua purificada* y además con los requisitos del ensayo de endotoxinas bacterianas (ver 330. *Ensayo de endotoxinas bacterianas*).

Agua estéril para inyectables - Es *Agua para inyectables* esterilizada. Se emplea principalmente como solvente de productos parenterales.

Agua bacteriostática para inyectables - Es *Agua estéril para inyectables* a la cual se le ha agregado uno o varios conservantes apropiados. Se utiliza como solvente de preparados parenterales. Puede envasarse en envases monodosis o multidosis de un tamaño no mayor a 30 ml.

Agua estéril para irrigación - Es *Agua para inyectables* esterilizada en envases monodosis de más de 1 litro destinados a una rápida descarga del contenido. No necesita cumplir con el ensayo 650. *Partículas en inyectables*.

Agua estéril para inhalación - Es *Agua para inyectables* envasada en envases monodosis no mayores a 20 ml y esterilizada. Se emplea en nebulizadores y en la preparación de soluciones para nebulizar.

Solución fisiológica

Cuando en las monografías o capítulos generales se indique *Solución fisiológica* emplear una solución de cloruro de sodio al 0,9 % en agua purificada.

Solución fisiológica estéril - Es una solución de cloruro de sodio al 0,9 % en agua para inyectables que cumple con los requisitos de 370. *Ensayo de Esterilidad*.

Solución fisiológica para nebulizar - Es una solución de cloruro de sodio al 0,90 % en agua purificada preparada sin el agregado de

conservantes, conservada en envases monodosis de hasta 20 ml, con ausencia de gérmenes revivificables en un mililitro y en cuyo rótulo se indica: “*Solución fisiológica para nebulizar. No inyectable*”.

MONOGRAFÍAS

Fórmula Química

Cuando se conoce la composición química de una sustancia oficial, se especifica a título informativo la fórmula molecular y desarrollada, el peso molecular y el número CAS (Chemical Abstracts Service). Esta información se refiere a la sustancia químicamente pura y no se considera un indicador de la pureza del material oficial.

Cuando se especifica la configuración estereoquímica absoluta, se emplean los sistemas de designación propuestos por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) *R/S* y *E/Z*.

El nombre químico será otorgado según las reglas propuestas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

Caracteres Generales

Las afirmaciones comprendidas bajo el subtítulo *Caracteres generales* referidas a términos como

inodoro, prácticamente inodoro, con un débil olor característico o expresiones semejantes, se aplican al examen después de la exposición al aire durante 15 minutos de un envase recientemente abierto del producto (envases que contengan no más de 25 g) o de una porción de aproximadamente 25 g del producto (en caso de envases más grandes) que haya sido trasladada de su envase a un cristalizador, con una capacidad de aproximadamente 100 ml. Solo se hará mención a este tipo de características cuando la misma sea un elemento relevante en la descripción del principio activo.

Solubilidad

El término parcialmente soluble se emplea en el caso de una mezcla en la que sólo una parte de sus componentes se disuelve. El término miscible se emplea para describir un líquido que es miscible en todas las proporciones con el solvente indicado.

Las indicaciones de solubilidad que figuran bajo el epígrafe *Caracteres generales* se expresan en términos cuyo significado, referido a una temperatura entre 15 y 30 °C, es el siguiente:

<i>Término descriptivo</i>	<i>Volúmenes aproximados de solvente en mililitros por gramo de sustancia</i>
Muy soluble	Inferior a 1
Fácilmente soluble	De 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Moderadamente soluble	De 30 a 100
Poco soluble	De 100 a 1.000
Muy poco soluble	De 1.000 a 10.000
Prácticamente insoluble	Más de 10.000

Identificación

Los ensayos de la Farmacopea que figuran después del subtítulo *Identificación* no están destinados a proporcionar una confirmación completa de la estructura química o composición del producto; su objeto es confirmar que el producto se ajusta a la descripción dada en el rótulo del envase. Cuando un producto no satisface los requisitos de un ensayo de identificación descripto, indica que el mismo no cumple con las especificaciones. Otros ensayos o especificaciones en la monografía a menudo contribuyen a establecer o confirmar la identidad del producto ensayado.

A menos que se indique lo contrario en la monografía individual, todos los ensayos identificatorios son de carácter obligatorio y por ende, necesarios para demostrar que el producto cumple con la descripción dada en el rótulo.

Ensayos y valoraciones

Los ensayos y las valoraciones descritas en esta Farmacopea constituyen los métodos oficiales de análisis. Se podrá emplear ensayos alternativos, previamente validados (ver 1130. Validación de métodos analíticos), si éstos demuestran otorgar ventajas desde el punto de vista de la exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad o simplificar el procedimiento sin modificar los atributos anteriores. Sin embargo, en caso de indecisión o litigio, los ensayos descriptos en esta Farmacopea serán los definitivos.

La concentración de impurezas establecida en ciertos ensayos se expresa entre paréntesis como porcentaje o partes por millón (ppm). En el caso que corresponda, el cumplimiento de este ensayo

será necesario para establecer la conformidad de un producto. Cuando corresponda, deberán realizarse análisis complementarios según se indica más abajo en *Atributos adicionales*.

Los materiales volumétricos, pesas y balanzas deberán ajustarse a las especificaciones establecidas en los capítulos <620>. *Materiales volumétricos y <690>. Pesas y balanzas*.

Cuando en un ensayo o valoración se indique que se debe examinar una cierta cantidad de sustancia o un número exacto de unidades de dosificación, la cantidad especificada representa un número mínimo que se elige únicamente para facilitar la manipulación analítica. Esto de ninguna manera limita la cantidad total de material a emplear.

Procedimientos

En todos los ensayos descritos en esta Farmacopea, se deberá cumplir estrictamente con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

La utilización de las siguientes expresiones se refieren a:

Blanco: cuando se indique que se deben hacer las correcciones necesarias por medio de una determinación con un control, tal determinación se hará empleando las mismas cantidades de los reactivos tratados de igual manera que la solución o mezcla que contiene la sustancia bajo valoración o ensayo, pero omitiendo dicha sustancia.

Baño de agua: cuando se indique el empleo de *baño de agua*, se empleará un baño de agua a ebullición salvo que se indique una temperatura distinta.

Baño de vapor: cuando se indique el empleo de *baño de vapor*, podrá emplearse la exposición al vapor vivo fluente u otra forma de calor regulado, a una temperatura equivalente a la del vapor fluente.

Cepas microbianas: cuando se cita una *cepa microbiana* y se la identifica por el número de catálogo ATCC (American Type Culture Collection) o de otra colección similar, la cepa específica se empleará directamente o, si se subcultiva, se emplearán no más de cinco pasajes a partir de la cepa original.

Comparación de color: cuando se indique una *comparación visual de color o de turbidez*, deberán emplearse tubos de comparación de fondo plano (tubos de Nessler) cuyas medidas internas se correspondan lo más estrechamente posible. Para la comparación del color, los tubos en posición vertical deberán ser observados longitudinalmente a lo largo del tubo con una fuente de luz difusa sobre un fondo blanco, mientras que para la comparación de turbidez deberán ser observados transversalmente, colocados sobre un fondo oscuro,

con ayuda de una fuente luminosa que los ilumine lateralmente.

Cuantitativamente y en etapas: cuando se indique que una solución debe ser diluida cuantitativamente y en etapas, una porción medida con exactitud será disuelta en agua u otro solvente en la proporción indicada en uno o más pasos. La elección del material volumétrico a emplearse deberá tener en cuenta los errores relativamente grandes que generalmente se asocian a materiales volumétricos de volumen pequeño (ver 620. *Materiales volumétricos*).

Densidad relativa: cuando no se indique lo contrario, la densidad relativa se calculará como la relación entre el peso de un volumen determinado de una sustancia en el aire a 25 °C y el peso de un volumen igual de agua a esa misma temperatura.

Desecador: la expresión *en un desecador* especifica el empleo de un recipiente perfectamente cerrado, de tamaño y forma apropiados, que mantenga una atmósfera de bajo contenido de humedad mediante gel de sílice u otro desecante apropiado.

Filtrar: cuando se indique filtrar, sin otra calificación, se entenderá que el líquido debe ser filtrado a través de papel de filtro apropiado o con un medio equivalente de modo que el filtrado sea claro.

Ignición hasta peso constante: significa que deberá continuarse la ignición a 800 ± 25 °C a menos que se indique de otro modo, hasta que dos pesadas consecutivas no difieran en más de 0,50 mg por gramo de sustancia ensayada, haciendo la segunda pesada después de un período de 15 minutos de ignición adicional.

Indicador: cuando una solución de reactivo se utilice como indicador, se agregarán aproximadamente 0,2 ml o 3 gotas de la solución, generalmente cerca del punto final, a menos que se indique de otro modo.

Medidas de presión: el término *mm Hg* empleado en referencia a mediciones de presión se refiere al uso de un manómetro apropiado o un barómetro calibrado en términos de la presión ejercida por una columna de mercurio de la altura indicada.

Pesar y medir exactamente: las expresiones *pesar exactamente alrededor de* o *medir exactamente alrededor de* indican que se debe tomar una cantidad dentro de 100 ± 10 % del peso o volumen especificado. Sin embargo, el peso o volumen que se tome deberá ser determinado con exactitud y el resultado calculado sobre la base de la cantidad que se haya tomado. Se pueden tomar cantidades proporcionalmente mayores o menores que los pesos y volúmenes especificados, tanto para

la *Sustancia de Referencia* como para la sustancia en ensayo, siempre que la medida se tome con exactitud y que se ajusten a los pasos siguientes, para proporcionar concentraciones equivalentes a las descriptas. Expresiones tales como *25,0 ml* y *25,0 mg* se emplean en relación a medidas de volumen o de peso e indican que la cantidad debe ser *medida o pesada exactamente* dentro de los límites establecidos en los capítulos <620>. *Materiales volumétricos* o <690>. *Pesas y balanzas*.

Pipetas: cuando se indique el uso de una pipeta para medir un volumen, aquélla deberá cumplir con los requisitos establecidos en el capítulo <620>. *Materiales volumétricos* y deberá emplearse de manera que el error no exceda el límite establecido para una pipeta del tamaño especificado. Cuando se especifica el empleo de una pipeta, ésta puede sustituirse por una bureta apropiada que cumpla con los requisitos especificados en <620>. *Materiales volumétricos*.

Secado hasta peso constante: significa que deberá continuarse el secado a menos que se indique de otro modo, hasta que dos pesadas consecutivas no difieran en más de 0,50 mg por gramo de sustancia ensayada, haciendo la segunda pesada después de una hora adicional de secado; según la metodología establecida en la monografía correspondiente.

Soluciones: la expresión *1 en 10* significa que 1 parte en volumen de un líquido debe diluirse con, o 1 parte *en peso* de un sólido debe disolverse en suficiente solvente para que el volumen de la solución final sea de 10 partes en *volumen*.

La expresión *10:6:1* significa que los números respectivos de partes, en volumen, de los líquidos señalados deberán mezclarse, a menos que se indique de otro modo.

La expresión partes por millón (ppm) sin otra precisión, se refiere a peso con respecto a un millón de partes en peso.

Solventes: cuando no se menciona explícitamente el solvente, se entiende que la muestra es disuelta en agua.

Temperaturas: todas las temperaturas en esta Farmacopea se expresan en grados centígrados (Celsius) y todas las mediciones se hacen a 25 °C, a menos que se especifique de otro modo.

Tiempo límite: al efectuar ensayos y valoraciones se aguardará 5 minutos para que se produzca la reacción, a menos que se especifique de otro modo.

Vacío: el término *al vacío* especifica la exposición a una presión menor de 20 mm Hg, a menos que se indique de otro modo. Cuando se especifique en la monografía correspondiente la

deseccación al vacío sobre un desecante, se deberá emplear un desecador al vacío, una pistola para desecar al vacío u otro instrumento apropiado para este fin.

ATRIBUTOS ADICIONALES

Además de cumplir los requisitos de los ensayos de Sustancias relacionadas, Pureza cromatográfica y Límite de impurezas, descriptos en las monografías correspondientes, el análisis de las materias primas deberá complementarse mediante la búsqueda de impurezas de síntesis y sustancias relacionadas según su origen.

MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS

Cada capítulo general es designado por un número de orden seguido del nombre del mismo. Estos capítulos que incluyen los requerimientos generales para ensayos y valoraciones son numerados de 1 a 990 y los capítulos que forman los textos de información general son numerados a partir de 1000.

UNIDADES DE POTENCIA BIOLÓGICA

Para las sustancias que no puedan ser caracterizadas completamente por medios químicos o físicos, podrá ser necesario expresar la actividad en unidades de potencia biológica.

Las unidades de potencia biológica definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de Estándares Biológicos Internacionales y Preparaciones Biológicas de Referencia Internacionales son denominadas Unidades Internacionales (UI). Las unidades definidas en la *FA* son Unidades Internacionales y las monografías correspondientes se refieren a éstas.

Para los antibióticos cuya potencia se expresa en unidades, éstas son definidas por las correspondientes *Sustancias de referencia SR-FA*. Cada unidad es en general establecida, basada en la definición de la Unidad Internacional de la OMS. Sin embargo, para la mayoría de los antibióticos no son necesarias las unidades biológicas de potencia y su actividad se expresa en unidades métricas (microgramos o miligramos) en función de sustancias químicamente definidas descriptas en las monografías correspondientes.

ELABORACIÓN DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

La elaboración de productos farmacéuticos deberá realizarse cumpliendo con la normativa

vigente de Buenas prácticas de fabricación, establecidas por la Autoridad Sanitaria y el producto resultante deberá cumplir con los requisitos técnicos establecidos en esta Farmacopea.

CONSERVACIÓN

Envases

Los requisitos farmacopeicos para el empleo de envases se especifican en las monografías correspondientes.

El empleo de las siguientes expresiones descriptas en esta Farmacopea se refieren a:

Envase con cierre inviolable: es aquél provisto de un dispositivo especial que revela inequívocamente si ha sido abierto.

Envase inactivo: es aquél que protege el contenido de los efectos de la luz, gracias a las propiedades específicas de los materiales con que está compuesto.

Envase bien cerrado: es el que evita el ingreso de sólidos extraños y la pérdida del contenido bajo las condiciones usuales de manejo, almacenamiento, distribución y transporte.

Envase de cierre perfecto: es aquél que protege el contenido de la contaminación con sustancias extrañas y evita la entrada de humedad, impidiendo la efervescencia, delicuescencia o evaporación bajo las condiciones usuales de manejo, almacenamiento, transporte, manteniendo su condición de cierre perfecto después de su manipulación.

Envase hermético: es aquel que no permite la entrada de sólidos, líquidos o gases en las condiciones usuales de manejo, almacenamiento, distribución y transporte.

Envase seguro para niños: es aquel que posee un mecanismo tal que dificulta su apertura directa. Dichos envases sólo pueden ser abiertos luego de recibir las instrucciones pertinentes.

Envase monodosis: es aquel que está diseñado para contener una cantidad de sustancia destinada a administrarse en una única dosis, inmediatamente después de abierto.

Envase multidosis: es aquel que permite la extracción de porciones sucesivas del contenido sin cambios en la potencia, calidad o pureza de la porción remanente.

Condiciones de almacenamiento

El almacenamiento de productos debe ser realizado en condiciones adecuadas de temperatura, humedad e iluminación de acuerdo con las instrucciones del fabricante, de manera de no afectar adversamente de forma directa o indirecta,

la calidad de los mismos. Este concepto debe extenderse a la distribución y transporte.

Las sustancias y las preparaciones descriptas deberán almacenarse a temperatura ambiente, a menos que se especifique de otro modo.

El empleo de las siguientes expresiones descriptas en esta Farmacopea se refieren a:

Almacenar en un freezer: corresponde al almacenamiento del producto a una temperatura establecida entre - 25 y - 10 °C.

Almacenar en un sitio frío: corresponde al almacenamiento del producto a una temperatura que no exceda los 8 °C. Una *heladera/refrigerador* es un sitio frío con una temperatura que se mantiene termostáticamente entre 2 y 8 °C.

Almacenar en un sitio fresco: corresponde al almacenamiento del producto a temperatura entre 8 y 15 °C. Las cámaras frías permiten obtener estas condiciones.

Almacenar a temperatura ambiente: corresponde al almacenamiento a temperatura entre 15 y 30 °C. Este concepto está relacionado al almacenamiento en depósitos de laboratorios de especialidades medicinales y distribuidoras.

Almacenar a temperatura ambiente controlada: corresponde al almacenamiento de un producto a temperatura termostáticamente controlada entre 20 y 25 °C.

En algunas monografías pueden indicarse las siguientes expresiones:

“Evitar almacenar en ambientes cálidos” definiendo *cálido* a temperatura entre 30 y 40 °C.

“Evitar el calor excesivo”, definiendo *calor excesivo* a temperatura superior a 40 °C.

“Evitar el congelamiento” en los casos en que el mismo ocasionara la pérdida de potencia o cambio en las características fisicoquímicas de un producto.

Indicaciones generales:

- No deben retirarse los medicamentos de sus envases primario y secundario.
- No deben exponerse los productos al sol ni a las temperaturas extremas.
- Se debe evitar almacenar los medicamentos en ambientes húmedos.
- No deben almacenarse medicamentos en heladera excepto que dicha condición se encuentre indicada en el rótulo, prospecto y/o envase.

ROTULADO

El rótulo de cada producto deberá establecer el contenido del o de los principios activos expresados en las monografías.

Cantidad de principio activo por unidad de dosificación: la potencia de un producto se expresa en el rótulo del envase como microgramos, miligramos, gramos, porcentaje del ingrediente, o unidad internacional terapéuticamente activa presente en la preparación.

Las formas farmacéuticas como cápsulas, comprimidos u otras formas de dosificación deberán rotularse de modo que expresen la cantidad de cada principio activo contenido en cada unidad de dosificación.

En el caso de líquidos de administración oral o sólidos para reconstituir, deberán rotularse en términos, como por ej., *cada 5 mililitros* del líquido o del preparado resultante.

Rotulado de electrolitos: la concentración y dosificación de electrolitos para terapias de reposición deberá especificarse en miliequivalentes-gramo (mEq).

Rotulado del contenido alcohólico: el contenido de alcohol en una preparación líquida deberá especificarse como % v/v de etanol.

Fecha de vencimiento: la fecha de vencimiento identifica el fin del período de vida útil del

producto, durante el cual el mismo deberá cumplir con los requisitos establecidos en la presente Farmacopea, siempre que se conserve en las condiciones de almacenamiento establecidas.

Todos los productos deberán exhibir la fecha de vencimiento en el rótulo y en su envase primario, la cual es asignada a través de estudios de estabilidad realizados para esa formulación en un envase predefinido y autorizado por la Autoridad Sanitaria. Cuando la fecha de vencimiento se indique como Mes/Año, la misma incluye hasta el último día del mes indicado.

UNIDADES DEL SISTEMA INTERNACIONAL (SI) Y EQUIVALENCIA CON OTRAS UNIDADES DE MEDIDA

Los nombres y símbolos empleados en la *Farmacopea Argentina* para las unidades de medición son los del Sistema Internacional de Unidades (SI), establecido por la Conferencia General de Pesas y Medidas. Comprende tres clases de unidades: unidades básicas, unidades derivadas y unidades complementarias.

Cantidad		Unidad	
Nombre	Símbolo	Nombre	Símbolo
Longitud	<i>l</i>	metro	M
Masa	<i>m</i>	kilogramo	Kg
Tiempo	<i>t</i>	segundo	S
Corriente eléctrica	<i>I</i>	amperio	A
Temperatura termodinámica	<i>T</i>	kelvin	K
Cantidad de sustancia	<i>n</i>	mol	Mol
Intensidad luminosa	<i>I_v</i>	candela	Cd

Unidades utilizadas con el SI

Cantidad	Unidad		Valor en unidades SI
	Nombre	Símbolo	
Tiempo	Minuto	<i>min</i>	1 min = 60 s
	Hora	<i>h</i>	1 h = 60 min = 3.600 s
	Día	<i>d</i>	1d = 24 h = 86.400 s
Ángulo plano	Grado	°	1° = (π/180) rad
Volumen	Litro	<i>l</i>	1 l = 1 dm ³ = 10 ⁻³ m ³
Masa	Tonelada	<i>t</i>	1 t = 10 ³ kg
Frecuencia de giro	revolución por minuto	<i>rpm</i>	1 rpm = (1/60) s ⁻¹

Múltiplos y submúltiplos decimales de las unidades

Factor	Prefijo	Símbolo	Factor	Prefijo	Símbolo
10 ¹⁸	exa	<i>E</i>	10 ⁻¹	deci	<i>d</i>
10 ¹⁵	peta	<i>P</i>	10 ⁻²	centi	<i>c</i>

10^{12}	tera	T	10^{-3}	mili	m
10^9	giga	G	10^{-6}	micro	μ
10^6	mega	M	10^{-9}	nano	n
10^3	kilo	k	10^{-12}	pico	p
10^2	hecto	h	10^{-15}	femto	f
10^1	deca	da	10^{-18}	atto	a

Unidades SI utilizadas en la *Farmacopea Argentina* y su equivalencia con otras unidades

Cantidad		Unidad				Conversión de otras unidades en unidades SI
Nombre	Símbolo	Nombre	Símbolo	Expresión en unidades SI básicas	Expresión en otras unidades SI	
Número de onda	ν	uno por metro	1/m	m^{-1}		
Longitud de onda	λ	micrómetro	μm	10^{-6}m		
		nanómetro	Nm	10^{-9}m		
Frecuencia	ν	hertz	Hz	s^{-1}		
Área	A, S	metro cuadrado	m^2	m^2		
Volumen	V	metro cúbico	m^3	m^3		$1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 = 10^{-6}\text{m}^3$
Densidad (concentración de masa)	ρ	kilogramo por metro cúbico	kg/m^3	kg m^{-3}		$1\text{g}/\text{ml}=1\text{g}/\text{cm}^3=10^3\text{kg}/\text{m}^3$
Velocidad	v	metro por segundo	m/s	m s^{-1}		
Fuerza	F	newton	N	m kg s^{-2}		$1 \text{ dina}=1 \text{ g cm s}^{-2}=10^5\text{N}$ $1 \text{ kp} = 9,80665 \text{ N}$
Presión	P	pascal	Pa	$\text{m}^{-1} \text{ kg s}^{-2}$	N m^{-2}	$1 \text{ dina}/\text{cm}^2=10^{-1}\text{Pa}=10^{-1} \text{ N m}^{-2}$
						$1 \text{ atm} = 101,325 \text{ Pa} = 101,325 \text{ kPa}$
						$1 \text{ bar} = 105 \text{ kPa} = 0,1 \text{ Mpa}$
						$1 \text{ mmHg} = 133,322387 \text{ Pa}$
						$1 \text{ Torr} = 133,322368 \text{ Pa}$
$1 \text{ psi} = 6,894757 \text{ kPa}$						
Viscosidad absoluta	η	pascal segundo	Pa s	$\text{m}^{-1} \text{ kg s}^{-1}$	N s m^{-2}	$1 \text{ P} = 10^{-1} \text{ Pa s} = 10^{-1} \text{ N s m}^{-2}$ $1 \text{ cP} = 1 \text{ mPa s}$
Viscosidad cinemática	ν	metro cuadrado por segundo	m^2/s	$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$	$\text{Pa s m}^3 \text{ kg}^{-1}$ N m s kg^{-1}	$1 \text{ St} = 1 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} = 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
Energía	W	joule	J	$\text{m}^2 \text{ km s}^{-2}$	N m	$1 \text{ erg} = 1 \text{ cm}^3 \text{ g s}^{-2} = 1 \text{ dina cm} = 10^{-1} \text{ J}$ $1 \text{ cal} = 4,1868 \text{ J}$
Potencia (flujo de radiación)	P	watio	W	$\text{m}^2 \text{ km s}^{-3}$	N m s^{-1} J s^{-1}	$1 \text{ erg}/\text{s} = 1 \text{ dina cm s}^{-1} = 10^{-7} \text{ W} =$ $10^{-7} \text{ N m s}^{-1} = 10^{-7} \text{ J s}^{-1}$
Dosis absorbida (energía radiante)	D	gray	Gy	$\text{m}^2 \text{ s}^{-2}$	J kg^{-1}	$1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ Gy}$
Potencial eléctrico (fuerza electromotriz)	U	volt	V	$\text{m}^2 \text{ kg s}^{-3} \text{ A}^{-1}$	W A^{-1}	
Resistencia eléctrica	R	ohm	Ω	$\text{m}^2 \text{ kg s}^{-3} \text{ A}^{-2}$	V A^{-1}	
Cantidad de electricidad	Q	coulomb	C	A s		
Actividad de un radionucléido	A	becquerel	Bq	s^{-1}		$1 \text{ Ci} = 37 \times 10^9 \text{ Bq} = 37 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$
Concentración molar	M	molaridad	mol/dm^3	10^3 mol m^{-3}		$1 \text{ mol}/\text{l} = 1 \text{ M} = 1 \text{ mol}/\text{dm}^3 = 10^3 \text{ mol m}^{-3}$

FARMACOPEA ARGENTINA SEPTIMA EDICIÓN

TERCER VOLUMEN

ÍNDICE

Monografías de Producto Terminado

Acetazolamida Comprimidos	Comprimidos
Aciclovir Cápsulas Comprimidos	Atenolol Comprimidos
Agua estéril para Inyectables para Irrigación para Nebulizar	Atropina, Sulfato de Solución Inyectable Solución Oftálmica
Albendazol Comprimidos	Bario, Sulfato de para Suspensión Oral Suspensión Oral
Alopurinol Comprimidos	Bencilo, Benzoato de Emulsión Dérmica
Amilorida, Clorhidrato de Comprimidos	Bencilpenicilina Benzatina Suspensión inyectable
Amiodarona, Clorhidrato de Comprimidos	Benzoólo, Peróxido de Gel Tópico
Amitriptilina, Clorhidrato de Comprimidos	Betametasona Comprimidos Solución Oral
Amoxicilina Cápsulas Comprimidos para Suspensión Oral	Betametasona, Benzoato de Gel Tópico
Amoxicilina Sódica para Inyección	Betametasona, Dipropionato de Crema Dérmica Loción Ungüento Tópico
Ampicilina Comprimidos para Suspensión Oral	Betametasona, Fosfato Sódico de Solución Inyectable
Ampicilina Sódica para Inyección	Betametasona, Valerato de Crema Dérmica Loción Ungüento Tópico
Ascórbico, Ácido Comprimidos Polvo Solución Inyectable	Biperideno, Clorhidrato de Comprimidos
Aspirina	Bleomicina, Sulfato de para Inyección

Budesonida Aerosol	Solución Oral
Bupivacaina, Clorhidrato de Solución Inyectable	Cloroquina, Fosfato de Comprimidos
Calcio, Gluconato de Solución Inyectable	Cloroquina, Sulfato de Comprimidos
Carbamazepina Comprimidos	Clorpromazina, Clorhidrato de Comprimidos Solución Inyectable
Carboplatino para Inyección	Colchicina Comprimidos
Carmustina para Inyección	Dactinomicina para Inyección
Cefadroxilo Cápsulas Comprimidos para Suspensión Oral	Dapsona Comprimidos
Cefalexina Comprimidos para Suspensión Oral	Deferoxamina, Mesilato de para Inyección
Ciclofosfamida Comprimidos para Inyección	Dexametasona Comprimidos Solución Inyectable
Ciclosporina Cápsulas	Dexametasona, Acetato de Suspensión Inyectable
Ciprofloxacino Solución Oftálmica Ungüento Oftálmico	Dexametasona, Fosfato Sódico de Solución Inyectable
Ciprofloxacino, Clorhidrato de Comprimidos	Diatrizoato de Meglumina Solución Inyectable
Citarabina para Inyección	Diazepam Comprimidos Solución Inyectable
Claritromicina Comprimidos	Dietilcarbamazina, Citrato de Comprimidos
Clofazimina Cápsulas	Difenhidramina, Clorhidrato de Cápsulas Comprimidos Solución Oral
Clomipramina, Clorhidrato de Comprimidos Grageas	Digoxina Comprimidos Solución Inyectable Solución Oral
Cloranfenicol Cápsulas Comprimidos Solución Oftálmica Solución Ótica	Doxiciclina Cápsulas
Cloranfenicol, Succinato Sódico para Inyección	Doxiciclina, Hiclato de Cápsulas Comprimidos
Clorfeniramina, Maleato de Comprimidos	Doxorubicina, Clorhidrato de para Inyección
	Edetato cálcico disódico

Solución Inyectable	Fitomenadiona
Enalapril, Maleato de	Emulsión Inyectable
Comprimidos	Fluorouracilo
Epinefrina	Solución Inyectable
Solución Inyectable	Ungüento
Ergometrina, Maleato de	Flutamida
Comprimidos	Comprimidos
Solución inyectable	Fólico, Ácido
Ergotamina, Tartrato de	Comprimidos
Comprimidos	Solución Inyectable
Eritromicina	Furosemida
Comprimidos	Comprimidos
Gel Tópico	Solución Inyectable
Solución Tópica	Solución Oral
Eritromicina, Estearato de	Ganciclovir
Comprimidos	para Inyección
Eritromicina, Estolato de	Gemcitabina
Comprimidos	para Inyección
Suspensión Oral	Gentamicina, Sulfato de
Eritromicina, Etilsuccinato de	Crema Dérmica
Comprimidos	Solución Inyectable
Solución Inyectable	Solución Oftálmica
Suspensión Oral	Glibenclamida
Espironolactona	Comprimidos
Comprimidos	Glucosa
Estreptomina, Sulfato de	Solución Inyectable
para Inyección	Glucosa y Cloruro de Sodio
Etambutol, Clorhidrato de	Solución Inyectable
Comprimidos	Griseofulvina
Etosuximida	Comprimidos
Cápsulas	Haloperidol
Fenitoína	Comprimidos
Comprimidos	Solución Inyectable
Suspensión Oral	Solución Oral
Fenitoína Sódica	Hidroclorotiazida
Solución Inyectable	Comprimidos
Fenobarbital	Hidrocortisona
Comprimidos	Crema Dérmica
Fenobarbital Sódico	Gel Tópico
Solución Inyectable	Ungüento Tópico
Fenoximetilpenicilina	Hidrocortisona, Acetato de
Comprimidos	Crema Dérmica
Fenoximetilpenicilina Potásica	Suspensión Oftálmica
Comprimidos	Ungüento Oftálmico
Ferroso, Sulfato	Ungüento Tópico
Solución Oral	Hidrocortisona, Valerato de
	Crema Dérmica
	Ungüento Tópico

Hidroxiurea Cápsulas	Megestrol, Acetato de Comprimidos
Hioscina, Butilbromuro de Comprimidos	Melfalán Comprimidos
Homatropina, Metilbromuro de Comprimidos	Menadiona Solución Inyectable
Ibuprofeno Comprimidos Crema Dérmica Suspensión Oral	Metformina, Clorhidrato de Comprimidos
Idarubicina, Clorhidrato de para Inyección	Metildopa Comprimidos
Idopovidona solución de lavado	Metoclopramida, Clorhidrato de Comprimidos Solución Inyectable Solución Oral
Iohexol Solución Inyectable	Metotrexato Comprimidos para Inyección
Iopanoico, Ácido Comprimidos	Metronidazol Comprimidos Gel Tópico Óvulos Vaginales Solución Inyectable
Isoniazida Comprimidos	Metronidazol, Benzoato de Suspensión Oral
Ketamina, Clorhidrato de Solución Inyectable	Miconazol, Nitrato de Crema Dérmica
Ketoconazol Comprimidos	Morfina, Clorhidrato de Solución Inyectable
Leucovorina Cálcica Comprimidos Solución Inyectable	Nalidíxico, Ácido Comprimidos
Levotiroxina, Sódica Comprimidos	Naloxona, Clorhidrato de Solución Inyectable
Lidocaína Aerosol Tópico	Neostigmina, Bromuro de Comprimidos
Lidocaína, Clorhidrato de Solución Inyectable Solución Tópica	Neostigmina, Metilsulfato de Solución Inyectable
Litio, Carbonato de Comprimidos	Nicotinamida Comprimidos
Magnesio, Hidróxido de Suspensión Oral	Nifedipina Cápsulas
Magnesio, Sulfato de Solución Inyectable	Nistatina Comprimidos Comprimidos Vaginales Crema Dérmica Suspensión Oral Ungüento Tópico
Mebendazol Comprimidos Suspensión Oral	Nitrofurantoína
Medroxiprogesterona, Acetato de Comprimidos Suspensión Inyectable	

Suspensión Oral	Solución Oral
Noretisterona Comprimidos	Rifampicina Cápsulas para Inyección
Noretisterona, Acetato de Comprimidos	Ringer Solución Inyectable
Norfloxacin	Ringer Lactato Solución Inyectable
Paracetamol Comprimidos Solución Oral Supositorios	Salbutamol Comprimidos Solución para Nebulizar
Pilocarpina, Clorhidrato de Solución Oftálmica	Sales para Rehidratación Oral Polvo
Pilocarpina, Nitrato de Solución Oftálmica	Salicílico, Ácido Gel Tópico
Pirantel, Pamoato de Suspensión Oral	Sodio, Cloruro de Solución Inyectable Solución Isotónica Estéril para Irrigación Solución Isotónica Estéril para Nebulizar
Pirazinamida Comprimidos	Solución Oftálmica Ungüento Oftálmico
Piridoxina, Clorhidrato de Solución Inyectable	Sodio, Nitrito de Solución Inyectable
Pirimetamina Comprimidos	Sodio, Tiosulfato Solución Inyectable
Plata, Nitrato de Solución Oftálmica	Sulfadiazina Comprimidos
Prazicuantel Comprimidos	Sulfasalazina Comprimidos
Prednisolona Sódica Fosfato Solución Oftálmica	Teofilina Cápsulas Comprimidos
Prednisona Comprimidos	Tetraciclina, Clorhidrato de Cápsulas Comprimidos
Primaquina, Fosfato de Comprimidos	Tiamina, Clorhidrato de Comprimidos Solución Inyectable
Prometazina, Clorhidrato de Solución Inyectable	Timolol, Maleato de Comprimidos Solución Oftálmica
Propranolol, Clorhidrato de Comprimidos Solución Inyectable	Tiopental Sódico para Inyección
Quinidina, Sulfato de Cápsulas Comprimidos	Tropicamida Solución Oftálmica
Quinina, Sulfato de Comprimidos	
Ranitidina, Clorhidrato de Comprimidos Solución Inyectable	

Valproico, Ácido
Cápsulas
Solución Oral

Verapamilo, Clorhidrato de
Comprimidos
Solución Inyectable

Warfarina Sódica
Comprimidos

Zalcitabina
Comprimidos

Zidovudina
Cápsulas
Comprimidos
Solución Inyectable
Solución Oral

Apartado de Medicamentos Herbarios

Apartado de Hemoderivados

Apartado de Medicamentos Oficinales

Apartado de Productos Biológicos

Apartado de Productos Médicos

Apartado de Productos Radiofarmacéuticos

Apartado de Sueros y Vacunas

MONOGRAFÍAS
PRODUCTO TERMINADO

ACETAZOLAMIDA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Acetazolamida deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_4H_6N_4O_3S_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetazolamida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_4H_6N_4O_3S_2$ disuelta obtenida a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 265 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Acetazolamida SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_4H_6N_4O_3S_2$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto

Fase móvil - Disolver 4,1 g de acetato de sodio

anhidro en 950 ml de agua, agregar 20 ml de metanol y 30 ml de acetonitrilo y mezclar. Ajustar a pH $4,0 \pm 0,05$ con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución del estándar interno - Transferir aproximadamente 100 mg de *Sulfadiazina* a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0,5 N y mezclar hasta disolver. Completar a volumen con agua y mezclar.

Solución madre del estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Acetazolamida SR-FA, transferir a un matraz aforado de 25 ml, agregar 2,5 ml de hidróxido de sodio 0,5 N y mezclar hasta disolver. Completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar - Transferir 10,0 ml de la *Solución madre del estándar* y 10,0 ml de la *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0,5 N, completar a volumen con agua y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg de Acetazolamida SR-FA por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Acetazolamida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de acetazolamida, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0,5 N y sonicar durante 5 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar una porción de esta solución, descartando los primeros 20 ml del filtrado. Transferir 10,0 ml del filtrado transparente a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10,0 ml de *Solución del estándar interno* y 10 ml de hidróxido de sodio 0,5 N, completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,7 para acetazolamida y 1,0 para sulfadiazina; la resolución *R* entre los picos de acetazolamida y de sulfadiazina no debe ser menor de 2,0; la desviación estándar relativa del cociente entre las respuestas de los picos del analito y del estándar interno para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_4H_6N_4O_3S_2$ en los Comprimidos de Acetazolamida, de acuerdo a la cantidad declarada.

ACICLOVIR

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Aciclovir deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_8H_{11}N_5O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Aciclovir SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto. Conservar entre 15 y 25 °C y proteger de la humedad.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_8H_{11}N_5O_3$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 254 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Aciclovir SR-FA, en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_8H_{11}N_5O_3$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema 1, Solución de aptitud del sistema 2 y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución muestra - Emplear la *Preparación muestra* obtenida en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo un volumen de aproximadamente 20 µl de la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en las Cápsulas de Aciclovir, en relación a la suma de las respuestas de todos los picos. No debe contener más de 2,0 % de guanina y no más de 0,5 % de cualquier impureza individual.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4,2 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Ácido acético 0,02 M. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de aptitud del sistema 1 - Pesar exactamente cantidades apropiadas de Aciclovir SR-FA y guanina, disolver en hidróxido de sodio 0,1 N y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con agua para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg de cada una por ml.

Solución de aptitud del sistema 2 - Pesar exactamente una cantidad apropiada de guanina, disolver en hidróxido de sodio 0,1 N y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con agua para obtener una solución de aproximadamente 2,0 µg por ml.

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad apropiada de Aciclovir SR-FA, disolver en hidróxido de sodio 0,1 N y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con agua para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Preparación muestra - Extraer el contenido de no menos de diez Cápsulas de Aciclovir y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 10 mg de aciclovir, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N, completar a volumen con agua, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema 1* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,6 para guanina y 1,0 para aciclovir; la resolución *R* entre guanina y aciclovir no debe ser menor de 2,0 %. Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema 2* y registrar las res-

puestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_8H_{11}N_5O_3$ en las Cápsulas de Aciclovir, de acuerdo a la cantidad declarada.

ACICLOVIR

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Aciclovir deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_8H_{11}N_5O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Aciclovir SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto. Conservar entre 15 y 25 °C y proteger de la humedad.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario y determinar la cantidad de $C_8H_{11}N_5O_3$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 254 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Aciclovir SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_8H_{11}N_5O_3$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Fase móvil, y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Emplear la *Preparación estándar* obtenida en *Valoración*.

Solución muestra - Emplear la *Preparación muestra* obtenida en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo un volumen de 20 µl de la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos.

Calcular el porcentaje de cada impureza en los Comprimidos de Aciclovir, en relación a la suma de las respuestas de todos los picos. No debe presentar más de 2,0 % de guanina y no más de 0,5 % de cualquier otra impureza.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema 1, Solución de aptitud del sistema 2, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Cápsulas de Aciclovir*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de diez Comprimidos de Aciclovir. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 10 mg de aciclovir, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_8H_{11}N_5O_3$ en los Comprimidos de Aciclovir, de acuerdo a la cantidad declarada.

AGUA ESTÉRIL

PARA INYECTABLES

H₂O

PM: 18,0

Definición - Agua Estéril para Inyectables es el *Agua para Inyectables*, esterilizada en su envase final, envasada en envases monodosis no mayores a un litro. No debe contener agentes antimicrobianos ni sustancias agregadas.

Caracteres generales - Líquido transparente, incoloro, inodoro e insípido.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de plástico (ver 420. *Envases primarios de plástico*) o de vidrio tipo I o II.

ENSAYOS

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,0; determinado sobre una solución conteniendo 0,3 ml de una solución saturada de cloruro de potasio cada 100 ml de Agua Estéril para Inyectables.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

No debe contener más de 0,25 Unidades de Endotoxinas por ml.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Amoníaco

Para envases cuyo volumen de llenado es menor de 50 ml, diluir 50 ml de Agua Estéril para Inyectables con 50 ml de Agua de alta pureza (SR), emplear esta dilución como solución de ensayo. Cuando el volumen de llenado es igual o mayor de 50 ml, emplear 100 ml como solución de ensayo.

Procedimiento - A 100 ml de solución de ensayo, agregar 2 ml de solución alcalina de ioduro mercúrico potásico (SR): cualquier coloración amarilla desarrollada no debe ser más intensa que la de un control conteniendo 30 µg de amoníaco en 100 ml de Agua de alta pureza (SR). El límite es 0,6 ppm para envases cuyo volumen de llenado es menor a 50 ml y 0,3 ppm para envases cuyo volumen de llenado es igual o mayor de 50 ml.

Calcio y Magnesio

A 100 ml de Agua Estéril para Inyectables, agregar 2 ml de Solución reguladora de amoníaco – cloruro de amonio (SR), 50 mg de negro de eriocromo T y 0,5 ml de solución de EDTA 0,01 M (SV): se debe observar una coloración azul.

Dióxido de carbono

A 25 ml de Agua Estéril para Inyectables, agregar 25 ml de solución de Hidróxido de calcio (SR): la mezcla debe permanecer transparente.

Cloruro

Transferir 20 ml de Agua Estéril para Inyectables a un tubo de Nessler, agregar 5 gotas de ácido nítrico, 1 ml de solución de nitrato de plata (SR) y mezclar suavemente. Cualquier turbidez que se desarrolle dentro de los 10 minutos, observando desde arriba hacia abajo sobre una superficie oscura con luz lateral, no debe ser más intensa que la de un control tratado de la misma manera, conteniendo 10 µg de cloruro en 20 ml de Agua de alta pureza (SR). El límite es 0,5 ppm.

Sulfato

A 100 ml de Agua Estéril para Inyectables, agregar 1 ml de solución de cloruro de bario (SR): no se debe producir turbidez.

Sustancias oxidables

Solución muestra - Agregar 10 ml de ácido sulfúrico 2 N a 100 ml de Agua Estéril para Inyectables y calentar a ebullición.

Procedimiento - Para envases cuyo volumen de llenado es menor de 50 ml, agregar a la *Solución muestra* 0,4 ml de solución de permanganato de potasio (SR) y continuar con el calentamiento a ebullición durante 5 minutos adicionales. Cuando el volumen de llenado es igual o mayor de 50 ml, agregar a la *Solución muestra* 0,2 ml de solución de permanganato de potasio (SR) y continuar con el calentamiento a ebullición durante 5 minutos. Si se forma un precipitado, enfriar en un baño de hielo hasta temperatura ambiente y filtrar a través de un filtro de vidrio sinterizado: el color rosado no debe desaparecer completamente.

Conductividad <70>

Transferir una cantidad suficiente de agua a un recipiente adecuado y agitar. Ajustar la temperatura, si es necesario, y mientras se mantiene a 25 ± 1 °C, comenzar a agitar vigorosamente la muestra observando periódicamente la conductividad. Cuando el cambio en la conductividad (debido a la incorporación de dióxido de carbono ambiental) es menor a 0,1 µS/cm, registrar el valor de la conductividad.

Para envases con un volumen nominal de 10 ml o menor, el Agua Estéril para Inyectables cumple con los requerimientos si la conductividad no es mayor que 25 µS/cm.

Para envases con un volumen nominal mayor de 10 ml, el Agua Estéril para Inyectables cumple con

los requerimientos si la conductividad no es mayor que 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

ROTULADO

No inyectar en forma directa. Isotonizar con un soluto adecuado antes de su uso.

AGUA ESTÉRIL PARA IRRIGACIÓN

H₂O

PM: 18,0

Definición - Agua Estéril para Irrigación es el *Agua para Inyectables*, esterilizada en su envase final, envasada en envases monodosis, que pueden contener más de un litro. No debe contener agentes antimicrobianos ni otras sustancias agregadas.

Caracteres generales - Líquido transparente, incoloro, inodoro e insípido.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de plástico o vidrio tipo I o II. [NOTA: el diseño del envase debe permitir el vaciado rápido.]

ENSAYOS

Otros requisitos

Debe cumplir con los requisitos de todos los ensayos para *Agua Estéril para Inyectables*, exceptuando el ensayo *Partículas en inyectables <650>*.

ROTULADO

En el rótulo deben figurar las leyendas: “No emplear como inyectable”; “Usar sólo para irrigación”.

AGUA ESTÉRIL PARA NEBULIZAR

H₂O

PM: 18,0

Definición - Agua Estéril para Nebulizar es *Agua Purificada*, esterilizada y envasada en envases monodosis no mayores de 20 ml. No debe contener agentes antimicrobianos ni otras sustancias agregadas.

Caracteres generales - Líquido transparente, incoloro, inodoro e insípido.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de plástico o vidrio tipo I o II.

ENSAYOS

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 7,5, determinado sobre una solución conteniendo 0,3 ml de solución saturada de cloruro de potasio cada 100 ml de Agua Estéril para Nebulizar.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Amoníaco

Diluir 50 ml de Agua Estéril para Nebulizar con 50 ml de Agua de Alta Pureza (SR). Homogeneizar y agregar 2 ml de solución alcalina de ioduro mercuríco potásico (SR). Cualquier coloración amarilla que se desarrolle inmediatamente no debe ser más intensa que la de un control conteniendo 30 µg de amoníaco en 100 ml de Agua de Alta Pureza (SR). El límite es 0,6 ppm.

Calcio

A 100 ml de Agua Estéril para Nebulizar, agregar 2 ml de solución de oxalato de amonio (SR): no se debe producir turbidez.

Dióxido de carbono

A 25 ml de Agua Estéril para Nebulizar, agregar 25 ml de solución de hidróxido de calcio (SR): la mezcla debe permanecer transparente.

Cloruro

A 20 ml de Agua Estéril para Nebulizar, en un tubo de Nessler, agregar 5 gotas de ácido nítrico, 1 ml de solución de nitrato de plata (SR) y mezclar suavemente. Cualquier turbidez que se desarrolle dentro de los 10 minutos, observando desde arriba hacia abajo sobre una superficie oscura con luz lateral, no debe ser más intensa que la de un control tratado del mismo modo, conteniendo 10 µg de cloruro en 20 ml de Agua de Alta Pureza (SR). El límite es 0,5 ppm.

Sulfato

A 100 ml de Agua Estéril para Nebulizar, agregar 1 ml de solución de cloruro de bario (SR): no se debe producir turbidez.

Sustancias oxidables

A 100 ml de Agua Estéril para Nebulizar, agregar 10 ml de ácido sulfúrico 2 N y calentar a ebullición. Agregar 0,4 ml de solución de permanganato de potasio 0,1 N y continuar con el calentamiento a ebullición durante 5 minutos más. Si se forma un precipitado, enfriar en un baño de hielo hasta temperatura ambiente y filtrar a través de un filtro de vidrio sinterizado. El color rosado no debe desaparecer completamente.

ROTULADO

En el rótulo deben figurar las leyendas: “*No emplear como inyectable*”; “*Emplear sólo para nebulizar*”; “*Una vez abierto el envase, desechar el remanente*”.

ALBENDAZOL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Albendazol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Albendazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción ultravioleta <470>

Solvente: Emplear *Diluyente* preparado según se indica en *Ensayo de disolución*.

Concentración: 10 μ g por ml, preparado a partir de una dilución del filtrado obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Diluyente - Transferir 50 ml de metanol a un matraz aforado de 100 ml, agregar 2 ml de ácido clorhídrico, completar a volumen con metanol y mezclar.

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 90 mg de Albendazol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 250 ml, agregar 10 ml de *Diluyente* y agitar hasta disolver. Completar a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con hidróxido de sodio 0,1 N y mezclar.

Solución muestra - Transferir 10,0 ml de cada porción filtrada a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con hidróxido de sodio 0,1 N y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima y mínima absorción, 308 y 350 nm, respectivamente, empleando hidróxido de sodio 0,1 N como blanco.

Calcular la cantidad de $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ disuelta, a partir de las diferencias de las absorbancias a 308 y 350 nm ($A_{308} - A_{350}$) obtenidas con la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, respectivamente.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Diluyente, Solución estándar - Proceder según se indica en *Ensayo de disolución*.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Albendazol a un matraz aforado de 500 ml, agregar aproximadamente 300 ml de *Diluyente* y agitar durante 30 minutos. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Filtrar una porción de esta solución descartando los primeros 20 ml del filtrado. Transferir 4,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con hidróxido de sodio 0,1 N y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias en el ultravioleta de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* a la longitud de onda de máxima y mínima absorción, 308 y 350 nm, empleando hidróxido de sodio 0,1 N como blanco. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ en cada Comprimido de Albendazol, a partir de las diferencias de las absorbancias a 308 y 350 nm ($A_{308} - A_{350}$) obtenidas con la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, respectivamente.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Diluyente - Metanol y ácido sulfúrico (99:1).

Fase móvil - Disolver 0,50 g de fosfato monobásico de amonio en 400 ml de agua, agregar 600 ml de metanol y mezclar. Filtrar descartando los primeros 15 ml del filtrado y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100. Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 100 mg de Albendazol SR-FA, transferir

a un matraz aforado de 50 ml, agregar 5 ml de *Diluyente*, 25 ml de metanol y agitar hasta disolver. Completar a volumen con metanol y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Albendazol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de albendazol, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 5 ml de *Diluyente*, 20 ml de metanol y agitar durante 15 minutos. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar descartando los primeros 15 ml del filtrado. Transferir 5,0 ml de la solución filtrada a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la eficiencia de la columna no debe ser menor de 1.000 platos teóricos; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ en los Comprimidos de Albendazol, de acuerdo a la cantidad declarada.

ALOPURINOL COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Alopurinol deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_5H_4N_4O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Alopurinol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de Alopurinol, a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Suspender en 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N, filtrar, acidificar el filtrado con ácido acético 1 N y dejar en reposo entre 10 y 15 minutos. Recoger el precipitado, lavar con porciones de 3 ml de alcohol absoluto y finalmente con 4 ml de éter etílico anhidro. Dejar secar al aire durante 15 minutos y luego secar a 105 °C durante 3 horas: el residuo obtenido debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Alopurinol*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_5H_4N_4O$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Solución madre del estándar - Pesar exactamente alrededor 40 mg de Alopurinol SR-FA y transferir a un matraz aforado de 200 ml. Agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N, agitar, completar a volumen con *Medio* y mezclar.

Solución estándar - Diluir la *Solución madre del estándar* con *Medio* hasta obtener una solución de concentración similar a la empleada en el ensayo.

Procedimiento - Determinar las absorbancias en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, a 250 nm, comparando con la *Solución estándar*.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_5H_4N_4O$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

[NOTA: preparar todas las soluciones en el día de su uso].

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Fosfato monobásico de amonio 0,05 M. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución del estándar interno - Disolver alrededor de 50 mg de hipoxantina en 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N, en un matraz aforado de 50 ml, agitar durante 10 minutos, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Alopurinol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N, agitar durante 10 minutos, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 4,0 ml de esta solución y 2,0 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Alopurinol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de alopurinol, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N, agitar durante 10 minutos, completar a volumen con agua y mezclar. [NOTA: a partir de este punto, realizar el resto de la *Valoración* rápidamente]. Filtrar, descartando los primeros 10 ml del filtrado. Transferir 4,0 ml del filtrado y 2,0 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,6 para hipoxantina y 1,0 para alopurinol; la resolución *R* entre los picos del alopurinol y del estándar interno no debe ser menor de 5,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repeti-

das no debe ser mayor de 3,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_5H_4N_4O$ en la porción de Comprimidos de Alopurinol, de acuerdo a la cantidad declarada.

AMILORIDA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Amilorida deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_8ClN_7O \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Amilorida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_6H_8ClN_7O \cdot HCl$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 363 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Amilorida SR-FA, en el mismo medio. [NOTA: puede emplearse una cantidad de metanol que no exceda el 2 % del volumen total de la *Solución estándar*, para disolver el Clorhidrato de Amilorida].

Tolerancia - No menos del 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_6H_8ClN_7O \cdot HCl$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Diluyente - Ácido clorhídrico 0,1 N.

Solución muestra - Reducir a polvo fino un Comprimido de Clorhidrato de Amilorida, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 60 ml de *Diluyente* y agitar durante 30 minutos. Completar a volumen con *Diluyente*, mezclar y centrifugar una porción de la mezcla. Diluir una porción exactamente medida del líquido sobrenadante transparente para obtener una solución de aproximadamente 10 µg de clorhidrato de amilorida por ml.

Solución estándar - Preparar una solución de Clorhidrato de Amilorida SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 10 µg por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* a la longitud de onda de máxima absorción, 363 nm, con un espectrofotómetro, empleando *Diluyente* como blanco. Calcular la cantidad de $C_6H_8ClN_7O \cdot HCl$ cada Comprimido de Clorhidrato de Amilorida.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 286 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución reguladora - Disolver 136 g de fosfato monobásico de potasio en 800 ml de agua. Ajustar a pH 3,0 con ácido fosfórico. Diluir a 1 litro con agua y mezclar.

Fase móvil - Agua, metanol y *Solución reguladora* (71:25:4). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad de Clorhidrato de Amilorida SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 1,0 mg de clorhidrato de amilorida por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, agregar 10,0 ml de metanol y 2,0 ml de ácido clorhídrico 0,1 N. Completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Amilorida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 5 mg de clorhidrato de amilorida, transferir a un matraz aforado de 50 ml, conteniendo 15,0 ml de metanol y 2,0 ml de ácido clorhídrico 0,1 N. Sonicar durante 10 minutos, completar a volumen con agua, sonicar durante 10 minutos adicionales, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría del pico principal no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cro-

matógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Calcular la cantidad de $C_6H_8ClN_7O \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Amilorida, de acuerdo a la cantidad declarada.

AMIODARONA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Amiodarona deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Amiodarona SR-FA. Impureza D de Clorhidrato de Amiodarona SR-FA: 2-N-butil-3-(3',5'-diiodo-4'-hidroxibenzoil)benzofurano. Impureza E de Clorhidrato de Amiodarona SR-FA: 2-N-butil-3-(4-hidroxibenzoil)benzofurano.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados. Proteger de la humedad. A temperatura que no exceda los 30 °C.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloruro de metileno, metanol y ácido fórmico (85:10:5).

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 200 mg de Clorhidrato de Amiodarona SR-FA, transferir a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con metanol y agitar hasta disolución total.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 200 mg de clorhidrato de amiodarona a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración* y transferir a un erlenmeyer de 25 ml. Agregar 10,0 ml de metanol, sonicar durante 10 minutos y agitar durante 20 minutos. Filtrar y descartar los primeros mililitros del filtrado.

Procedimiento - Colocar la placa en la cámara y dejar que el frente del solvente recorra toda la longitud de la misma. Retirar la placa de la cámara y dejar secar. Aplicar por separado sobre la placa, en bandas, 20 µl de la *Solución muestra* y 20 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres

cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder en valor de R_f e intensidad con la obtenida a partir de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de pH 4,9, Fase móvil y Diluyente - Proceder según se indica en *Sustancias Relacionadas en Clorhidrato de Amiodarona*.

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 10 mg de Impureza D de Clorhidrato de Amiodarona SR-FA, 10 mg de Impureza E de Clorhidrato de Amiodarona SR-FA y 10 mg de Clorhidrato de Amiodarona SR-FA. Transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver con metanol y completar a volumen con el mismo solvente. Transferir 1,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 200 ml y completar a volumen con *Diluyente*.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de amiodarona a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar metanol, sonicar durante 15 minutos y agitar durante 15 minutos. Completar a volumen con el mismo solvente y filtrar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución R entre los picos de impureza D e impureza E no debe ser menor de 3,5; el factor de asimetría para el pico de amiodarona no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas durante al menos 60 minutos y medir las respuestas de todos los picos. Identificar los picos que pudieran aparecer en el cromatograma de la *Solución muestra* de acuerdo a los tiempos de retención relativos indicados en la siguiente tabla:

<i>Pico</i>	<i>Tiempo de retención relativo</i>
impureza A	0,26
impureza D	0,29
impureza E	0,37
impureza B	0,49
impureza C	0,55
impureza G	0,62
impureza F	0,69
amiodarona	1,00

en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, la respuesta de ningún pico individual debe ser mayor a la respuesta del pico correspondiente a amiodarona obtenido con la *Solución estándar* (0,2 %); la suma de las respuestas de todos los picos no debe ser mayor a 2,5 veces la respuesta del pico correspondiente a amiodarona obtenido con la *Solución estándar* (0,5 %). Ignorar cualquier pico con una respuesta menor a 0,1 veces la respuesta del pico correspondiente a amiodarona obtenido con la *Solución estándar* (0,02 %).

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 100 rpm.

Medio: agua, conteniendo lauril sulfato de sodio al 0,5 %; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Solución estándar: Pesar exactamente alrededor de 45 mg de Clorhidrato de Amiodarona SR-FA y transferir a un matraz aforado de 100 ml. Disolver y completar a volumen con metanol y agitar hasta disolución total. Transferir 2,0 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con *Medio*.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta determinadas a la longitud de onda de máxima absorción, 244 nm, comparando con una *Solución estándar*.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 1,5 g del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración* y secar a 105 °C hasta peso constante: no debe perder más de 2,5 % de su peso.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de pH 4,9, Fase móvil y Diluyente - Proceder según se indica en *Sustancias Relacionadas* en *Clorhidrato de Amiodarona*.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Clorhidrato de Amiodarona SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con metanol y agitar hasta disolución total. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. [NOTA: esta solución es estable durante aproximadamente 18 horas, conservada en recipientes herméticamente cerrados a temperatura ambiente.]

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Amiodarona. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de amiodarona, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar metanol, sonicar durante 15 minutos y agitar durante 15 minutos. Completar a volumen con el mismo solvente y filtrar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. [NOTA: esta solución es estable durante aproximadamente 18 horas, conservada en recipientes herméticamente cerrados a temperatura ambiente.]

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico de amiodarona no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas durante al menos 30 minutos y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Amiodarona, de acuerdo a la cantidad declarada.

AMITRIPTILINA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Amitriptilina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{20}H_{23}N \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Amitriptilina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción ultravioleta <470>

Pesar una cantidad equivalente a 10 mg de clorhidrato de amitriptilina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 50 ml de metanol, agitar y completar a volumen con el mismo solvente. Filtrar una porción de esta solución, transferir 10 ml del filtrado a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con metanol. El espectro de absorción de esta solución debe presentar un máximo a la misma longitud de onda que el de una solución preparada del mismo modo a partir de Clorhidrato de Amitriptilina SR-FA.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{20}H_{23}N \cdot HCl$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 239 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Amitriptilina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos del 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{20}H_{23}N \cdot HCl$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato - Disolver 11,04 g de fosfato monobásico de sodio en 900 ml de agua, ajustar a pH $2,5 \pm 0,5$ con ácido fosfórico, diluir a 1 litro con agua y mezclar.

Fase móvil - *Solución reguladora de fosfato* y acetonitrilo (58:42). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Amitriptilina SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,2 mg de clorhidrato de amitriptilina por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino veinte Comprimidos de Clorhidrato de Amitriptilina, transferir a un matraz aforado de 500 ml, agregar 250 ml de *Fase móvil* y agitar hasta disolución completa. Completar a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar. Diluir cuantitativamente un volumen exactamente medido del filtrado transparente con *Fase móvil* hasta obtener una solución de aproximadamente 0,2 mg de clorhidrato de amitriptilina por ml.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; el número de platos teóricos no debe ser menor de 800; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{20}H_{23}N \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Amitriptilina, de acuerdo a la cantidad declarada.

AMOXICILINA

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Amoxicilina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Amoxicilina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm, para cápsulas que contengan 250 mg de amoxicilina.

Aparato 2: 75 rpm, para cápsulas que contengan 500 mg de amoxicilina.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 272 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Amoxicilina SR-FA, en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ se debe disolver en 60 minutos.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No debe contener más de 14,5 %.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Diluyente, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Amoxicilina*.

Preparación muestra - Extraer el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Amoxicilina y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 200 mg de amoxicilina anhidra, transferir a un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Sonicar, si fuera necesario, para asegurar una disolución completa. [NOTA: emplear esta solución dentro de las 6 horas de su preparación].

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Amoxicilina*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ en las Cápsulas de Amoxicilina, de acuerdo a la cantidad declarada.

AMOXICILINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Amoxicilina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Amoxicilina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 90 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ disuelta empleando la técnica siguiente.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 230 nm, una columna de 30 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro, mantenida aproximadamente a 40 ± 1 °C y un guarda columna de 2 cm \times 2 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a gel de sílice de una porosidad superficial controlada constituida por un núcleo esférico sólido de 30 a 50 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,7 ml por minuto.

Solución reguladora de pH 5,0 - Disolver 27,2 g de fosfato monobásico de potasio en 3 litros de agua, ajustar a pH $5,0 \pm 0,1$ con una solución de hidróxido de potasio al 45 % p/p, diluir a 4 litros con agua y mezclar.

Fase móvil - *Solución reguladora de pH 5,0* y acetonitrilo (39:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (Ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Pesar exactamente una cantidad de Amoxicilina SR-FA, disolver en *Solución reguladora de pH 5,0* hasta obtener una solución de aproximadamente 0,05 mg por ml. [NOTA: emplear esta solución dentro de las 6 horas de su preparación].

Solución muestra - Diluir cuantitativamente con agua, un volumen exactamente medido de cada alícuota filtrada hasta obtener una solución de aproximadamente 0,045 mg de amoxicilina por ml. [NOTA: emplear esta solución dentro de las 6 horas de su preparación].

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de capacidad k' se debe encontrar entre 1,1 y 2,8; la eficiencia de la columna no debe ser menor de 1.700 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,5 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ se debe disolver en 90 minutos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Diluyente, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Procede según se indica en *Valoración* en *Amoxicilina*.

Preparación muestra - Colocar no menos de cinco Comprimidos de Amoxicilina en un recipiente de vidrio de una mezcladora de alta velocidad que contenga un volumen exactamente medido de *Diluyente* suficiente para obtener una concentración de aproximadamente 1 mg de amoxicilina anhidra por ml. Mezclar durante 4 ± 1 minutos, dejar reposar aproximadamente 5 minutos y centrifugar una porción de la mezcla. [NOTA: cuando el volumen del *Diluyente* necesario sea mayor de 500 ml, colocar cinco Comprimidos de Amoxicilina en un matraz aforado de una capacidad tal que cuando se diluya finalmente a volumen, se obtenga una solución de aproximadamente 1 mg de amoxicilina anhidra por ml. Agregar un volumen de *Diluyente* equivalente aproximadamente a tres cuartos de la capacidad del matraz aforado y sonicar durante aproximadamente 5 minutos. Completar a volumen con *Diluyente* y agitar mediante una barra magnética durante aproximadamente 30 minutos. Centrifugar una porción de esta solu-

ción]. Filtrar una porción del líquido sobrenadante transparente a través de una membrana filtrante de 1 μm o porosidad menor y emplear el filtrado como *Preparación muestra*. [NOTA: emplear esta solución dentro de las 6 horas de su preparación].

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ en los Comprimidos de Amoxicilina, de acuerdo a la cantidad declarada.

AMOXICILINA

PARA SUSPENSIÓN ORAL

Definición - Amoxicilina para Suspensión Oral debe contener el equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia – Amoxicilina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,5; determinado sobre la suspensión reconstituida según se indica en el rótulo.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 %, excepto cuando en el rótulo se indica que contiene 80 mg de amoxicilina por ml de la solución reconstituida donde el límite no debe ser mayor de 4,0 %.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos para sólidos en envases monodosis.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Diluyente, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Amoxicilina*.

Preparación muestra - Reconstituir la Amoxicilina para Suspensión Oral según se indica en el rótulo, agitar y diluir un volumen exactamente medido y libre de burbujas, cuantitativamente y en etapas, con *Diluyente* para obtener una solución de 1 mg de amoxicilina por ml. [NOTA: emplear la solución dentro de las 6 horas de preparada].

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración en Amoxicilina*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ en la Amoxicilina para Suspensión Oral reconstituida, de acuerdo a la cantidad declarada.

AMOXICILINA SÓDICA

PARA INYECCIÓN

Definición - Amoxicilina Sódica para Inyección debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de amoxicilina ($C_{16}H_{19}N_3O_5S$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Amoxicilina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 4,0 %, determinado sobre 300 mg.

Determinación del pH <250>

Entre 8,0 y 10,0; determinado sobre una solución de amoxicilina al 10 %.

Sustancias relacionadas

Solución reguladora de pH 9,0 - Transferir 6,20 g de ácido bórico a un matraz aforado de 1 litro y disolver en 500 ml de agua. Ajustar a pH 9,0 con hidróxido de sodio y completar a volumen con agua.

Solución reguladora de pH 4,6 - Transferir 5,4 g de acetato de sodio a un matraz aforado de 100 ml y disolver en 50 ml de agua. Agregar 2,4 g de ácido acético glacial y completar a volumen con agua. Ajustar el pH si fuera necesario.

Solución muestra - A una cantidad de Amoxicilina Sódica para Inyección, equivalente a 250 mg de amoxicilina, agregar 25 ml de *Solución reguladora de pH 9,0* y 5,0 ml de anhídrido acético, agitar durante 3 minutos y agregar 10 ml de *Solución reguladora de pH 4,6*. [NOTA: preparar esta solución en el momento de su uso.]

Procedimiento - Titular la *Solución muestra* con nitrato mercúrico 0,02 M (SV), determinando el punto final potenciométricamente. Emplear un electrodo indicador de platino o mercurio y un electrodo de referencia de sulfato de mercurio-mercurio (I). Ignorar cualquier inflexión preliminar sobre la curva de titulación. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*).

Cada ml de nitrato mercúrico 0,02 M equivale a 7,748 mg de $C_{16}H_{18}N_3NaO_5S$. No debe contener más de 0,9 % con respecto a la Amoxicilina Sódica.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Disolver el contenido del envase de Amoxicilina Sódica para Inyección en *Agua reactivo* para obtener una solución de aproximadamente 10 mg de amoxicilina por ml. Esta solución debe contener menos de 2,5 Unidades de Endotoxina por ml. Proceder según se indica en *Máxima dilución válida* calculando la concentración de esta solución a partir de la sensibilidad del lisado declarada en el rótulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución A, Solución B y Fase móvil - Proceder según se indica en *Valoración en Amoxicilina Sódica*.

Preparación estándar - Preparar una solución de Amoxicilina SR-FA en *Fase móvil* de aproximadamente 0,7 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir el contenido de no menos de diez envases de Amoxicilina Sódica para Inyección a un recipiente apropiado y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 60 mg de amoxicilina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 80 ml de *Solución A* y agitar durante 15 minutos. Sonicar durante 1 minuto, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución de resolución - Preparar una solución de *Cefadroxilo* y Amoxicilina SR-FA en *Solución A* de aproximadamente 4 y 30 μg por ml, respectivamente.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de amoxicilina y cefadroxilo no debe ser menor de 2,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ en Amoxicilina Sódica para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

AMPICILINA COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Ampicilina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ampicilina Trihidrato SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice, de 0,25 mm de espesor.

Diluyente - Preparar una solución de edetato de sodio al 0,1 % en una solución de fosfato monobásico de sodio al 5 %.

Fase móvil - Acetato de *n*-butilo, ácido acético glacial, *Diluyente* y butanol (50:30:10:5).

Solución estándar - Pesar exactamente una cantidad de Ampicilina Trihidrato SR-FA y disolver en solución reguladora de fosfato pH 7,0 (ver *Soluciones reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*) para obtener una solución de aproximadamente 1,4 mg por ml.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 125 mg de ampicilina a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 70 ml de solución reguladora de fosfato pH 7,0 (ver *Soluciones reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*), agitar durante 15 minutos, completar a volumen con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 1,25 mg por ml y filtrar.

Revelador - Mucílago de almidón, ácido acético glacial y solución de yodo al 1 % en solución de ioduro de potasio al 4 % (100:6:2).

Procedimiento - Pulverizar sobre la placa con *Diluyente*, dejar secar al aire y calentar a 105 °C durante 1 hora. Aplicar por separado sobre la placa 1 µl de la *Solución estándar* y 1 µl de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Calentar a 105 °C entre 10 y 15 minutos y pulverizar sobre la placa con *Revelador*: el valor de

R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 10 mg de ampicilina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Suspender en 1 ml de agua y agregar 2 ml de una mezcla de 2 ml de tartrato cúprico alcalino (SR) y 6 ml de agua: se debe producir inmediatamente un color violeta magenta.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Solución reguladora de sulfato cúprico pH 5,2 - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Pesar exactamente una cantidad de Ampicilina Trihidrato SR-FA, equivalente a 14 mg de ampicilina, transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver con agua, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, para obtener una *Solución muestra* de concentración similar a la *Solución estándar*. Transferir a sendas probetas de 25 ml con tapón, 2,0 ml de *Solución estándar*, 2,0 ml de *Solución muestra* y 2,0 ml de agua para emplear como blanco, completar a volumen con *Solución reguladora de sulfato cúprico pH 5,2* y mezclar. Calentar en un baño de agua a 75 °C, durante 30 minutos, enfriar rápidamente a temperatura ambiente y, si fuera necesario, completar a volumen con agua. Determinar las absorbancias de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, a 320 nm. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ disuelto.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Solución reguladora de sulfato cúprico pH 5,2 - Disolver 15,22 g de fosfato dibásico de sodio anhidro en cantidad suficiente de agua para obtener 536 ml y agregar aproximadamente 460 ml de una solución de ácido cítrico al 2,1 % para obtener una

solución con pH entre 5,15 y 5,25. Mezclar 985 ml de la solución resultante con 15 ml de una solución de sulfato cúprico al 0,393 %.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Ampicilina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de ampicilina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua, agitar durante 15 minutos y filtrar. Diluir 2,0 ml de esta solución a 100 ml con *Solución reguladora de sulfato cúprico pH 5,2*. Transferir 10 ml de esta solución a un tubo de ensayo con tapón y calentar en un baño de agua a 75 °C durante aproximadamente 30 minutos. Enfriar inmediatamente a temperatura ambiente, ajustar el volumen, si fuera necesario, a 10 ml con agua.

Preparación estándar - Proceder según se indica en *Preparación muestra* pero empleando 120 mg de Ampicilina Trihidrato SR-FA.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 320 nm, con un espectrofotómetro, empleando la *Solución de sulfato cúprico pH 5,2*, sin calentar, como blanco. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ en los Comprimidos de Ampicilina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cantidad de Ampicilina Anhidra.

AMPICILINA

PARA SUSPENSIÓN ORAL

Definición - Ampicilina para Suspensión Oral debe contener una cantidad de *Ampicilina* equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}N_3O_4S$, cuando es reconstituida según se indica en el rótulo y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ampicilina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetona, agua, tolueno y ácido acético glacial (650:100:100:25).

Diluyente - Acetona y ácido clorhídrico 0,01 N (4:1).

Solución estándar - Pesar exactamente una cantidad de Ampicilina SR-FA y disolver en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 5 mg por ml.

Solución muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Ampicilina para Suspensión Oral a un recipiente apropiado y mezclar con *Diluyente* para obtener una solución de 5 mg por ml.

Revelador - Ninhidrina en alcohol 3 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 2 μ l de la *Solución estándar* y 2 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y secar a 90 °C durante 15 minutos: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Uniformidad de unidades de dosificación
<740>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,5, determinado sobre la suspensión reconstituida según se indica en el rótulo.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 2,5 % para ampicilina anhidra o no más de 5,0 % para ampicilina trihidrato, que contenga el equivalente a 100 mg de ampicilina por ml cuando se reconstituye según se indica en el rótulo.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación estándar - Preparar según se indica en *Solución estándar* en 760. *Valoración iodométrica de antibióticos betalactámicos*, empleando Ampicilina SR-FA.

Preparación muestra - Diluir un volumen exactamente medido de Ampicilina para Suspensión Oral, reconstituida según se indica en el rótulo, recientemente mezclada y libre de burbujas, cuantitativamente y en etapas, en agua para obtener una solución de aproximadamente 1,25 mg por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en 760 *Valoración iodométrica de antibióticos betalactámicos*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ en la Ampicilina para Suspensión Oral reconstituida, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo si la Ampicilina es anhidra o trihidrato.

AMPICILINA SÓDICA

PARA INYECCIÓN

Definición - La Ampicilina Sódica para Inyección debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 115,0 por ciento de la cantidad declarada de ampicilina ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones. .

Sustancia de referencia - Ampicilina Sódica SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de vidrio tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En suspensión.*

B - Debe responder a los ensayos para Sodio <410>.

C - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Cristalinidad

Proceder según se indica en *Ampicilina Sódica*.

Determinación del pH <250>

Proceder según se indica en *Ampicilina Sódica*.

Determinación de agua <120>

Proceder según se indica en *Ampicilina Sódica*.

Disolución completa <280>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,15 Unidades de Endotoxina por mg de Ampicilina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Preparación estándar, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución muestra - Transferir a recipientes individuales la *Preparación muestra 1* o la *Preparación muestra 2* preparadas según se indica en *Valoración*, o ambas cuando sea apropiado.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Ampicilina*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ampicilina Sódica SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml. Agitar y sonicar, si fuera necesario, hasta disolver.

Preparación muestra 1 (cuando está contenida en un envase monodosis) - Reconstituir la Ampicilina Sódica para Inyección en un volumen exactamente medido de *Diluyente*, correspondiente al volumen de solvente especificado en el rótulo. Retirar todo el contenido extraíble y diluir con *Diluyente* hasta obtener una solución de aproximadamente 1 mg de ampicilina por ml. [NOTA: preparar esta solución en el momento de su uso.]

Preparación muestra 2 (cuando en el rótulo se declara la cantidad de ampicilina en un volumen dado de solución reconstituida) - Reconstituir un envase de Ampicilina Sódica para Inyección en un volumen exactamente medido de *Diluyente*, correspondiente al volumen de solvente especificado en el rótulo. Diluir una porción exactamente medida de la solución reconstituida con *Diluyente* hasta obtener una solución de aproximadamente 1 mg de ampicilina por ml. [NOTA: preparar esta solución en el momento de su uso.]

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración* en *Ampicilina*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ en Ampicilina Sódica para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

ASCÓRBICO, ÁCIDO COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Ácido Ascórbico deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_8O_6$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ácido Ascórbico SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Reducir a polvo fino los Comprimidos de Ácido Ascórbico, triturarlos con suficiente alcohol diluido para obtener una solución de ácido ascórbico de aproximadamente 1 en 50, filtrar y proceder según los ensayos siguientes. Una porción del filtrado debe responder al ensayo de *Identificación B* en *Ácido Ascórbico*. [NOTA: retener el resto del filtrado obtenido para los ensayos de *Identificación B* y *C*.]

B - A 2 ml del filtrado obtenido en *Identificación A*, agregar 4 gotas de azul de metileno (SR) y calentar a 40 °C: el color azul profundo se debe aclarar notoriamente o desaparecer completamente dentro de los 3 minutos.

C - A 1 ml del filtrado obtenido en *Identificación A*, agregar 15 ml de una solución de ácido tricloroacético al 5 %, agregar alrededor de 200 mg de carbón activado, agitar vigorosamente durante 1 minuto y filtrar para clarificar. A 5 ml del filtrado, agregar 1 gota de pirrol y agitar suavemente hasta disolver, luego calentar en un baño de agua a 50 °C: se debe desarrollar color azul.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Procedimiento - Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario y determinar la cantidad disuelta de $C_6H_8O_6$ procediendo según se indica en *Valoración*, comenzando donde dice "...Transferir una alícuota de esta solución a un tubo de centrifuga...".

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_6H_8O_6$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Ácido metafosfórico-acético - Disolver 15 g de ácido metafosfórico en 40 ml de ácido acético glacial. Diluir a 500 ml con agua. [NOTA: mantener esta solución en un sitio frío y emplear dentro de los dos días de preparada.]

Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol - A 50 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol sódico, conservado en un desecador sobre cal sodada, agregar 50 ml de agua a la que se ha agregado 42 mg de bicarbonato de sodio. Agitar vigorosamente y una vez que el colorante se disolvió por completo, diluir a 200 ml con agua. Filtrar y transferir a un recipiente de color caramelo con tapón de vidrio. [NOTA: emplear dentro de los dos días de preparada. Estandarizar inmediatamente antes de su uso según se indica en *Estandarización de la Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol*.]

Estandarización de la Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol - Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Ácido Ascórbico SR-FA, previamente secado en un desecador durante 24 horas, y transferir a un matraz aforado de 50 ml con tapón de vidrio. Disolver y completar a volumen con *Ácido metafosfórico-acético*. Transferir de inmediato 2,0 ml de esta solución a un erlenmeyer de 50 ml que contenga 5 ml de *Ácido metafosfórico-acético* y titular rápidamente con la *Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol* a estandarizar, hasta punto final rosado nítido que persista durante al menos 5 segundos. Realizar una determinación con un blanco preparado a partir de 7 ml de *Ácido metafosfórico-acético* y un volumen de agua igual al volumen de *Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol* empleado para titular el Ácido Ascórbico SR-FA. Expresar la concentración de la *Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol* como su equivalente en mg de ácido ascórbico.

Procedimiento - Transferir no menos de veinte Comprimidos de Ácido Ascórbico a un matraz aforado de 1 litro que contenga 250 ml de *Ácido metafosfórico-acético*. Tapar y agitar durante 30 minutos o hasta que los comprimidos se hayan desintegrado completamente. Completar a volumen con agua y mezclar. Transferir una alícuota de esta solución a un tubo de centrifuga y centrifugar hasta obtener una solución sobrenadante transparente. Diluir cuantitativamente el sobrenadante con agua, si fuera necesario, hasta obtener una solución de aproximadamente 500 µg de ácido ascórbico por ml. Transferir 4,0 ml de esta solución, equivalente a 2 mg de ácido ascórbico

co, a un erlenmeyer de 50 ml, agregar 5 ml de *Ácido metafosfórico-acético* y titular con *Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol* hasta obtener un color rosado nítido que persista durante al menos 5 segundos. Corregir por el volumen de *Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol* consumido por un blanco preparado a partir de 5,5 ml de *Ácido metafosfórico-acético* y 15 ml de agua. Calcular el contenido de $C_6H_8O_6$ en los Comprimidos de Ácido Ascórbico, a partir del equivalente de ácido ascórbico obtenido según se indica en *Estandarización de la Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol*.

ASCÓRBICO, ÁCIDO POLVO

Definición - El polvo de Ácido Ascórbico debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_8O_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ácido Ascórbico SR-FA

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar exactamente una cantidad del Polvo de Ácido Ascórbico, equivalente a 500 mg de ácido ascórbico, transferir a un recipiente apropiado, agregar 30 ml de agua, agitar durante 1 minuto y filtrar. Transferir 5,0 ml del filtrado a un erlenmeyer, agregar una gota de permanganato de potasio (SR) o una gota de 2,6-diclorofenol-indofenol sódico (SR): el color de la solución debe desaparecer inmediatamente.

B - Pesar exactamente una cantidad del Polvo de Ácido Ascórbico, equivalente a 10 mg de ácido ascórbico, transferir a un recipiente apropiado, agregar 10 ml de una solución de ácido metafosfórico (1 en 50), agitar durante 1 minuto y filtrar. Transferir 5 ml del filtrado a un erlenmeyer, agregar Iodo (SR) hasta que el color de la solución sea amarillo pálido. Luego agregar una gota de una solución de sulfato cúprico (1 en 1.000) y una gota de pirrol. Calentar la mezcla a 50 °C durante 5 minutos: se debe desarrollar color azul.

Pureza

El Polvo de Ácido Ascórbico debe encontrarse libre de cualquier olor y gusto rancio o desagradable.

VALORACIÓN

Ácido metafosfórico-ácido acético, Solución de 2,6-diclorofeno-indofenol, Estandarización de la Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol - Proceder según se indica en Comprimidos de Ácido Ascórbico.

Procedimiento - Pesar exactamente una cantidad del Polvo de Ácido Ascórbico, equivalente a 100 mg de ácido ascórbico, extraer con sucesivas porciones de *Ácido metafosfórico-ácido acético*, combinar los extractos y filtrar. Lavar el residuo con *Ácido metafosfórico-ácido acético*. Combinar filtrados y lavados y diluir a un volumen de 200 ml con el mismo solvente. Proceder según se indica en *Procedimiento en Comprimidos de Ácido Ascórbico*

comenzando donde dice: “Transferir 4,0 ml de esta solución...”. Calcular el contenido de $C_6H_8O_6$ en el Polvo de Ácido Ascórbico, a partir del equivalente de ácido ascórbico obtenido según se indica en *Estandarización de la Solución de 2,6-diclorofenol-indofenol*

ASCÓRBICO, ÁCIDO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Ácido Ascórbico es una solución estéril de *Ácido Ascórbico* en *Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_8O_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ácido Ascórbico SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis de vidrio Tipo I o Tipo II.

ENSAYOS

Identificación

A - A un volumen de la Solución Inyectable de Ácido Ascórbico, equivalente a 40 mg de ácido ascórbico, agregar 4 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, 4 gotas de azul de metileno (SR) y calentar a 40 °C: el color azul se debe aclarar notoriamente o desaparecer por completo dentro de un período de 3 minutos.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

C - Debe responder al ensayo de la llama para *Sodio* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 5,5 y 7,0.

Limite de oxalato

Diluir un volumen de la Solución Inyectable de Ácido Ascórbico, equivalente a 50 mg de ácido ascórbico, a 5 ml con agua. Agregar 0,2 ml de ácido acético y 0,5 ml de cloruro de calcio (SR): no se debe producir turbidez en 1 minuto.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 1,2 Unidades de Endotoxina por mg de Ácido Ascórbico.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 245 nm y una columna de 15,0 cm × 6 mm con fase estacionaria constituida por gel polihidroximetacrilato hidrofílico. El caudal debe ser aproximadamente 0,6 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 15,6 g de fosfato dibásico de sodio y 12,2 g de fosfato monobásico de potasio en 2 litros de agua, ajustar a pH $2,50 \pm 0,05$ con ácido fosfórico. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ácido Ascórbico SR-FA en *Fase móvil* y mezclar hasta obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml. [NOTA: refrigerar y almacenar esta solución protegida de la luz hasta el momento de su uso. Preparar en el día de su uso e inyectar dentro de las 3 horas siguientes de sacar la solución del refrigerador].

Preparación muestra - Diluir cuantitativamente y en etapas si fuera necesario, la Solución Inyectable de Ácido Ascórbico con *Fase móvil* hasta obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml. [NOTA: refrigerar y almacenar esta solución protegida de la luz hasta el momento de su uso. Preparar en el día de su uso e inyectar dentro de las 3 horas siguientes de sacar la solución del refrigerador].

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor de 3.500 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,6; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,5 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 4 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_6H_8O_6$ en la Solución Inyectable de Ácido Ascórbico, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que los envases cerrados a la llama de las Soluciones Inyectables de Ácido Ascórbico con concentraciones de 250 mg por ml o mayores deben envolverse con una cubierta protectora antes de abrirlo, dado que la presión interna puede aumentar durante períodos de almacenamiento prolongados.

ASPIRINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Aspirina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_9H_8O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Aspirina SR-FA.
Ácido Salicílico SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Reducir a polvo fino un Comprimido de Aspirina, calentar a ebullición con 50 ml de agua durante 5 minutos, enfriar y agregar 1 ó 2 gotas de cloruro férrico (SR): se debe desarrollar un color rojo violáceo.

B - Pesar una cantidad equivalente a 500 mg de aspirina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación madre de la muestra* en *Valoración*. Transferir a un recipiente apropiado, agregar 10 ml de alcohol y mezclar durante varios minutos. Centrifugar la mezcla, transferir el líquido sobrenadante transparente a un erlenmeyer y evaporar hasta sequedad. Secar el residuo al vacío a 60 °C durante 1 hora: debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Aspirina*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 50 rpm.

Medio: solución reguladora de acetato 0,05 M, preparada mezclando 2,99 g de acetato de sodio trihidrato y 1,66 ml de ácido acético glacial con agua para obtener 1 litro de una solución de pH $4,50 \pm 0,05$; 500 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario y determinar la cantidad de $C_9H_8O_4$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda del punto isobéptico de la aspirina y del ácido salicílico, 265 ± 2 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Aspirina SR-FA, en el mismo medio. [NOTA: preparar la *Solución estándar* en el momento de su uso. Puede emplearse una cantidad de alcohol que no exceda el 1 % del volumen total de la *Solución estándar* para disolver la sustancia de referencia antes de diluirla con *Medio*].

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_9H_8O_4$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de ácido salicílico libre

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Diluyente - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ácido Salicílico SR-FA en una porción de la *Preparación estándar* empleada en la *Valoración*, para obtener una solución de aproximadamente 0,015 mg de ácido salicílico por ml.

Solución muestra - Emplear la *Preparación madre de la muestra* preparada en *Valoración*.

Aptitud del sistema - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos, según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,7 para ácido salicílico y 1,0 para aspirina; la resolución *R* entre los picos de ácido salicílico y aspirina no debe ser menor de 2,0; la desviación estándar relativa de las respuestas de los picos de ácido salicílico no debe ser mayor de 4,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de ácido salicílico ($C_7H_6O_3$) en los Comprimidos de Aspirina, en relación a las respuestas de los picos de ácido salicílico obtenidos a partir de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. No debe contener más de 0,3 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 30 cm \times 4,0 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unida a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 2 g de 1-heptanosulfonato de sodio en una mezcla de 850 ml de agua y 150 ml de acetonitrilo y ajustar a pH 3,4 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Acetonitrilo y ácido fórmico (99:1).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Aspirina SR-FA en *Diluyen-*

te para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml.

Preparación madre de la muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Aspirina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de aspirina, transferir a un erlenmeyer, agregar 20,0 ml de *Diluyente* y aproximadamente 10 perlas de vidrio. Agitar durante 10 minutos y centrifugar.

Preparación muestra - Diluir cuantitativamente 1 volumen exactamente medido de *Preparación madre de la muestra* con 9 volúmenes de *Diluyente*. Retener la porción remanente de la *Preparación madre de la muestra* para el ensayo *Límite de ácido salicílico*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_9H_8O_4$ en los Comprimidos de Aspirina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ATENOLOL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Atenolol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{14}H_{22}N_2O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Atenolol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Pesar y reducir a polvo fino tres Comprimidos de Atenolol. Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de atenolol, mezclar con 15 ml de metanol, calentar la mezcla a 50 °C y agitar durante 5 minutos. Filtrar y evaporar el filtrado en un baño de agua hasta sequedad. Agregar al residuo 10 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, calentar la solución, agitar y filtrar. Agregar al filtrado suficiente hidróxido de sodio 1 N para alcalinizar, realizar una extracción con 10 ml de cloroformo y secar el extracto clorofórmico sobre sulfato de sodio anhidro. Filtrar la solución clorofórmica, evaporar el filtrado en un baño de agua hasta sequedad y secar el residuo a 105 °C durante 1 hora.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: solución reguladora de acetato 0,1 N pH 4,6, preparada mezclando una solución de ácido acético 0,1 N y acetato de sodio 0,1 N (55:45); 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{14}H_{22}N_2O_3$ disuelto empleando la técnica siguiente.

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Atenolol SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,01 mg por ml.

Solución muestra - Diluir un volumen exactamente medido de cada alícuota filtrada con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,01 mg de atenolol por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{14}H_{22}N_2O_3$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 226 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,6 ml por minuto.

Fase Móvil - Disolver 1,1 g de 1-heptanosulfonato de sodio y 0,71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro en 700 ml de agua. Agregar 2 ml de dibutilamina y ajustar a pH 3,0 con ácido fosfórico 0,8 M. Agregar 300 ml de metanol y mezclar. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Atenolol SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,01 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir diez Comprimidos de Atenolol a un matraz aforado de 1 litro. Agregar 500 ml de *Fase móvil* y sonicar durante 15 minutos hasta desintegrar los Comprimidos de Atenolol. Completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Centrifugar una porción de esta mezcla y diluir con *Fase móvil* un volumen exactamente medido del líquido sobrenadante para obtener una solución de aproximadamente 0,01 mg de atenolol por ml.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor de 5.000 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación

estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{14}H_{22}N_2O_3$ en los Comprimidos de Atenolol, de acuerdo a la cantidad declarada.

ATROPINA, SULFATO DE

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Sulfato de Atropina es una solución estéril de *Sulfato de Atropina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Atropina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Evaporar una porción de la Solución Inyectable de Sulfato de Atropina hasta sequedad: debe responder a los ensayos para Sulfatos <410>.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 6,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 55,6 Unidades de Endotoxina por mg de Sulfato de Atropina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2 ml por minuto.

Solución reguladora de acético-acetato - Preparar una solución en agua que contenga 0,05 moles de acetato de sodio y 2,9 ml de ácido acético glacial por litro.

Fase móvil - Transferir 5,1 g de sulfato ácido de tetrabutilamonio a un matraz aforado de 1 litro, agregar 50 ml de acetonitrilo y completar a volumen con *Solución reguladora de acético-acetato*. Ajustar a pH $5,5 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio 5 N. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Sulfato de Atropina SR-FA en agua y diluir cuantitativamente con agua para obtener una solución de aproximadamente 80 μg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Sulfato de Atropina, equivalente a 2 mg de sulfato de atropina, a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de resolución - Preparar una solución de aproximadamente 2,5 μg de ácido *p*-hidroxibenzoico por ml de agua. Diluir un volumen de esta solución con cuatro volúmenes de la *Preparación estándar*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,5 %. Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos para la atropina y para el ácido *p*-hidroxibenzoico deben ser aproximadamente 1,0 y 1,6, respectivamente; la resolución *R* entre los picos del ácido *p*-hidroxibenzoico y la atropina no debe ser menor de 2,2.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ en la Solución Inyectable de Sulfato de Atropina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ATROPINA, SULFATO DE

SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Atropina es una solución acuosa estéril de *Sulfato de Atropina*, conteniendo agentes antimicrobianos apropiados. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Atropina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Evaporar una porción de la Solución Oftálmica de Sulfato de Atropina hasta sequedad: debe responder a los ensayos para *Sulfatos* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 3,5 y 6,0.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 257 nm y una columna de 10 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Preparar una solución de acetato de sodio 0,01M y docusato de sodio 0,05 M en metanol al 60 % y ajustar a pH 5,5 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Sulfato de Atropina SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Sulfato de Atropina a un recipiente apropiado y diluir con agua, si fuera necesario, para obtener una

solución de aproximadamente 1 mg de sulfato de atropina por ml

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ en la Solución Oftálmica de Sulfato de Atropina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: “Descartar una vez finalizado el tratamiento”.

BARIO, SULFATO DE PARA SUSPENSIÓN ORAL

Valoración en Sulfato de Bario comenzando donde dice: “Enfriar, colocar el crisol en un vaso de precipitados de 400 ml”.

Definición - Sulfato de Bario para Suspensión Oral es una mezcla de polvos conteniendo *Sulfato de Bario*, uno o más agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de BaSO₄ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Someter a ignición 1,0 g de Sulfato de Bario para Suspensión Oral hasta peso constante: el residuo obtenido debe responder a los *Ensayos de Identificación A y B* en *Sulfato de Bario*.

Determinación del pH <250>

Entre 3,5 y 10,0, determinado en una suspensión acuosa al 60 % p/p, o en la suspensión reconstituida según se indica en el rótulo.

Pérdida por secado <680>

Secar a 105 °C durante 4 horas: no debe perder mas de 1,0 % de su peso.

VALORACIÓN

Pesar exactamente una cantidad de Sulfato de Bario para Suspensión Oral, equivalente a 600 mg de sulfato de bario, en un crisol de platino previamente pesado y someter a ignición bajo una llama suave hasta que toda la materia orgánica se carbonice. Enfriar, agregar cuidadosamente 0,5 ml de ácido nítrico, 0,5 ml de ácido sulfúrico y continuar la ignición bajo llama suave hasta que el residuo presente un color gris. Luego someter a ignición calentando en un mechero a altas temperaturas. Dejar reposar hasta temperatura ambiente.

[NOTA: si la muestra contiene un silicato, como bentonita, agregar 10 ml de agua y 1 ml de ácido sulfúrico al residuo en el crisol, mezclar y agregar 10 ml de ácido fluorhídrico. Calentar suavemente hasta que se produzcan vapores de trióxido de azufre, agregar 5 ml mas de ácido fluorhídrico, calentar nuevamente bajo llama suave hasta la aparición de vapores densos y continuar calentando hasta que el ácido sulfúrico se haya volatilizado por completo. Dejar enfriar].

Agregar al crisol de platino 10 g de carbonato de sodio anhidro, mezclar con las cenizas hasta obtener una fusión clara y calentar durante 30 minutos adicionales. Proceder según se indica en

BARIO, SULFATO DE SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Sulfato de Bario debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $BaSO_4$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

Agitar la Suspensión Oral de Sulfato de Bario, transferir un volumen equivalente a 500 mg de sulfato de bario a un recipiente apropiado y someter a ignición hasta peso constante: el residuo obtenido debe responder a los *Ensayos de Identificación A y B* en *Sulfato de bario*

Determinación del pH<250>

Entre 3,5 y 10,0.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

El recuento total bacteriano no debe ser mayor de 100 ufc por ml, el recuento total combinado de hongos y levaduras no debe ser mayor de 10 ufc por ml y debe cumplir con los requisitos para los ensayos de ausencia de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

VALORACIÓN

Agitar la Suspensión Oral de Sulfato de Bario, transferir un volumen equivalente a 600 mg de sulfato de bario a un crisol de platino previamente pesado y someter a ignición calentando suavemente hasta que toda materia orgánica se carbonice. Enfriar, agregar cuidadosamente 0,5 ml de ácido nítrico y 0,5 ml de ácido sulfúrico y continuar la ignición con llama suave hasta que el residuo presente un color gris. Luego someter a ignición calentando en un mechero a altas temperaturas. Dejar reposar hasta que alcance la temperatura ambiente.

[NOTA: si la muestra contiene un silicato como bentonita, agregar 10 ml de agua y 1 ml de ácido sulfúrico al residuo en el crisol, mezclar y agregar 10 ml de ácido fluorhídrico. Calentar suavemente hasta que se produzcan vapores de trióxido de azufre. Agregar 5 ml más de ácido fluorhídrico, calentar nuevamente bajo llama suave hasta la aparición de vapores densos y continuar calentando hasta que el ácido sulfúrico se haya volatilizado por completo. Dejar enfriar. Si la muestra no contiene

un silicato, omitir el tratamiento con los ácidos fluorhídrico y sulfúrico].

Agregar al crisol 10 g de carbonato de sodio anhidro y mezclar. Fundir la mezcla sobre un mechero y calentar durante 30 minutos adicionales. Proceder según se indica en *Valoración en Sulfato de Bario* comenzando donde dice: “Enfriar, colocar el crisol en un vaso de precipitados de 400 ml...”

BENCILO, BENZOATO DE EMULSIÓN DÉRMICA

Definición - La Emulsión Dérmica de Benzoato de Bencilo debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{14}H_{12}O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Evaporar hasta un volumen de aproximadamente 25 ml la solución obtenida en *Valoración* y filtrar. Transferir 5 ml de la solución anterior a un tubo de ensayo, acidificar ligeramente con ácido clorhídrico 3 N y agregar unas gotas de cloruro férrico (SR): se debe desarrollar un precipitado rosado.

B - Transferir 5 ml de la solución obtenida en el ensayo de *Identificación A* a un tubo de ensayo, agregar 2 ml de ácido clorhídrico 3 N, mezclar y filtrar. Lavar el precipitado presente en el filtro con diez porciones de 1 ml de agua y secar a 60 °C con ayuda de vacío. Determinar el punto de fusión del ácido benzoico así obtenido: debe estar comprendido entre 121 y 123 °C.

Determinación del pH <250>

Entre 8,5 y 9,2.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Transferir una porción de la Emulsión Dérmica de Benzoato de Bencilo, equivalente a 1,5 g de benzoato de bencilo, a un erlenmeyer. Agregar 25 ml de etanol y dos gotas de fenolftaleína (SR), enfriar a 15 °C y neutralizar con hidróxido de sodio 0,1 N hasta obtener una coloración ligeramente rosada. Agregar 25,0 ml de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N (SV) exactamente medidos y someter a ebullición a reflujo durante una hora. Enfriar, agregar fenolftaleína (SR) y titular con ácido clorhídrico 0,5 N (SV). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N equivale a 106,1 mg de $C_{14}H_{12}O_2$.

BENCILPENICILINA BENZATINA

SUSPENSIÓN INYECTABLE

Definición - La Suspensión Inyectable de Bencilpenicilina Benzatina es una suspensión estéril de *Bencilpenicilina Benzatina* en *Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de penicilina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Bencilpenicilina Benzatina SR-FA. Bencilpenicilina Potásica SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I o Tipo II, en un refrigerador.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Metanol, acetonitrilo e hidróxido de amonio (70:30:3).

Solución estándar - Preparar una solución de Bencilpenicilina Benzatina SR-FA en metanol de aproximadamente 2,5 mg por ml.

Solución muestra - Mezclar una porción de la Suspensión Inyectable de Bencilpenicilina Benzatina con metanol para obtener una solución de aproximadamente 3.000 Unidades de Bencilpenicilina por ml.

Revelador - Disolver 20 g de ácido tartárico y 1,7 g de subnitrito de bismuto en 80 ml de agua. A 50 ml de agua agregar 2,5 ml de esta solución, 2,5 ml de solución de yoduro de potasio (4 en 10), 10 g de ácido tartárico y mezclar.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 µl de la *Solución muestra* y 20 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*. Examinar los cromatogramas: el valor de R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,01 Unidades de Endotoxina cada 100 Unidades de Bencilpenicilina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Método de transferencia directa*, excepto que se debe emplear *Caldo de tioglicolato* y *Caldo digerido de Caseína-soja* que contenga solución de polisorbato 80 (1 en 200) y una cantidad suficiente de penicilinas estéril para inactivar la Bencilpenicilina de cada tubo y agitar los tubos una vez por día.

VALORACIÓN

Preparación estándar - Proceder según se indica en *Preparación estándar* en 760. *Valoración iodométrica de antibióticos betalactámicos*, empleando Bencilpenicilina Potásica SR-FA.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Inyectable de Bencilpenicilina Benzatina, equivalente a 300.000 Unidades de Bencilpenicilina, a un recipiente apropiado y diluir cuantitativamente con hidróxido de sodio 1 N para obtener una solución de aproximadamente 2.000 Unidades de Bencilpenicilina por ml. Transferir 2,0 ml de esta solución a un erlenmeyer de 125 ml provisto de un tapón de vidrio.

Preparación blanco -. Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Inyectable de Bencilpenicilina Benzatina, equivalente a 300.000 Unidades de Bencilpenicilina y diluir cuantitativamente con *Solución reguladora No. 1* para obtener una suspensión de aproximadamente 2.000 Unidades de Bencilpenicilina por ml. Transferir 2,0 ml de esta solución a un erlenmeyer de 125 ml provisto de un tapón de vidrio.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en 760. *Valoración iodométrica de antibióticos betalactámicos*, pero al realizar la *Inactivación* y *Titulación* se debe omitir el agregado de hidróxido de sodio 1,0 N a la *Preparación muestra* y se debe realizar la *Titulación del blanco* empleando la *Preparación blanco* en lugar de la *Preparación muestra*. Calcular la cantidad en Unidades de Bencilpenicilina en cada ml de la Suspensión Inyectable de Bencilpenicilina Benzatina en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$(T/2D)(F)(B - I)$$

en la cual T es la cantidad declarada en Unidades de Bencilpenicilina por ml en la Suspensión Inyectable de Bencilpenicilina Benzatina en ensayo, y D es la concentración en Unidades de Bencilpenicilina por ml en la *Preparación muestra*, de acuerdo a la cantidad declarada en la Suspensión Inyectable de Bencilpenicilina Benzatina y la dilución efectuada.

BENZOÍLO, PERÓXIDO DE GEL TÓPICO

Definición - El Gel Tópico de Peróxido de Benzoílo es *Peróxido de Benzoílo* en un gel base apropiado. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 125,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{14}H_{10}O_4$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH<250>

Entre 2,8 y 6,6.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 235 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,2 ml por minuto. El cromatógrafo debe programarse del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0	18	82	equilibrio
0-20	18 \rightarrow 60	82 \rightarrow 40	gradiente lineal
20-30	60	40	isocrática

Solución A - Acetonitrilo y ácido acético glacial (1000:1).

Solución B - Agua y ácido acético glacial (1000:1).

Fase móvil - Emplear mezclas variables de *Solución A* y *Solución B*, según se indica en *Sistema cromatográfico*. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de aptitud del sistema - Preparar una solución en acetonitrilo de aproximadamente 100 μ g de ácido benzoico y 60 μ g de metilparabeno por ml.

Solución estándar A - Disolver una cantidad exactamente pesada de ácido benzoico en acetonitrilo y diluir con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 500 μ g por ml.

Solución estándar B - Disolver una cantidad exactamente pesada de benzoato de etilo en acetonitrilo y diluir con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 20 μ g por ml.

Solución estándar C - Disolver una cantidad exactamente pesada de benzaldehído en acetonitrilo y diluir con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 20 μ g por ml.

Solución estándar D - Disolver una cantidad exactamente pesada de *Peróxido de Benzoílo hidratado* en acetonitrilo y diluir con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 40 μ g de peróxido de benzoílo anhidro por ml.

Solución muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Gel Tópico de Peróxido de Benzoílo, equivalente a 100 mg de peróxido de benzoílo, a un matraz aforado de 50 ml, agregar 25 ml de acetonitrilo y agitar hasta dispersar. Sonicar durante 5 minutos, completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de ácido benzoico y metilparabeno no debe ser menor de 2,0; los factores de asimetría para ambos picos no deben ser menores de 2,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de las *Soluciones estándar A, B, C y D* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. La respuesta de cualquier pico obtenido a partir de la *Solución muestra* correspondiente a ácido benzoico, benzoato de etilo y benzaldehído no debe ser mayor que las obtenidas a partir de la *Solución estándar A* (25 %), la *Solución estándar B* (1 %) y la *Solución estándar C* (1 %), respectivamente; la respuesta de cualquier otro pico, a excepción del pico principal de peróxido de benzoílo y de los picos de ácido benzoico, benzoato de etilo, benzaldehído, metilparabeno o propilparabeno y de todo pico de disolvente en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, no debe ser mayor que la respuesta del pico principal obtenido a partir de la *Solución estándar D* (2 %), y la suma de las respuestas de todos los picos distintos de ácido benzoico, benzoato de etilo y benzaldehído no debe ser mayor que la respuesta del pico de peróxido de

benzoílo obtenido a partir de la *Solución estándar D* (2 %).

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 235 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Acetonitrilo y agua (5 en 10). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución del estándar interno - Disolver una cantidad necesaria de benzoato de etilo en acetonitrilo para obtener una solución de aproximadamente 3,6 mg por ml.

Preparación estándar - Transferir una cantidad apropiada de *Peróxido de Benzoílo Hidratado*, recientemente valorado, a un erlenmeyer previamente pesado con tapón y pesar nuevamente. Disolver cuantitativamente en acetonitrilo para obtener una solución de aproximadamente 0,8 mg de peróxido de benzoílo por ml. Transferir 10 ml de esta solución y 5 ml de la *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,32 mg de peróxido de benzoílo por ml.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Gel Tópico de Peróxido de Benzoílo, equivalente a 40 mg de peróxido de benzoílo, a un matraz aforado de 50 ml, agregar 40 ml de acetonitrilo y agitar hasta dispersar. Sonicar durante 5 minutos, completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y filtrar. Transferir 10 ml del filtrado y 5 ml de la *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar tres inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa de los cocientes entre el pico más bajo y más alto (R_E) de inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %; la resolución R entre los picos de benzoato de etilo y peróxido de benzoílo no debe ser menor de 2,0; los factores de

asimetría para los picos de benzoato de etilo y peróxido de benzoílo no deben ser menores de 2,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{14}H_{10}O_4$ en el Gel Tópico de Peróxido de Benzoílo, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Betametasona deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{22}H_{29}FO_5$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Betametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto, entre 2 y 25°C.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml. Agregar 1,0 ml de la *Solución del estándar interno* a cada vaso.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y agua (60:40). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Preparar una solución de Betametasona SR-FA en metanol de aproximadamente 0,5 mg por ml. Transferir 1 ml de esta solución a un recipiente apropiado y diluir cuantitativamente a 900 ml con agua.

Aptitud del sistema - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 3,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 200 µl) de la *Solución estándar* y las porciones

filtradas en ensayo. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{22}H_{29}FO_5$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Solución estándar - Preparar según se indica en *Preparación estándar* en 750. *Valoración de Esteroides*, empleando Betametasona SR-FA para obtener una solución de aproximadamente 12 µg por ml.

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino un Comprimido de Betametasona. Transferir a una ampolla de decantación de 125 ml, agregar 20 ml de agua y agitar. Extraer con tres porciones de 15 ml de cloroformo, filtrar cada porción a través de una torunda de algodón previamente lavada con cloroformo, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con cloroformo y mezclar. Transferir 20,0 ml de esta solución a un erlenmeyer con tapón de vidrio de 50 ml, evaporar el cloroformo en un baño de vapor hasta sequedad, enfriar y disolver el residuo en 20,0 ml de alcohol.

Procedimiento - Proceder según se indica en 750. *Valoración de Esteroides*, dejando reposar a una temperatura constante de 45 ± 1 °C durante 90 minutos. Agregar 1,0 ml de ácido acético glacial y enfriar. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en cada Comprimido de Betametasona en ensayo, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y agua (60:40). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100 *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Betametasona SR-FA en metanol y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,06 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Betame-

tasona. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 1,5 mg de betametasona, transferir a un matraz aforado de 25 ml, agregar 12,5 ml de metanol y sonicar durante 10 minutos. Agregar 5 ml de Fase móvil y agitar durante 10 minutos. Completar a volumen con el mismo solvente, centrifugar 10 minutos y filtrar el sobrenadante.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 15 μ l) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en los Comprimidos de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA

SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Betametasona debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{22}H_{29}FO_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia -
Betametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto, entre 2 y 25 °C. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Betametasona*.

Preparación muestra - Medir exactamente un volumen de solución equivalente a alrededor de 5 mg de Betametasona y transferir a un matraz aforado de 25 ml. Agregar 15 ml de metanol y agitar 5 minutos y completar a volumen con metanol. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml y completar a volumen con Agua. Filtrar por membrana de 0,45 μ m.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Betametasona*. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en la Solución Oral de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA, BENZOATO DE GEL TÓPICO

Definición - El Gel Tópico de Benzoato de Betametasona debe contener el equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{29}H_{33}FO_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Benzoato de Betametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 236 nm y una columna de 30 cm x 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. Mantener la columna aproximadamente a 30°C. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol, agua y acetonitrilo (23:18:9). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Benzoato de Betametasona SR-FA en metanol y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación muestra - Pesar exactamente una cantidad del Gel Tópico de Benzoato de Betametasona, equivalente a 0,5 mg de benzoato de betametasona, transferir a una ampolla de decantación, agregar 20 ml de agua, 2 ml de solución saturada de acetato de sodio, agitar hasta dispersar. Extraer esta solución con una porción de 50 ml de cloroformo, seguida de tres porciones de 40 ml del mismo solvente. Descartar la fase acuosa, lavar el extracto clorofórmico con 10 ml de agua y dejar reposar durante 10 minutos. Transferir a través de un papel de filtro conteniendo sulfato de sodio anhidro a un recipiente apropiado y evaporar al vacío hasta sequedad a 30 °C. Disolver el residuo en 10 ml de metanol.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos principales según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{29}H_{33}FO_6$ en la porción de Gel Tópico de Benzoato de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA, DIPROPIONATO DE CREMA DÉRMICA

Definición - La Crema Dérmica de Dipropionato de Betametasona debe contener una cantidad de Dipropionato de Betametasona ($C_{28}H_{37}FO_7$) equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de betametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$) en una crema base apropiada y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Dipropionato de Betametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo y acetona (7:1).

Diluyente - Metanol y ácido clorhídrico diluido 1 en 120 (4:1).

Solución estándar - Disolver una porción de Dipropionato de Betametasona SR-FA en cloroformo para obtener una solución de aproximadamente 150 µg por ml.

Solución muestra - Transferir aproximadamente 1,5 g de la Crema Dérmica de Dipropionato de Betametasona a un tubo de centrífuga de 50 ml con tapón. Agregar 15 ml de *Diluyente* y agitar hasta obtener una mezcla homogénea. Agregar 30 ml de éter de petróleo, mezclar durante 10 minutos y centrifugar. Transferir la fase inferior acuosa a un segundo tubo de centrífuga, agregar 20 ml de agua y mezclar. Extraer esta mezcla acuosa con cloroformo mediante agitación, centrifugación y remoción de la fase inferior clorofórmica. Evaporar en un baño de vapor con la ayuda de una corriente de nitrógeno hasta sequedad, dejar en reposo hasta alcanzar temperatura ambiente y disolver el residuo en cloroformo para obtener una solución de

aproximadamente 150 µg de dipropionato de betametasona por ml.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 40 µl de la *Solución muestra* y 40 µl de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Dipropionato de Betametasona*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad necesaria de Dipropionato de Betametasona SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,133 mg de dipropionato de betametasona por ml.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada de la Crema Dérmica de Dipropionato de Betametasona, equivalente a 2 mg de dipropionato de betametasona, a un tubo de centrífuga de 50 ml, agregar 15,0 ml de *Diluyente*. Calentar en baño de agua a 60 °C con agitación hasta la fusión de la muestra en ensayo. Remover del baño y agitar hasta que vuelva a solidificar. Repetir calentamiento y agitación. Congelar en baño de hielo-metanol durante 15 minutos, centrifugar durante 5 minutos y transferir a otro recipiente.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Dipropionato de Betametasona*. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en la Crema Dérmica de Dipropionato de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA, DIPROPIONATO DE LOCIÓN

Definición - La Loción de Dipropionato de Betametasona debe contener una cantidad de Dipropionato de Betametasona ($C_{28}H_{37}FO_7$) equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de betametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Dipropionato de Betametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo y acetona (7:1).

Solución estándar - Disolver una porción de Dipropionato de Betametasona SR-FA en cloroformo para obtener una solución de aproximadamente 150 µg por ml.

Solución muestra - Transferir una cantidad de Loción de Dipropionato de Betametasona, equivalente a 0,6 mg dipropionato de betametasona, a un recipiente de 50 ml. Agregar 10 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, 4 ml de cloroformo y dispersar durante 1 minuto. Agitar vigorosamente durante 10 minutos y centrifugar durante 5 minutos. Transferir la fase clorofórmica a un recipiente apropiado.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 40 µl de la *Solución muestra* y 40 µl de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución*

muestra se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Dipropionato de Betametasona*.

Preparación estándar - Proceder según se indica en *Dipropionato de Betametasona*, empleando cloroformo como solvente. Transferir 10,0 ml de ácido clorhídrico 0,1 N a un tubo de centrifuga de 50 ml con tapa, agregar 4,0 ml de la solución recientemente preparada, tapar y agitar vigorosamente durante aproximadamente 2 minutos. Centrifugar durante 3 minutos, transferir la fase clorofórmica a un recipiente apropiado y evaporar bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad. Dejar reposar hasta que alcance la temperatura ambiente, agregar 4,0 ml de metanol y mezclar hasta disolver el residuo.

Preparación muestra - Pesar exactamente una cantidad de la Loción de Dipropionato de Betametasona, equivalente a 1,2 mg de dipropionato de betametasona, transferir a un tubo de centrifuga de 50 ml con tapa, agregar 10,0 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y agitar hasta dispersar. Agregar 2,0 ml de la *Solución del estándar interno* y 2,0 ml de cloroformo. Proceder según se indica en *Preparación estándar* comenzando donde dice: "*tapar y agitar vigorosamente durante 2 minutos*".

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Dipropionato de Betametasona*. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en la Loción de Dipropionato de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA, DIPROPIONATO DE UNGÜENTO TÓPICO

Definición - El Ungüento Tópico de Dipropionato de Betametasona debe contener una cantidad de Dipropionato de Betametasona ($C_{28}H_{37}FO_7$) equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de betametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Dipropionato de Betametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil, Diluyente, Solución estándar y Solución muestra - Proceder según se indica en el ensayo de *Identificación B* en *Crema Dérmica de Dipropionato de Betametasona*.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Identificación B* en *Crema Dérmica de Dipropionato de Betametasona*: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Determinación del contenido neto del envase
<220>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Dipropionato de Betametasona*.

Diluyente - Ácido acético y alcohol (1 en 1.000).

Preparación estándar - Disolver una cantidad necesaria de Dipropionato de Betametasona SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,133 mg de dipropionato de betametasona por ml.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Ungüento Tópico de Dipropionato de Betametasona, equivalente a 2 mg de dipropionato de betametasona, a un tubo de centrífuga de 50 ml, agregar 5,0 ml de *Solución del estándar interno* y 10,0 ml de *Diluyente*. Calentar en baño de agua a 70 °C con agitación hasta la fusión de la muestra en ensayo. Remover del baño y agitar hasta que vuelva a solidificar. Calentar nuevamente y agitar. Congelar en baño de hielo-metanol durante 15 minutos, centrifugar durante 5 minutos y transferir a otro recipiente.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Dipropionato de Betametasona*. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en el Ungüento Tópico de Dipropionato de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA, FOSFATO SÓDICO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Fosfato Sódico de Betametasona es una solución estéril de *Fosfato Sódico de Betametasona en Agua para Inyectables*. Debe contener una cantidad de fosfato sódico de betametasona ($C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$) equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de betametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fosfato Sódico de Betametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Alcohol *n*-butílico previamente saturado con ácido clorhídrico 1 N.

Solución muestra - Diluir la Solución Inyectable de Fosfato Sódico de Betametasona con metanol, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 2 mg de fosfato sódico de betametasona por ml.

Solución estándar - Preparar una solución de Fosfato Sódico de Betametasona SR-FA en metanol de aproximadamente 2 mg por ml.

Revelador - Ácido sulfúrico, metanol y ácido nítrico (10:10:1).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar a 105 °C durante 10 minutos: el valor de R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la

Preparación muestra se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 8,0 y 9,0.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 29,2 Unidades de Endotoxina por mg de Betametasona.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos para *Inyectables de pequeño volumen*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y fosfato monobásico de potasio 0,05 M (1:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100. Cromatografía*).

Solución del estándar interno - Transferir aproximadamente 100 mg de *Butilparabeno* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad de Fosfato Sódico de Betametasona SR-FA para obtener una solución de aproximadamente 4 mg por ml en agua. Transferir 3,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, agregar 5,0 ml de *Solución del estándar interno*, completar a volumen con agua y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg de Fosfato Sódico de Betametasona SR-FA por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Fosfato Sódico de Betametasona, equivalente a 9 mg de betametasona, a un matraz aforado de 25 ml. Agregar 5,0 ml de la *Solución del estándar interno*, completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser de aproximadamente 1,0 para fosfato

sódico de betametasona y 2,4 para butilparabeno; la resolución R entre los picos del analito y el estándar interno no debe ser menor de 5,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en la Solución Inyectable de Fosfato Sódico de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA, VALERATO DE CREMA DÉRMICA

Definición - La Crema Dérmica de Valerato de Betametasona debe contener una cantidad de Valerato de Betametasona ($C_{27}H_{37}FO_6$) equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de betametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$) en una crema base apropiada y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Valerato de Betametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Valerato de Betametasona*.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada de la Crema Dérmica de Valerato de Betametasona, equivalente a 2,5 mg de betametasona, a un tubo de centrífuga de 50 ml, agregar 10,0 ml de *Solución del estándar interno* y 5,0 ml de *Diluyente*. Tapar el tubo y calentar en baño de agua a 60 °C con agitación hasta la fusión de la muestra en ensayo. Remover del baño y agitar hasta que vuelva a solidificar. Repetir el calentamiento y la agitación dos veces más. Colocar el tubo en un baño de hielo-metanol durante 20 minutos y centrifugar para separar las fases. Transferir el sobrenadante a otro recipiente con tapón y dejar reposar hasta que alcance temperatura ambiente.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Valerato de*

Betametasona. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en la Crema Dérmica de Valerato de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA, VALERATO DE LOCIÓN

Definición - La Loción de Valerato de Betametasona debe contener una cantidad de Valerato de Betametasona ($C_{27}H_{37}FO_6$) equivalente a no menos de 95,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de betametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Valerato de Betametasona SR-FA. Dipropionato de Beclometasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo y acetato de etilo (1:1).

Diluyente - Metanol y cloroformo (2:1).

Solución estándar - Preparar una solución de Valerato de Betametasona SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 0,6 mg por ml.

Solución muestra - Transferir una cantidad de la Loción de Valerato de Betametasona, equivalente a 5 mg de betametasona, a un recipiente apropiado y diluir a 10 ml con *Diluyente*.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 20 μ l de la *Solución muestra* y 20 μ l de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Valerato de Betametasona*.

Solución del estándar interno - Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Dipropionato de Beclometasona SR-FA, transferir a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con cloroformo y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 40 mg de Valerato de Betametasona SR-FA, transferir a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con cloroformo y mezclar. Transferir 2,0 ml de esta solución a un tubo de centrífuga de 50 ml, agregar 10,0 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y 2,0 ml de la *Solución del estándar interno*. Tapar el tubo, agitar vigorosamente durante 2 minutos y centrifugar para separar las fases. Transferir la fase inferior clorofórmica a un recipiente pequeño con tapa, evaporar el cloroformo en un baño de vapor, a baja temperatura con la ayuda de una corriente de nitrógeno. Agregar 4,0 ml de *Diluyente* y agitar hasta disolver el residuo.

Preparación muestra - Pesar exactamente una cantidad de la Loción de Valerato de Betametasona, equivalente a 2,5 mg de betametasona, transferir a un tubo de centrífuga de 50 ml, agregar 10,0 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, colocar la tapa y agitar hasta dispersar. Agregar 2,0 ml de cloroformo y 2,0 ml de la *Solución del estándar interno*. Proceder según se indica en *Preparación estándar* comenzando donde dice: "agitar vigorosamente durante 2 minutos...".

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Valerato de Betametasona*. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en la Loción de Valerato de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BETAMETASONA, VALERATO DE UNGÜENTO TÓPICO

Definición - El Ungüento Tópico de Valerato de Betametasona debe contener una cantidad de Valerato de Betametasona ($C_{27}H_{37}FO_6$) equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de betametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$) en un apropiado ungüento base y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Valerato de Betametasona SR-FA. Dipropionato de Beclometasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Valerato de Betametasona*.

Diluyente - Ácido acético y alcohol (1 en 1.000).

Solución del estándar interno - Pesar exactamente alrededor de 20 mg de Dipropionato de Beclometasona SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 30 mg de Valerato de Betametasona SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un recipiente apropiado con tapa, agregar 10,0 ml de *Solución del estándar interno* y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,2 mg de Valerato de Betametasona SR-FA por ml.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Ungüento Tópico de Valerato de Betametasona, equivalente a 2,5 mg de betametasona, a un tubo de centrifuga de 50 ml, agregar 10,0 ml de *Solución del estándar interno* y 5,0 ml de *Diluyente*. Tapar el tubo y calentar en baño de agua a 70 °C con agitación hasta la fusión de la muestra en ensayo. Remover del baño y agitar hasta que vuelva a solidificar. Repetir el calentamiento y la agitación dos veces más. Colocar el tubo en baño de hielo-metanol durante 20 minutos y centrifugar para separar las fases. Transferir el sobrenadante a otro recipiente con tapón y dejar reposar hasta que alcance temperatura ambiente.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Valerato de Betametasona*. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en el Ungüento Tópico de Valerato de Betametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

BIPERIDENO, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Biperideno deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{29}NO \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Biperideno SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor. [NOTA: inmediatamente antes de usar calentar la placa a 105 °C durante 1 hora y dejar enfriar].

Fase móvil - Metanol e hidróxido de amonio (100:1,5).

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 10 mg de clorhidrato de biperideno a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Agregar 5 ml de agua, mezclar y sonicar para dispersar el polvo. Agregar 5 ml de metanol, mezclar y sonicar durante 15 minutos. Filtrar la solución en una ampolla de decantación, agregar 2 ml de hidróxido de sodio 1 N y 10 ml de cloroformo y agitar aproximadamente durante 3 minutos. Filtrar y transferir la fase clorofórmica a un matraz con tapa y emplear esta solución.

Solución estándar - Proceder según se indica en *Solución muestra* empleando 10 mg de Clorhidrato de Biperideno SR-FA. .

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 μ l de la *Solución muestra* y 20 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Exponer la placa a vapores de yodo en una cámara cerrada durante 10 minutos: el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 500 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad disuelta mediante la siguiente técnica.

Solución A - Disolver 38 g de fosfato monobásico de sodio y 2 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, a 1 litro con agua. Ajustar a pH $5,3 \pm 0,1$, si fuera necesario.

Solución B - Disolver 400 mg de púrpura de bromocresol en 30 ml de agua, agregar 6,3 ml de hidróxido de sodio 0,1 N y diluir a 500 ml con agua.

Solución reguladora de fosfato con púrpura de bromocresol - Mezclar volúmenes iguales de *Solución A*, *Solución B* y cloroformo, agitar en una ampolla de decantación y descartar el cloroformo. Si se desarrolla color en la solución, se debe repetir con porciones adicionales de cloroformo hasta que no se observe coloración.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Biperideno SR-FA en metanol y diluir cuantitativamente con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,8 mg por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 500 ml, agregar ácido clorhídrico 0,01 N, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 25 ml de esta solución a un vaso de precipitados y ajustar a pH 5,3 con hidróxido de sodio 0,01 N. Transferir esta solución a un matraz aforado de 100 ml con la ayuda de agua, completar a volumen con agua y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 2 μ g por ml.

Solución muestra - Transcurridos los 45 minutos, tomar 75 ml del medio de disolución, filtrar y transferir 50 ml del filtrado a un vaso de precipitados. Ajustar a pH 5,3 con hidróxido de sodio 0,01 N. Transferir esta solución a un matraz aforado de 100 ml con la ayuda de agua, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Transferir a sendas ampollas de decantación 20 ml de la *Solución estándar*, 20 ml *Solución muestra* y 20 ml de agua para preparar un *Blanco*, conteniendo cada una 10,0 ml de *Solución reguladora de fosfato con púrpura de bromocresol*. Realizar una extracción con 40,0 ml de cloroformo durante 10 minutos. Luego de separadas las fases, filtrar cada extracto clorofórmico a través de papel de filtro en matraces separados con tapón de vidrio, descartando los primeros 10 ml de cada filtrado. Determinar la cantidad de $C_{21}H_{29}NO \cdot HCl$ disuelta, a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda

de máxima absorción, 408 nm, en celdas de 1 cm, de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, empleando el *Blanco* para ajustar a cero la lectura del aparato.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{21}H_{29}NO \cdot HCl$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 220 nm y una columna de 12,5 cm × 4,0 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro, desactivada para bases. Mantener la temperatura de la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato pH 2,3 - Pesar alrededor de 6,8 g de fosfato monobásico de potasio y disolver en 700 ml de agua. Ajustar a pH 2,3 con ácido fosfórico y completar a 1 litro con agua.

Fase móvil - Solución reguladora de fosfato pH 2,3 y acetonitrilo (65:35). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Metanol y agua (65:35).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 20 mg de Clorhidrato de Biperideno SR-FA y transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 50 ml de *Diluyente*, sonicar hasta disolución total y completar a volumen con *Diluyente*. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Biperideno. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 4 mg de clorhidrato de biperideno, transferir a un matraz aforado de 50 ml y agregar 25 ml de *Diluyente*. Agitar mecánicamente durante 30 minutos, completar a volumen con *Diluyente* y centrifugar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{29}NO \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Biperideno, de acuerdo a la cantidad declarada.

BLEOMICINA, SULFATO

PARA INYECCIÓN

Definición - Sulfato de Bleomicina para Inyección debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de Bleomicina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Bleomicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Sulfato de Bleomicina*.

B - Debe responder al ensayo de *Identificación B* en *Sulfato de Bleomicina*.

Aspecto de la solución reconstituida

Reconstituir el Sulfato de Bleomicina para Inyección según se indica en el rótulo. La solución reconstituida debe cumplir con los requisitos en 280. *Disolución completa* y estar libre de partículas extrañas cuando se realiza una inspección visual.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 6,0, determinado sobre una solución de aproximadamente 10 Unidades de Bleomicina por ml.

Determinación de agua <120>

Titulación coulombimétrica. No más de 6,0 %. Preparar la muestra según se indica a continuación: emplear una jeringa seca para inyectar 4,0 ml de metanol anhidro a través de los tapones de dos envases previamente pesados, y agitar para disolver. Con la misma jeringa, extraer el contenido de los dos envases, transferir al vaso de titulación y titular volumétricamente. Emplear 8,0 ml de metanol anhidro para realizar un blanco. Determinar los pesos de los envases vacíos y calcular el porcentaje de agua.

Contenido de cobre

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Contenido de cobre* en *Sulfato de Bleomicina*.

Contenido de bleomicinas

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Contenido de bleomicinas* en *Sulfato de Bleomicina*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 10,0 Unidades de Endotoxina por Unidad de Bleomicina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica en *Método de filtración por membrana*, empleando el contenido completo de cada envase.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Reconstituir un envase de Sulfato de Bleomicina para Inyección según se indica en el rótulo. Retirar todo el contenido extraíble y diluir cuantitativamente con *Solución reguladora N° 16* para obtener una solución de concentración apropiada.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Sulfato de Bleomicina*

BUDESONIDA

AEROSOL

Definición - El Aerosol de Budesonida debe contener no menos de 80,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada $C_{25}H_{34}O_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Budesonida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases sellados, a una temperatura que no exceda los 25 °C.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención de los picos principales en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se deben corresponder con el de los obtenidos en la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos de administración inhalatoria.

Ensayos farmacotécnicos para aerosoles <390>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Número total de descargas por envase y Peso de la dosis para Aerosoles dosificadores*.

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Microscopía en Tamaño de partícula*.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Aerosoles dosificadores*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 240 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato - Pesar alrededor de 4,0 g fosfato monobásico de sodio, agregar 980 ml de agua y ajustar a pH $3,2 \pm 0,2$ con ácido fosfórico.

Fase móvil - *Solución reguladora de fosfato* y acetonitrilo (98:80). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en *100. Cromatografía*).

Preparación estándar - Preparar una solución de Budesonida SR-FA en alcohol de aproximadamente 10 µg por ml.

Preparación muestra - Quitar el actuador al aerosol y limpiar el envase, retirando las etiquetas y toda marca que pueda presentar con un solvente apropiado. Secar, colocar nuevamente el actuador, agitar durante 20 segundos, descargar una dosis, esperar no más de 5 segundos y descargar nuevamente. Colocar en un vaso de precipitados de 50 ml, un disco de acero de aproximadamente 3 cm de diámetro y 5 mm de altura, que posee tres patas de aproximadamente 7 mm de altura y un agujero central de 3 mm de diámetro y agregar alcohol hasta cubrir unos 5 mm por encima de la superficie del disco. Agitar el aerosol y colocar invertido sobre el disco, introduciendo el vástago en el agujero central. Descargar una pulsación, presionando el aerosol contra el disco [NOTA: la descarga pasa a través del agujero central]. Retirar el aerosol del vaso, enjuagando el casquillo y el vástago, tanto interna como externamente, con alcohol. Transferir el contenido del vaso a un matraz aforado de 25 ml, enjuagar el vaso y el disco con alcohol y completar a volumen con el mismo solvente. La solución así obtenida contiene aproximadamente 8,0 µg de budesonida por ml.

Aptitud del sistema (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos correspondientes al epímero A y al epímero B no debe ser menor de 1,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas, de la suma de las respuestas de los dos epímeros, no debe ser mayor de 2,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación muestra* y las *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{25}H_{34}O_6$ en el Aerosol de Budesonida, a partir de la suma de las respuestas de los picos de los dos epímeros y de acuerdo a la cantidad declarada.

BUPIVACAÍNA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Bupivacaína es una solución estéril de *Clorhidrato de Bupivacaína en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{18}H_{28}N_2O \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Bupivacaína SR-FA

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Diluir un volumen de Solución Inyectable de Clorhidrato de Bupivacaína, equivalente a 50 mg de clorhidrato de bupivacaína, con ácido clorhídrico 0,01 N a 25 ml y proceder según se indica en 490. *Identificación de bases orgánicas nitrogenadas*, comenzando donde dice “*Transferir el líquido a una ampolla de decantación...*”. La Solución Inyectable de Clorhidrato de Bupivacaína debe cumplir con los requisitos.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico de principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 6,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 2,5 Unidades de Endotoxina por mg de Clorhidrato de Bupivacaína.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 263 nm y una columna de 12,5 cm × 4 mm con fase estacionaria constituida

por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,3 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato de pH 6,8 - Disolver 1,94 g de fosfato monobásico de potasio y 2,48 g de fosfato dibásico de potasio en 800 ml de agua. Ajustar a pH 6,8, si fuera necesario, con hidróxido de potasio 1 N o ácido fosfórico 1 M. Completar a 1 litro con agua.

Fase móvil - Acetonitrilo y *Solución reguladora de fosfato de pH 6,8* (70:30). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*). [NOTA: preparar esta solución en el momento de uso].

Diluyente - Acetonitrilo y agua (65:35).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 40 mg de Clorhidrato de Bupivacaína SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml y disolver con *Diluyente*, sonicar si fuera necesario. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Clorhidrato de Bupivacaína, equivalente a 10 mg de clorhidrato de bupivacaína, a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{18}H_{28}N_2O \cdot HCl$ en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Bupivacaína, de acuerdo a la cantidad declarada.

CALCIO, GLUCONATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Gluconato de Calcio es una solución estéril de *Gluconato de Calcio Calidad Inyectable en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad total de calcio declarada en el rótulo y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Gluconato de Potasio SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Una dilución 1 en 5 de la Solución Inyectable de Gluconato de Calcio en agua debe responder a los ensayos para *Calcio* <410>.

B - Una dilución 1 en 100 de la Solución Inyectable de Gluconato de Calcio debe responder al *Ensayo B de Identificación en Gluconato de Calcio Calidad Inyectable*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 6,0 y 8,2.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,17 Unidades de Endotoxina por mg de Gluconato de Calcio.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectable <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

A un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Gluconato de Calcio, equivalente a 500 mg de gluconato de calcio, agregar 2 ml de ácido clorhídrico 3 N y diluir a 150 ml con agua. Agregar aproximadamente 20 ml de edetato disódico 0,05 M (SV) desde una bureta de 50 ml, en constante agitación. Agregar 15 ml de hidróxido de sodio 1 N y 300 mg de azul de hidroxinaftol triturado y continuar la titulación hasta punto final azul. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de edetato disódico 0,05 M equivale a 2,004 mg de Ca.

ROTULADO

Indicar en el rótulo si la Solución Inyectable de Gluconato de Calcio presenta sales de calcio agregadas, calculado como porcentaje de calcio en la solución inyectable. Indicar la concentración osmolar total en mOsmol por litro. Cuando el contenido sea menor de 100 ml, o cuando en el rótulo se indique que la Solución Inyectable no es para inyección directa sino que se debe diluir antes de usar, se puede declarar la concentración osmolar total en mOsmol por ml.

CARBAMAZEPINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Carbamazepina deben contener no menos de 92,0 por ciento y no más de 108,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{15}H_{12}N_2O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Carbamazepina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto, preferentemente de vidrio.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 250 mg de carbamazepina a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Transferir a un vaso de precipitados de 50 ml, calentar a ebullición con 15 ml de acetona durante 5 minutos. Filtrar la solución en caliente a un segundo vaso de precipitados con la ayuda de dos porciones de 5 ml de acetona caliente. Evaporar con ayuda de nitrógeno hasta 5 ml y enfriar en un baño de hielo hasta que se formen cristales. Filtrar, lavar con 3 ml de acetona fría y secar al vacío a 70 °C durante 30 minutos: los cristales obtenidos deben responder al ensayo de *Identificación A* en *Carbamazepina*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: agua conteniendo lauril sulfato de sodio al 1 %; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{15}H_{12}N_2O$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 288 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Carbamazepina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancias - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{12}N_2O$ se debe disolver en 60 minutos. Emplear la *Tabla de Aceptación 1* en 530. *Liberación de principios activos*, con las siguientes excepciones: a los 60 minutos en N_2 ninguna unidad debe liberar menos de $Q - 5$ %; en N_3

ninguna unidad debe liberar menos de $Q - 10$ %; y no más de 2 de las 24 unidades deben liberar menos de $Q - 5$ %.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de agua

Determinar el contenido de agua procediendo según se indica en 680. *Pérdida por secado*. Reducir a polvo fino veinte Comprimidos de Carbamazepina y pesar exactamente alrededor de 1,5 g en una cápsula seca previamente pesada. Secar a 120 °C durante 2 horas: no debe perder más de 5,0 % de su peso.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Carbamazepina*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Carbamazepina SR-FA en metanol y diluir cuantitativamente con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml. Transferir 5 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con *Diluyente*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Carbamazepina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 25 mg de carbamazepina, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 40 ml de metanol, sonicar durante aproximadamente 15 minutos y dejar en reposo hasta alcanzar temperatura ambiente. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar, descartando los primeros 10 ml de filtrado. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con una mezcla de metanol y agua (1:1) y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Carbamazepina*. Calcular la cantidad de $C_{15}H_{12}N_2O$ en los Comprimidos de Carbamazepina, de acuerdo a la cantidad declarada.

CARBOPLATINO

PARA INYECCIÓN

Definición - Carboplatino para Inyección es una mezcla estéril de *Carboplatino* y *Manitol*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_{12}N_2O_4Pt$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Precaución - Evitar el contacto con la piel y mucosas. *Carboplatino es carcinógeno.*

Sustancia de referencia - Carboplatino SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Aspecto de la solución reconstituida

Reconstituir el Carboplatino para Inyección según se indica en el rótulo. La solución reconstituida debe cumplir con los requisitos en *280. Disolución completa* y estar libre de partículas extrañas cuando se realiza una inspección visual.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,0; determinado sobre la solución reconstituida según se indica en el rótulo con *Agua para Inyectables*.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 %. Emplear formamida anhidra como solvente y proceder según se indica a continuación. Introducir aproximadamente 50 ml de formamida anhidra en el recipiente de titulación y titular con *Reactivo* hasta punto final electrométrico. Emplear la formamida así secada para enjuagar una jeringa de vidrio apropiada, equipada con una aguja calibre 22, de aproximadamente 8 cm de largo. Agregar el enjuague nuevamente al vaso de titulación y, si fuera necesario, titular nuevamente el contenido del vaso. Con la jeringa, extraer 5,0 ml de la formamida titulada de esta manera y, a través del cierre del recipiente, introducir el contenido dentro del envase de Carboplatino para Inyección. Agitar para disolver. Con la misma jeringa, extraer todo el contenido del envase y transferir al recipiente de titulación. Titular volumétricamente hasta punto

final, ajustando el control de velocidad al valor más bajo, para evitar la sobretitulación.

Límite de ácido 1,1-ciclobutanodicarboxílico

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Límite de ácido 1,1-ciclobutanodicarboxílico* en *Carboplatino*.

Solución estándar - - Disolver una cantidad exactamente pesada de ácido 1,1-ciclobutanodicarboxílico en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml. Transferir 2,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución muestra - Disolver cuantitativamente el contenido de un envase de Carboplatino para Inyección en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml [NOTA: emplear dentro de las dos horas de preparada.]

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Límite de ácido 1,1-ciclobutanodicarboxílico* en *Carboplatino*. Calcular la cantidad en porcentaje de ácido 1,1-ciclobutanodicarboxílico en Carboplatino para Inyección. No debe contener más de 1,0 % de ácido 1,1-ciclobutanodicarboxílico.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,54 Unidades de Endotoxina por mg de carboplatino.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica en *Método de filtración por membrana*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Carboplatino*.

Preparación muestra - Disolver cuantitativamente el contenido de un envase de Carboplatino para Inyección en agua para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml [NOTA: emplear esta solución dentro de las dos horas de preparada.]

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Carboplatino*. Calcular la cantidad de $C_6H_{12}N_2O_4Pt$ en Carboplatino para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

CARMUSTINA

PARA INYECCIÓN

Definición - La Carmustina para Inyección debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_5H_9Cl_2N_3O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de vidrio Tipo I, en un refrigerador.

Precaución - Manipular con cuidado evitando su inhalación y el contacto con la piel.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder al ensayo de *Identificación* en *Carmustina*.

Aspecto de la solución reconstituida

Reconstituir la Carmustina para Inyección según se indica en el rótulo. La solución reconstituida debe cumplir con los requisitos en *280. Disolución completa*, ser transparente e incolora y estar libre de partículas extrañas cuando se realiza una inspección visual.

Determinación del pH <250>

Entre 5,6 y 6,0. Reconstituir la Carmustina para Inyección según se indica en el rótulo. Transferir cuantitativamente a un vaso de precipitados de 50 ml, agregar 27 ml de *Agua para Inyectables*, mezclar y determinar el valor de pH.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 1 %, determinado sobre 0,5 g de Carmustina.

Ensayo de pirogénos <340>

Debe cumplir con los requisitos. Reconstituir la Carmustina para Inyección según se indica en el rótulo y diluir con Solución fisiológica (SR) estéril para obtener una solución de aproximadamente 1,67 mg de carmustina por ml. Inyectar 2 ml de esta solución por kg de peso corporal.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Pesar exactamente una cantidad de Carmustina para inyección, equivalente a 100,0 mg de carmustina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en 30 ml de alcohol absoluto, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 3,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Carmustina*.

CEFADROXILO

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Cefadroxilo deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Cefadroxilo SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta determinadas a la longitud de onda de máxima absorción, 263 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Cefadroxilo SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ se debe disolver en 30 minutos.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 7,0 %.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de pH 5,0, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Cefadroxilo*.

Preparación muestra - Extraer el contenido de no menos de diez Cápsulas de Cefadroxilo y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a

200 mg de cefadroxilo, transferir a un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con *Solución reguladora de pH 5,0* y agitar durante 5 minutos. [NOTA: emplear esta solución en el día de su preparación].

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Cefadroxilo*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ en las Cápsulas de Cefadroxilo, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo cuando las Cápsulas de Cefadroxilo se preparan empleando la forma hemihidratada de Cefadroxilo.

CEFADROXILO

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Cefadroxilo deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Cefadroxilo SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta determinadas a la longitud de onda de máxima absorción, 263 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Cefadroxilo SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 8,0 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de pH 5,0, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Cefadroxilo*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de diez Comprimidos de Cefadroxilo.

lo. Transferir una porción exactamente pesada, equivalente a 200 mg de cefadroxilo, a un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con *Solución reguladora de pH 5,0* y agitar durante 5 minutos. [NOTA: emplear esta solución en el día de preparación].

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Cefadroxilo*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ en los Comprimidos de Cefadroxilo, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo cuando los Comprimidos de Cefadroxilo se preparan empleando la forma hemihidratada de Cefadroxilo.

CEFADROXILO

PARA SUSPENSIÓN ORAL

Cefadroxilo para Suspensión Oral, de acuerdo a la cantidad declarada.

Definición - Cefadroxilo para Suspensión Oral debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Cefadroxilo SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 2,0 %.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 6,0, determinado sobre la suspensión reconstituida según se indica en el rótulo.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de pH 5,0, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Cefadroxilo*.

Preparación muestra - Reconstituir un envase del Cefadroxilo para Suspensión Oral según se indica en el rótulo. Transferir un volumen exactamente medido, equivalente a 250 mg de cefadroxilo, a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con *Solución reguladora de pH 5,0*, agitar durante 5 minutos y filtrar. [NOTA: preparar la solución en el día de su uso].

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Cefadroxilo*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{17}N_3O_5S$ en

CEFALEXINA COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Cefalexina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Cefalexina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 20 µg por ml y determinar la cantidad de $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, a 262 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Cefalexina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ se debe disolver en 30 minutos.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 9,0 %.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución de fosfato, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Cefalexina*.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Cefalexina SR-FA y transferir a un matraz aforado de 25 ml, agregar 10 ml de diluyente,

sonicar 10 minutos hasta disolución total, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con agua.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Cefalexina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de cefalexina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 50 ml de agua, sonicar 10 minutos, completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar o centrifugar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con agua.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Cefalexina*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ en los Comprimidos de Cefalexina, de acuerdo a la cantidad declarada.

CEFALEXINA

PARA SUSPENSIÓN ORAL

Definición - Cefalexina para Suspensión Oral debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ en la suspensión reconstituida según se indica en el rótulo y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Cefalexina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 6,0; determinado en la suspensión reconstituida según se indica en el rótulo.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 2,0 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución de fosfato, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Cefalexina*.

Preparación muestra - Reconstituir Cefalexina para Suspensión Oral, según se indica en el rótulo. Transferir un volumen exactamente medido de la suspensión recientemente mezclada y libre de burbujas, equivalente a 250 mg de cefalexina, a un matraz aforado de 250 ml, agregar 150 ml de agua, sonicar 10 minutos y agitar mecánicamente 10 minutos más. Completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con agua.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Cefalexina*.

Calcular la cantidad de $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ en Cefalexina para Suspensión Oral reconstituida, de acuerdo a la cantidad declarada.

CICLOFOSFAMIDA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Ciclofosfamida deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ciclofosfamida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto, a una temperatura no mayor de 30 °C.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Pulverizar una cantidad apropiada de los Comprimidos de Ciclofosfamida, pesar una cantidad equivalente a 50 mg de ciclofosfamida y extraer con 25 ml de cloroformo. Filtrar 2 ml de la fase clorofórmica, mezclar con 500 mg de bromuro de potasio y evaporar hasta sequedad. El espectro de absorción infrarroja de la dispersión en bromuro de potasio se debe corresponder con el de una preparación similar de Ciclofosfamida SR-FA.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido en la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua desgasificada; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario y determinar la cantidad de $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico y Fase móvil - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ciclofosfamida SR-FA en agua y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, para obtener una solución de concentración conocida similar a la de la solución en ensayo.

Aptitud del sistema - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ l) de la *Solución estándar* y de las soluciones en ensayo, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ disuelta.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido.

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Ciclofosfamida a un matraz aforado apropiado de modo tal que la concentración final sea aproximadamente 1 mg de ciclofosfamida anhidra por ml. Llenar con agua hasta la mitad, agitar durante 30 minutos, completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar y transferir 25,0 ml del filtrado a un matraz de 50 ml, agregar 5,0 ml de *Solución del estándar interno*, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración*. Calcular la cantidad de $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ en cada Comprimido de Ciclofosfamida.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Ciclofosfamida*.

Preparación muestra - Transferir no menos de diez Comprimidos de Ciclofosfamida a un matraz aforado apropiado de modo tal que la concentración final sea aproximadamente 1 mg de ciclofosfamida anhidra por ml. Llenar con agua hasta la mitad, agitar durante 30 minutos, completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar y transferir 25,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 50 ml, agregar 5,0 ml de *Solución del estándar interno*, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Ciclofosfamida*. Calcular la cantidad de $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ en los Comprimidos de Ciclofosfamida, de acuerdo a la cantidad declarada.

CICLOFOSFAMIDA

PARA INYECCIÓN

Definición - Ciclofosfamida para Inyección debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ciclofosfamida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de vidrio Tipo I, a una temperatura no mayor de 30 °C.

ENSAYOS

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido en la *Preparación estándar*, ambos relativos al estándar interno.

Aspecto de la solución reconstituida

Reconstituir la Ciclofosfamida para Inyección según se indica en el rótulo. La solución reconstituida debe cumplir con los requisitos en 280. *Disolución completa* y estar libre de partículas extrañas cuando se realiza una inspección visual.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 9,0, con un intervalo no mayor a 3 unidades de pH; determinado sobre una solución de Ciclofosfamida para Inyección que contenga el equivalente a 20 mg de ciclofosfamida anhidra por ml. [NOTA: realizar la determinación 30 minutos luego de preparada la solución.]

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,20 Unidades de Endotoxina por mg de ciclofosfamida.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Ciclofosfamida*.

Preparación muestra - Pesar exactamente una

cantidad de Ciclofosfamida para Inyección, equivalente a 200 mg de ciclofosfamida anhidra, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar 50 ml de agua, agitar durante aproximadamente 5 minutos, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 25,0 ml de esta solución y 5,0 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ en Ciclofosfamida para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

CICLOSPORINA

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Ciclosporina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ciclosporina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 150 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N que contenga 0,5 % de lauril sulfato de sodio; 1000 ml.

Tiempo: 90 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad disuelta de $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ por la técnica siguiente.

Sistema cromatográfico - Proceder según se indica en *Valoración*.

Fase móvil - Acetonitrilo, agua, metanol y ácido fosfórico (900:450:50:0,5). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Pesar exactamente una cantidad apropiada de Ciclosporina SR-FA, disolver y diluir con *Medio* para obtener una solución de aproximadamente 0,001*T* mg por ml, siendo *T* la cantidad declarada en mg de ciclosporina en cada cápsula. Transferir 25,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,0005*T* mg de Ciclosporina SR-FA por ml, siendo *T* la cantidad declarada de ciclosporina en el rótulo.

Solución muestra - Transferir 5,0 ml de la solución en ensayo filtrada a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor de 7.000 platos teóricos, la desviación estándar relati-

va para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ disuelta.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ se debe disolver en 90 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de agua <120>

No debe contener más de 3,5 % determinado sobre el polvo fino contenido en las cápsulas.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 210 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por trimetilsilano unido químicamente a partículas de sílice porosa, de 3 a 10 μ m de diámetro. Mantener la temperatura de la columna aproximadamente a 70 °C. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Acetonitrilo, agua, metanol y ácido fosfórico (605:400:50:0,5). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Acetonitrilo, tetrahidrofurano y alcohol absoluto (9:5:4).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Ciclosporina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 25 ml, agregar 2,5 ml de agua y sonicar durante 10 minutos. Agregar 10 ml de *Diluyente*, sonicar durante 5 minutos, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Preparación madre de la muestra - Extraer el contenido de veinte Cápsulas de Ciclosporina y transferir a un matraz aforado apropiado para obtener una solución de aproximadamente 10 mg de ciclosporina por ml. Agregar un volumen de agua equivalente a un décimo del volumen del matraz y sonicar durante 10 minutos. Agregar 0,4 volúmenes de *Diluyente*, sonicar durante 5 minutos más, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Preparación muestra - Transferir 5,0 ml de la *Preparación madre de la muestra* a un matraz afora-

do de 50 ml, agregar 5,0 ml de agua, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor de 700 platos teóricos, el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,5, la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ en las Cápsulas de Ciclosporina, de acuerdo a la cantidad declarada.

CIPROFLOXACINO

SOLUCIÓN OFTÁLMICA

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda:
“Descartar una vez finalizado el tratamiento”.

Definición - La Solución Oftálmica de Ciprofloxacina es una solución acuosa estéril de *Clorhidrato de Ciprofloxacino*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Ciprofloxacino SR-FA. Impureza B de Ciprofloxacino SR-FA: Clorhidrato del ácido 7-[(2-aminoetil)amino]-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico (Análogo etilendiamino de Ciprofloxacino).

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH<250>

Entre 3,5 y 5,5.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Ciprofloxacino*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Ciprofloxacino SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 0,14 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Ciprofloxacino, equivalente a 6 mg de ciprofloxacino, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ en la Solución Oftálmica de Ciprofloxacino, de acuerdo a la cantidad declarada.

CIPROFLOXACINO

UNGÜENTO OFTÁLMICO

Definición - El Ungüento Oftálmico de Ciprofloxacino debe contener una cantidad de *Clorhidrato de Ciprofloxacino* equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Ciprofloxacino SR-FA. Impureza B de Ciprofloxacino SR-FA: Clorhidrato del ácido 7-[(2-aminoetil)amino]-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico (Análogo etilendiamino de Ciprofloxacino).

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido neto del envase
<220>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Método de filtración por membrana en Procedimiento general*.

Partículas metálicas en ungüentos oftálmicos
<660>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fosfato de tetrabutilamonio 0,005 M - Preparar una solución de tetrabutilamonio 0,005 M y ajustar a pH 2,0 con ácido fosfórico.

Fase móvil - Fosfato de tetrabutilamonio 0,005 M y metanol (75:25). Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Ciprofloxacino SR-FA en ácido clorhídrico 0,1 N para obtener una solución de aproximadamente 0,033 mg por ml.

Solución de resolución - Disolver una cantidad de Impureza B de Ciprofloxacino SR-FA en una porción de *Preparación estándar* para obtener una solución de aproximadamente 0,005 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Ungüento Oftálmico de Ciprofloxacino, equivalente a 750 μg de ciprofloxacino, a un recipiente con tapa, agregar 15 ml de éter de petróleo y agitar hasta dispersar el ungüento oftálmico. Retirar la tapa y calentar en un baño de agua a 60 °C durante 30 minutos rotándolo ocasionalmente. Remover del baño, colocar la tapa y agitar durante 1 o 2 minutos en caliente. Agregar 25,0 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y agitar durante aproximadamente un minuto. Permitir que las fases se separen y emplear la fase inferior acuosa.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,8 para la impureza B y 1,0 para ciprofloxacino; la resolución *R* entre los picos de impureza B y ciprofloxacino no debe ser menor de 2,0. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor que 500 platos teóricos; el factor de asimetría para el pico analizado no debe ser menor de 0,9 ni mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ en el Ungüento Oftálmico de Ciprofloxacino, de acuerdo a la cantidad declarada.

CIPROFLOXACINO, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Ciprofloxacino deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Ciprofloxacino SR-FA. Impureza B de Ciprofloxacino SR-FA: Clorhidrato del ácido 7-[(2-aminoetil)amino]-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico (Análogo etilendiamino de Ciprofloxacino).

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil - Proceder según se indica en *Identificación B* en *Ciprofloxacino*.

Solución estándar - Disolver una porción de Clorhidrato de Ciprofloxacino SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 1,5 mg de ciprofloxacino por ml.

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino cinco Comprimidos de Clorhidrato de Ciprofloxacino. Pesar una cantidad equivalente a 1,5 g de ciprofloxacino, transferir a un matraz aforado de 1 litro que contenga 750 ml de agua y sonicar durante 20 minutos. Completar a volumen con agua y mezclar. Centrifugar una porción de esta suspensión y emplear el sobrenadante.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Identificación B* en *Ciprofloxacino*, excepto que se deben aplicar 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de

máxima absorción, 276 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Ciprofloxacino SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Solución de resolución - Proceder según se indica en *Valoración* en *Clorhidrato de Ciprofloxacino*.

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad de Clorhidrato de Ciprofloxacino SR-FA y disolver en agua hasta obtener una solución de aproximadamente 0,3 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir no menos de cinco Comprimidos de Clorhidrato de Ciprofloxacino a un matraz aforado de 500 ml, agregar 400 ml de agua y sonicar durante 20 minutos. Completar a volumen con agua y mezclar. Diluir una porción de esta solución para obtener una solución de aproximadamente 0,25 mg de ciprofloxacino por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración* en *Clorhidrato de Ciprofloxacino*. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Ciprofloxacino, de acuerdo a la cantidad declarada.

CITARABINA

PARA INYECCIÓN

Definición - Citarabina para Inyección debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_9H_{13}N_3O_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Citarabina SR-FA.
Uracilarabinósido SR-FA

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Aspecto de la solución reconstituida

Reconstituir la Citarabina para Inyección según se indica en el rótulo. La solución reconstituida debe cumplir con los requisitos en 280. *Disolución completa* y estar libre de partículas extrañas cuando se realiza una inspección visual.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 %.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 6,0; determinado sobre una solución de aproximadamente 10 mg de citarabina por ml.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,07 Unidades de Endotoxina por mg de citarabina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica en *Método de filtración por membrana*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos para inyectables de pequeño volumen.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida

por octadecilsilano químicamente unida a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato - Disolver 0,73 g de fosfato monobásico de sodio y 1,4 g de fosfato dibásico de sodio en 1 litro de agua y mezclar.

Fase móvil - Solución reguladora de fosfato y metanol (95:5). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100. Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Citarabina SR-FA en agua y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con agua para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Solución de aptitud del sistema - Disolver una cantidad exactamente pesada de Uracilarabinósido SR-FA en *Preparación estándar*, y diluir cuantitativamente si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Preparación muestra - Reconstituir cinco envases de Citarabina para Inyección con agua según se indica en el rótulo. Combinar y mezclar las soluciones reconstituidas en un recipiente apropiado. Transferir un volumen exactamente medido, equivalente a 100 mg de citarabina, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Cromatografiar la *Solución aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 1,0 para citarabina y 1,3 para uracilarabinósido; y la resolución *R* entre los picos de citarabina y uracilarabinósido no debe ser menor de 2,5. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_9H_{13}N_3O_5$ en Citarabina para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

CLARITROMICINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Claritromicina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{38}H_{69}NO_{13}$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Claritromicina SR-FA. Impureza A de Claritromicina SR-FA: 6,11-di-*O*-Metileritromicina.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Solución reguladora de acetato de sodio 0,1 M - Pesar 13,61 g de acetato de sodio, transferir a un matraz aforado de 1 litro, agregar agua hasta disolver, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Ajustar a pH 5,0 con ácido acético 0,1 M.

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: *Solución reguladora de acetato de sodio 0,1 M*; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Fase móvil*, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 125 µg de claritromicina por ml. Determinar la cantidad de $C_{38}H_{69}NO_{13}$ disuelta según se indica en *Valoración*.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{38}H_{69}NO_{13}$ se debe disolver en 30 minutos.

Pérdida por secado <210>

Pesar una porción del polvo fino obtenido a partir de la *Preparación muestra* en *Valoración*, secar al vacío a una presión que no exceda los 5 mm de mercurio, a 110 °C durante 3 horas: no debe perder más de 6,0 % de su peso.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 210 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. Mantener la columna aproximadamente a 50 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Preparar una mezcla de metanol y fosfato monobásico de potasio 0,067 M (65:35), ajustar a pH 4,0 con ácido fosfórico. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación madre del estándar - Pesar exactamente una cantidad apropiada de Claritromicina SR-FA, disolver en metanol, agitar y sonicar hasta disolver y diluir con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 625 µg de claritromicina por ml.

Preparación estándar - Transferir 10,0 ml de la *Preparación madre del estándar* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución de resolución - Preparar una solución de Impureza A de Claritromicina SR-FA en metanol de aproximadamente 625 µg por ml. Transferir 10,0 ml de esta solución y 10,0 ml de la *Preparación madre del estándar* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino una cantidad de Comprimidos de Claritromicina equivalente a 2.000 mg de claritromicina, transferir a un matraz aforado de 500 ml, agregar 350 ml de metanol, agitar durante 30 minutos, completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y permitir que decante lo insoluble. Transferir 3,0 ml del sobrenadante a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativa deben ser aproximadamente 0,75 para claritromicina y 1,0 para la impureza A de claritromicina; la resolución *R* entre la claritromicina y la impureza A de claritromicina no debe ser menor de 2,0. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna, determinada sobre el pico de claritromicina, no debe ser menor de 750 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser menor de 0,9 y mayor de 1,5; la

desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (entre 20 y 50 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $\text{C}_{38}\text{H}_{69}\text{NO}_{13}$ en los Comprimidos de Claritromicina, de acuerdo a la cantidad declarada.

CLOFAZIMINA

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Clofazimina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{27}H_{22}Cl_2N_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clofazimina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza cromatográfica*. El valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los espectros de absorción obtenidos en *Valoración*. El espectro de absorción ultravioleta obtenido a partir de la *Preparación muestra* debe presentar máximos y mínimos de absorción a las mismas longitudes de onda que el obtenido con la *Preparación estándar*.

Ensayo de disgregación <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 500 ml.

Tiempo: 15 minutos.

Procedimiento - Colocar una Cápsula de Clofazimina en cada vaso y permitir que la Cápsula de Clofazimina descienda hasta el fondo del vaso antes de comenzar la rotación de la paleta. Observar las Cápsulas de Clofazimina y registrar los tiempos en que la cobertura de cada cápsula se rompe.

Tolerancia - El tiempo de ruptura de todas las Cápsulas de Clofazimina en ensayo no debe ser menor que 15 minutos. Si una o dos Cápsulas de Clofazimina se rompen en más de 15 minutos pero no más de 30 minutos, se debe repetir el ensayo con doce Cápsulas de Clofazimina adicionales. No deben romperse más de dos Cápsulas de Clofazimina de un total de dieciocho ensayadas en más de 15 minutos pero menos de 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control higiénico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Pureza cromatográfica

Fase estacionaria, Fase móvil, Solución de amoníaco y Procedimiento - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica en Clofazimina*.

Solución estándar A - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clofazimina SR-FA en cloruro de metileno y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml.

Solución estándar B - Diluir una porción de la *Solución estándar A* con cloruro de metileno para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Solución estándar C - Diluir una porción de la *Solución estándar A* con cloruro de metileno para obtener una solución de aproximadamente 0,04 mg por ml.

Solución muestra - Pesar una porción del contenido de las Cápsulas de Clofazimina, equivalente a 500 mg de clofazimina, transferir a un envase apropiado, agregar 25 ml de cloruro de metileno, 25 ml de hidróxido de sodio 0,1 N, mezclar y sonicar durante 30 minutos. Retirar la fase de cloruro de metileno y filtrar a través de sulfato de sodio anhidro.

VALORACIÓN

Ácido clorhídrico metanólico 0,1 N - Transferir 10 ml de ácido clorhídrico a un matraz aforado de 1 litro que contenga 500 ml de metanol, mezclar y completar a volumen con metanol.

Solución blanco - Transferir 5 ml de cloruro de metileno a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Ácido clorhídrico metanólico 0,1 N* y mezclar.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clofazimina SR-FA en cloruro de metileno y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con cloruro de metileno para obtener una solución de aproximadamente a 0,075 mg por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Ácido clorhídrico metanólico 0,1 N* y mezclar.

Preparación muestra - Remover, lo más completamente posible, el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Clofazimina con la ayuda de cloruro de metileno. Disolver en cloruro de metileno, filtrar la solución a través de una torunda de algodón y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,075 mg por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Ácido clorhídrico metanólico 0,1 N* y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*), de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, a la longitud de onda de máxima absorción, 491 nm,

empleando la *Solución blanco* para llevar a cero la lectura del aparato. Calcular la cantidad en mg de $C_{27}H_{22}Cl_2N_4$ en las Cápsulas de Clofazimina, en base a la cantidad declarada.

CLOMIPRAMINA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Clomipramina deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Clomipramina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - El espectro de absorción ultravioleta de la *Preparación muestra* obtenida en *Valoración* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de clomipramina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Disolver en 25 ml de agua y filtrar: debe responder a los ensayos para *Cloruros* <410>.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de disgregación <310>

No más de 30 minutos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Clomipramina, pesar una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de clomipramina, transferir a un matraz aforado de 250 ml, agregar 100 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y agitar durante 30 minutos. Completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y filtrar descartando los primeros mililitros del filtrado. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N y mezclar.

Preparación estándar - Preparar una solución de aproximadamente 20 µg de Clorhidrato de Clomipramina por ml del mismo modo que la

Preparación muestra, empleando Clorhidrato de Clomipramina SR-FA.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* a la longitud de onda de máxima absorción, 252 nm, con un espectrofotómetro, empleando como blanco ácido clorhídrico 0,1 N. Calcular la cantidad de $C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Clomipramina, de acuerdo a la cantidad declarada.

CLOMIPRAMINA, CLORHIDRATO DE GRAGEAS

Definición - Las Grageas de Clorhidrato de Clomipramina deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Clomipramina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - El espectro de absorción ultravioleta obtenido a partir de la *Preparación muestra* en *Valoración* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Eliminar la cubierta de no menos de diez Grageas de Clorhidrato de Clomipramina. Pesar y reducir a polvo fino, pesar una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de clomipramina, disolver con 25 ml de agua y filtrar: debe responder a los ensayos para *Cloruros* <410>.

C - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil, Revelador y Solución estándar - Proceder según se indica en *Ensayo de Identificación C* en *Comprimidos de Clorhidrato de Clomipramina*.

Solución muestra - Eliminar la cubierta de no menos de diez Grageas de Clorhidrato de Clomipramina. Pesar y reducir a polvo fino, pesar una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de clomipramina, agregar 20 ml de agua, agitar durante 10 minutos y filtrar. Transferir el filtrado a una ampolla de decantación y alcalinizar con hidróxido de sodio 2 N. Proceder con esta solución según se indica en *Solución estándar* comenzando donde dice "extraer con dos porciones...".

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Ensayo de Identificación C* en *Comprimidos de Clorhidrato de Clomipramina*. La mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder en valor de R_f , tamaño y color con los de la *Solución estándar*.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de disgregación <310>

No más de 60 minutos.

Control higiénico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Eliminar la cubierta de no menos de veinte Grageas de Clorhidrato de Clomipramina y proceder según se indica en *Valoración* en *Comprimidos de Clorhidrato de Clomipramina*.

Preparación estándar - Proceder según se indica en *Valoración* en *Comprimidos de Clorhidrato de Clomipramina*.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 252 nm, con un espectrofotómetro, empleando ácido clorhídrico 0,1 N como blanco. Calcular la cantidad en mg de $C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$ por Gragea de Clorhidrato de Clomipramina en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$CD(A_M/A_E)$$

en la cual C es la concentración en mg por ml de Clorhidrato de Clomipramina SR-FA, D es el factor de dilución de Clorhidrato de Clomipramina en la *Preparación muestra*, y A_M y A_E son las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

CLORANFENICOL

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Cloranfenicol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Cloranfenicol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 278 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Cloranfenicol SR-FA, en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Cloranfenicol*.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Cloranfenicol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar 10 ml de agua, sonicar y agitar hasta disolución completa. Completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación muestra - Transferir un número exacto de Cápsulas de Cloranfenicol, equivalente a

2.500 mg de cloranfenicol, a un recipiente apropiado, agregar 100 ml de agua y calentar en un baño de vapor hasta que las cápsulas se desintegren. Agregar 300 ml de agua y calentar en un baño de vapor durante 20 minutos, mezclando ocasionalmente. Enfriar a temperatura ambiente, transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 1 litro, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Cloranfenicol*. Calcular la cantidad de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ en las Cápsulas de Cloranfenicol, de acuerdo a la cantidad declarada.

CLORANFENICOL

COMPRIMIDOS

Cloranfenicol, de acuerdo a la cantidad declarada.

Definición - Los Comprimidos de Cloranfenicol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Cloranfenicol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disgregación <310>

Debe cumplir con los requisitos en un tiempo de 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Cloranfenicol*.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Cloranfenicol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar 10 ml de agua y calentar en un baño de vapor hasta disolución completa. Enfriar a temperatura ambiente, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Cloranfenicol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 500 mg de cloranfenicol, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar 80 ml de agua y calentar en un baño de vapor durante 20 minutos, mezclando ocasionalmente. Enfriar a temperatura ambiente, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Cloranfenicol*. Calcular la cantidad de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ en los Comprimidos de

CLORANFENICOL

SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Cloranfenicol es una solución estéril de *Cloranfenicol*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 130,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Cloranfenicol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto. Conservar en refrigerador hasta su dispensación.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 7,5.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Método de filtración por membrana*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Cloranfenicol*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Cloranfenicol SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 100 µg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Cloranfenicol, equivalente a 50 mg de cloranfenicol, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Cloranfenicol*. Calcular la cantidad de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ en la Solución Oftálmica de Cloranfenicol, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: “Descartar una vez finalizado el tratamiento”.

CLORANFENICOL

SOLUCIÓN ÓTICA

Definición - La Solución Ótica de Cloranfenicol es una solución estéril de *Cloranfenicol*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 130,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Cloranfenicol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre hermético.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 2,0 %.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 8,0, determinado sobre una solución diluida al medio con agua.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Método de filtración por membrana* en *Procedimiento general*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Cloranfenicol*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Cloranfenicol SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente y en etapas con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 100 µg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Ótica de Cloranfenicol, equivalente a 50 mg de cloranfenicol, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración* en *Cloranfenicol*. Calcular la cantidad de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ en la Solución Ótica de Cloranfenicol, de acuerdo a la cantidad declarada.

CLORANFENICOL, SUCCINATO SÓDICO DE PARA INYECCIÓN

Definición - El Succinato Sódico de Cloranfenicol debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más del 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Cloranfenicol SR-FA. Succinato Sódico de Cloranfenicol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos sellados para sólidos estériles, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil, Solución estándar A y Solución estándar B - Proceder según se indica en el ensayo de *Identificación A* en *Succinato Sódico de Cloranfenicol*.

Solución muestra - Pesar exactamente una cantidad del Succinato Sódico de Cloranfenicol para Inyección, equivalente a 20 mg de cloranfenicol, y disolver en 2 ml de acetona.

Procedimiento - Proceder según se indica en el ensayo de *Identificación A* en *Succinato Sódico de Cloranfenicol*.

B - Debe responder a los ensayos para *Sodio* <410>.

Determinación de pH <250>

Entre 6,0 y 7,0; determinado sobre una solución equivalente a 200 mg de Cloranfenicol por ml.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 5,0 %, determinado sobre 500 mg.

Ensayo de piretógenos <340>

Debe cumplir con los requisitos. Inyectar a cada conejo 2,0 ml de una solución de aproximadamente 1,8 mg de Cloranfenicol por ml en *Agua para inyectables*, por kilogramo de peso corporal.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos del ensayo.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Pesar el contenido de diez envases de Succinato Sódico de Cloranfenicol para Inyección y mezclar. Disolver una cantidad equivalente a 200 mg de cloranfenicol en agua y

diluir a 500 ml con el mismo solvente. Diluir 5 ml de esta solución a 100 ml con agua.

Preparación estándar - Preparar una solución de Succinato Sódico de Cloranfenicol SR-FA de aproximadamente 0,02 mg de cloranfenicol por ml en agua.

Procedimiento - Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* a la longitud de onda de máxima absorción, 276 nm, con un espectrofotómetro, empleando agua como blanco. Calcular el contenido de $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ en Succinato Sódico de Cloranfenicol para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cantidad de Succinato Sódico de Cloranfenicol en términos de cantidad equivalente a Cloranfenicol.

CLORFENIRAMINA MALEATO DE, COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Maleato de Clorfeniramina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Maleato de Clorfeniramina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 25 mg de maleato de clorfeniramina, a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración* y dispersar en aproximadamente 20 ml de ácido clorhídrico diluido 1 en 100.

Solución estándar - Disolver alrededor de 25 mg de Maleato de Clorfeniramina SR-FA en 20 ml de ácido clorhídrico diluido 1 en 100.

Procedimiento - Proceder con la *Solución muestra* y la *Solución estándar* del siguiente modo. Alcalinizar hasta pH 11,0 con solución de hidróxido de sodio (1 en 10). Extraer con dos porciones de 50 ml de éter de petróleo, recoger los extractos y evaporar hasta sequedad. Preparar una dispersión del residuo obtenido en aceite mineral y determinar el espectro de absorción infrarroja de la preparación en la región entre 2 y 12 μ m: el espectro de la *Solución muestra* debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 500 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$ disuelta a partir de las absorbancias al ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 265 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Maleato de Clorfeniramina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Maleato de Clorfeniramina. Transferir una porción exactamente pesada, equivalente a 4 mg de maleato de clorfeniramina, a una ampolla de decantación de 125 ml. Agregar 20 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100) y agitar durante 5 minutos. Agregar 20 ml de éter de petróleo, agitar cuidadosamente, filtrar la fase ácida y transferirla a una segunda ampolla de decantación de 125 ml. Agitar la fase etérea con dos porciones de 10 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100), filtrar cada porción de ácido, transferirla a la segunda ampolla de decantación y descartar el éter de petróleo. Agregar al extracto ácido 10 ml de hidróxido de sodio (SR) y 50 ml de éter de petróleo, agitar cuidadosamente y transferir la fase acuosa a una tercera ampolla de decantación de 125 ml que contenga 50 ml de éter de petróleo. Agitar la tercera ampolla de decantación cuidadosamente y descartar la fase acuosa. Lavar las dos soluciones de éter de petróleo, sucesivamente, con una sola porción de 20 ml de agua y descartar el agua. Extraer cada una de las dos soluciones de éter de petróleo con porciones de 20, 20 y 5 ml de ácido sulfúrico (1 en 70), en el orden enumerado, pero siempre extrayendo primero la solución de éter de petróleo de la tercera ampolla de decantación y luego de la segunda ampolla de decantación. Combinar los extractos ácidos en un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con ácido y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 40 mg de Maleato de Clorfeniramina SR-FA, disolver en 200,0 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100). Proceder con 20,0 ml de esta solución del mismo modo que con la *Preparación muestra*.

Procedimiento - Diluir 10,0 ml de la *Preparación muestra* y 10,0 ml de la *Preparación estándar* a 25,0 ml con ácido clorhídrico diluido (1 en 100) y determinar la absorbancia de cada solución a la longitud de onda de máxima absorción, 264 nm, empleando ácido clorhídrico diluido (1 en 100) como blanco. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$ en los Comprimidos de Maleato de Clorfeniramina, de acuerdo a la cantidad declarada.

CLORFENIRAMINA, MALEATO DE SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Maleato de Clorfeniramina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Maleato de Clorfeniramina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Evaporar el extracto remanente obtenido en *Valoración* en un baño de vapor hasta un menor volumen, transferir a un recipiente pequeño y continuar la evaporación hasta que los vapores de hexano no sean perceptibles. Transferir el residuo oleoso, con la ayuda de cuatro porciones de 3 ml de dimetilformamida, a una probeta graduada, diluir hasta un volumen de 15 ml y mezclar: la rotación óptica de la solución obtenida, en una celda de 100 mm y corregida por el blanco, no debe ser mayor de $+0,01^\circ$ (*diferencia con maleato de dexclorfeniramina*).

B - Absorción ultravioleta <470>

La *Preparación muestra* obtenida en *Valoración* debe presentar máximos de absorbancia a las mismas longitudes de onda que una solución de concentración similar de Maleato de Clorfeniramina SR-FA.

Determinación de alcohol <130>

Entre 6,0 y 8,0 % de alcohol.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Extracto ácido - Transferir 50 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100) a una ampolla de decantación, lavar con tres porciones de 30 ml de cloroformo, luego con 50 ml de éter de petróleo y descartar los lavados. Filtrar la fase ácida.

Preparación estándar - Pesar exactamente 40 mg de Maleato de Clorfeniramina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución a una ampolla de decantación, agregar 10 ml de solución de hidróxido de sodio (1 en 10) y

extraer con dos porciones de 50 ml de éter de petróleo. Combinar los extractos en una segunda ampolla de decantación, lavar con 10 ml de solución de hidróxido de sodio (1 en 250) y descartar los lavados. Extraer la solución etérea con porciones de 40 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100), transferir los extractos a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con el mismo ácido clorhídrico diluido y mezclar. Lavar una porción de 50 ml de la solución con tres porciones de 30 ml de cloroformo, luego con 50 ml de éter de petróleo y descartar los lavados. Filtrar la fase ácida.

Preparación muestra - Transferir 10,0 ml, exactamente medidos, de la Solución Oral de Maleato de Clorfeniramina a una ampolla de decantación y proceder según se indica en *Preparación estándar*, comenzando donde dice: "agregar 10 ml de solución de hidróxido de sodio (1 en 10)".

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 264 nm, con un espectrofotómetro, empleando el *Extracto ácido* como blanco. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$ en la Solución Oral de Maleato de Clorfeniramina, de acuerdo a la cantidad declarada.

CLOROQUINA, FOSFATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Fosfato de Cloroquina deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fosfato de Cloroquina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción ultravioleta <470>

El espectro de absorción ultravioleta obtenido a partir de la *Preparación muestra* en *Valoración* debe presentar máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que el de una solución similar de Fosfato de Cloroquina SR-FA, medido concomitantemente. El cociente A_{343}/A_{329} debe estar comprendido entre 1,00 y 1,15.

B - A 20 ml de una solución filtrada de los Comprimidos de Fosfato de Cloroquina en agua, equivalente a 20 mg fosfato de cloroquina por ml, agregar 5 ml de trinitrofenol (SR): se debe producir un precipitado amarillo. Filtrar, lavar el precipitado con agua hasta que el lavado sea incoloro y secar sobre gel de sílice: el precipitado debe fundir entre 205 y 210 °C.

Precaución - Los picratos pueden estallar.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 100 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 343 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Fosfato de Cloroquina SR-FA, en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Diluyente - Ácido clorhídrico diluido (1 en 1.000).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Fosfato de Cloroquina SR-FA en *Diluyente* y diluir cuantitativamente y en etapas con el mismo solvente hasta obtener una solución de aproximadamente 10 µg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Fosfato de Cloroquina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 800 mg de fosfato de cloroquina, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar aproximadamente 100 ml de agua y agitar durante 20 minutos. Completar a volumen con agua, mezclar y filtrar, descartando los primeros 50 ml del filtrado. Transferir 50 ml del filtrado transparente a una ampolla de decantación de 250 ml, agregar 5 ml de hidróxido de amonio 6 N, agitar y extraer la cloroquina liberada con cinco porciones de 25 ml de cloroformo. Lavar los extractos clorofórmicos combinados con 10 ml de agua y extraer el lavado de agua con 10 ml de cloroformo. Evaporar los extractos clorofórmicos combinados en un baño de vapor hasta aproximadamente 10 ml, agregar 50 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 250) y continuar calentando en el baño de vapor hasta no percibir más olor a cloroformo. Transferir la solución a un matraz aforado de 200 ml, lavar el recipiente de evaporación con porciones de *Diluyente*, agregando los lavados al matraz aforado, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Diluir esta solución cuantitativamente y en etapas con *Diluyente* hasta obtener una solución de aproximadamente 10 µg por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra* a la longitud de onda de máxima absorción, 343 nm, empleando *Diluyente* como blanco. Calcular la cantidad de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$ en los Comprimidos de Fosfato de Cloroquina, de acuerdo a la cantidad declarada.

CLOROQUINA, SULFATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Sulfato de Cloroquina deben contener no menos de 92,5 por ciento y no más de 107,5 por ciento de la cantidad declarada de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Cloroquina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>

Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de sulfato de cloroquina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Proceder según se indica en *Identificación A* en *Sulfato de Cloroquina*.

B - Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de sulfato de cloroquina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración* y agitar con 10 ml de agua y 1 ml de ácido clorhídrico 2 N. Filtrar y agregar 1 ml de cloruro de bario (SR): se debe producir un precipitado amarillo.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 344 nm, empleando como coeficiente de extinción específico $E(1\%, 1\text{ cm})$ en el máximo de absorción el valor de 450.

Tolerancia - No menos de 70 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$ se debe disolver en 45 minutos.

Pureza cromatográfica

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, ciclohexano y dietilamina (50:40:10).

Solución muestra - Reducir a polvo fino los Comprimidos de Sulfato de Cloroquina, pesar una

cantidad equivalente a 2,0 g de sulfato de cloroquina, agitar con 50 ml de agua durante 30 minutos, centrifugar y emplear el líquido sobrenadante. Filtrar, si fuera necesario.

Solución estándar A - Diluir 1,0 ml de la *Solución muestra* a 100 ml con agua.

Solución estándar B - Diluir 25,0 ml de la *Solución estándar A* a 50 ml con agua.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 2 μ l de la *Solución muestra* y 2 μ l de las *Soluciones estándar A* y *B*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Dejar secar la placa al aire. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta a 254 nm: ninguna mancha secundaria en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe ser más intensa que la mancha principal obtenida con la *Solución estándar A* y no más de una mancha de dichas manchas puede ser más intensa que la mancha principal obtenida con la *Solución estándar B*.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Sulfato de Cloroquina. Pesar una cantidad equivalente a 500 mg de sulfato de cloroquina, disolver en 20 ml de hidróxido de sodio 1 N. Extraer con cuatro porciones de 25 ml de cloroformo. Combinar los extractos clorofórmicos y evaporar hasta un volumen de aproximadamente 10 ml. Agregar 40 ml de ácido acético anhidro y titular con ácido perclórico 0,1 N (SV). Determinar el punto final potenciométricamente. Cada ml de ácido perclórico 0,1 N equivale a 20,90 mg de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot H_2SO_4$

CLORPROMACINA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Clorpromacina deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Clorpromacina SR-FA.

[NOTA: en todos los *Procedimientos* siguientes proteger la muestra, la *Sustancia de referencia* y las soluciones que la contienen, realizando los procedimientos sin demora, bajo luz de baja intensidad y empleando material de vidrio inactínico].

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Los Comprimidos de Clorhidrato de Clorpromacina deben responder al ensayo de *Identificación B* en *Clorhidrato de Clorpromacina*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 25 mg de clorhidrato de clorpromacina, a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*, suspender en 25 ml de agua y filtrar: la solución obtenida debe responder al ensayo de *Identificación C* en *Clorhidrato de Clorpromacina*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 254 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Clorpromacina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Otras fenotiacinas alquiladas

Fase estacionaria, *Fase móvil*, *Solución estándar*, *Solución estándar diluida* y *Procedimiento* -

Proceder según se indica en en *Otras fenotiacinas alquiladas* en *Clorhidrato de Clorpromacina*.

Solución muestra - [NOTA: si son grageas eliminar la cubierta de azúcar por lavado previo con agua]. Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de clorpromacina, a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un tubo de centrifuga con tapón, agregar 10 ml de metanol, agitar y centrifugar.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Clorpromacina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de clorhidrato de clorpromacina, transferir a un matraz aforado de 500 ml. Agregar aproximadamente 200 ml de agua y 5 ml de ácido clorhídrico, tapar y agitar durante 10 minutos. Completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar una porción de esta solución, descartando los primeros 50 ml del filtrado. Transferir 10 ml de la solución a una ampolla de decantación de 250 ml, agregar aproximadamente 20 ml de agua, alcalinizar con hidróxido de amonio y extraer con cuatro porciones de 25 ml de éter. Extraer los extractos etéreos combinados con cuatro porciones de 25 ml de ácido clorhídrico 0,1 N pasar una corriente de aire para eliminar el éter residual y transferir los extractos acuosos a un matraz aforado de 250 ml. Completar a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad de Clorhidrato de Clorpromacina SR-FA, disolver en ácido clorhídrico 0,1 N y diluir cuantitativamente y en etapas con el mismo solvente hasta obtener una solución de aproximadamente 8 µg por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, determinadas a las longitudes de onda de máxima absorción, 254 y 277 nm, con un espectrofotómetro, empleando ácido clorhídrico 0,1 N como blanco. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Clorpromacina de acuerdo a la cantidad declarada, relacionando las diferencias entre las absorbancias a 254 y 277 nm, para la *Solución muestra* y la *Solución estándar*.

CLORPROMAZINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Clorpromazina es una solución estéril de *Clorhidrato de Clorpromazina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 95 por ciento y no más de 105 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Clorpromazina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

[NOTA: proteger las muestras o soluciones de *Valoración*, la Sustancia de referencia y las soluciones que las contienen, realizando los procedimientos siguientes sin demora, bajo luz de baja intensidad o empleando material de vidrio inactivo].

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Éter y acetato de etilo saturado con hidróxido de amonio (50:50)

Solución estándar - Disolver una cantidad apropiada de Clorhidrato de Clorpromazina SR-FA en metanol diluido 9 en 10 para obtener una solución de aproximadamente 2,5 mg por ml.

Solución muestra - Transferir un volumen de Solución Inyectable de Clorhidrato de Clorpromazina, equivalente a 25 mg de clorhidrato de clorpromazina, a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 5 μ l de la *Solución muestra* y 5 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente de solvente y dejar secar al aire. Examinar bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Debe responder a los ensayos para *Cloruro* <410>.

Límite de sulfóxido de clorpromazina

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Éter y acetato de etilo saturado con hidróxido de amonio (50:50)

Solución estándar - Disolver una cantidad apropiada de Clorhidrato de Clorpromazina SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 50 μ g por ml.

Solución muestra - Transferir 4 ml de la *Solución muestra* preparada con metanol según se indica en *Ensayo de Identificación A*, a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución estándar* y 10 μ l de *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones con la ayuda de una corriente de nitrógeno y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar bajo luz ultravioleta a 254 nm: en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* puede aparecer una única mancha a excepción de la mancha principal; el tamaño e intensidad de la misma no deben ser mayores que el tamaño e intensidad que la mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar* (5,0 %).

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,4 y 5,4.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 6,9 Unidades de Endotoxina por mg de Clorhidrato de Clorpromazina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Clorhidrato de Clorpromazina, equivalente a

100 mg de clorhidrato de clorpromazina, a un matraz aforado de 500 ml, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución en una ampolla de decantación, agregar aproximadamente 20 ml de agua, alcalinizar con hidróxido de amonio y extraer con cuatro porciones de 25 ml de éter. Combinar los extractos etéreos, extraer con cuatro porciones de 25 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y transferir los extractos acuosos a un matraz aforado de 250 ml. Burbujear para eliminar el éter residual, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad apropiada de Clorhidrato de Clorpromazina SR-FA, disolver en ácido clorhídrico 0,1 N y diluir cuantitativamente y en etapas con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 8 µg por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, en celdas de 1 cm a las longitudes de onda de máxima absorción, 254 y 277 nm, con un espectrofotómetro apropiado, empleando ácido clorhídrico 0,1 N como blanco. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{19}ClN_2S \cdot HCl$ en de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Clorpromazina, relacionando las diferencias de las absorbancias a 254 y 277 nm obtenidas a partir de la *Solución muestra* y de la *Solución estándar*.

COLCHICINA, COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Colchicina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{22}H_{25}NO_6$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Colchicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarrojo <460>. *En fase sólida.*

Pesar exactamente una cantidad equivalente a 20 mg de colchicina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Suspender en 20 ml de agua, dejar sedimentar los sólidos y filtrar el líquido sobrenadante en una ampolla de decantación. Extraer con 30 ml de cloroformo. Evaporar el extracto cloroformico hasta sequedad, calentando ligeramente.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido en la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

[NOTA: realizar este *Procedimiento* sin demora, con luz tenue y empleando material de vidrio inactínico].

Procedimiento para muestreo unificado

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua; 500 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar, reunir en un recipiente apropiado y determinar la cantidad de $C_{22}H_{25}NO_6$ disuelta, mediante la técnica siguiente.

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar, Aptitud del sistema y Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{22}H_{25}NO_6$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

[NOTA: realizar todas las diluciones en material de vidrio inactínico].

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Colchicina*.

Preparación muestra - [NOTA: preparar inmediatamente antes de su uso]. Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Colchicina. Transferir una porción exactamente pesada, equivalente a 0,6 mg de colchicina, a un matraz aforado de 100 ml, agregar alrededor de 50 ml de una mezcla de metanol y agua (1:1) y agitar mecánicamente durante 15 minutos, enjuagar las paredes del matraz aproximadamente durante 8 minutos. Completar a volumen con la misma mezcla y filtrar.

Procedimiento - Proceder según se indica para *Procedimiento en Valoración en Colchicina*. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{25}NO_6$ en los Comprimidos de Colchicina, de acuerdo a la cantidad declarada.

DACTINOMICINA PARA INYECCIÓN

Definición - Dactinomicina para Inyección es una mezcla estéril que contiene *Dactinomicina* y *Manitol*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Dactinomicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de vidrio Tipo I.

Precaución - Prevenir su inhalación y contacto con la piel.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Dactinomicina*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido en la *Preparación estándar*.

Aspecto de la solución reconstituida

Reconstituir la Dactinomicina para Inyección según se indica en el rótulo. La solución reconstituida debe cumplir con los requisitos en 280. *Disolución completa* y estar libre de partículas extrañas cuando se realiza una inspección visual.

Determinación del pH <250>

Entre 5,5 y 7,5; determinado sobre una solución reconstituida según se indica en el rótulo.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 100,0 Unidades de Endotoxina por mg de dactinomicina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica en *Método de filtración por membrana*, reconstituyendo asépticamente con *Agua estéril para inyectables* cada envase de Dactinomicina para Inyección y recolectando asépticamente el contenido de todos los envases con la ayuda de 200 ml de *Solución A*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado <680>

Secar al vacío, a una presión inferior a 5 mm Hg, a 60 °C, durante 3 horas: no debe perder más de 4,0 % de su peso.

VALORACIÓN

[NOTA: efectuar la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* en el momento de su uso y protegerlas en todo momento de la luz].

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,5 ml por minuto.

Fase móvil - Acetonitrilo y agua (6:4). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Dactinomicina SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente para obtener una solución de aproximadamente 250 μg por ml.

Preparación muestra - Agregar un volumen exactamente medido de *Fase móvil* a un envase de Dactinomicina para Inyección para obtener una solución de aproximadamente 250 μg por ml, filtrando si fuera necesario.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor de 1.200 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para tres inyecciones repetidas no debe ser mayor de 3,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatografo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ en Dactinomicina para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: "Proteger de la luz".

DAPSONA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Dapsona deben contener no menos de 92,5 por ciento y no más de 107,5 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Dapsona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de dapsona a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Transferir a un envase apropiado, agregar 5 ml de acetona, agitar durante 5 minutos, filtrar y evaporar el filtrado hasta sequedad. Secar el residuo a 105 °C durante 1 hora: el residuo obtenido debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Dapsona*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de dapsona a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, suspender en 50 ml de metanol y filtrar. Diluir una porción del filtrado con metanol hasta obtener una solución de aproximadamente 5 µg por ml: debe responder al ensayo de *Identificación B* en *Dapsona*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico diluido (2 en 100); 1.000 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Transferir a un matraz aforado de 25 ml una porción exactamente medida del filtrado, que contenga aproximadamente 0,2 mg de dapsona, agregar 5 ml de hidróxido de sodio 1 N, completar a volumen con agua y mezclar.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta determinadas a la longitud de onda de máxima absorción, 290 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Dapsona SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Dapsona a un matraz aforado de 100 ml, agregar 2,0 ml de agua y dejar reposar durante 30 minutos, agitando ocasionalmente por rotación. Agregar aproximadamente 70 ml de metanol y sonicar hasta que la muestra esté completamente disuelta. Completar a volumen con metanol, mezclar y centrifugar una porción de la mezcla. Diluir con metanol un volumen exactamente medido del líquido sobrenadante transparente para obtener una solución de aproximadamente 8 µg de dapsona por ml.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Dapsona SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 8 µg de Dapsona SR-FA por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y de la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 296 nm, con un espectrofotómetro empleando metanol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ en cada Comprimido de Dapsona en ensayo, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Dapsona*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Dapsona. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de dapsona, transferir a un matraz aforado de 200 ml. Agregar 150 ml de metanol y colocar el matraz en un baño ultrasónico a 35 °C durante 15 minutos, agitando ocasionalmente. Dejar enfriar a temperatura ambiente, completar a volumen con metanol y mezclar. Centrifugar una porción de la mezcla hasta que sea transparente. Transferir 5,0 ml del líquido sobrenadante transparente a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Dapsona*. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ en los Comprimidos de Dapsona, de acuerdo a la cantidad declarada.

DEFEROXAMINA, MESILATO DE PARA INYECCIÓN

Definición - El Mesilato de Deferoxamina para Inyección debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_4O_3S$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Mesilato de Deferoxamina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos de *Identificación A* y *B* en *Mesilato de Deferoxamina*.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 1,5 %.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 6,0; determinado sobre una solución 1 en 100.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,33 Unidades de Endotoxinas por mg de Mesilato de Deferoxamina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Solución de cloruro férrico - Pesar 6,7 g de cloruro férrico, transferir a un matraz aforado de 100 ml y disolver con ácido clorhídrico diluido 1 en 100. Completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y filtrar.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Mesilato de Deferoxamina SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Preparación muestra - Reconstituir el contenido de un envase de Mesilato de Deferoxamina para Inyección en agua, diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Solución blanco - Transferir 2 ml de agua a un

matraz aforado de 25 ml, agregar 3 ml de *Solución de cloruro férrico*, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Transferir 2 ml de la *Preparación estándar* y 2 ml de la *Preparación muestra* a sendos matraces aforados de 25 ml, agregar 3 ml de la *Solución de cloruro férrico*, completar a volumen con agua y mezclar. Determinar las absorbancias de las soluciones preparadas a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* a la longitud de onda de máxima absorción, 485 nm, con un espectrofotómetro, empleando la *Solución blanco* como blanco. Calcular la cantidad de $C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_4O_3S$ en Mesilato de Deferoxamina para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

DEXAMETASONA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Dexametasona deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{22}H_{29}FO_5$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Dexametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloruro de metileno y metanol (45:4).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Dexametasona SR-FA en cloroformo para obtener una solución de aproximadamente 500 μg por ml.

Solución muestra - Evaporar 10 ml del extracto metanólico de los Comprimidos de Dexametasona obtenido según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*, en un baño de vapor hasta sequedad y disolver el residuo en 1 ml con cloroformo.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μl de la *Solución muestra* y 20 μl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas según se indica en *Valoración de un esteroide aislado previamente* en 750. *Valoración de Esteroides*. Marcar el frente del solvente y examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico diluido (1 en 100); 500 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la canti-

dad de $C_{22}H_{29}FO_5$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Solución estándar - Preparar según se indica en *Preparación estándar* en *Valoración directa* en 750. *Valoración de Esteroides*, empleando Dexametasona SR-FA.

Solución muestra - Extraer cada alícuota filtrada con tres porciones de 15 ml de cloroformo, equivalente a 200 μg de dexametasona, evaporar los extractos clorofórmicos combinados en un baño de vapor hasta sequedad, enfriar y disolver el residuo en 20 ml de alcohol.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración directa* en 750. *Valoración de Esteroides*, excepto que se debe dejar reposar en la oscuridad durante 45 minutos.

Tolerancia - No menos de 70 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{22}H_{29}FO_5$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido.

Solución estándar - Preparar según se indica en *Preparación estándar* en *Valoración directa* en 750. *Valoración de Esteroides*, empleando Dexametasona SR-FA.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Dexametasona a una ampolla de decantación con 15 ml de agua y agitar por rotación hasta desintegrarlo completamente. Extraer con cuatro porciones de 10 ml de cloroformo, filtrando cada porción a través de una torunda de algodón previamente lavada con cloroformo en un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con cloroformo y mezclar. Transferir un volumen de esta solución, equivalente a 200 μg de dexametasona, a un erlenmeyer con tapón de vidrio de 50 ml, evaporar el cloroformo en un baño de vapor hasta sequedad, enfriar y disolver el residuo en 20,0 ml de alcohol. Emplear esta solución donde se especifica la *Preparación muestra* en *Procedimiento*.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración directa* en 750. *Valoración de Esteroides*, excepto que se debe dejar reposar en la oscuridad durante 45 minutos. Calcular la cantidad total de esteroides como $C_{22}H_{29}FO_5$ en los Comprimidos de Dexametasona.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Acetonitrilo en agua (1 en 3). Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Metanol diluido (1 en 2).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Dexametasona SR-FA en *Diluyente* hasta obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de diez Comprimidos de Dexametasona. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 5 mg de dexametasona, transferir a un matraz aforado de 50 ml y agregar 30 ml de *Diluyente*. Sonicar aproximadamente durante 2 minutos, agitar durante 30 minutos y completar a volumen con el mismo solvente. Filtrar una porción de la mezcla hasta obtener un filtrado transparente.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: ajustar la *Fase móvil* de tal manera que el tiempo de retención de la dexametasona se encuentre entre 3 y 6 minutos; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 3,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente entre 5 y 25 µl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular la cantidad de C₂₂H₂₉FO₅ en los Comprimidos de Dexametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

DEXAMETASONA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Dexametasona es una solución estéril de *Dexametasona* en *Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{22}H_{29}FO_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Dexametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloruro de metileno y metanol (180:16).

Revelador - Diluir una solución de ácido *p*-toluensulfónico 1 en 5 en una mezcla alcohol y propilenglicol (9:1). Mezclar y calentar.

Solución muestra - Transferir una cantidad de Solución Inyectable de Dexametasona, equivalente a 5,0 mg de dexametasona, a una ampolla de decantación de 50 ml, agregar 10 ml de agua, y extraer con dos porciones de 20 ml de cloroformo. Filtrar la fase inferior, transferir el filtrado a un erlenmeyer de 50 ml, evaporar hasta sequedad y disolver el residuo con 10 ml de cloroformo.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución estándar* y 10 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y examinar los cromatogramas: el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 5,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 21,0 Unidades de Endotoxinas por mg de dexametasona.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, cuando se procese según se indica en *Métodos de filtración por membrana*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos para *Inyectables de Pequeño Volumen*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agua y acetonitrilo (70:30). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de aptitud del sistema - Preparar una solución de aproximadamente 0,30 mg de Dexametasona SR-FA, 1,35 mg de alcohol bencílico, 0,27 mg de metilparabeno y 0,03 mg de propilparabeno por ml en *Fase móvil*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Dexametasona SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 7,5 mg por ml. Transferir 4 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,3 mg de Dexametasona SR-FA por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Dexametasona, equivalente aproximadamente a 30 mg de dexametasona, a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con *Fase móvil*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,4 para alcohol bencílico, 0,5 para metilparabeno, 1,0 para dexametasona y 1,4 para propilparabeno; la resolución *R* entre los picos de alcohol bencílico y metilparabeno, metilparabeno y dexametasona y dexametasona y propilparabeno no debe ser menor de 3,0. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los

picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0%.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en la Solución Inyectable de Dexametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

DEXAMETASONA, ACETATO DE SUSPENSIÓN INYECTABLE

Definición - La Suspensión Inyectable de Acetato de Dexametasona es una suspensión estéril de *Acetato de Dexametasona* en *Agua para Inyectables*. Debe contener una cantidad de Acetato de Dexametasona monohidrato ($C_{22}H_{29}FO_5 \cdot H_2O$) equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de dexametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetato de Dexametasona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En suspensión.*

Solución muestra - Transferir el contenido de un envase de Suspensión Inyectable de Acetato de Dexametasona, previamente agitado, a un recipiente apropiado, filtrar la suspensión a través de un filtro de vidrio de porosidad fina. Lavar el residuo con varias porciones de 10 ml de agua. Remover el polvo del filtro y dejar secar al aire. [NOTA: no emplear calor para secar la muestra. Puede ocurrir una deshidratación parcial o total]. Emplear una preparación similar de Acetato de Dexametasona SR-FA sin secar.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <210>

Entre 5,0 y 7,5.

Determinación del contenido extraíble del envase <250>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 21,7 Unidades de Endotoxinas por mg de Acetato de Dexametasona.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución reguladora de pH 6,0 y Diluyente - Proceder según se indica en *Valoración en Acetato de Dexametasona*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Acetato de Dexametasona SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,09 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Suspensión Inyectable de Acetato de Dexametasona, equivalente aproximadamente a 40 mg de dexametasona, a un matraz aforado de 100 ml, agregar 75 ml de *Diluyente*, sonicar hasta obtener una solución transparente, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales, (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* (antes y después de la *Preparación muestra*) y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{29}FO_5$ en la Suspensión Inyectable de Acetato de Dexametasona, de acuerdo a la cantidad declarada.

DEXAMETASONA, FOSFATO SÓDICO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Fosfato Sódico de Dexametasona es una solución estéril de Fosfato Sódico de Dexametasona en Agua para Inyectables. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de fosfato de dexametasona ($C_{22}H_{30}FO_8P$), presente como sal disódica y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias	de	referencia	-
Dexametasona SR-FA.	Fosfato	de	
Dexametasona SR-FA.			

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. Cromatografía) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, acetona y agua (50:50:1).

Solución reguladora de pH 9,0 - Mezclar 3,1 g de ácido bórico y 500 ml de agua en un matraz aforado de 1 litro. Agregar 21 ml de hidróxido de sodio 1 N y 10 ml de cloruro de magnesio 0,1 M, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de fosfatasa alcalina - Transferir 50 mg de fosfatasa alcalina a un matraz aforado de 50 ml y disolver con *Solución reguladora de pH 9,0*. Completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Solución estándar - Preparar una solución de Dexametasona SR-FA en cloruro de metileno de aproximadamente 300 µg por ml.

Solución muestra - Transferir un volumen de Solución Inyectable de Fosfato Sódico de Dexametasona, equivalente a 10 mg de fosfato de dexametasona, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 5 ml de esta solución en una ampolla de decantación de 125 ml y lavar con dos porciones de 10 ml de cloruro de metileno lavado con agua, descartando los lavados. Transferir la solución a un tubo con tapón de vidrio de 50 ml y agregar 5 ml de *Solución de fosfatasa alcalina*. Dejar reposar a 37 °C durante 45 minutos y extraer con 25 ml de cloruro de metileno. Evaporar el extracto de

cloruro de metileno en un baño de vapor hasta sequedad y disolver el residuo en 1 ml de cloruro de metileno.

Revelador - Ácido sulfúrico diluido 1 en 2.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 5 µl de la *Solución muestra* y 5 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar a 105 °C hasta que aparezcan manchas marrones o negras: el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Solución estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 8,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 31,3 Unidades de Endotoxina por mg de fosfato de dexametasona.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,4 ml por minuto.

Fase móvil - Preparar una solución de fosfato monobásico de potasio 1,36 g por litro de una mezcla de metanol y agua (50:50). Filtrar y degasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. Cromatografía).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Fosfato de Dexametasona SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 80 µg por ml. [NOTA: preparar esta solución en el momento de su uso].

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Fosfato Sódico de Dexametasona, equivalente a 8 mg de fosfato de dexametasona, a un matraz

aforado de 100 ml. Completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para cinco inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,5 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{30}FO_8P$ en la Solución Inyectable de Fosfato Sódico de Dexametasona, en base a la cantidad declarada.

DIATRIZOATO DE MEGLUMINA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Diatrizoato de Meglumina es una solución estéril de *Diatrizoato de Meglumina en Agua para Inyectables*, o una solución estéril de *Ácido Diatrizoico en Agua para Inyectables* preparada con *Meglumina*. Puede contener cantidades pequeñas de reguladores de pH y de *Edetato de Calcio Disódico* o *Edetato Disódico* como estabilizadores. La Solución Inyectable de Diatrizoato de Meglumina para uso intravascular no contiene agentes antimicrobianos. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_9I_3N_2O_4 \cdot C_7H_{17}NO_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Ácido Diatrizoico SR-FA. Impureza A de Ácido Diatrizoico SR-FA: Ácido 5-acetamido-3-amino-2, 4, 6-triiodobenzoico.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis de vidrio Tipo I o Tipo III cuando esté destinada para inyección intravascular. En botellas inactínicas de vidrio Tipo I o Tipo III de 500 ml o 1 litro cuando esté destinada para administración con un inyector a presión mediante una conexión de transferencia apropiada. [NOTA: cuando esté para uso no intravascular se pueden envasar en envases inactínicos multidosis de 100 ml de vidrio Tipo I o Tipo III.]

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol e hidróxido de amonio (20:10:2).

Diluyente - Solución de hidróxido de sodio en metanol (0,8 en 1.000).

Solución estándar - Preparar una solución de aproximadamente 1 mg de Ácido Diatrizoico SR-FA por ml de *Diluyente*.

Solución muestra - Diluir un volumen de Solución Inyectable de Diatrizoato de Meglumina, si fuera necesario, con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Solución estándar*.

B - Evaporar hasta sequedad un volumen de Solución Inyectable de Diatrizoato de Meglumina, equivalente a 500 mg de diatrizoato de meglumina, calentar el residuo obtenido en un crisol: se deben producir vapores de color violeta.

Determinación del pH <250>

Entre 6,0 y 7,7.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Las soluciones inyectables con menos de 50 % de diatrizoato de meglumina deben contener menos de 1,1 Unidades de Endotoxina por ml y las soluciones inyectables con 50 % o más de diatrizoato de meglumina deben contener menos de 5,0 Unidades de Endotoxina por ml.

Iodo y yoduro

Solución muestra - Transferir un volumen de Solución Inyectable de Diatrizoato de Meglumina, equivalente a 2,0 g de diatrizoato de meglumina, a un tubo de centrifuga de 50 ml con tapa y diluir con 24 ml de agua.

Procedimiento - Agregar a la *Solución muestra* 5 ml de tolueno y 5 ml de ácido sulfúrico 2 N, agitar y centrifugar: la fase orgánica no debe adquirir color rojo. Agregar 1 ml de solución de nitrito de sodio 1 en 50, agitar y centrifugar: el color rojo producido en la fase orgánica no debe ser más intenso que el obtenido cuando se sustituye la *Solución muestra* por un volumen de solución de yoduro de potasio 1 en 4.000 con una cantidad de yoduro equivalente al 0,02 % del peso de diatrizoato de meglumina en el volumen de Solución Inyectable de Diatrizoato de Meglumina en ensayo y se diluye a 24 ml con agua (0,02 % de yoduro).

Límite de metales pesados <590>

Solución estándar - Transferir 2,0 ml de *Solución estándar de plomo (10 ppm)* a un tubo de Nessler de 50 ml, agregar 5 ml de hidróxido de sodio 1 N, diluir con agua a 40 ml y mezclar.

Solución muestra - En un tubo de Nessler de 50 ml, mezclar un volumen de Solución Inyectable de Diatrizoato de Meglumina, equivalente a 1,0 g

de diatrizoato de meglumina con 5 ml de hidróxido de sodio 1 N, diluir a 40 ml con agua y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en el ensayo para *Límite de metales pesados* en *Diatrizoato de Meglumina*: el límite es 0,002 %.

Aminas aromáticas libres

Solución estándar - Disolver una cantidad de Impureza A de Ácido Diatrizoico SR-FA en hidróxido de sodio 0,1 N, empleando 0,2 ml de hidróxido de sodio 0,1 N por cada 5,0 mg de Impureza A de Ácido Diatrizoico SR-FA. Diluir con agua para obtener una solución de aproximadamente 500 µg por ml. Transferir un volumen exactamente medido de la solución anterior a un matraz aforado de 50 ml, diluir a 5 ml con agua y agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N. [NOTA: el volumen empleado de *Solución estándar* debe contener una cantidad de aminas aromáticas libres correspondiente a 0,05 % del peso de diatrizoato de meglumina en el volumen de *Solución Inyectable* de *Diatrizoato* de *Meglumina* en ensayo.]

Solución muestra - Transferir un volumen exactamente medido de *Solución Inyectable* de *Diatrizoato* de *Meglumina*, equivalente a 1 g de diatrizoato de meglumina, a un matraz aforado de 50 ml con tapón de vidrio. Diluir con agua a 5 ml y agregar 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N.

Blanco - Transferir 5 ml de agua y 10 ml de hidróxido de sodio 0,1 N a un matraz aforado de 50 ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Aminas aromáticas libres* en *Diatrizoato de Meglumina*

Contenido de meglumina

Determinar la rotación óptica (ver 170. *Determinación de la rotación óptica*) de la *Solución Inyectable* de *Diatrizoato* de *Meglumina*, empleando una celda de 10 cm y un polarímetro apropiado. Calcular el contenido, en mg por ml, de meglumina en la *Solución Inyectable* de *Diatrizoato* de *Meglumina* por la fórmula siguiente:

$$1.000a/24,9$$

en la cual *a* es la rotación óptica observada en grados, corregida por el blanco y el factor 24,9 es la rotación específica promedio en grados de la meglumina. El contenido de meglumina se debe encontrar entre 22,9 y 25,3 % de la cantidad declarada de *Diatrizoato* de *Meglumina*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Transferir un volumen de *Solución Inyectable* de *Diatrizoato* de *Meglumina*, o una dilución apropiada, equivalente a 600 mg de diatrizoato de meglumina, a un erlenmeyer con tapón de vidrio de 125 ml; agregar 30 ml de hidróxido de sodio 1,25 N y 500 mg de polvo de zinc, conectar el erlenmeyer a un condensador y calentar la mezcla a reflujo durante 1 hora. Enfriar el erlenmeyer a temperatura ambiente, lavar el condensador con 20 ml de agua, desconectar el erlenmeyer del condensador y filtrar la mezcla. Lavar el filtro y el erlenmeyer exhaustivamente, agregando los lavados al filtrado. Agregar 5 ml de ácido acético glacial y 1 ml de tetrabromofenoltaleinato de etilo (SR) y titular con nitrato de plata 0,05 N (SV) hasta que el precipitado amarillo se vuelva de color verde. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de nitrato de plata 0,05 N equivale a 13,49 mg de $C_{11}H_9I_3N_2O_4 \cdot C_7H_{17}NO_5$.

ROTULADO

Indicar en el rótulo de la *Solución Inyectable* de *Diatrizoato* de *Meglumina* en envases monodosis para inyección intravascular que se debe descartar cualquier porción no utilizada del envase o que, cuando estén envasadas en botellas a granel debe figurar la siguiente leyenda: "*Envase a Granel - exclusivamente para llenado estéril de inyectores a presión*"; indicar que no contiene conservantes antimicrobianos y que se debe descartar cualquier porción no utilizada remanente en el envase después de 6 horas. Indicar en las botellas a granel que el inyector a presión se debe llenar con una dosis inmediatamente antes de la administración de la solución inyectable. Indicar en el rótulo de las *Solución Inyectable* de *Diatrizoato* de *Meglumina* para inyección no intravascular que el contenido no está destinado para inyección intravascular.

DIAZEPAM

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Diazepam deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{13}ClN_2O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Diazepam SR-FA. Nordazepam SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención relativo al estándar interno, del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo y *n*-hexano (1:1).

Solución estándar - Preparar una solución de Diazepam SR-FA de aproximadamente 4 mg por ml en alcohol.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 10 mg de diazepam a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Transferir a un matraz de 5 ml, disolver y completar a volumen con alcohol. Centrifugar. Emplear el líquido sobrenadante.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 4 μ l de la *Solución muestra* y 2 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Examinar la placa a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con

Medio, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{16}H_{13}ClN_2O$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 242 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Diazepam SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{13}ClN_2O$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 15 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Acetonitrilo, agua y metanol (2:2:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Diazepam SR-FA en metanol, diluir cuantitativamente y en etapas si fuera necesario, con metanol para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Diazepam. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 10 mg de diazepam, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar aproximadamente 50 ml de metanol, sonicar durante 5 minutos, agitar durante 5 minutos, completar a volumen con metanol y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Disolver cantidades apropiadas de Nordazepam SR-FA y Diazepam SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg de cada una por ml.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,76 para nordazepam y 1,0 para diazepam; la resolución R entre los picos de nordazepam y diazepam no debe ser menor de 4,0; la eficiencia de la columna no debe ser me-

nor de 5.000 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{13}ClN_2O$ en los comprimidos de Diazepam, de acuerdo a la cantidad declarada.

DIAZEPAM

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Diazepam es una solución estéril de *Diazepam* en *Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{13}ClN_2O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Diazepam SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los espectros obtenidos en *Valoración*. El máximo de absorción, a 368 nm, obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo y metanol (10:1).

Solución estándar - Preparar una solución de Diazepam SR-FA de aproximadamente 1 mg por ml de metanol.

Solución muestra - Emplear un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Diazepam que contenga aproximadamente 1 mg de Diazepam por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas, en una cámara sin saturar, hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Examinar la placa a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 6,2 y 7,0.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Diluyente - *Solución reguladora de fosfato de pH 7,0* (ver *Soluciones*).

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Diazepam, equivalente a 10 mg de diazepam, a una ampolla de decantación y agregar 20 ml de *Diluyente*. Extraer la solución con cuatro porciones de 20 ml de cloroformo, pasar cada extracto a través de los mismos 5 g de sulfato de sodio anhidro. Combinar los extractos clorofórmicos, diluir a 100 ml con el mismo solvente y mezclar. Evaporar 10 ml hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno, disolver el residuo obtenido en 25 ml de ácido sulfúrico metanólico 0,05 M y mezclar.

Preparación estándar - Proceder según se indica en *Preparación muestra*, transfiriendo 10 mg de Diazepam SR-FA.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de las soluciones preparadas a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* a la longitud de onda de máxima absorción, 368 nm, con un espectrofotómetro. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{13}ClN_2O$ en la Solución Inyectable de Diazepam, de acuerdo a la cantidad declarada.

DIETILCARBAMAZINA, CITRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Citrato de Dietilcarbamazina deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{10}H_{21}N_3O \cdot C_6H_8O_7$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Citrato de Dietilcarbamazina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Los comprimidos de Citrato de Dietilcarbamazina deben cumplir con los requisitos según se indica en 490. *Identificación de bases orgánicas nitrogenadas.*

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{10}H_{21}N_3O \cdot C_6H_8O_7$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución reguladora de fosfato - Disolver 62,48 g de fosfato monobásico de potasio en 1 litro de agua.

Solución muestra - Diluir una alícuota de las porciones filtradas con igual volumen de *Solución reguladora de fosfato*.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{10}H_{21}N_3O \cdot C_6H_8O_7$ se debe disolver en 45 minutos.

Pureza cromatográfica

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución reguladora de fosfato y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Citrato de Dietilcarbamazina*.

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Citrato de Dietilcarbamazina. Pesar exactamente una cantidad

equivalente a 300 mg de citrato de dietilcarbamazina, transferir a un matraz aforado de 100 ml y diluir a volumen con *Solución amortiguadora de fosfato*. Mezclar, filtrar o centrifugar y emplear el sobrenadante o filtrado transparente.

Solución de ácido cítrico - Preparar una solución de ácido cítrico en *Solución reguladora de fosfato* que contenga 2 mg por ml.

Solución estándar - Preparar una solución de Citrato de Dietilcarbamazina SR-FA que contenga aproximadamente 0,003 mg por ml.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Solución estándar*, la *Solución muestra* y la *Solución de ácido cítrico*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a todos los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza individual obtenida a partir de la *Solución muestra* en relación a la respuesta del pico principal obtenido a partir de la *Solución estándar*. Ignorar los picos cuyo tiempo de retención se corresponden con el pico principal de la *Solución de ácido cítrico*. No debe contener más de 0,1 % de cualquier impureza individual.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control higiénico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución reguladora de fosfato, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Citrato de Dietilcarbamazina*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Citrato de Dietilcarbamazina. Pesar exactamente una cantidad de polvo equivalente a 5 mg de citrato de dietilcarbamazina y transferir a un matraz aforado de 50 ml. Disolver en *Solución reguladora de fosfato*, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Citrato de Dietilcarbamazina*. Calcular la cantidad de $C_{10}H_{21}N_3O \cdot C_6H_8O_7$ en los Comprimidos de Citrato de Dietilcarbamazina, en base a la cantidad declarada.

DIFENHIDRAMINA, CLORHIDRATO DE CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Clorhidrato de Difenhidramina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Difenhidramina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua; 500 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ disuelta empleando la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema, Aptitud del sistema y Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Difenhidramina SR-FA en *Medio* para obtener una solución de concentración similar a la de la *Solución muestra*.

Solución muestra - Emplear las alícuotas filtradas.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 250 mm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por grupos nitrilo químicamente unidos a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol, agua y trietilamina (50:50:0,5). Ajustar a pH 6,5 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Difenhidramina SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y extraer el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Clorhidrato de Difenhidramina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de difenhidramina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Disolver aproximadamente 5 mg de benzofenona en 5 ml de acetonitrilo, diluir con agua a 100 ml y mezclar. Transferir 1,0 ml de esta solución y 5 mg de Clorhidrato de Difenhidramina a un matraz aforado de 10 ml, diluir a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de benzofenona y difenhidramina no debe ser menor de 2,0. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico de clorhidrato de difenhidramina no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ en las Cápsulas de Clorhidrato de Difenhidramina, de acuerdo a la cantidad declarada.

DIFENHIDRAMINA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Difenhidramina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Difenhidramina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua; 500 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso y determinar la cantidad de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ disuelta empleando la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema, Aptitud del sistema y Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Difenhidramina SR-FA en *Medio* para obtener una solución de concentración similar a la de la *Solución muestra*.

Solución muestra - Combinar las alícuotas extraídas de cada uno de los vasos, centrifugar durante 15 minutos a 4.000 rpm y emplear el sobrenadante.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Clorhidrato de Difenhidramina a un matraz aforado de 100 ml, disolver con agua, sonicar durante 10 minutos y completar a volumen con el mismo solvente. Centrifugar durante 15 minutos a 4.000 rpm y emplear el sobrenadante.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 250 mm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por grupos nitrilo químicamente unidos a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol, agua y trietilamina (50:50:0,5). Ajustar a pH 6,5 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Difenhidramina SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Difenhidramina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de difenhidramina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver con agua, sonicar 10 minutos, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Disolver aproximadamente 5 mg de benzofenona en 5 ml de acetonitrilo, diluir con agua a 100 ml y mezclar. Transferir 1,0 ml de esta solución y 5 mg de Clorhidrato de Difenhidramina a un matraz aforado de 10 ml, diluir a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de benzofenona y difenhidramina no debe ser menor de 2,0. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico de clorhidrato de difenhidramina no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Difenhidramina, de acuerdo a la cantidad declarada.

DIFENHIDRAMINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Clorhidrato de Difenhidramina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Difenhidramina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica.

Solución estándar - Transferir 50 mg de Clorhidrato de Difenhidramina SR-FA a una ampolla de decantación y disolver con 25 ml de agua.

Solución muestra - Transferir una cantidad de la Solución Oral de Clorhidrato de Difenhidramina, equivalente a 50 mg de clorhidrato de difenhidramina, a una ampolla de decantación, agregar 0,5 ml de ácido sulfúrico 2 N y extraer con tres porciones de éter. Agregar 15 ml de agua.

Procedimiento - Tratar a la *Solución muestra* y a la *Solución estándar* del siguiente modo. Agregar 2 ml de hidróxido de sodio 1 N y extraer con 75 ml de *n*-heptano. Lavar el extracto de *n*-heptano con 10 ml de agua, evaporar el extracto hasta sequedad y disolver el residuo en 4 ml de disulfuro de carbono y filtrar. Determinar el espectro de absorción infrarroja de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* según se indica en 490. *Identificación de bases orgánicas nitrogenadas.*

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación de alcohol <130>

Entre 90,0 y 110,0 % de la cantidad de C_2H_5OH declarada en el rótulo.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector

ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 250 mm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por grupos nitrilo químicamente unidos a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol, agua y trietilamina (50:50:0,5). Ajustar a pH 6,5 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver Aptitud del sistema en 100. Cromatografía).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Difenhidramina SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oral de Clorhidrato de Difenhidramina, equivalente a 50 mg de clorhidrato de difenhidramina, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Disolver aproximadamente 5 mg de benzofenona en 5 ml de acetonitrilo, diluir con agua a 100 ml y mezclar. Transferir 1,0 ml de esta solución y 5 mg de Clorhidrato de Difenhidramina a un matraz aforado de 10 ml, diluir a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de benzofenona y difenhidramina no debe ser menor de 2,0. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico de clorhidrato de difenhidramina no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en Clorhidrato de Difenhidramina. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$ en la Solución Oral de Clorhidrato de Difenhidramina, de acuerdo a la cantidad declarada.

DIGOXINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Digoxina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{41}H_{64}O_{14}$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Digoxina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil y Reactivo de cloramina T y Ácido tricloroacético - Proceder según se indica en *Glucósidos Relacionados en Digoxina*.

Diluyente - Alcohol absoluto.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Digoxina SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,25 mg por ml.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 0,5 mg de digoxina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración* y transferir a un tubo de centrífuga de 10 ml. Agregar 2 ml de *Diluyente*, sonicar entre 10 y 15 minutos y centrifugar. Emplear la solución sobrenadante.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Glucósidos Relacionados en Digoxina*, excepto que se debe omitir el empleo de *Solución estándar de Gitoxina*. Examinar la placa a 366 nm: el valor de R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

[NOTA: durante todo el ensayo, emplear material de vidrio perfectamente limpio, enjuagado previa y sucesivamente con ácido clorhídrico, agua y alcohol y secado cuidadosamente. Tomar precauciones para evitar la contaminación con partículas fluorescentes y con superficies metálicas y de elastómeros].

Aparato 1: 120 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 500 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrarlas a través de un filtro de membrana de 0,8 μ m de porosidad, descartar los primeros 10 ml del filtrado y determinar la cantidad de $C_{41}H_{64}O_{14}$ disuelta mediante la técnica siguiente.

Solución de ácido ascórbico-metanol - Preparar una solución de aproximadamente 2 mg de ácido ascórbico por ml de metanol.

Solución de peróxido de hidrógeno-metanol - Diluir en el día de su uso, 2,0 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %, recientemente valorado, a 100 ml con metanol. Almacenar en un refrigerador. Inmediatamente antes de usar, diluir 2,0 ml de esta solución a 100 ml con metanol.

Soluciones estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Digoxina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 500 ml, disolver en una cantidad mínima de alcohol, completar a volumen con alcohol diluido (4 en 5) y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con alcohol diluido (4 en 5) y mezclar. Inmediatamente antes de usar, diluir alícuotas de la solución resultante a 50,0 ml con *Medio* para preparar *Soluciones estándar* equivalentes a 20 %; 40 %; 60 %; 80 % y 100 %, respectivamente, de la cantidad declarada de Digoxina en 500 ml.

Procedimiento - Transferir por duplicado 1,0 ml de las *Soluciones estándar* a un matraz con tapón de vidrio. Repetir el mismo procedimiento con 1,0 ml de la *Solución muestra* y 1,0 ml de *Medio* para proporcionar un blanco. Mantener todos los matraces en el mismo orden, para que el tiempo transcurrido desde el agregado del reactivo hasta la lectura de la fluorescencia sea el mismo para todos los matraces. Proceder con un matraz a la vez agregando los reactivos en el siguiente orden, lo más rápido posible, agitando por rotación después de cada agregado: 1,0 ml de *Solución de ácido ascórbico-metanol*, 5,0 ml de ácido clorhídrico y 1,0 ml de *Solución de peróxido de hidrógeno-metanol*. Tapar los matraces y después de 2 horas medir la fluorescencia, a 485 nm, siendo la longitud de onda de excitación 372 nm. Para controlar la estabilidad del fluorómetro, repetir la medición de fluorescencia en una o varias *Soluciones estándar* tratadas. Corregir cada lectura por el blanco y trazar una curva de fluorescencia con los estándares en función del porcentaje de disolución. Determinar la ecuación de la recta que mejor ajuste y calcular el porcentaje de $C_{41}H_{64}O_{14}$ disuelto.

Tolerancias - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{41}H_{64}O_{14}$ se debe disolver en 60 minutos. Los comprimidos deben disolverse

según la tabla siguiente en lugar de la descrita en 320. *Ensayo de disolución.*

Etapa	Unidades Probadas	Criterios de aceptación
E ₁	6	Cada unidad no debe ser menor que $Q + 5\%$.
E ₂	6	El promedio de 12 unidades (E ₁ +E ₂) debe ser igual o mayor que Q y ninguna unidad debe ser menor que $Q - 5\%$

Uniformidad de unidades de dosificación
<740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Digoxina.*

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Digoxina SR-FA en alcohol diluido, sonicar, y diluir con el mismo solvente hasta obtener una solución de aproximadamente 40 µg por ml. .

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Digoxina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 1,0 mg de digoxina, transferir a un erlenmeyer de 50 ml con tapón de vidrio. Agregar 25 ml de alcohol diluido agitando por rotación, sonicar durante 30 minutos y enfriar. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,8 µm de porosidad descartando los primeros 10 ml del filtrado.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de C₄₁H₆₄O₁₄ en los Comprimidos de Digoxina, de acuerdo a la cantidad declarada.

DIGOXINA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Digoxina es una solución estéril de *Digoxina* en *Agua para Inyectables* y *Alcohol* u otros solventes apropiados. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{41}H_{64}O_{14}$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Digoxina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de vidrio Tipo I

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil, Reactivo de cloramina T y Ácido tricloroacético y Diluyente - Proceder según se indica en *Glucosidos relacionados en Digoxina*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Digoxina SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,25 mg por ml.

Solución muestra - Transferir un volumen de la Solución Inyectable de Digoxina, equivalente a 0,5 mg de digoxina, a una ampolla de decantación, y agregar 5 ml de agua. Extraer con tres porciones de 10 ml de cloroformo y combinar los extractos obtenidos en un erlenmeyer. Evaporar hasta sequedad en un baño de vapor [NOTA: si quedan vestigios de agua o propilenglicol, secar al vacío a 100 °C durante 30 minutos.] Disolver el residuo obtenido en 2 ml de *Diluyente*.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de *Solución muestra* y 10 μ l de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Reactivo de cloramina T y Ácido tricloroacético* y calentar en estufa a 110 °C durante 10 minutos. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 366 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la

Solución muestra se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Determinación de alcohol <130>

Entre 9,0 y 11,0 % de C_2H_5OH .

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

No debe contener más de 200 Unidades de Endotoxina por mg de Digoxina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Digoxina*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Digoxina SR-FA en alcohol diluido y diluir cuantitativamente con el mismo solvente hasta obtener una solución de aproximadamente 250 μ g por ml. Sonicar hasta disolver. Si fuera necesario, diluir cuantitativamente para obtener en una solución de concentración similar a la *Preparación muestra*.

Preparación muestra - Emplear la Solución Inyectable de Digoxina.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{41}H_{64}O_{14}$ en la Solución Inyectable de Digoxina en ensayo.

DIGOXINA

SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Digoxina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{41}H_{64}O_{14}$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Digoxina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto, evitar la exposición excesiva al calor.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil, Reactivo de cloramina T y Ácido tricloroacético y Diluyente - Proceder según se indica en *Glucósidos relacionados en Digoxina*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Digoxina SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,25 mg por ml.

Solución muestra - Transferir un volumen de la Solución Oral de Digoxina, equivalente a 0,5 mg de digoxina, a una ampolla de decantación. Agregar cantidad suficiente de agua para obtener un volumen de 50 ml, extraer la fase acuosa con tres porciones de 30 ml de cloroformo y combinar los extractos en un erlenmeyer. Evaporar hasta sequedad. Agregar 2 ml de *Diluyente* al residuo y agitar durante 2 minutos.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Glucósidos relacionados en Digoxina*, omitiendo el uso de la *Solución estándar de gitoxina*. Examinar bajo luz visible los cromatogramas obtenidos: el valor de *R_f* de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Solución estándar*.

Determinación de alcohol <130>

Entre 90 y 115 % de la cantidad declarada de alcohol.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 218 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,5 ml por minuto.

Fase móvil - Agua, acetonitrilo y alcohol isopropílico (70:27,5:2,5). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100. Cromatografía*).

Solución de aptitud del sistema - Preparar según se indica en *Valoración en Digoxina*

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Digoxina SR-FA en alcohol diluido y diluir, cuantitativamente y en etapas, con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 20 μg de Digoxina por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oral de Digoxina, equivalente a 500 μg de digoxina, a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con alcohol diluido y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de digoxina y digoxigenina no debe ser mayor de 2,0; el factor de asimetría para el pico de digoxina no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{41}H_{64}O_{14}$ en la Solución Oral de Digoxina, de acuerdo a la cantidad declarada.

DOXICICLINA

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Doxiciclina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{22}H_{24}N_2O_8$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Hiclato de Doxiciclina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad apropiada a partir del contenido de las Cápsulas de Doxiciclina obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*, diluir con metanol para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml, agitar y filtrar. Emplear esta solución como *Solución muestra*. Proceder según se indica en *Método 1* en 500. *Identificación de tetraciclinas*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{22}H_{24}N_2O_8$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 268 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Hiclato de Doxiciclina SR-FA, en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{22}H_{24}N_2O_8$ se debe disolver en 60 minutos.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No debe contener más de 5,5 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

[NOTA: proteger de la luz la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*].

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 270 nm y una columna de 25 cm x 4,6 mm con fase estacionaria constituida por copolímero rígido, esférico de divinilbenceno y estireno de 5 a 10 μ m de diámetro. Mantener la columna a 60 ± 1 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Pesar exactamente alrededor de 2,72 g de fosfato monobásico de potasio, 0,74 g de hidróxido de sodio, 0,50 g de sulfato ácido de tetrabutilamonio y 0,40 g de edetato disódico, transferir a un matraz aforado de 1 litro, agregar aproximadamente 850 ml de agua y agitar hasta disolver. Agregar 60 g de alcohol butílico terciario con la ayuda de agua, completar a volumen con agua y ajustar a pH $8,0 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio 1 N. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100. Cromatografía*). [NOTA: si se disminuye la cantidad de alcohol butílico terciario se aumenta el tiempo de retención de doxiciclina y mejora la separación con las sustancias relacionadas].

Diluyente - Ácido clorhídrico 0,01 N.

Solución de resolución - Preparar una solución de Hiclato de Doxiciclina SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 6 mg de doxiciclina por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, calentar durante aproximadamente 60 minutos y evaporar hasta sequedad. Disolver el residuo con ácido clorhídrico 0,01 N, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Filtrar y emplear el filtrado como *Solución de resolución*. Esta solución contiene una mezcla de 4-epidoxiciclina, 6-epidoxiciclina y doxiciclina. [NOTA: esta solución puede ser usada dentro de los 14 días de preparada cuando se conserva en un refrigerador].

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Hiclato de Doxiciclina SR-FA, transferir a un recipiente apropiado, agregar aproximadamente 6 ml de *Diluyente*, sonicar durante 5 minutos hasta disolver y diluir a 20 ml con *Diluyente* y mezclar.

Preparación muestra - Extraer el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Doxiciclina y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de doxiciclina y transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 20 ml de

ácido clorhídrico 0,1 N, sonicar y agitar durante 5 y 15 minutos, respectivamente. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,4 para 4-epidoxiciclina (el principal pico de degradación), 0,7 para 6-epidoxiciclina y 1,0 para doxiciclina; la resolución *R* entre los picos de 4-epidoxiciclina y doxiciclina no debe ser menor de 3,0; el factor de asimetría para el pico de doxiciclina no debe ser mayor de 2,0. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{24}N_2O_8$ en las Cápsulas de Doxiciclina, de acuerdo a la cantidad declarada.

DOXICICLINA, HICLATO DE CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Hiclato de Doxiciclina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de Doxiciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Hiclato de Doxiciclina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad apropiada a partir del contenido de las Cápsulas de Hiclato de Doxiciclina obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*, diluir con metanol hasta obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml, agitar y filtrar. Emplear esta solución como *Solución muestra*. Proceder según se indica en *Método 1* en *500. Identificación de tetraciclinas*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

[NOTA: proteger de la luz la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*].

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución de resolución, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Cápsulas de Doxiciclina*.

Preparación muestra - Extraer el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Hiclato de Doxiciclina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de doxiciclina y transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 75 ml de *Diluyente*, sonicar durante 5 minutos y agitar durante 15 minutos, respectivamente. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la

principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm. Mantener una distancia de $4,5 \pm 0,5$ cm entre la paleta y el interior del fondo del vaso.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{22}H_{24}N_2O_8$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 276 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Hiclato de Doxiciclina SR-FA, en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{22}H_{24}N_2O_8$ se debe disolver en 30 minutos.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No debe contener más de 8,5%.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

cantidad de $C_{22}H_{24}N_2O_8$ en las Cápsulas de Hiclato de Doxiciclina, de acuerdo a la cantidad declarada.

DOXICICLINA, HICLATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Hiclato de Doxiciclina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de Doxiciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Hiclato de Doxiciclina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Pesar exactamente una cantidad apropiada a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Disolver y diluir con metanol para obtener una solución equivalente a 1 mg de doxiciclina por ml y filtrar. Emplear el filtrado como *Solución muestra* y proceder según se indica para *Método I* en 500. *Identificación de tetraciclinas*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm; la distancia entre la paleta del rotor y el fondo de interior del vaso se mantiene a $4,5 \pm 0,5$ cm durante el ensayo.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 90 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{22}H_{24}N_2O_8$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 276 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Hiclato de Doxiciclina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{22}H_{24}N_2O_8$ se debe disolver en 90 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 5,0 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

[NOTA: proteger de la luz a la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*].

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución de resolución, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Cápsulas de Doxiciclina*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Hiclato de Doxiciclina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de doxiciclina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar aproximadamente 75 ml de *Diluyente*, sonicar durante 5 minutos, agitar durante 15 minutos, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de principales. Calcular la cantidad de Doxiciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) en los Comprimidos de Hiclato de Doxiciclina, de acuerdo a la cantidad declarada.

DOXORUBICINA, CLORHIDRATO DE PARA INYECCIÓN

Definición - Clorhidrato de Doxorubicina para Inyección es una mezcla estéril que contiene *Clorhidrato de Doxorubicina* y *Lactosa*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Doxorubicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis de vidrio Tipo I.

Precaución - *Manipular el Clorhidrato de Doxorubicina para Inyección con sumo cuidado, evitando la inhalación de sus partículas y el contacto con la piel.*

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Aspecto de la solución reconstituida

Reconstituir el Clorhidrato de Doxorubicina para Inyección según se indica en el rótulo. La solución reconstituida debe cumplir con los requisitos en *280. Disolución completa* y estar libre de partículas extrañas cuando se realiza una inspección visual.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 6,5, determinado sobre una solución reconstituida según se indica en el rótulo.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 4,0 %, excepto que la muestra debe transferirse empleando una jeringa seca para inyectar un volumen exactamente medido de metanol u otro disolvente, a un recipiente pesado y agitando para disolver la muestra. Con la misma jeringa, retirar la solución anterior y transferirla al frasco de titulación.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 2,2 Unidades de Endotoxinas por mg de clorhidrato de doxorubicina, empleando una solución de clorhidrato de doxoru-

bicina para Inyección de aproximadamente 1,1 mg de clorhidrato de doxorubicina por ml.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica el *Método de filtración por membrana*, recolectando asépticamente el contenido de todos los envases con la ayuda de 200 ml de *Solución A*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Clorhidrato de Doxorubicina*.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm x 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,8 ml por minuto.

Fase móvil - Solución de laurilsulfato de sodio de aproximadamente 2,88 g/l y ácido fosfórico de aproximadamente 2,3 g/l, acetonitrilo y metanol (50:45:5). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en *100. Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Clorhidrato de Doxorubicina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver en *Fase móvil* y completar a volumen con el mismo solvente. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con *Fase móvil*.

Preparación muestra - Transferir el contenido de no menos de diez envase de Clorhidrato de Doxorubicina para Inyección a un recipiente apropiado y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de doxorubicina, transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver en *Fase móvil* y completar a volumen con el mismo solvente. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con *Fase móvil*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ en Clorhidrato de Doxorubicina para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

EDETATO CÁLCICO DISÓDICO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Edetato Cálcico Disódico es una solución estéril de *Edetato Cálcico Disódico* en *Agua para Inyectables*. Debe contener por cada ml no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{10}H_{12}CaN_2Na_2O_8$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Edetato Cálcico Disódico SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Transferir un volumen de la Solución Inyectable de Edetato Cálcico Disódico, que contenga aproximadamente 1 g de edetato cálcico disódico, a una cápsula de evaporación y evaporar a sequedad en un baño de vapor: el residuo obtenido debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Edetato Cálcico Disódico*.

B - Debe responder al ensayo de *Identificación B* en *Edetato Cálcico Disódico*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 6,5 y 8,0.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,01 Unidades de Endotoxina por mg de edetato cálcico disódico.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos para inyecciones de pequeño volumen.

VALORACIÓN

Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Edetato Cálcico Disódico que contenga 1 g de edetato cálcico disódico y diluir con agua hasta 75 ml aproximadamente. Agregar 25 ml de ácido acético 1 N y 1 ml de difenilcarbazona (SR), mezclar y valorar lentamente con nitrato mercúrico 0,1 M (SV) hasta la primera aparición de color púrpura. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (Ver 780. *Valoración*).

Cada ml de nitrato mercúrico 0,1 M equivale a 37,43 mg de $C_{10}H_{12}CaN_2Na_2O_8$.

ENALAPRIL, MALEATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Maleato de Enalapril deben contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Maleato de Enalapril SR-FA. Enalaprilat SR-FA. Dicotopiperazina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrarlas y determinar la cantidad de $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$ disuelta según se indica en *Procedimiento en Uniformidad de unidades de dosificación*, empleando:

- agua en lugar de *Solución reguladora de fosfato pH 2,5* para preparar la *Solución estándar*,
- una porción filtrada de la alícuota tomada como la *Preparación muestra*; y
- realizar las modificaciones necesarias en las concentraciones de muestra y estándar.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de fosfato pH 2,5, Fase móvil, Solución de dicotopiperazina, Solución estándar de enalaprilat, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Transferir aproximadamente 10 mg de Maleato de Enalapril SR-FA a un matraz aforado de 100 ml. Agregar aproximadamente

50 ml de *Solución reguladora de fosfato pH 2,5*, agitar y sonicar si fuera necesario para disolver. Completar a volumen con *Solución reguladora de fosfato pH 2,5* y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg de Maleato de Enalapril SR-FA por ml.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Maleato de Enalapril a un matraz aforado apropiado para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg de maleato de enalapril por ml. Agregar un volumen de *Solución reguladora de fosfato pH 2,5* que sea aproximadamente la mitad del volumen nominal del matraz, sonicar durante 15 minutos y luego agitar durante 30 minutos. Completar a volumen con *Solución reguladora de fosfato pH 2,5*, agitar y sonicar durante 15 minutos.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ l) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$ en cada Comprimido de Maleato de Enalapril en ensayo, de acuerdo a la cantidad declarada.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de fosfato pH 2,5, Fase móvil, Solución de dicotopiperazina, Solución estándar de enalaprilat, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Emplear la *Preparación estándar* según se indica en *Valoración*.

Solución estándar diluida - Transferir 5 ml de la *Solución estándar* a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con *Solución reguladora de fosfato pH 2,5*.

Solución muestra - Emplear la *Preparación muestra* según se indica en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ l) de la *Solución estándar diluida*, la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Ignorar la respuesta obtenida debida al ácido maleico. Calcular el porcentaje de enalaprilat (expresado como porcentaje de Maleato de Enalapril) en la porción de Maleato de Enalapril en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$100(492,5/348,4)C_E/C_M(r_i/r_E)$$

en la cual 492,5 y 348,4 son los pesos moleculares de Maleato de Enalapril y Enalaprilat, respectivamente, C_E es la concentración en mg por ml de Enalaprilat SR-FA en la *Solución estándar*, C_M es la concentración en mg por ml de Maleato de Enala-

pril en la *Solución muestra*, r_i es la respuesta del pico correspondiente a enalaprilat en la *Solución muestra* y r_E es la respuesta del pico de enalaprilat en la *Solución estándar*. Calcular el porcentaje de dicetopiperazina (expresado como porcentaje de Maleato de Enalapril) en la porción de Maleato de Enalapril en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$100(492,5/358,4)C_E/C_M(r_i/1,25r_E)$$

en la cual 358,4 es el peso molecular de dicetopiperazina, C_E es la concentración en mg por ml de Maleato de Enalapril SR-FA en la *Solución estándar diluida*, C_M es la concentración en mg por ml de Maleato de Enalapril en la *Solución muestra*, r_i es la respuesta del pico correspondiente a enalapril dicetopiperazina en la *Solución muestra*, r_E es la respuesta del pico de enalapril en la *Solución estándar diluida* y los demás términos están indicados anteriormente. Calcular el porcentaje de sustancias relacionadas desconocidas (expresado como porcentaje de Maleato de Enalapril) en la porción de Maleato de Enalapril en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$100C_E/C_M(r_i/r_E)$$

en la cual C_E es la concentración en mg por ml de Maleato de Enalapril SR-FA en la *Solución estándar diluida*, C_M es la concentración en mg por ml de Maleato de Enalapril en la *Solución muestra*, r_i es la sumatoria de las respuestas correspondientes a cualquier pico que aparezca en el cromatograma de la *Solución muestra*, excepto los correspondientes a ácido maleico, enalapril, enalaprilat y Dicetopiperazina y r_E es la respuesta del pico de enalapril en la *Solución estándar diluida*. No debe contener más de 5,0 % de impurezas totales.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de fosfato pH 2,5, Fase móvil, Solución de dicetopiperazina, Solución estándar de enalaprilat, Preparación estándar, Solución aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Maleato de Enalapril*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de diez Comprimidos de Maleato de Enalapril. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 20 mg de maleato de enalapril y transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar aproximadamente 50 ml de *Solución reguladora de fosfato pH 2,5*, sonicar durante 15 minutos hasta disolución

total, agitar durante 15 minutos y completar a volumen con el mismo solvente.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$ en los Comprimidos de Maleato de Enalapril, de acuerdo a la cantidad declarada.

EPINEFRINA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Epinefrina es una solución estéril de *Epinefrina* en *Agua para Inyectables* preparada con el agregado de Ácido Clorhídrico u otro regulador apropiado del pH. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_9H_{13}NO_3$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Tartrato Ácido de Epinefrina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - A 5 ml de Solución reguladora de ftalato de pH 4,0 (ver *Soluciones Reguladoras en Reactivos y Soluciones*), agregar 0,5 ml de Solución Inyectable de Epinefrina y 1,0 ml de iodo 0,1 N. Mezclar y dejar reposar durante 5 minutos. Agregar 2 ml de solución de tiosulfato de sodio (1 en 40): se debe producir un color rojo intenso.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Color y Transparencia

Solución estándar - Transferir 2,0 ml de iodo 0,1 N (SV) a un matraz aforado de 500 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Examinar una porción de la Solución Inyectable de Epinefrina (*Solución muestra*) en un tubo de ensayo de vidrio transparente contra un fondo blanco: no debe ser de color rosado ni debe contener precipitado. Si se observara cualquier coloración amarillenta en la *Solución muestra*, determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y de la *Solución estándar* en celdas de 1 cm con un espectrofotómetro a 460 nm: la absorbancia de la *Solución muestra* no debe ser mayor que la de la *Solución estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 2,2 y 5,0.

Acidez total

Transferir 5,0 ml de la Solución Inyectable de Epinefrina a un erlenmeyer, agregar 10 ml de agua y titular con hidróxido de sodio 0,01 N (SV) hasta pH 7,40. Realizar una determinación con un blanco

y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). No se deben consumir más de 25,0 ml de hidróxido de sodio 0,01 N.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 357,0 Unidades de Endotoxina por mg de Epinefrina.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 15 cm x 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas totalmente porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato pH 3,8 - A 1 litro de fosfato monobásico de sodio 0,05 M, agregar aproximadamente 519 mg de 1-octanosulfonato de sodio y aproximadamente 45 mg de edetato disódico y mezclar. Ajustar a pH 3,8 mediante el agregado gota a gota de ácido fosfórico, si fuera necesario.

Fase móvil - *Solución reguladora de fosfato pH 3,8* y metanol (85:15). Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Tartrato Ácido de Epinefrina SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente y en etapas si fuera necesario, con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg de Epinefrina por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Epinefrina, equivalente aproximadamente a 1 mg de Epinefrina, a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Disolver 10 mg de clorhidrato de dopamina en 100 ml de la *Preparación estándar* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 1,0 para Epinefrina y

2,0 para dopamina; la resolución R entre los picos de Epinefrina y dopamina no debe ser menor de 3,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_9H_{13}NO_3$ en la Solución Inyectable de Epinefrina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la Solución Inyectable de Epinefrina no debe emplearse si su color fuera rosado o más oscuro que amarillo pálido o si contuviera un precipitado.

ERGOMETRINA, MALEATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los comprimidos de Maleato de Ergometrina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de $C_{19}H_{23}N_3O_2 \cdot C_4H_4O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Maleato de Ergometrina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Alcaloides relacionados*. El valor de R_f de la mancha principal azul obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{19}H_{23}N_3O_2 \cdot C_4H_4O_4$ disuelta a partir de las absorbancias medidas por fluorescencia empleando una longitud de onda de excitación a un máximo de 322 nm y el máximo de emisión a 428 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Maleato de Ergometrina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{19}H_{23}N_3O_2 \cdot C_4H_4O_4$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Alcaloides relacionados

[NOTA: realizar el ensayo rápidamente, sin exponer a la luz natural y con mínima exposición a la luz artificial].

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100.

Cromatografía) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol e hidróxido de amonio (75:25:1).

Solución madre del estándar - Pesar exactamente alrededor 25 mg de Maleato de Ergometrina SR-FA, transferir a una ampolla de decantación, agitar con 10 ml de agua, agregar hidróxido de amonio 6 N hasta alcalinidad y extraer con tres porciones de 10 ml de cloroformo. Evaporar los extractos combinados bajo corriente de nitrógeno, pero sin calentar, hasta sequedad. Disolver y diluir el residuo a 10 ml con *Fase móvil*.

Soluciones estándar A, B, C y D - Diluir volúmenes exactamente medidos de la *Solución madre del estándar* con *Fase móvil* hasta obtener las *Soluciones estándar* procediendo según se indica en la tabla siguiente:

Solución estándar	Dilución	concentración (µg por ml)	% con respecto a la muestra
A	1 en 20	125	5,0
B	1 en 33	75	3,0
C	1 en 100	25	1,0
D	1 en 200	12,5	0,5

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 5 mg de maleato de ergometrina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a una ampolla de decantación, agitar con 10 ml de agua, agregar hidróxido de amonio 6 N hasta alcalinidad y extraer con tres porciones de 10 ml de cloroformo. Evaporar los extractos combinados bajo corriente de nitrógeno, pero sin calentar, hasta sequedad. Disolver y diluir el residuo a 2,0 ml con *Fase móvil*. [NOTA: preparar esta solución en el momento de su uso].

Revelador - Cuidadosamente disolver 800 mg de *p*-dimetilaminobenzaldehído en una mezcla de alcohol y ácido sulfúrico (100:10).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 µl de la *Solución muestra* y 20 µl de las *Soluciones estándar A, B, C y D*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore en una corriente de aire frío. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 366 nm y localizar las manchas principales y secundarias fluorescentes. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y localizar las manchas principales y secundarias de color azul. Comparar las intensidades de las manchas secundarias en el cromatograma obtenido a partir de

la *Solución muestra* con las manchas principales de la *Solución estándar*: la suma de las intensidades de las manchas secundarias obtenidas a partir de la *Solución muestra* no debe ser mayor de 5,0 % de sustancias relacionadas.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 312 nm y una columna de 30 cm × 3 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato 0,5 M - Disolver 6,8 g de fosfato monobásico de potasio en 600 ml de agua y ajustar a pH 2,1 con ácido fosfórico. Diluir a 1 litro con agua y mezclar.

Fase móvil - *Solución reguladora de fosfato 0,5 M* y acetonitrilo (80:20). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100.Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Maleato de Ergometrina SR-FA en *Fase móvil* hasta obtener una solución de aproximadamente 0,02 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Maleato de Ergometrina. Pesar exactamente una cantidad equivalente aproximadamente a 1 mg de maleato de ergometrina, transferir a un matraz aforado de 50 ml. Agregar 25 ml de *Fase móvil*, sonicar durante 5 minutos, enfriar a temperatura ambiente, completar a volumen con *Fase móvil*, mezclar y centrifugar. Emplear el líquido sobrenadante.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención relativo debe ser aproximadamente 3 minutos para el maleato de ergometrina; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 3,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{19}H_{23}N_3O_2 \cdot C_4H_4O_4$ en la porción de los Comprimidos de Maleato de Ergometrina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ERGOMETRINA, MALEATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Maleato de Ergometrina es una solución estéril de *Maleato de Ergometrina* en *Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{19}H_{23}N_3O_2 \cdot C_4H_4O_4$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Maleato de Ergometrina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis de vidrio Tipo I, en un sitio frío.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en el ensayo de *Alcaloides relacionados*. El valor de R_f de la mancha azul principal, obtenida a partir de la *Solución muestra*, se debe corresponder con el de la *Solución estándar A*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 2,7 y 3,5.

Alcaloides relacionados

[NOTA: realizar este ensayo rápidamente, sin exposición a la luz del día y con exposición mínima a la luz artificial].

Fase estacionaria, Fase móvil, Diluyente, Solución madre del estándar y Soluciones estándar - Proceder según se indica en *Alcaloides relacionados* en *Maleato de Ergometrina*.

Solución muestra - Inmediatamente antes de usar, transferir un volumen de Solución Inyectable de Maleato de Ergometrina, equivalente a 5 mg de maleato de ergometrina, a una ampolla de decantación y extraer con tres porciones de 5 ml de cloroformo. Descartar los extractos clorofórmicos. Alcalinizar frente al tornasol con hidróxido de amonio 6 N y extraer con tres porciones de 5 ml de cloroformo. Evaporar hasta sequedad los extractos combinados con la ayuda de una corriente de nitrógeno, pero sin calentar. Disolver el residuo obtenido en 0,5 ml de *Diluyente*.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en el ensayo de *Alcaloides relacionados* en *Maleato de Ergometrina*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 700,0 Unidades de Endotoxina por mg de maleato de ergometrina

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 312 nm y una columna de 30 cm x 3,0 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato 0,05 M - Disolver 6,8 g de fosfato monobásico de potasio en 600 ml de agua y ajustar con ácido fosfórico a pH 2,1. Diluir a 1 litro con agua y mezclar.

Fase móvil - *Solución reguladora de fosfato 0,05 M* y acetonitrilo (80:20). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Maleato de Ergometrina SR-FA en *Fase móvil*, agregando una cantidad de agua equivalente al 10 % del volumen final, para obtener una solución de aproximadamente 0,02 mg por ml.

Preparación muestra - Diluir cuantitativamente un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Maleato de Ergometrina, equivalente a 2 mg de maleato de ergometrina con *Fase móvil* y agua, si fuera necesario, hasta obtener una solución de 0,02 mg por ml en la cual el volumen de Solución Inyectable de Maleato de Ergonovina más el agua agregada constituya 10 % del volumen final.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención debe ser aproximadamente 3 minutos. La desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe mayor de 3,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y

medir las respuestas de los picos principales.
Calcular la cantidad en de $C_{19}H_{23}N_3O_2 \cdot C_4H_4O_4$ en
la Solución Inyectable de Maleato de Ergometrina,
en base a la cantidad declarada.

ERGOTAMINA, TARTRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Tartrato de Ergotamina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de $(C_{33}H_{35}N_5O_5)_2 \cdot C_4H_6O_6$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Tartrato de Ergotamina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad equivalente aproximadamente a 5 mg de tartrato de ergotamina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, triturar con 10 ml de éter de petróleo durante unos minutos, dejar decantar y descartar el extracto con éter de petróleo. Agregar al residuo 10 ml de cloroformo saturado con amoníaco (agitar el cloroformo con hidróxido de amonio, descartar la capa clorofórmica sobrenadante) y triturar durante unos minutos. Filtrar y evaporar el filtrado hasta sequedad en un baño de agua. Disolver el residuo en una mezcla de 4 ml de ácido acético glacial y 4 ml de acetato de etilo. A 1 ml de esta solución agregar lentamente, con agitación continua y enfriando 1 ml de ácido sulfúrico: se debe desarrollar una coloración azul con un tinte rojo. Agregar 0,1 ml de cloruro férrico, previamente diluido con el mismo volumen de agua: el tinte rojo debe ser menos aparente y el color azul más pronunciado.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención relativo del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disgregación <310>

No más de 5 minutos.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: solución de ácido tartárico (1 en 100); 1.000 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $(C_{33}H_{35}N_5O_5)_2 \cdot C_4H_6O_6$ disuelta a partir de las absorbancias medidas por fluorescencia empleando una longitud de onda de excitación a un máximo de

327 nm y el máximo de emisión a 427 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Tartrato de Ergotamina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $(C_{33}H_{35}N_5O_5)_2 \cdot C_4H_6O_6$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm x 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Acetonitrilo y fosfato monobásico de potasio 0,01 M (55:45). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Acetonitrilo y agua (55:45).

Solución del estándar interno - Transferir aproximadamente 40 mg de *Maleato de Ergometrina* a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 10 mg de Tartrato de Ergotamina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, agregar 5,0 ml de *Solución del estándar interno*, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino los Comprimidos de Tartrato de Ergotamina, pesar una cantidad equivalente a 10 mg de tartrato de ergotamina, transferir a un matraz aforado de 500 ml. Agregar 50 ml de la *Solución del estándar interno*, 300 ml de *Diluyente* y sonicar durante 10 minutos. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Filtrar y descartar los primeros 25 ml del filtrado.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,7 para el maleato de

ergometrina y 1,0 para el tartrato de ergotamina; la resolución R entre el tartrato de ergotamina y el estándar interno no debe ser menor de 3,0; la eficiencia de la columna no debe ser menor de 3.000 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $(C_{33}H_{35}N_5O_5)_2 \cdot C_4H_6O_6$ en los Comprimidos de Tartrato de Ergotamina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ERITROMICINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Eritromicina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{37}H_{67}NO_{13}$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Eritromicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. Cromatografía) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Metanol y cloroformo (85:15).

Revelador - Alcohol, *p*-metoxibenzaldehído y ácido sulfúrico (90:5:5).

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino tres Comprimidos de Eritromicina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 125 mg de eritromicina, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 125 mg de Eritromicina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*. Calentar la placa a 100 °C durante 10 minutos: la presencia de eritromicina se evidencia como una mancha púrpura casi negra; el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: solución reguladora de fosfato 0,05 M pH 6,8 (ver *Soluciones reguladoras en Reactivos y soluciones*); 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la

cantidad de $C_{37}H_{67}NO_{13}$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Solución muestra - Diluir una porción filtrada de la alícuota en ensayo con *Medio* para obtener una solución de aproximadamente 0,28 mg de Eritromicina por ml y mezclar.

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Eritromicina SR-FA en metanol (no más de 1 ml de metanol por cada 14 mg de la *Sustancia de referencia*) y diluir con agua para obtener una solución de aproximadamente 0,56 mg por ml.

Solución estándar - Diluir la *Solución madre del estándar* con agua para obtener una solución de aproximadamente 0,28 mg por ml. [NOTA: preparar la solución inmediatamente antes de su uso].

Procedimiento - Transferir 5,0 ml de la *Solución muestra* y 5,0 ml de la *Solución estándar* a sendos matraces aforados de 25 ml y proceder con cada matraz del siguiente modo: agregar 2,0 ml de agua y dejar reposar durante 5 minutos agitando intermitentemente. Agregar 15,0 ml de hidróxido de sodio 0,25 N, completar a volumen con *Medio* y mezclar. Calentar a 60 °C durante 5 minutos y dejar enfriar. Determinar las absorbancias a la longitud de onda de máxima absorción, 236 nm, con un espectrofotómetro, empleando una solución blanco preparada de forma similar, pero sustituir los 2,0 ml de agua por 2,0 ml de ácido sulfúrico 0,5 N.

Tolerancia - No menos de 70 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{37}H_{67}NO_{13}$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado <680>

Pesar aproximadamente 100 mg del polvo fino obtenido en *Valoración*. Transferir a un pesafiltro con tapa provista de un capilar y secar al vacío a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 5,0 % de su peso.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para Eritromicina en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*. Pesar y reducir a polvo fino no menos de diez Comprimidos de Eritromicina. Pesar exactamente una cantidad apropiada y diluir con metanol para obtener una *Solución madre de la muestra* que contenga no menos de 1 mg de Eritromicina.

Agitar esta solución durante 15 minutos y diluir con *Solución reguladora N° 3* para obtener las soluciones de ensayo.

ERITROMICINA

GEL TÓPICO

Definición - El Gel Tópico de Eritromicina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 125,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{37}H_{67}NO_{13}$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Eritromicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Metanol, agua y trietilamina (90:9:1).

Solución muestra - Transferir una cantidad de Gel Tópico de Eritromicina, equivalente a 20 mg de eritromicina, a un tubo con tapón de 50 ml, agregar 20 ml de ácido clorhídrico 0,01 N y calentar en baño de agua a reflujo. Remover el tubo del baño de agua y agitar. Colocar en el baño, calentar nuevamente, remover el tubo del mismo y transferir inmediatamente una porción del sobrenadante clarificado a un tubo de ensayo. Dejar en reposo hasta que alcance la temperatura ambiente, agregar el mismo volumen de *Fase móvil* y mezclar.

Solución estándar - Transferir 5 mg de Eritromicina SR-FA a un tubo con tapón, agregar 5 ml de ácido clorhídrico 0,01 N y calentar en baño de agua a reflujo. Proceder según se indica en *Solución muestra* comenzando donde dice: "Remover el tubo del baño...".

Revelador - Alcohol, *p*-metoxibenzaldehído y ácido sulfúrico (90:5:5).

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 5 μ l de la *Solución muestra* y 5 μ l de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar la placa con *Revelador*, calentar a 100 °C durante 10 minutos y examinar los cromatogramas: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para Eritromicina en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*.

Transferir una porción exactamente pesada del Gel Tópico de Eritromicina, equivalente a 20 mg de eritromicina, a un recipiente de vidrio, agregar 200 ml de *Solución reguladora N° 3* adicionada con 0,5 % de polisorbato 80 y agitar durante 3 minutos a alta velocidad. Diluir un volumen exactamente medido de la solución resultante con *Solución reguladora N° 3* para obtener las soluciones de ensayo.

ERITROMICINA

SOLUCIÓN TÓPICA

Definición - La Solución Tópica de Eritromicina es una solución de *Eritromicina*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 125,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{37}H_{67}NO_{13}$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Eritromicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Metanol y cloroformo (85:15).

Revelador - Alcohol, *p*-metoxibenzaldehído y ácido sulfúrico (90:5:5).

Solución estándar - Preparar una solución de Eritromicina SR-FA en metanol de aproximadamente 2,5 mg por ml.

Solución muestra - Transferir una cantidad apropiada de la Solución Tópica de Eritromicina a un recipiente apropiado y diluir con metanol para obtener una solución de aproximadamente 2,5 mg de eritromicina por ml.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente la mitad de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*, calentar a 100 °C durante 10 minutos y examinar las manchas de color púrpura a negro en los cromatogramas: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 8,0 % si contiene 20 mg por ml, no más de 5,0 % si contiene 15 mg por ml, o no más de 2,0 % si contiene acetona. Emplear 20 ml de una mezcla de piridina y metanol (1:1) para reemplazar al metanol en el recipiente de titulación.

Determinación de alcohol <130>

Método II. Entre 92,5 y 107,5 % de la cantidad declarada de C_2H_5OH .

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para Eritromicina en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*.

Emplear un volumen exactamente medido de la Solución Tópica de Eritromicina y diluir cuantitativamente y en etapas con *Solución reguladora N° 3* para obtener las soluciones de ensayo.

ERITROMICINA, ESTEARATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Estearato de Eritromicina deben contener el equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de eritromicina ($C_{37}H_{67}NO_{13}$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Eritromicina SR-FA. Estearato de Eritromicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Metanol y cloroformo (85:15).

Revelador 1 - Solución metanólica de diclorofluorescína (1 en 500).

Revelador 2 - Alcohol absoluto, *p*-metoxibenzaldehído y ácido sulfúrico (90:5:5).

Solución muestra - Pesar una cantidad apropiada del polvo fino obtenido en *Valoración*, agregar metanol para obtener una solución de aproximadamente 5 mg de eritromicina por ml. Agitar durante aproximadamente 30 minutos. Centrifugar y emplear el sobrenadante transparente.

Solución estándar - Preparar una solución de Estearato de Eritromicina SR-FA en metanol de aproximadamente 8 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 μ l de la *Solución muestra* y 20 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente la mitad de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1* y examinar bajo luz ultravioleta a 366 nm: los valores de R_f de las manchas principales obtenidas a partir de la *Solución muestra* se deben corresponder con las de la *Solución estándar*. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 2*, calentar la placa a 100 °C durante 10 minutos y examinar los cromatogramas: la mancha correspondiente a la eritromicina debe ser color negro o púrpura; el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corres-

ponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 100 rpm.

Medio: *Solución reguladora de fosfato pH 6,8* (ver *Soluciones reguladoras en Reactivos y Soluciones*); 900 ml.

Tiempo: 120 minutos.

Determinar la cantidad de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Eritromicina SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 14 mg por ml. Transferir una porción de esta solución a un matraz aforado y diluir cuantitativamente con agua para obtener una solución de aproximadamente 0,56 mg por ml.

Solución estándar - Transferir 25,0 ml de *Solución madre del estándar* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar. [NOTA: preparar esta solución en el día de su uso].

Solución muestra - Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 0,28 mg de eritromicina por ml.

Procedimiento - Transferir 5,0 ml de la *Solución estándar* a dos matraces aforados de 25 ml, empleando uno de los matraces como *Blanco del estándar*. Proceder del mismo modo con 5,0 ml de la *Solución muestra*, pero empleando uno de los matraces como *Blanco de la muestra*. A cada uno de los blancos agregar 2 ml de ácido sulfúrico 0,5 N y a los otros matraces agregar 2,0 ml de agua. Dejar en reposo durante 5 minutos, agitando ocasionalmente. Agregar a todos los matraces 15,0 ml de hidróxido de sodio 0,25 N, completar a volumen con *Medio* y mezclar. Transferir a sendos recipientes apropiados y calentar en un baño de agua a $60 \pm 0,5$ °C y luego dejar enfriar. Determinar las absorbancias de la *Solución muestra*, la *Solución estándar*, el *Blanco del estándar* y el *Blanco de la muestra*, a la longitud de onda de máxima absorción, 236 nm. Determinar la cantidad de eritromicina ($C_{37}H_{67}NO_{13}$) disuelta a partir de la *Solución muestra* comparando con la solución obtenida a partir de la *Solución estándar*.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{37}H_{67}NO_{13}$ se debe disolver en 120 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 100 mg del polvo fino obtenido en *Valoración* en un recipiente con tapa

con perforación capilar y secar al vacío a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 5,0 % de su peso.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración en Comprimidos de Eritromicina*.

ERITROMICINA, ESTOLATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Estolato de Eritromicina deben contener el equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de eritromicina ($C_{37}H_{67}NO_{13}$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias	de	referencia	-
Eritromicina SR-FA.		Estolato	de
Eritromicina SR-FA.			

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Metanol y cloroformo (85:15).

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino tres Comprimidos de Estolato de Eritromicina. Transferir una cantidad apropiada a una ampolla de decantación, diluir con metanol para obtener una solución equivalente a 20 mg de eritromicina por ml y mezclar.

Solución estándar - Preparar una solución de Estolato de Eritromicina SR-FA en metanol de aproximadamente 20 mg de eritromicina por ml.

Revelador - Alcohol, *p*-metoxibenzaldehído y ácido sulfúrico (90:5:5).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 3 μ l de la *Solución muestra* y 3 μ l de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente la mitad de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y secar a 100 °C durante 10 minutos: la presencia de eritromicina se evidencia como una mancha púrpura casi negra; el valor de *R_f* de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disgregación <310>

Tiempo: 30 minutos; procediendo según se indica para *Comprimidos no Recubiertos*, pero no usar discos y emplear *Fluido gástrico simulado* como líquido de inmersión en vez de agua.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 5,0 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para Eritromicina en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*. Pesar y reducir a polvo fino no menos de diez Comprimidos de Estolato de Eritromicina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 0,25 g de estolato de eritromicina, transferir a un matraz aforado de 1 litro, agregar 400 ml de metanol, 200 ml de *Solución reguladora N° 3* y completar a volumen con *Agua purificada* estéril. Mantener esta solución a 60 °C durante 3 horas, enfriar y diluir con *Solución reguladora N° 3* para obtener las soluciones de ensayo.

ERITROMICINA, ESTOLATO DE SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Estolato de Eritromicina debe contener el equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de eritromicina ($C_{37}H_{67}NO_{13}$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias	de	referencia	-
Eritromicina SR-FA.		Estolato	de
Eritromicina SR-FA.			

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto. Conservar y almacenar en un sitio frío.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Metanol y cloroformo (85:15).

Solución estándar - Pesar exactamente una cantidad de Estolato de Eritromicina SR-FA, equivalente a 20 mg de eritromicina. Transferir a una ampolla de decantación y realizar la extracción según se indica en *Solución muestra*.

Solución muestra - Transferir una cantidad de la Suspensión Oral de Estolato de Eritromicina, equivalente a 20 mg de eritromicina, a una ampolla de decantación. Agregar 15 ml de hidróxido de sodio 0,02 N y mezclar por rotación. Agregar 2 g de cloruro de sodio, 25 ml de cloroformo y agitar durante 3 minutos. Transferir la fase clorofórmica a través de una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro, previamente lavado con cloroformo, y recoger el extracto clorofórmico en un vaso de precipitados, lavando el sulfato de sodio anhidro con 10 ml adicionales del mismo solvente. Evaporar el cloroformo hasta sequedad y disolver el residuo en 1 ml de metanol.

Revelador - Alcohol absoluto, *p*-metoxibenzaldehído y ácido sulfúrico (90:5:5).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 3 μ l de la *Solución estándar* y 3 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente la mitad de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar

secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*, calentar a 100°C durante 10 minutos y examinar los cromatogramas, donde las manchas de eritromicina aparecen de color negro-púrpura: el valor de R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,5 y 6,5.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para *Eritromicina* en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*.

Diluir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oral de Estolato de Eritromicina, recientemente mezclado y libre de burbujas, con metanol para obtener una solución de aproximadamente 2,5 mg de eritromicina por ml. Diluir cuantitativamente y en etapas con *Solución reguladora N° 3* y dejar reposar durante 18 horas a temperatura ambiente para obtener las soluciones de ensayo.

ERITROMICINA, ETILSUCCINATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Etilsuccinato de Eritromicina deben contener el equivalente a no menos del 90,0 por ciento y no más del 120,0 por ciento de la cantidad declarada de eritromicina ($C_{37}H_{67}NO_{13}$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias	de	referencia	-
Eritromicina SR-FA.		Etilsuccinato	de
Eritromicina SR-FA.			

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Metanol y cloroformo (85:15).

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino tres Comprimidos de Etilsuccinato de Eritromicina, transferir una cantidad apropiada a un matraz y agregar una cantidad suficiente de metanol para obtener una solución de aproximadamente 2,5 mg de eritromicina por ml. Agitar durante aproximadamente 30 minutos. Centrifugar una porción de esta mezcla y emplear el líquido sobrenadante transparente.

Solución estándar - Preparar una solución de Etilsuccinato de Eritromicina SR-FA en metanol de aproximadamente 3 mg por ml.

Revelador - Alcohol, *p*-metoxibenzaldehído y ácido sulfúrico (90:5:5).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*. Colocar la placa en una cámara cromatográfica y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente la mitad de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*. Calentar la placa a 100 °C durante 10 minutos: la presencia de eritromicina y ácido succínico se evidencian como manchas púrpuras casi negras; los valores de R_f de las manchas principales obtenidas a partir de la *Solución muestra* se deben corresponder con los de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso y determinar la cantidad de $C_{37}H_{67}NO_{13}$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Reactivo de color - A 173 ml de agua fría, agregar 325 ml de ácido sulfúrico agitando constante y lentamente. Dejar enfriar la solución, agregar 2 ml de solución de cloruro férrico 1 en 40, 1 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído y agitar hasta disolución. Almacenar en un recipiente de vidrio inactivo. [NOTA: preparar este reactivo en el día de su uso].

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Eritromicina SR-FA en *Medio* para obtener una solución de aproximadamente 0,44 mg por ml, sonicar para disolver, si fuera necesario. [NOTA: emplear esta solución dentro de aproximadamente 5 horas de preparada].

Solución muestra - Filtrar porciones de las alícuotas en ensayo, descartando los primeros 5 ml del filtrado. Emplear el filtrado como *Solución muestra*.

Procedimiento - A tres erlenmeyers de 50 ml, con tapones de vidrio, agregar 2,0 ml de la *Solución estándar*, 2,0 ml de la *Solución muestra* y 2,0 ml de *Medio* para emplear como blanco, respectivamente. Colocar los erlenmeyers en un baño de hielo durante aproximadamente 15 minutos. A intervalos precisos de 1 minuto, agregar 10,0 ml de *Reactivo de color* a la *Solución estándar*, a la *Solución muestra* y al blanco. Inmediatamente después de agregar el *Reactivo de color*, retirar cada uno de los erlenmeyers del baño de hielo, taparlos, mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente exactamente durante 30 minutos. Determinar las absorbancias a 480 nm de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* a intervalos precisos de 1 minuto, con un espectrofotómetro, empleando el blanco preparado.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada equivalente a $C_{37}H_{67}NO_{13}$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 100 mg a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*, secar al vacío a una presión que no exceda los 5 mm de Hg a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 4,0 % de su peso.

Control microbiológico de productos no

obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración en Comprimidos de Eritromicina*.

ERITROMICINA, ETILSUCCINATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Etilsuccinato de Eritromicina es una solución estéril de *Etilsuccinato de Eritromicina* en *Polietilenglicol 400* y 2 % de aminobenzoato de butilo. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{37}H_{67}NO_{13}$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Eritromicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 1,5 %, empleando 20 ml de metanol con 10 % de imidazol en lugar de metanol en el recipiente de titulación.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Método de filtración por membrana*, empleando un filtro de membrana resistente al efecto solvente del polietilenglicol 400.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para *Eritromicina* en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos.*

Diluir cuantitativamente un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Etilsuccinato de Eritromicina con metanol para obtener una solución de aproximadamente 1 mg de eritromicina por ml. Diluir una porción de esta solución cuantitativamente y en etapa con *Solución reguladora N° 3* para obtener las soluciones de ensayo.

ERITROMICINA, ETILSUCCINATO DE SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Etilsuccinato de Eritromicina es una suspensión de *Etilsuccinato de Eritromicina* en un vehículo apropiado. Debe contener el equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de eritromicina ($C_{37}H_{67}NO_{13}$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias	de	referencia	-
Eritromicina SR-FA.		Etilsuccinato	de
Eritromicina SR-FA.			

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto, en un sitio frío.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Metanol y cloroformo (85:15).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Etilsuccinato de Eritromicina SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 3 mg por ml.

Solución muestra - Diluir una cantidad apropiada de la Suspensión Oral de Etilsuccinato de Eritromicina en metanol para obtener una solución que contenga el equivalente a 2,5 mg de eritromicina por ml. Agitar durante 30 minutos, centrifugar una porción de la mezcla y emplear el sobrenadante.

Revelador - Alcohol absoluto, *p*-metoxibenzaldheido y ácido sulfúrico (90:5:5).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución estándar* y 10 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente la mitad de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*, secar a 100 °C durante 10 minutos y examinar los cromatogramas: las manchas de eritromicina y ácido succínico se visualizan como manchas de color negro púrpura; los valores de R_f de las manchas principales obtenidos a partir de la

Solución muestra se deben corresponder con los de la *Solución estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 6,5 y 8,5.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para *Eritromicina* en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*. Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oral de Etilsuccinato de Eritromicina, recientemente mezclado y libre de burbujas, a un recipiente de vidrio apropiado. Agitar durante aproximadamente 4 minutos a alta velocidad con cantidad suficiente de metanol para obtener una solución de 1 mg de eritromicina por ml. Diluir cuantitativamente y en etapas con *Solución reguladora N° 3* para obtener las soluciones de ensayo.

ESPIRONOLACTONA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Espironolactona deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{24}H_{32}O_4S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Espironolactona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, acetato de etilo y metanol (2:2:1).

Solución muestra - Reducir a polvo fino los Comprimidos de Espironolactona, pesar una cantidad equivalente a 100 mg de espironolactona, mezclar con 25 ml de metanol y filtrar.

Solución estándar - Preparar una solución de Espironolactona SR-FA en metanol de aproximadamente 4 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N que contenga 0,1 % de lauril sulfato de sodio; 1.000 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{24}H_{32}O_4S$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 242 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Espironolactona SR-FA en el mismo medio. [NOTA: se puede emplear un volumen de alcohol que no exceda el 1 % del volumen final de la solución para preparar la *Solución estándar*].

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{24}H_{32}O_4S$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Espironolactona*.

Preparación muestra - Pesar exactamente veinte Comprimidos de Espironolactona, transferir a un matraz aforado de 1 litro, agregar 100 ml de agua, sonicar durante 15 minutos o hasta que los Comprimidos de Espironolactona se hayan desintegrado y dejar enfriar durante 10 minutos. Agregar 500 ml de acetonitrilo, agitar durante 30 minutos y luego sonicar durante 30 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar. Centrifugar una porción de la mezcla aproximadamente a 3.000 rpm durante 10 minutos. Diluir una cantidad exactamente medida de la solución sobrenadante, cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con una mezcla de acetonitrilo y agua (1:1) para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg de espironolactona por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Espironolactona*. Calcular la cantidad de $C_{24}H_{32}O_4S$ en los Comprimidos de Espironolactona, de acuerdo a la cantidad declarada.

ESTREPTOMICINA, SULFATO DE PARA INYECCIÓN

Definición - Estreptomina para Inyección debe contener una cantidad de Sulfato de Estreptomina equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de estreptomina ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Estreptomina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos de *Identificación* en *Sulfato de Estreptomina*.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 7,0, determinado en una solución de 200 mg de Estreptomina por ml.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,25 Unidades de Endotoxina por mg de Estreptomina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado <680>

Secar 100 mg de Sulfato de Estreptomina para Inyección en un pesafiltro provisto de perforación capilar al vacío a una presión que no exceda los 5 mm Hg, a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 5,0 % de su peso.

VALORACIÓN

Preparación muestra 1 - (cuando está contenida en un envase monodosis). Reconstituir la Estreptomina para Inyección en un volumen de agua, exactamente medido, correspondiente al volumen de solvente indicado en el rótulo. Retirar todo el contenido extraíble y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con agua para obtener una solución que contenga una cantidad apropiada de estreptomina por ml.

Preparación muestra 2 - (cuando en el rótulo se indica la cantidad de estreptomina en un volumen

de solución reconstituida). Reconstituir un envase de Sulfato de Estreptomina para Inyección en un volumen exactamente medido de agua, correspondiente al volumen de solvente indicado en el rótulo. Diluir una porción exactamente medida de la solución reconstituida de Sulfato de Estreptomina para Inyección, cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con agua para obtener una solución que contenga una cantidad apropiada de estreptomina por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*, empleando un volumen exactamente medido de la *Preparación muestra* diluida cuantitativamente con agua para obtener una *Preparación muestra diluida* con una concentración igual al nivel de dosis intermedio del *Estándar*.

ETAMBUTOL, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Etambutol deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Etambutol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de etambutol a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Suspender con 3 ml de metanol en un mortero de vidrio. Agregar 5 ml de metanol y filtrar a través de un papel de filtro previamente humedecido con metanol. Transferir el filtrado a un vaso de precipitados con aproximadamente 100 ml de acetona. Agitar la mezcla y dejar cristalizar durante 15 minutos. Decantar el líquido y secar suavemente los cristales hasta peso constante: los cristales obtenidos deben cumplir con los ensayos de *Identificación* en *Clorhidrato de Etambutol*.

Ensayo de Disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Solución reguladora de fosfato - Disolver 38,0 g de fosfato monobásico de sodio y 2,0 g de fosfato dibásico de sodio anhidro en agua hasta obtener 1 litro de solución.

Solución de verde de bromocresol - Disolver 200 mg de verde de Bromocresol en 30 ml de agua y 6,5 ml de hidróxido de sodio 0,1 N. Diluir a 500 ml con *Solución reguladora de fosfato*, mezclar y ajustar a pH $4,6 \pm 0,1$ con ácido clorhídrico 0,1 N.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Etambu-

tol SR-FA en agua y diluir con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg de por ml.

Procedimiento - Emplear tres tubos de centrifuga de vidrio de 50 ml con tapón, transferir (a) 1,0 ml de una porción filtrada de la alícuota en ensayo, (b) 1,0 ml de *Preparación estándar* y (c) 1,0 ml de agua como blanco. Agregar 5,0 ml de *Solución de verde de bromocresol* a cada tubo y mezclar. Agregar 10,0 ml de cloroformo a cada uno, tapar y agitar las mezclas vigorosamente. Decantar y descartar las fases acuosas y filtrar la fase clorofórmica a través de distintas torundas de algodón. Determinar la cantidad de $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$ disuelta a partir de las absorbancias medidas a la longitud de onda de máxima absorción, 415 nm, obtenidas a partir de las alícuotas en ensayo comparando con las de la *Solución estándar*. Llevar a cero con el blanco.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Límite de 2-aminobutanol

Fase estacionaria, Fase móvil y Revelador - Proceder según se indica en *Límite de 2-aminobutanol* en *Clorhidrato de Etambutol*.

Solución estándar - Disolver 50 mg de 2-aminobutanol en metanol y diluir a 10 ml con el mismo solvente. Diluir 1,0 ml de esta solución a 10 ml con metanol.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de etambutol a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*, agitar durante 5 minutos con cantidad suficiente de metanol y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Límite de 2-aminobutanol* en *Clorhidrato de Etambutol*. La mancha correspondiente a 2-aminobutanol en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* no debe ser más intensa que la mancha obtenida con la *Solución estándar* (1,0 %).

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 200 nm y una columna de

15 cm × 4,6 mm desactivada para bases con fase estacionaria constituida por grupos nitrilos químicamente unidos a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución de trietilamina - Mezclar 1 ml de trietilamina con 1 litro de agua. Ajustar a pH 7,0 con ácido fosfórico.

Fase móvil - Solución de trietilamina y acetonitrilo (1:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad de Clorhidrato de Etambutol SR-FA, disolver en agua para obtener una solución de aproximadamente 0,30 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Etambutol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 30 mg de clorhidrato de etambutol, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en agua, sonicar hasta disolución y completar a volumen con el mismo solvente. Filtrar esta solución descartando los primeros 10 ml.

Aptitud del Sistema - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Etambutol, de acuerdo a la cantidad declarada.

ETOSUXIMIDA

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Etosuximida deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_7H_{11}NO_2$, presente en la forma de una solución de *Etosuximida en Polietilenglicol 400* u otro solvente apropiado y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Etosuximida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Absorción infrarroja <460>. Extraer el contenido de tres Cápsulas de Etosuximida y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 250 mg de etosuximida y transferir a una ampolla de decantación que contenga 50 ml de éter. Mezclar con tres porciones de 10 ml de agua, descartando los extractos acuosos. Agregar aproximadamente 5 g de sulfato de sodio anhidro, mezclar durante 3 minutos, filtrar a través de una torunda de algodón previamente lavado con éter. Evaporar la solución etérea, a temperatura ambiente, hasta sequedad y disolver el residuo obtenido en 5 ml de cloroformo: el espectro de absorción infrarroja de esta solución, en la región comprendida entre 3.000 cm^{-1} y 1.650 cm^{-1} , determinada en celdas de 0,1 mm, debe presentar sólo máximos a las mismas longitudes de onda que una solución de Etosuximida SR-FA en cloroformo 1 en 15.

Ensayo de disolución <320>

Procedimiento para muestreo unificado

Aparato 1: 50 rpm.

Medio: *Solución reguladora de fosfato pH 6,8* (ver *Soluciones reguladoras en Reactivos y Soluciones*); 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_7H_{11}NO_2$ disuelta, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Etosuximida SR-FA en el mismo medio, empleando la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El

caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Agua y acetonitrilo (80:20). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µl) de las alícuotas en ensayo y la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_7H_{11}NO_2$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Límite de ácido 2-etil-2-metilsuccínico

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de ácido 2-etil-2-metilsuccínico en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,026 mg por ml.

Solución muestra - Transferir veinte Cápsulas de Etosuximida a un matraz aforado de 2 litros, disolver en 1.800 ml de *Fase móvil*, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de ácido 2-etil-2-metilsuccínico en las Cápsulas de Etosuximida, relacionando las respuestas de los picos de ácido 2-etil-2-metilsuccínico obtenidos a partir de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. No debe contener más de 0,5 %.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 225 nm y una columna de vidrio de 15 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido

a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (875:125:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de aptitud del sistema - Disolver una cantidad apropiada de Etosuximida SR-FA y ácido 2-etil_2-metilsuccínico en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,062 mg por ml y 0,064 mg por ml, respectivamente.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de ácido Etosuximida SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,062 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de veinte Cápsulas de Etosuximida, transferir a un matraz aforado de 2 litros, disolver en 1.800 ml de *Fase móvil*, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de etosuximida y ácido 2-etil-2-metilsuccínico no debe ser menor de 3,5; el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,5; la desviaciones estándar relativas para inyecciones repetidas determinadas para etosuximida y ácido 2-etil-2-metilsuccínico no deben ser mayor de 2,0 % y 5,0 %, respectivamente.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_2$ en las Cápsulas de Etosuximida, de acuerdo a la cantidad declarada.

FENITOÍNA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Fenitoína deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fenitoína SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 100 rpm.

Solución reguladora de tris 0,05 M - Disolver 60,5 g de tris(hidroximetil)aminometano en 6 litros de agua. Diluir a 10 litros con agua. Ajustar a pH $9,00 \pm 0,05$ con ácido fosfórico. Disolver 100 g de lauril sulfato de sodio en aproximadamente 6 litros de la solución reguladora, transferir esta solución a la solución reguladora remanente y mezclar.

Medio: *Solución reguladora de tris 0,05 M*; 900 ml.

Tiempo: 120 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico, Solución de trietilamina, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Fenitoína SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 3 mg de fenitoína por ml. Transferir una porción de esta solución a un matraz aforado y diluir cuantitativamente con *Medio*, en etapas si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 0,06 mg de fenitoína por ml.

Solución estándar - Transferir 10,0 ml de *Solución madre del estándar* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución muestra - Retirar una porción de cada alícuota y descartar los primeros 3 ml del filtrado.

Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos.

Tolerancia - No menos de 70 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ se debe disolver en 120 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación
<740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Solución de trietilamina - Transferir 1 ml de trietilamina a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Fase móvil - Agua, metanol, acetonitrilo, *Solución de trietilamina* y ácido acético (500:270:230:5:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Fenitoína SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg de fenitoína por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Fenitoína. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 250 mg de fenitoína, transferir a un matraz aforado de 500 ml, disolver y completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor de 6.500 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ en los Comprimidos de Fenitoína, de acuerdo a la cantidad declarada.

FENITOÍNA

SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Fenitoína es una suspensión de *Fenitoína* en un medio apropiado. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fenitoína SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

A - Agitar un volumen de la Suspensión Oral de Fenitoína, equivalente a 100 mg de fenitoína, con 50 ml de una mezcla de éter y cloroformo (1 en 2) en una ampolla de decantación. Evaporar el extracto hasta sequedad y secar al vacío a 105 °C durante 4 horas: debe fundir entre 292 y 299 °C, con descomposición. Emplear el *Método I* en 260. *Determinación del punto de fusión*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 35 rpm.

Solución reguladora Tris 0,05 M: Disolver 36,3 g de tris (hidroximetil)amino metano y 60 g de laurilsulfato de sodio en 6 litros de agua, ajustar a pH $7,5 \pm 0,05$ con ácido clorhídrico y desgasificar.

Medio: *Solución reguladora Tris 0,05 M*; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 240 nm y una columna de 15 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato de sodio 0,02 M - Disolver 2,76 g de fosfato monobásico de sodio en 1 litro de agua.

Fase móvil - Solución reguladora de fosfato de sodio 0,02 M, metanol y acetonitrilo (50:27:23). Ajustar a pH 3,0 con ácido fosfórico. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 35 mg de Fenitoína SR-FA, transferir a un matraz aforado de 250 ml. Disolver con 15 ml de metanol, completar a volumen con *Medio* y mezclar.

Aptitud del sistema - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor de 5.400 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Solución estándar* y las soluciones en ensayo, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Para suspensiones orales en envases monodosis: debe cumplir con los requisitos.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Para suspensiones orales en envases multidosis: debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 229 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Agua, metanol, acetonitrilo, trietilamina 0,5 % en agua y ácido acético 1,74 N (191:100:40:1,3:1). Filtrar y desgasificar. Hacer

los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación muestra - Transferir un volumen de la Suspensión Oral de Fenitoína equivalente a 125 mg de fenitoína a un matraz aforado de 200 ml, lavar la pipeta con 40 ml de metanol y agregar los lavados al matraz. Agregar 50 ml de *Fase móvil*, completar a volumen con metanol, mezclar, sonicar y filtrar.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Fenitoína SR-FA en metanol y diluir con *Fase móvil* para obtener una solución de concentración similar a la obtenida a partir de la *Preparación muestra*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ en la Suspensión Oral de Fenitoína, de acuerdo a la cantidad declarada.

FENITOÍNA SÓDICA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Fenitoína Sódica es una solución estéril de Fenitoína Sódica con propilenglicol y alcohol en *Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{15}H_{11}N_2NaO_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Fenitoína SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida*. Transferir un volumen de la Solución Inyectable de Fenitoína Sódica, equivalente a 250 mg de fenitoína sódica, a una ampolla de decantación que contiene 25 ml de agua. Extraer, en el orden enumerado, con porciones de 50, 30 y 30 ml de acetato de etilo. Lavar cada extracto con dos porciones de 20 ml de solución de acetato de sodio 1 en 100. Evaporar los extractos combinados de acetato de etilo y secar el residuo de fenitoína a 105 °C hasta peso constante: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión en bromuro de potasio del residuo así obtenido debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de una preparación similar de Fenitoína SR-FA. .

B - Debe responder al ensayo a la llama para *Sodio* <410>

Determinación del pH <250>

Entre 10,0 y 12,3.

Contenido de alcohol y propilenglicol

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografías de gases con un detector de ionización a la llama y una columna de vidrio de 1,8 m × 2,0 mm con fase estacionaria silanizada con un soporte constituido por un copolímero de estireno-divinilbenceno con un área superficial nominal de 500 a 600 m² por g y un diámetro de poro promedio de 0,0075 µm, de malla 50 a 80. Mantener la columna a 140 °C durante 3 minutos, aumentar la temperatura a razón de 6 °C por minuto hasta llegar a 190 °C y mantener a esta temperatura durante 6 minutos. Emplear helio como gas transportador con un caudal de aproximadamente 40 ml por minuto. Mantener el inyector y el detector a 200 °C.

Solución del estándar interno - Transferir 8 ml de metanol y 20 ml de etilenglicol a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de alcohol - Transferir 6 ml de alcohol absoluto a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de propilenglicol - Transferir 20 ml de propilenglicol a un matraz aforado de 100 ml, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución estándar - Transferir 10 ml de *Solución del estándar interno*, 10 ml de *Solución de alcohol* y 10 ml de *Solución de propilenglicol* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución muestra - Transferir 5 ml de la Solución Inyectable de Fenitoína Sódica y 10 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el orden de elusión debe ser metanol, alcohol, etilenglicol y propilenglicol; la resolución *R* entre el metanol y el alcohol no debe ser menor de 2,0; la resolución *R* entre el etilenglicol y el propilenglicol no debe ser menor de 3,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 2 µl) de la *Solución estándar* y de la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

Calcular el cociente relativo de la respuesta para el pico de alcohol con respecto al pico de metanol y para el pico de propilenglicol con respecto al pico de etilenglicol. Calcular el porcentaje de alcohol por la fórmula siguiente:

$$12(R_M/R_E)$$

en la cual R_M y R_E son los cocientes relativos de las respuestas de los picos del metanol y los picos del alcohol obtenidos a partir de la *Solución muestra* y de la *Solución estándar*, respectivamente. No debe contener menos de 9,0 ni más de 11,0 % de alcohol.

Calcular el porcentaje de propilenglicol por la fórmula siguiente:

$$40(R'_M/R'_E)$$

en la cual R'_M y R'_E son los cocientes relativos de las respuestas de los picos del etilenglicol y del propilenglicol obtenidos a partir de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, respectivamente.

No debe contener menos de 37,0 ni más de 43,0 % de propilenglicol.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,3 Unidades de Endotoxina por mg de Fenitoína Sódica.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un cromatógrafo de líquidos equipado con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 250 mm × 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosas de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y agua (55:45). Filtrar y desgasificar. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Fenitoína SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 230 µg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Fenitoína Sódica, equivalente a 250 mg de fenitoína sódica, a un matraz aforado de capacidad apropiada y diluir cuantitativamente y en etapas, con *Fase móvil* hasta obtener una solución de aproximadamente 250 µg de fenitoína sódica por ml.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar*, y registrar las respuestas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir la respuesta de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{15}H_{11}N_2NaO_2$ en la Solución Inyectable de Fenitoína Sódica, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la Solución Inyectable de Fenitoína Sódica no se debe emplear si presenta turbidez o contiene un precipitado.

FENOBARBITAL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Fenobarbital deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{12}N_2O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fenobarbital SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad equivalente a 60 mg de fenobarbital a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, suspender con 50 ml de cloroformo y filtrar. Evaporar el filtrado hasta sequedad y secar a 105 °C durante 2 horas: el residuo obtenido debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Fenobarbital*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Solución reguladora alcalina de borato de pH 9,6* (ver *Soluciones Reguladoras estándar* en *Reactivos y Soluciones*), si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{12}H_{12}N_2O_3$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 240 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Fenobarbital SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{12}H_{12}N_2O_3$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de pH 4,5, Fase móvil, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Fenobarbital*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Fenobarbital. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 20 mg de fenobarbital, agregar 15 ml de *Solución del estándar interno*, mezclar y sonicar durante 15 minutos. Filtrar antes de su uso.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{12}N_2O_3$ en los Comprimidos de Fenobarbital, de acuerdo a la cantidad declarada.

FENOBARBITAL SÓDICO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Fenobarbital Sódico es una solución estéril de *Fenobarbital Sódico* en un solvente apropiado. El Fenobarbital puede sustituir a una cantidad equivalente de Fenobarbital Sódico para ajustar el pH. La Solución Inyectable de Fenobarbital Sódico debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{11}N_2NaO_3$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fenobarbital SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Transferir a una ampolla de decantación un volumen de la Solución Inyectable de Fenobarbital Sódico, equivalente a 50 mg de fenobarbital sódico, agregar 15,0 ml de agua, agregar 2,0 ml de ácido clorhídrico, agitar y extraer el fenobarbital liberado con cuatro porciones de 25 ml de cloroformo. Filtrar los extractos combinados y transferir a un vaso de precipitados. Lavar la ampolla de decantación y el filtro con varias porciones pequeñas de cloroformo. Evaporar una porción de 50 ml de la solución clorofórmica de fenobarbital en un baño de vapor. Agregar 10,0 ml de éter, evaporar nuevamente y secar el residuo a 105 °C durante 2 horas: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión en bromuro de potasio del residuo así obtenido debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de una preparación similar de Fenobarbital SR-FA.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*, ambos relativos al estándar interno.

Determinación del pH <250>

Entre 9,2 y 10,2.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,3 Unidades de Endotoxina por mg de Fenobarbital Sódico.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de pH 4,5, Fase móvil, Solución del estándar interno y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Fenobarbital*.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 15,0 mg de Fenobarbital SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 25 ml de *Fase móvil* y sonicar hasta disolver. Agregar 15,0 ml de *Solución del estándar interno*, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,3 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Fenobarbital Sódico, equivalente a 65,0 mg de fenobarbital sódico, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 25,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, agregar 15,0 ml de *Solución del estándar interno*, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica para *Procedimiento en Valoración en Fenobarbital*. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{11}N_2NaO_3$ en la Solución Inyectable de Fenobarbital Sódico, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la Solución Inyectable de Fenobarbital Sódico no se debe emplear si contiene un precipitado.

FENOXIMETILPENICILINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Fenoximetilpenicilina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de Unidades de Fenoximetilpenicilina declarado y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fenoximetilpenicilina Potásica SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{16}H_{18}N_2O_5S$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Fenoximetilpenicilina Potásica SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos del 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{18}N_2O_5S$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Solución de resolución - Proceder según se indica en *Valoración en Fenoximetilpenicilina*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte comprimidos de Fenoximetilpenicilina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 400.000 Unidades de fenoximetilpenicilina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil*, agitar durante 5 minutos y filtrar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración en Fenoximetilpenicilina*. Calcular la cantidad de Unidades de Fenoximetilpenicilina en los Comprimidos de Fenoximetilpenicilina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el contenido de Fenoximetilpenicilina en mg y/o en Unidades considerando que 1.600 Unidades de Fenoximetilpenicilina equivalen a 1 mg de Fenoximetilpenicilina o ambas.

FENOXIMETILPENICILINA POTÁSICA COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Fenoximetilpenicilina Potásica deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de Unidades de Fenoximetilpenicilina declaradas y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fenoximetilpenicilina Potásica SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: solución reguladora de fosfato de pH 6,0 (ver *Soluciones reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*); 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de Unidades de Fenoximetilpenicilina disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, con un espectrofotómetro, comparando con una *Solución estándar* de Fenoximetilpenicilina Potásica SR-FA de concentración conocida de Unidades de Fenoximetilpenicilina, en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{18}N_2O_5S$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado <680>

Pesar aproximadamente 100 mg del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Secar en un recipiente de pesaje con tapa con perforación capilar al vacío a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 1,5 % de su peso.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Fenoximetilpenicilina*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Fenoximetilpenicilina Potásica. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 400.000 Unidades de fenoximetilpenicilina, transferir a un matraz aforado de 100 ml. completar a volumen con *Fase móvil*, agitar durante aproximadamente 5 minutos y filtrar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración* en *Fenoximetilpenicilina*. Calcular la cantidad de Unidades de Fenoximetilpenicilina en los Comprimidos de Fenoximetilpenicilina Potásica, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el contenido de Fenoximetilpenicilina en mg y/o en Unidades considerando que 1.600 Unidades de Fenoximetilpenicilina equivalen a 1 mg de Fenoximetilpenicilina.

FERROSO, SULFATO

SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Sulfato Ferroso debe contener no menos de 94,0 por ciento y no más de 106,0 por ciento de la cantidad declarada de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos para *Sales ferrosas* <410> y *Sulfato* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 1,4 y 5,3.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oral de Sulfato Ferroso, equivalente a 625 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a un erlenmeyer de 200 ml. Agregar 25 ml de ácido sulfúrico 2 N y 75 ml de agua recientemente hervida y enfriada. Agregar ortofenantrolina (SR) y titular de inmediato con sulfato cérico 0,1 N (SV). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de sulfato cérico 0,1 N equivale a 27,80 mg de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

ROTULADO

Indicar en el rótulo el contenido de Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y el contenido de hierro elemental.

FITOMENADIONA

EMULSIÓN INYECTABLE

Definición - La Emulsión Inyectable de Fitomenadiona es una dispersión estéril, acuosa de *Fitomenadiona*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{31}H_{46}O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fitomenadiona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 3,5 y 7,0.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 14,0 Unidades de Endotoxina por mg de Fitomenadiona.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

[NOTA: emplear material de vidrio inactínico durante todo el ensayo y proteger las soluciones de la exposición a la luz].

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,7 ml por minuto.

Fase móvil - Alcohol absoluto y agua (95:5). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Fitomenadiona SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml. Transferir 1,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml,

completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Preparación muestra - Medir exactamente un volumen de Emulsión Inyectable de Fitomenadiona y diluir, cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,5 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{31}H_{46}O_2$ en la Emulsión Inyectable de Fitomenadiona, de acuerdo a la cantidad declarada.

FLUOROURACILO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Fluorouracilo es una solución estéril de Fluorouracilo en Agua para Inyectables, preparada con Hidróxido de Sodio. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de $C_4H_3FN_2O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fluorouracilo SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de vidrio Tipo I. Evitar la congelación y la exposición a la luz.

ENSAYOS

Identificación

A - Acidificar cuidadosamente una porción de la Solución Inyectable de Fluorouracilo, equivalente a 100 mg de fluorouracilo, con ácido acético glacial. Agitar y enfriar apenas la solución para precipitar el fluorouracilo. Recolectar el precipitado, lavar con 1 ml de agua y secar al vacío sobre pentóxido de fósforo a 80 °C durante 4 horas: el residuo obtenido debe responder al ensayo de *Identificación A* en Fluorouracilo.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

C - Debe responder al ensayo de *Identificación C* en Fluorouracilo.

Determinación del pH <250>

Entre 8,6 y 9,4.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,33 Unidades de Endotoxina por mg de fluorouracilo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en Fluorouracilo.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Fluorouracilo, equivalente a 50 mg de fluorouracilo, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Diluir cuantitativamente con agua un volumen conocido de esta solución hasta obtener una solución de aproximadamente 10 µg por ml.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_4H_3FN_2O_2$ de la Solución Inyectable de Fluorouracilo, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la Solución Inyectable de Fluorouracilo no debe emplearse si se ha formado un precipitado como resultado de la exposición a temperaturas bajas. Disolver calentando a 60 °C, agitar y dejar enfriar a alrededor de 37 °C antes de usar.

FLUOROURACILO

UNGÜENTO

Definición - El Ungüento de Fluorouracilo debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_4H_3FN_2O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fluorouracilo SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

Precaución: evitar el contacto con la piel y la inhalación de partículas de fluorouracilo.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido neto del envase
<220>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Libre de patógenos, el recuento de organismos mesófilos aerobios no debe ser mayor de 100 ufc por g y el recuento total de hongos filamentosos y levaduras no debe ser mayor de 10 ufc por g.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Fluorouracilo*.

Solución reguladora pH 4,7 - Pesar exactamente alrededor de 8,4 g de acetato de sodio, transferir a un matraz aforado de 1 litro, agregar 3,35 ml de ácido acético glacial, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Pesar exactamente una cantidad del Ungüento de Fluorouracilo, equivalente a 45 mg de fluorouracilo, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar 100 ml de *Solución reguladora pH 4,7*, agitar durante 5 minutos, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Filtrar, descartar los primeros 20 ml de filtrado, transferir 20 ml a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Solución reguladora pH 4,7* y mezclar. Transferir 20 ml de esta solución a una ampolla de decantación, extraer

con 5 porciones de 20 ml de éter etílico y combinar los extractos orgánicos en otra ampolla de decantación. Extraer la fase acuosa de la primer ampolla con cuatro porciones de 20 ml de cloroformo, descartar los extractos clorofórmicos y transferir la fase acuosa a un matraz aforado de 100 ml. Extraer el éter etílico de la segunda ampolla de decantación con dos porciones de 20 ml de *Solución reguladora pH 4,7*, combinar los extractos acuosos y transferir al matraz aforado mencionado anteriormente. Evaporar el solvente residual en baño de vapor bajo una corriente de nitrógeno, dejar reposar hasta que alcance la temperatura ambiente, completar a volumen con *Solución reguladora pH 4,7* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_4H_3FN_2O_2$ en la porción del Ungüento Tópico de Fluorouracilo en ensayo, en base a la cantidad declarada.

FLUTAMIDA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Flutamida deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{11}F_3N_2O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Flutamida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

Precauciones - Todos los ensayos deben realizarse bajo campana de extracción. Evitar la inhalación del polvo o el contacto de la solución con la piel o mucosas.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo y acetato de etilo (3:1).

Diluyente - Cloroformo y metanol (5:1).

Solución estándar - Preparar una solución de Flutamida SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 3,0 mg de flutamida por ml.

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de diez Comprimidos de Flutamida, pesar una cantidad equivalente a 75 mg de flutamida, transferir a un matraz aforado de 25ml y disolver en *Diluyente*. Completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y filtrar si fuera necesario.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 μ l de la *Solución muestra* y 20 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Examinar la placa a 254 nm: la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder en valor de R_f , tamaño e intensidad con los de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: lauril sulfato de sodio al 2 %; 1.000 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad disuelta de Flutamida por el método siguiente.

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 12,5 mg de Flutamida SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver, completar a volumen con *Medio* y mezclar. Transferir 3,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Medio* y mezclar.

Solución muestra - Transferir de cada porción filtrada, una cantidad equivalente a 750 μ g de flutamida, a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Medio* y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 306 nm, empleando *Medio* como blanco. Calcular la cantidad de $C_{11}H_{11}F_3N_2O_3$ disuelta, en base a la cantidad declarada.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Diluyente - Metanol y agua (95:5).

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 12,5 mg de Flutamida SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 3,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 12,5 mg de flutamida a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar *Diluyente* y agitar durante 30 minutos. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 3,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 299 nm, empleando *Diluyente* como blanco. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ en cada Comprimido de Flutamida.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y fosfato monobásico de potasio 0,05 M (7:4). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100. Cromatografía*).

Diluyente - Metanol y agua (95:5).

Solución de aptitud del sistema - Pesar aproximadamente 18 mg de Flutamida SR-FA y 9,0 mg de testosterona de pureza conocida, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver, completar a volumen con metanol y mezclar. Esta solución contiene 0,18 mg de flutamida y 0,09 mg de testosterona por ml.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 9,0 mg de Flutamida SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Flutamida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 150 mg de flutamida, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 40 ml de *Diluyente*, agitar durante 30 minutos. Completar a volumen con *Diluyente*, mezclar y filtrar. Transferir 3,0 ml a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de flutamida y testosterona no debe ser menor de 2,0; los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 1,2 para testosterona y 1,0 para flutamida; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{11}H_{11}F_3N_2O_3$ en los Comprimidos de Flutamida, de acuerdo a la cantidad declarada.

FÓLICO, ÁCIDO

COMPRIMIDOS

Definición - Los comprimidos de Ácido Fólico deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{19}H_{19}N_7O_6$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Ácido Fólico SR-FA. Impureza A de Ácido Fólico SR-FA: Formiltetrahidrofolato cálcico.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Absorción ultravioleta <470>

Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de ácido fólico a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, suspender en 100 ml de solución de hidróxido de sodio (1 en 250) y filtrar. Ajustar a pH 3,0 con ácido clorhídrico, enfriar a 5 °C, filtrar y lavar el precipitado con agua fría hasta que no se detecte cloruro. Lavar con acetona y secar a 80 °C durante 1 hora: el espectro de absorción ultravioleta de una solución de ácido fólico 1 en 100.000, empleando una solución de hidróxido de sodio (1 en 250) como blanco, debe presentar máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que una solución similar de Ácido Fólico SR-FA, medida concomitantemente. La relación A_{256}/A_{365} debe estar comprendida entre 2,80 y 3,00.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 500 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{19}H_{19}N_7O_6$ disuelta, empleando la técnica especificada en *Valoración*; realizar modificaciones si fuera necesario.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{19}H_{19}N_7O_6$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Pesar exactamente alrededor de 35,1 g de perclorato de sodio y 1,40 g de fosfato monobásico de potasio, transferir a un matraz aforado de 1 litro, agregar 7,0 ml de hidróxido de potasio 1 N y 40 ml de metanol, completar a volumen con agua y mezclar. Ajustar a pH 7,2 con hidróxido de potasio 1 N o ácido fosfórico. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Transferir 1 g de perclorato sódico y 2 ml de hidróxido de amonio a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con agua.

Solución de aptitud del sistema - Preparar una solución de aproximadamente 0,2 mg de Ácido Fólico SR-FA y 0,2 mg de Impureza A de Ácido Fólico SR-FA por ml de *Diluyente*.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 30 mg de Ácido Fólico SR-FA, disolver y diluir cuantitativamente en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,20 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Ácido Fólico. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 10 mg de ácido fólico, transferir a un matraz aforado de 50 ml con la ayuda de *Diluyente*. Agitar suavemente hasta que el Ácido Fólico se haya disuelto, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Aptitud del sistema - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución R entre los picos de impureza A de Ácido Fólico y de ácido fólico no debe ser menor de 3,6; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las

respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{19}H_{19}N_7O_6$ en los Comprimidos de Ácido Fólico, de acuerdo a la cantidad declarada.

FÓLICO, ÁCIDO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Ácido Fólico es una solución estéril de *Ácido Fólico* en *Agua para Inyectables* preparada con *Hidróxido de Sodio* o *Carbonato de Sodio*. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{19}H_{19}N_7O_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Ácido Fólico SR-FA. Impureza A de ácido Fólico SR-FA: Formiltetrahidrofolato cálcico.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Absorción ultravioleta <470>. A un volumen de la Solución Inyectable de Ácido Fólico, equivalente a 100 mg de ácido fólico, agregar agua hasta aproximadamente 25 ml. Ajustar a pH 3,0 con ácido clorhídrico, enfriar a 5 °C, filtrar y lavar el precipitado de ácido fólico con agua fría hasta que en los últimos lavados no se detecte cloruro. A continuación lavar con acetona y secar a 80 °C durante 1 hora: el espectro de absorción ultravioleta de una solución de ácido fólico 1 en 100.000, obtenido con solución de hidróxido de sodio 1 en 250, debe presentar máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que una solución similar de Ácido Fólico SR-FA. La relación A_{256}/A_{365} debe estar comprendida entre 2,80 y 3,00.

Determinación del pH <250>

Entre 8,0 y 11,0.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 357,1 Unidades de Endotoxina por mg de Ácido Fólico.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución de aptitud del sistema y Preparación estándar - Proceder según se indica en *Valoración en Comprimidos de Ácido Fólico*.

Preparación muestra - Diluir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Ácido Fólico, cuantitativamente y en etapas, con *Diluyente* hasta obtener una solución con una concentración entre 0,20 y 0,80 mg por ml, similar a la de la *Preparación estándar*.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración en Comprimidos de Ácido Fólico*. Calcular la cantidad de $C_{19}H_{19}N_7O_6$ en la Solución Inyectable de Ácido Fólico, de acuerdo a la cantidad declarada.

FUROSEMIDA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Furosemida deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Furosemida SR-FA. Impureza A de Furosemida SR-FA: Ácido 2-cloro-4-[(2-furilmetil)amino]-5-sulfamoilbenzoico. Impureza B de Furosemida SR-FA: Ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados.

ENSAYOS

[NOTA: proteger las soluciones preparadas que contengan furosemida de la luz]

Identificación

A - Examinar la solución obtenida en *Valoración* entre 220 y 320 nm (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*): la solución debe presentar dos máximos de absorción a 228 y 271 nm.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: solución reguladora de fosfato de pH 5,8 (ver *Soluciones Reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*); 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de 10 ml de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio* para obtener una solución de aproximadamente 0,01 mg de furosemida por ml y determinar la cantidad de $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ disuelta, a partir de las absorbancias en el ultravioleta a 277 nm, comparando con una *Solución estándar* de aproximadamente 0,01 mg de Furosemida SR-FA por ml en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 70 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Límite de Impureza B de Furosemida

Sistema cromatográfico, Diluyente, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Impureza B de Furosemida SR-FA en *Diluyente* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 8,0 µg por ml.

Solución muestra - Pesar exactamente una cantidad equivalente a 10 mg de furosemida a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Transferir a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales: la respuesta del pico correspondiente a impureza B de furosemida obtenido a partir de la *Solución muestra* no debe ser mayor que la respuesta del pico obtenido a partir de la *Solución estándar* (0,8 %).

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unidos a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Diluyente - Diluir 22 ml de ácido acético glacial a 1 litro con una mezcla de agua y acetonitrilo (50:50).

Fase móvil - Agua, tetrahidrofurano y ácido acético glacial (70:30:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de aptitud del sistema - Disolver cantidades apropiadas de Furosemida SR-FA e Impureza A de Furosemida SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 20 y 12 µg por ml, respectivamente.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Furosemida SR-FA en *Diluyente* y diluir cuantitativamente y en etapas, si

fuera necesario, con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 1,0 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Furosemida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de furosemida, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 30 ml de *Diluyente*, sonicar durante 10 minutos, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de furosemida e impureza A de furosemida no debe ser menor de 2,5, la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ en los Comprimidos de Furosemida, de acuerdo a la cantidad declarada.

FUROSEMIDA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Furosemida es una solución estéril de *Furosemida* en *Agua para Inyectables* empleando Hidróxido de Sodio como coadyuvante. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Furosemida SR-FA. Impureza A de Furosemida SR-FA: Ácido 2-cloro-4-[2-furilmetilamino]-5-sulfamoilbenzoico SR-FA. Impureza B de Furosemida SR-FA: Ácido 2-cloro-5-sulfamoilantranílico SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

[NOTA: proteger las soluciones preparadas que contengan furosemida de la luz]

Identificación

A - Examinar la solución obtenida en *Valoración* entre 220 y 320 nm (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*): la solución debe presentar dos máximos de absorción a 228 y 271 nm.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Límite de Impureza B de Furosemida

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad de Impureza B de furosemida SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 10 µg por ml.

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. La respuesta de ningún pico a excepción del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe ser mayor que la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Solución estándar* (1 %).

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 8,0 y 9,3.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 3,6 Unidades de Endotoxina por mg de furosemida.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agua, tetrahidrofurano y ácido acético glacial (70:30:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Diluir 22 ml de ácido acético glacial en una mezcla de acetonitrilo y agua (50:50) a 1 litro y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Disolver una cantidad de Furosemida SR-FA y de Impureza A de Furosemida SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 20 µg y 12 µg por ml, respectivamente.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de furosemida e impureza A de furosemida no debe ser menor de 2,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad apropiada de Furosemida SR-FA, disolver y diluir cuantitativamente en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 1,0 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Furosemida, equivalente a 10 mg de furosemida, a un matraz aforado de 10ml. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ en la Solución Inyectable de

Furosemida en ensayo, de acuerdo a la cantidad declarada.

FUROSEMIDA

SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Furosemida debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Furosemida SR-FA. Impureza A de Furosemida SR-FA: Ácido 2-cloro-4-[(2-furilmetil)amino]-5-sulfamoilbenzoico. Impureza B de Furosemida SR-FA: Ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

[NOTA: proteger las soluciones preparadas de que contengan furosemida de la luz]

Identificación

A - Absorción ultravioleta <470>

Solvente: hidróxido de sodio 0,01 N.

Concentración: 6 µg de por ml.

Las absorbividades no deben ser significativamente diferentes.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 10,0.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Límite de Impureza B de Furosemida

Sistema cromatográfico, Diluyente, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Impureza B de Furosemida SR-FA en *Diluyente* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario,

con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 15,0 µg por ml.

Solución muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oral de Furosemida, equivalente a 10 mg de furosemida, a un matraz aforado de 10 ml. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales: la respuesta del pico correspondiente a la impureza B de furosemida obtenido a partir de la *Solución muestra* no debe ser mayor que la de la *Solución estándar*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por grupos nitrilo unidos químicamente a partículas de sílice porosa, de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Diluyente - Agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (22:22:1).

Fase móvil - Agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (165:35:2). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de aptitud del sistema - Disolver cantidades apropiadas de Furosemida SR-FA, Impureza A de Furosemida SR-FA e Impureza B de Furosemida SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg de cada una por ml.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Furosemida SR-FA en *Diluyente* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 1 mg de furosemida por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oral de Furosemida, equivalente a 10 mg de furosemida, a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,2 para la impureza B de furosemida, 1,0 para la furosemida y 1,1 para la impureza A de furosemida; la resolución *R* entre los picos de furosemida y la impureza A de

furosemida no debe ser menor de 1,5; el factor de asimetría para el pico de furosemida no debe ser mayor de 1,5. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ en la Solución Oral de Furosemida, de acuerdo a la cantidad declarada.

GANCICLOVIR PARA INYECCIÓN

Definición - Ganciclovir para Inyección es un polvo liofilizado preparado mediante la neutralización de ganciclovir con hidróxido de sodio. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de ganciclovir ($C_9H_{13}N_5O_4$), calculado sobre la sustancia anhidra y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ganciclovir SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto, de vidrio Tipo I, a una temperatura comprendida entre 15 y 30 °C. Proteger de la humedad.

ENSAYOS

Precaución - *Manipular el Ganciclovir para Inyección con sumo cuidado, ya que es un potente agente citotóxico y un posible carcinógeno.*

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. Emplear una mezcla de formamida anhidra y metanol (50:50) como solvente en el frasco de titulación. El volumen de *Reactivo* consumido por el solvente en el frasco de titulación no debe ser mayor de 10 % del volumen inicial del solvente en el frasco de titulación. La concentración de Ganciclovir para Inyección en el frasco de titulación no debe ser mayor de 7 mg por ml. No debe contener más de 3,0 %.

Determinación del pH <250>

Entre 10,8 y 11,4, determinado sobre una solución reconstituida según se indica en el rótulo.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,84 Unidades de Endotoxina por mg de Ganciclovir para Inyección.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica en *Método de filtración por membrana*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos para inyectables de pequeño volumen.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 10 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,2 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 1,4 g de fosfato monobásico de amonio y 2,0 g de ácido fosfórico en 500 ml de agua, diluir a 1 litro con agua y mezclar. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución del estándar interno - Pesar exactamente alrededor de 75 mg de hipoxantina, transferir a un matraz aforado de 500 ml, disolver, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ganciclovir SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 250 μg por ml.

Preparación estándar - Transferir 20 ml de *Preparación madre del estándar* y 10 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 100 ml. Completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación madre de la muestra - Reconstituir el Ganciclovir para Inyección en una porción de agua, transferir cuantitativamente con agua a un matraz aforado apropiado y completar a volumen con agua para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir 5 ml de la *Preparación madre de la muestra* y 10 ml de la *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,7 para hipoxantina y 1,0 para ganciclovir; la resolución *R* entre los picos de hipoxantina y ganciclovir no debe ser menor de 3,0; la eficiencia de la columna no debe ser menor de 1.000 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente

10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_9H_{13}N_5O_4$ en Ganciclovir para Inyección, en base a la cantidad declarada.

GEMCITABINA

PARA INYECCIÓN

Definición - Gemcitabina para Inyección debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de clorhidrato de gemcitabina en la cantidad declarada de $C_9H_{11}F_2N_3O_4$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Precaución - Clorhidrato de Gemcitabina es un potente agente citotóxico. Evitar la inhalación de partículas y la exposición a la piel.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Gemcitabina SR-FA. Citosina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de vidrio tipo I a temperatura ambiente controlada. No refrigerar después de la reconstitución.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción ultravioleta <470>

Concentración: 16 µg por ml.

Solvente: Agregar 13,8 mg de fosfato monobásico de sodio y 2,5 ml de ácido fosfórico a 1 litro de agua para obtener una solución reguladora de fosfato 0,14 M de pH 2,5.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 2,7 y 3,3; determinado sobre una solución de aproximadamente 40 mg de gemcitabina por ml de solución de cloruro de sodio al 0,9 %.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,05 Unidades de Endotoxina por mg de gemcitabina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica en *Método de filtración por membrana*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos para inyectables de pequeño volumen.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Pureza cromatográfica

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema, Solución estándar y Aptitud

del sistema - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica en Clorhidrato de Gemcitabina*.

Solución muestra - Reconstituir el contenido de un envase de Gemcitabina para Inyección en agua para obtener una solución de aproximadamente 2 mg por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica en Clorhidrato de Gemcitabina*. Calcular la cantidad de citosina, expresada como porcentaje de clorhidrato de gemcitabina, por la fórmula siguiente:

$$0,1(263,20/299,66)(C_c V/L)(r_i / r_E)$$

en la cual 263,20 y 299,66 son los pesos moleculares de gemcitabina y de clorhidrato de gemcitabina, respectivamente; C_c es la concentración en µg por ml de Citosina SR-FA en la *Solución estándar*; V es el volumen de agua en ml empleado para reconstituir el contenido del envase; L es la cantidad en mg de Gemcitabina en el envase; r_i es la respuesta correspondiente al pico de citosina en la *Solución muestra*; y r_E es la respuesta de citosina en la *Solución estándar*: no debe contener más de 0,1 % de citosina. Calcular el porcentaje de cada impureza diferente de citosina en la porción de Gemcitabina en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$0,1(263,20/299,66)(C_E V/L)(r_i / r_E)$$

en donde C_E es la concentración en µg por ml de Clorhidrato de Gemcitabina SR-FA en la *Solución estándar*; r_i es la respuesta del número α de gemcitabina o cualquier otra impureza individual en la *Solución muestra*; r_E es la respuesta correspondiente al pico de gemcitabina en la *Solución estándar*; el resto de los términos son los descriptos anteriormente: no debe contener más de 0,1 % de número α de gemcitabina; no debe contener más de 0,2 % de cualquier otra impureza y la suma de todas las impurezas no debe ser mayor de 0,3 %. Ignorar cualquier pico que esté por debajo del límite de cuantificación (0,02 %).

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Clorhidrato de Gemcitabina*.

Preparación muestra - Reconstituir una cantidad de envases de Gemcitabina para Inyección en agua para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración en Clorhidrato de Gemcitabina*. Calcular la cantidad de $C_9H_{11}F_2N_3O_4$ en cada

envase de Gemcitabina para Inyección, en base a la cantidad declarada.

GENTAMICINA, SULFATO DE CREMA DÉRMICA

Definición - La Crema Dérmica de Sulfato de Gentamicina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 135,0 por ciento de la cantidad declarada de gentamicina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Gentamicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor con un tamaño de poro promedio de 6 nm.

Fase móvil - Cloroformo, metanol e hidróxido de amonio (20:13:10).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Sulfato de Gentamicina SR-FA, equivalente a 5 mg de gentamicina, en 5 ml de agua.

Solución muestra - Transferir una cantidad de la Crema Dérmica de Sulfato de Gentamicina, equivalente a 5 mg de gentamicina, a un recipiente apropiado, agregar una mezcla de 5 ml de agua y 200 ml de cloroformo y agitar. Permitir que las fases se separen y filtrar la fase acuosa. Emplear el filtrado.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 20 µl de la *Solución muestra* y 20 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Exponer a vapores de yodo en un recipiente conteniendo cristales de yodo: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para Gentamicina en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*.

Transferir una porción exactamente pesada de la Crema Dérmica de Sulfato de Gentamicina, equivalente a 1 mg de gentamicina, a una ampolla de decantación, agregar 50 ml de éter y agitar. Extraer con cuatro porciones de 20 ml de *Solución reguladora N° 3*. Combinar los extractos acuosos y diluir cuantitativamente y en etapas esta solución con *Solución reguladora N° 3* para obtener las soluciones de ensayo.

GENTAMICINA, SULFATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Sulfato de Gentamicina es una solución estéril de *Sulfato de Gentamicina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 125,0 por ciento de la cantidad declarada de gentamicina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Gentamicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol e hidróxido de amonio (20:13:10).

Solución muestra - Diluir la Solución Inyectable de Sulfato de Gentamicina en agua, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 1,0 mg de gentamicina por ml. Si la Solución Inyectable de Sulfato de Gentamicina contiene menos de 1,0 mg por ml, aplicar sobre la placa cromatográfica un volumen equivalente a 20 µg de gentamicina.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Sulfato de Gentamicina SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 1,0 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa una cantidad, equivalente a 20 µg de gentamicina, de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Exponer la placa a vapores de yodo en una cámara de detección que contenga cristales de yodo: las intensidades y los valores de R_f de las tres manchas principales obtenidas a partir de la *Solución muestra* se deben corresponder con los obtenidos con la *Solución estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 5,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,71 Unidades de Endotoxina por mg de gentamicina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*, diluir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Sulfato de Gentamicina con *Solución reguladora* N° 3 para obtener las soluciones de ensayo.

GENTAMICINA, SULFATO DE SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Sulfato de Gentamicina es una solución estéril de *Sulfato de Gentamicina*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 135,0 por ciento de la cantidad declarada de Gentamicina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Gentamicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol e hidróxido de amonio (20:13:10).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Sulfato de Gentamicina SR-FA en agua para obtener una solución con la misma concentración que la *Solución muestra*.

Solución muestra - Diluir una porción de la Solución Oftálmica de Sulfato de Gentamicina en agua para obtener una solución de aproximadamente 1.000 µg de gentamicina por ml. [NOTA: si la solución oftálmica contiene una cantidad menor de 1.000 µg de gentamicina por ml, aplicar un volumen equivalente a 20 µg de gentamicina sobre la placa en porciones separadas de no más de 20 µl, dejando secar antes de la siguiente aplicación]

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa un volumen equivalente a 20 µg de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Exponer la placa a vapores de yodo: la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder en valor de R_f e intensidad con la obtenida en la *Solución estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,5 y 7,5.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Método de filtración por membrana*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para Gentamicina en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*. Diluir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Sulfato de Gentamicina, cuantitativamente y en etapas, con *Solución reguladora N° 3* para obtener las soluciones de ensayo (aproximadamente de 0,1 µg de gentamicina por ml).

GLIBENCLAMIDA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Glibenclamida deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Glibenclamida SR-FA. Impureza A de Glibenclamida SR-FA: 4-[2-(5-Cloro-2-metoxibenzamido)etil] bencenosulfonamida. Impureza B de Glibenclamida SR-FA: N-4-[2-(5-cloro-2-metoxibenzamido)etil] bencenosulfonilcarbamato de metilo.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Sustancias relacionadas*. El valor de R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar C*.

Sustancias relacionadas

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Ciclohexano, cloroformo, ácido acético glacial y alcohol (45:45:5:5).

Diluyente - Cloroformo y metanol (50:50).

Solución estándar A - Preparar una solución de Impureza A de Glibenclamida SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 0,12 mg por ml.

Solución estándar B - Preparar una solución de Impureza B de Glibenclamida SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 0,20 mg por ml.

Solución estándar C - Preparar una solución de Glibenclamida SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 5,0 mg por ml.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 20 mg de glibenclamida a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración* y transferir a una ampolla de decantación. Realizar cuatro extracciones, de 5 ml cada una, con una mezcla de diclorometano y acetona (20:10) y filtrar. Evaporar hasta sequedad a una temperatura

no mayor de 40 °C y a 15 mm Hg. Disolver el residuo en 4 ml de *Diluyente*.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de las *Soluciones estándar A, B y C*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, secar al aire y examinar bajo luz ultravioleta a 254 nm: las manchas correspondientes a impureza A de glibenclamida e impureza B de glibenclamida en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* no deben ser más intensas que las obtenidas con las *Soluciones estándar A (2,4 %)* y *B (4,0 %)*, respectivamente.

Ensayo de disgregación <310>

No más de 15 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino un Comprimido de Glibenclamida. Pesar una cantidad equivalente a 5 mg o menos de glibenclamida, transferir a un recipiente apropiado. Agregar una mezcla de 2 ml de agua y 20 ml de metanol. Sonicar hasta dispersar completamente y filtrar a través de una membrana filtrante de 0,2 μ m de espesor.

Solución estándar - Transferir una solución de Glibenclamida SR-FA en metanol de aproximadamente 0,25 mg por ml, a un recipiente apropiado y diluir a 20 ml con el mismo solvente. Agregar 2 ml de agua y sonicar hasta dispersar completamente. Filtrar a través de una membrana filtrante de 0,2 μ m de espesor.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*. Calcular el contenido de $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ en cada Comprimido de Glibenclamida en ensayo.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 300 nm y una columna de 10 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Solución de fosfato monobásico de potasio de aproximadamente 13,6 mg por ml, ajustada a pH 3,0 con ácido fosfórico y acetonitri-

lo (53:47). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Glibenclamida SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver en 10 ml de metanol, sonicar durante aproximadamente 20 minutos y completar a volumen con el mismo solvente. Diluir 1 volumen de esta solución a 4 volúmenes con metanol. A 20 ml de esta solución, agregar 2 ml de agua y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino veinte Comprimidos de Glibenclamida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 5 mg de glibenclamida, transferir a un matraz que contenga 2 ml de agua y 20 ml de metanol. Mezclar hasta dispersar completamente y filtrar a través de una membrana filtrante de 0,2 μm de espesor.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el contenido de $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$ en los Comprimidos de Glibenclamida, de acuerdo a la cantidad declarada.

GLUCOSA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Sinonimia - Solución Inyectable de Dextrosa.

Definición - La Solución Inyectable de Glucosa es una solución estéril de *Glucosa* en *Agua para Inyectables* en envases monodosis no mayores a 1 litro, esterilizada en su envase final. No debe contener conservantes ni otras sustancias agregadas. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de glucosa anhidra o glucosa monohidrato según corresponda y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases de plástico o de vidrio tipo I o II.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los *Ensayos de Identificación* en *Glucosa*.

Determinación del pH <250>

Entre 3,2 y 6,5; determinado sobre una alícuota a la cual se han agregado 0,30 ml de solución saturada de cloruro de potasio cada 100 ml y que previamente se ha diluido con agua, si fuera necesario, a una concentración de no más de 5 % de glucosa.

Límite de metales pesados <590>

Método I. Transferir un volumen de Solución Inyectable de Glucosa, equivalente a 4,0 g de glucosa a un recipiente apropiado, y ajustar el volumen a 25 ml por evaporación o agregado de agua, según sea necesario. No debe contener más de 0,0005C %, donde C es la cantidad declarada en g de glucosa por ml de solución.

5-Hidroximetilfurfural y sustancias relacionadas

Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Glucosa, equivalente a 1,0 g de glucosa, a un matraz aforado de 250,0 ml y completar a volumen con agua. Determinar la absorbancia de esta solución (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*) en una celda de 1 cm, a 284 nm, empleando agua como blanco. La absorbancia de esta solución no debe ser mayor de 0,25.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando la concentración de glucosa es menor de 5 % no debe contener más de 0,5 Unidades de Endotoxina por ml. Para soluciones comprendidas entre el 5 y el 70 % de glucosa, no debe contener

más de 10,0 Unidades de Endotoxina por g de glucosa.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

PARA GLUCOSA ANHIDRA

Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Glucosa, que contenga entre 2 y 5 g de glucosa anhidra, a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 0,2 ml de hidróxido de amonio 6 N, completar a volumen con agua y mezclar. Determinar la rotación angular (ver 170. *Determinación de la rotación óptica*), a 25 °C. Calcular el peso en g de glucosa anhidra en la porción de Solución Inyectable de Glucosa en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$0,9477Aa$$

en la cual A es el cociente entre 200 y la longitud en mm del tubo polarimétrico empleado y a es la rotación observada en grados.

PARA GLUCOSA MONOHIDRATO

Proceder del mismo modo transfiriendo un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Glucosa, que contenga entre 2 y 5 g de glucosa monohidrato. Calcular el peso en g de glucosa monohidrato en la porción de Solución Inyectable de Glucosa en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$1,0425Aa$$

en la cual los términos son los definidos anteriormente.

ROTULADO

Indicar en el rótulo si la Solución Inyectable de Glucosa contiene glucosa anhidra o monohidrato. Indicar en el rótulo la concentración osmolar ideal expresada en miliosmoles por litro (mosm/l). Cuando el volumen es menor a 100 ml o cuando en el rótulo se indique que la solución no se debe administrar sin diluir, la concentración osmolar ideal puede expresarse en miliosmoles por ml (mosm/ml).

GLUCOSA Y CLORURO DE SODIO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Sinonimia - Solución Inyectable de Dextrosa y Cloruro de Sodio.

Definición - La Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio es una solución estéril de *Glucosa* y *Cloruro de Sodio* en *Agua para Inyectables* en envases monodosis no mayores a 1 litro, esterilizada en su envase final. No debe contener conservantes ni otras sustancias agregadas. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de glucosa anhidra o glucosa monohidrato, según corresponda, y cloruro de sodio. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases de plástico o de vidrio tipo I o II.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder a los ensayos de *Identificación* en *Glucosa*.

B - Debe responder a los ensayos para *Sodio* <410>.

C - Debe responder a los ensayos para *Cloruro* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 3,2 y 6,5; determinado sobre una alícuota de la Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio que previamente se ha diluido con agua, si fuera necesario, para obtener una solución de no más de 5 % de glucosa.

Límite de metales pesados <590>

Método I. Transferir un volumen de Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio, equivalente a 4,0 g de glucosa a un recipiente apropiado, y ajustar el volumen a 25 ml por evaporación o agregado de agua, según sea necesario. No debe contener más de 0,0005C %, donde C es la cantidad declarada en el rótulo en g de glucosa por ml de solución.

5-Hidroximetilfurfural y sustancias relacionadas

Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio, equivalente a 1,0 g de glucosa, a un matraz aforado de 250,0 ml y completar a volumen con agua. Determinar la absorbancia de esta solución (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*) en una celda de 1 cm, a 284 nm, empleando agua como

blanco. La absorbancia de esta solución no debe ser mayor de 0,25.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando la concentración de glucosa es menor de 5 % no debe contener más de 0,5 Unidades de Endotoxina por ml. Para soluciones comprendidas entre el 5 y el 70 % de glucosa, no debe contener más de 10,0 Unidades de Endotoxina por g de glucosa.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

PARA GLUCOSA ANHIDRA

Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio, que contenga entre 2 y 5 g de glucosa anhidra, a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 0,2 ml de hidróxido de amonio 6 N, completar a volumen con agua y mezclar. Determinar la rotación angular (ver 170. *Determinación de la rotación óptica*), a 25 °C. Calcular el peso en g de glucosa anhidra en la porción de Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$0,9477Aa$$

en la cual A es el cociente entre 200 y la longitud en mm del tubo polarimétrico empleado y a es la rotación observada en grados.

PARA GLUCOSA MONOHIDRATO

Proceder del mismo modo transfiriendo un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio, que contenga entre 2 y 5 g de glucosa monohidrato. Calcular el peso en g de glucosa monohidrato en la porción de Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$1,0425Aa$$

en la cual los términos son los definidos anteriormente.

PARA CLORURO DE SODIO

Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio, equivalente aproximadamente a 50 mg de Cloruro de Sodio a un erlenmeyer. Agregar agua, si fuera necesario, hasta aproximadamente 50 ml. Titular con nitrato de plata 0,1 N (SV), determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de nitrato de plata 0,1 N equivale a 5,844 mg de NaCl.

ROTULADO

Indicar en el rótulo si la Solución Inyectable de Glucosa y Cloruro de Sodio contiene glucosa anhidra o monohidrato. Indicar en el rótulo la concentración osmolar ideal expresada en miliosmoles por litro (mosm/l). Cuando el volumen es menor a 100 ml o cuando en el rótulo se indique que la solución no se debe administrar sin diluir, la concentración osmolar ideal puede expresarse en miliosmoles por ml (mosm/ml).

GRISEOFULVINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Griseofulvina deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{17}ClO_6$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Griseofulvina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Pesar una cantidad equivalente a 125 mg de griseofulvina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación madre de la muestra* en *Valoración*, extraer con 20 ml de cloroformo, agregar 1 g de sulfato de sodio anhidro, mezclar y filtrar. Evaporar el filtrado y secar el residuo durante aproximadamente 1 hora a una presión que no exceda los 5 mm Hg; el espectro de absorción infrarroja de este residuo se debe corresponder con el obtenido con una solución preparada del mismo modo empleando Griseofulvina SR-FA.

B - Pesar una cantidad equivalente a 80 mg de griseofulvina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación madre de la muestra* en *Valoración*, mezclar con 150 ml de alcohol durante 20 minutos. Diluir a 200 ml con el mismo solvente y filtrar. Diluir 2 ml del filtrado con 100 ml de alcohol. Examinar la solución obtenida entre 240 y 400 nm (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*): la solución debe presentar dos máximos de absorción a 291 y 325 nm y un hombro a 250 nm.

C - Pesar 5 mg a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación madre de la muestra* en *Valoración*, disolver con 1 ml de ácido sulfúrico y agregar 5 mg de dicromato de potasio pulverizado: se debe producir un color rojo.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: solución de lauril sulfato de sodio al 4%; 1.000 ml.

Tiempo: 90 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas en una mezcla de metanol y agua (4:1), si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{17}H_{17}ClO_6$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción,

291 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Griseofulvina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{17}H_{17}ClO_6$ se debe disolver en 90 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Griseofulvina a un recipiente apropiado, agregar metanol para obtener una solución de aproximadamente 1 mg de griseofulvina por ml, agitar durante 1 hora, o más si fuera necesario, para dispersar la muestra completamente y sonicar durante 1 minuto. Centrifugar una porción de esta solución y diluir cuantitativamente un volumen exactamente medido del líquido sobrenadante transparente para obtener una solución de aproximadamente 10 µg de griseofulvina por ml.

Solución estándar - Preparar una solución de Griseofulvina SR-FA en metanol de aproximadamente 10 µg por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 292 nm, con un espectrofotómetro, empleando metanol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{17}ClO_6$ en cada Comprimido de Griseofulvina, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 100 mg a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación madre de la muestra* en *Valoración*. Secar en un pesafiltro con tapa provisto de un capilar a una presión que no exceda los 5 mm Hg a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 5,0 % de su peso.

VALORACIÓN

Preparación madre de la muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Griseofulvina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 35 mg de griseofulvina y transferir a un recipiente apropiado. Agregar 60 ml de acetato de etilo, mezclar y calentar a 60 °C con agitación durante 20 minutos. Dejar enfriar, diluir a 100 ml con acetato de etilo y centrifugar.

Preparación muestra A - Transferir 5 ml del líquido sobrenadante transparente de la *Preparación madre de la muestra*, a un matraz aforado de

100 ml. Agregar 5 ml de ácido metanosulfónico metanólico 2 M, dejar en reposo a 20 °C durante aproximadamente 30 minutos y completar a volumen con metanol.

Preparación muestra B - Transferir 5 ml del líquido sobrenadante transparente de la *Preparación madre de la muestra*, a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con metanol.

Preparación madre del estándar - Proceder según se indica para *Preparación madre de la muestra* empleando 35 mg de Griseofulvina SR-FA.

Preparación estándar A y Preparación estándar B - Proceder según se indica en *Preparación muestra A y Preparación muestra B*, empleando la *Preparación madre del estándar* en lugar de *Preparación madre de la muestra*, respectivamente.

Blanco - Transferir 5 ml de ácido metanosulfónico metanólico 2 M a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con metanol.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de las *Preparaciones muestra A y B* y las *Preparaciones estándar A y B* (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*), en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 266 nm, con un espectrofotómetro. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{17}ClO_6$ en los Comprimidos de Griseofulvina, a partir de la relación entre la diferencia de la absorbancia obtenida con la *Preparación muestra A* y la suma de las absorbancias obtenidas con la *Preparación muestra B* y el *Blanco* ($A_{MA} - [A_{MB} + A_B]$) y la diferencia entre la absorbancia de la *Preparación estándar A* y la suma de las absorbancias obtenidas con la *Preparación estándar B* y el *Blanco* ($A_{EA} - [A_{EB} + A_B]$).

HALOPERIDOL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Haloperidol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Haloperidol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: fluido gástrico simulado (SR) (sin enzima); 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ disuelta empleando la siguiente técnica cromatográfica.

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ disuelta comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Haloperidol SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Haloperidol SR-FA, metanol hasta obtener una solución de aproximadamente 20 μ g por ml.

Solución muestra - Reducir a polvo fino un Comprimido de Haloperidol, transferir a un recipiente apropiado, agregar metanol para obtener una

solución de aproximadamente 20 μ g por ml. Mezclar durante 15 minutos y completar a volumen con metanol. Filtrar y descartar los primeros 20 ml del filtrado.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 245 nm, con un espectrofotómetro, empleando metanol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ en cada Comprimido de Haloperidol, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y solución reguladora de fosfato monobásico de potasio 0,05 M (60:40). Ajustar a pH 4,0 con hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Haloperidol SR-FA en *Fase móvil* y diluir con el mismo solvente hasta obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Haloperidol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 10 mg de haloperidol, transferir a un matraz aforado de 100 ml y agregar 60 ml de *Fase móvil*. Sonicar durante 10 minutos, agitar durante 60 minutos y completar a volumen con el mismo solvente. Filtrar y descartar los primeros 20 ml del filtrado.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 15 μ l) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ en los Comprimidos de Haloperidol, de acuerdo a la cantidad declarada.

HALOPERIDOL

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Haloperidol es una solución estéril de *Haloperidol* en *Agua para Inyectables*, preparada con *Ácido Láctico*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Haloperidol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Absorción ultravioleta <470>

La *Preparación muestra* preparada en *Valoración* debe presentar un máximo de absorción a 245 ± 2 nm.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 3,8.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 71,4 Unidades de Endotoxina por mg de haloperidol.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Diluyente - Ácido clorhídrico diluido (1 en 20)

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Haloperidol, equivalente a 10 mg de haloperidol, a una ampolla de decantación y agregar 20 ml de *Diluyente*. Extraer la solución con cuatro porciones de 25 ml de éter y lavar los extractos combinados con cuatro porciones de 5 ml de *Diluyente*. Descartar el éter y agregar los lavados ácidos a la fase acuosa. Filtrar la fase acuosa a través de una torunda de algodón recolectando el filtrado en un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación estándar - Preparar una solución de Haloperidol SR-FA de aproximadamente 20 μ g

por ml, procediendo del mismo modo que en *Preparación muestra*.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 245 nm, con un espectrofotómetro, empleando una solución 10 % de *Diluyente* en metanol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ en la Solución Inyectable de Haloperidol, de acuerdo a la cantidad declarada.

HALOPERIDOL

SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Haloperidol es una solución de Haloperidol en *Agua purificada*, preparada con la ayuda de *Ácido Láctico*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Haloperidol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Absorción ultravioleta <470>

La *Preparación muestra* preparada en *Valoración* debe presentar un máximo de absorción a 245 ± 2 nm.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 2,75 y 3,75.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Diluyente - Ácido clorhídrico diluido 1 en 20.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Oral de Haloperidol, equivalente a 10 mg de haloperidol, a una ampolla de decantación y agregar 20 ml de *Diluyente*. Extraer la solución con cuatro porciones de 20 ml de éter y lavar los extractos combinados con cuatro porciones de 5 ml de *Diluyente*. Descartar el éter y agregar los lavados ácidos a la fase acuosa. Filtrar, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 10 mg de Haloperidol SR-FA y transferir a un matraz aforado de 50 ml, disolver en *Diluyente* y completar a volumen con el mismo solvente. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 245 nm, con un espectrofotómetro, empleando una solución de 10 % de *Diluyente* en metanol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ en la Solución Oral de Haloperidol, de acuerdo a la cantidad declarada.

HIDROCLOROTIAZIDA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Hidroclorotiazida deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Hidroclorotiazida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de hidroclorotiazida a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 20 ml de solución de hidróxido de sodio 1 en 125, agitar durante 15 minutos y completar a volumen con el mismo solvente. Mezclar y filtrar, descartando los primeros ml del filtrado. Transferir 5 ml del filtrado a una ampolla de decantación de 125 ml y agregar 5 ml de ácido clorhídrico diluido 1 en 10. Realizar una extracción con 50 ml de éter, filtrar el extracto etéreo y evaporar hasta sequedad. Agregar 5 ml de alcohol y nuevamente evaporar hasta sequedad: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión en bromuro de potasio del residuo obtenido debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de una solución similar de Hidroclorotiazida SR-FA disuelta previamente en alcohol y recuperada evaporando la solución hasta sequedad.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar, diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario y determinar la cantidad de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ disuelta a partir de la absorbancia en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 272 nm, comparando con una *Solución estándar* con una concentración conocida de Hidroclorotiazida SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos del 60 % (Q) de la cantidad declarada de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Solución estándar - [NOTA: se puede emplear un volumen de acetonitrilo que no exceda el 10 % del volumen total de la solución para disolver la *Sustancia de referencia*]. Disolver una cantidad exactamente pesada de 4-Amino-6-cloro-1,3-benzenodisulfonamida en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 1,5 µg por ml.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* y medir las repuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de 4-Amino-6-cloro-1,3-benzenodisulfonamida en los Comprimidos de Hidroclorotiazida. No debe contener más de 1,0 %.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm x 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Fosfato monobásico de sodio 0,1 M y acetonitrilo (9:1), ajustar a pH $3,0 \pm 0,1$ con ácido fosfórico. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

[NOTA: se puede emplear un volumen de acetonitrilo que no exceda el 10 % del volumen total de la solución para disolver la *Sustancia de referencia*].

Solución de aptitud del sistema - Disolver una cantidad exactamente pesada de *Clorotiazida* y de Hidroclorotiazida SR-FA en *Fase móvil* para

obtener una solución de aproximadamente 0,15 mg por ml.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Hidroclorotiazida SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,15 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Hidroclorotiazida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 30 mg de hidroclorotiazida y transferir a un matraz aforado de 200 ml. Agregar 20 ml de *Fase móvil*, sonicar durante 5 minutos y agregar 20 ml de acetonitrilo. Sonicar durante 5 minutos, agregar 50 ml de *Fase móvil* y agitar durante 10 minutos. Completar a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,8 para clorotiazida y 1,0 para hidroclorotiazida; la resolución *R* entre los picos de clorotiazida e hidroclorotiazida no debe ser menor de 2,0. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,5 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* y medir las repuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ los Comprimidos de Hidroclorotiazida, de acuerdo a la cantidad declarada.

HIDROCORTISONA

CREMA DÉRMICA

Definición - La Crema Dérmica de Hidrocortisona debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{30}O_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Hidrocortisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. Cromatografía) recubierta con gel de sílice con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol y agua (180:15:1).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Hidrocortisona SR-FA en alcohol para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Solución muestra - Transferir una cantidad de la Crema Dérmica de Hidrocortisona, equivalente a 5 mg de hidrocortisona a un erlenmeyer, agregar 5 ml de alcohol y calentar en baño de vapor durante 5 minutos con agitación. Dejar en reposo hasta que alcance temperatura ambiente y filtrar.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución estándar* y 10 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta, a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro.

Fase móvil - Agua y acetonitrilo (75:25). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Hidrocortisona SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 500 μ g por ml. Diluir cuantitativamente 1 volumen de esta solución con 9 volúmenes de metanol diluido (1 en 2) para obtener una solución de aproximadamente 50 μ g por ml. [NOTA: si se emplea metanol en la última dilución de la *Preparación muestra*, emplear de forma similar metanol en lugar de metanol diluido en la última dilución de la *Preparación estándar*].

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada de la Crema Dérmica de Hidrocortisona, equivalente a 10 mg de hidrocortisona, a un recipiente para agitación de 150 ml, agregar 40 ml de metanol y calentar en baño de vapor con agitación hasta la fusión y dispersión de la crema. Dejar en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente y filtrar a través de lana de vidrio a un matraz aforado de 100 ml. Repetir la extracción con dos porciones más de 20 ml de metanol, combinar los extractos en el matraz, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Diluir cuantitativamente un volumen de esta solución y con un volumen de agua y filtrar a través de una membrana filtrante de 5 μ m de espesor. Si se produce precipitación al diluir con agua y la solución se encuentra turbia luego del filtrado, realizar la última dilución con metanol en lugar de agua y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención para el pico de hidrocortisona debe ser aproximadamente 10 minutos; la desviación estándar relativa para cinco inyecciones repetidas no debe ser mayor de 3,0 %

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (entre 10 y 25 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las

respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{30}O_5$ en la de Crema Dérmica de Hidrocortisona, de acuerdo la cantidad declarada.

HIDROCORTISONA

GEL TÓPICO

Definición - El Gel Tópico de Hidrocortisona debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{30}O_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia -
Hidrocortisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos de *Identificación A y B* en *Crema Dérmica de Hidrocortisona*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Crema Dérmica de Hidrocortisona*.

Fase móvil - Agua, metanol y acetonitrilo (6:2:2). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en *100. Cromatografía*).

Diluyente - Alcohol y diclorometano (75:25).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Hidrocortisona SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml. Diluir cuantitativamente esta solución con alcohol para obtener una solución de aproximadamente 10 µg por ml.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Gel Tópico de Hidrocortisona, equivalente a 10 mg de hidrocortisona, a un recipiente apropiado y diluir con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml. Diluir cuantitativamente esta solución con alcohol para obtener una solución de aproximadamente 10 µg por ml.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (entre 5 y 15 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación*

muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales a tiempos de retención equivalentes. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{30}O_5$ en el Gel Tópico de Hidrocortisona, de acuerdo a la cantidad declarada.

HIDROCORTISONA

UNGÜENTO TÓPICO

Definición - El Ungüento Tópico de Hidrocortisona debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{30}O_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Hidrocortisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol y agua (180:15:1).

Solución estándar - Preparar una solución de Hidrocortisona SR-FA en metanol de la misma concentración que la *Solución muestra*.

Solución muestra - Transferir una cantidad del Ungüento Tópico de Hidrocortisona, equivalente a 5 mg de hidrocortisona, a un erlenmeyer, agregar 10 ml de metanol y calentar en baño de vapor durante 5 minutos con agitación. Enfriar hasta que solidifique el ungüento base y filtrar.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta, a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Crema Dérmica de Hidrocortisona*.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Ungüento Tópico de Hidrocortisona, equivalente a 10 mg de hidrocortisona, a un recipiente para agitación de 150 ml, agregar 40 ml de metanol y calentar en baño de vapor con agitación hasta la fusión y dispersión del ungüento. Dejar en reposo hasta que alcance la temperatura ambiente y filtrar a través de lana de vidrio a un matraz aforado de 100 ml. Repetir la extracción con dos porciones más de 20 ml de alcohol, combinar los extractos en el matraz, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Diluir cuantitativamente un volumen de esta solución y con un volumen de agua y filtrar. Si se produce precipitación al diluir con agua y la solución se encuentra turbia luego del filtrado, realizar la última dilución con alcohol en lugar de agua y filtrar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Crema Dérmica de Hidrocortisona*. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{30}O_5$ en el Ungüento Tópico de Hidrocortisona, de acuerdo a la cantidad declarada.

HIDROCORTISONA, ACETATO DE CREMA DÉRMICA

Definición - La Crema Dérmica de Acetato de Hidrocortisona debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{23}H_{32}O_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetato de Hidrocortisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor. Calentar la placa durante 10 minutos a 105 °C y enfriar.

Fase móvil - Acetato de etilo, tolueno y acetona (140:40:13).

Solución estándar - Disolver una porción de Acetato de Hidrocortisona SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 250 µg por ml.

Solución muestra - Transferir aproximadamente 1 g de la Crema Dérmica de Acetato de Hidrocortisona a un recipiente apropiado, agregar 40 ml de una solución de acetonitrilo en metanol al 35 % y agitar hasta disolución. Transferir 20,0 ml de esta solución a otro recipiente, agregar 10,0 ml de isooctano y mezclar. Permitir que las fases se separen, descartar la fase superior y emplear la fase inferior.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de la *Solución muestra* y 10 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas, en una cámara cromatográfica equilibrada en una atmósfera de vapores de amoníaco, hasta que el frente de solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el obtenido en la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido en la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Acetato de Hidrocortisona*.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada de la Crema Dérmica de Acetato de Hidrocortisona, equivalente a 25 mg de acetato de hidrocortisona, a un recipiente apropiado, agregar 100 ml de tetrahidrofurano y agitar hasta la disolución de la crema. Transferir 10,0 ml de esta solución a otro recipiente, agregar 15,0 ml de *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{23}H_{32}O_6$ en la Crema Dérmica de Acetato de Hidrocortisona, de acuerdo a la cantidad declarada.

HIDROCORTISONA, ACETATO DE SUSPENSIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Suspensión Oftálmica de Acetato de Hidrocortisona es una suspensión estéril de *Acetato de Hidrocortisona* en medio acuoso, conteniendo un agente antimicrobiano apropiado. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de esteroides totales, calculada como $C_{23}H_{32}O_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetato de Hidrocortisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol y agua (180:15:1).

Solución estándar - Preparar una solución de Acetato de Hidrocortisona SR-FA en *Fase móvil* de una concentración similar a la *Solución muestra*.

Solución muestra - Evaporar hasta sequedad 50 ml de la *Preparación muestra* obtenida en *Valoración* y disolver el residuo en 1 ml de cloroformo.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,0 y 8,0.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Preparación estándar - Proceder según se indica en *Solución estándar* en 750. *Valoración de*

esteroides, empleando Acetato de Hidrocortisona SR-FA.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oftálmica de Acetato de Hidrocortisona, equivalente a 50 mg de acetato de hidrocortisona, a una ampolla de decantación y diluir a 15 ml con agua. Extraer con cuatro porciones de 25 ml de cloroformo, filtrar, transferir a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con cloroformo y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con cloroformo y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución a un erlenmeyer de 50 ml con tapón, evaporar hasta sequedad, dejar enfriar y disolver el residuo en 20,0 ml de alcohol.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en 750. *Valoración de esteroides*. Calcular la cantidad de $C_{23}H_{32}O_6$ en la Suspensión Oftálmica de Acetato de Hidrocortisona, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: "Descartar una vez finalizado el tratamiento".

HIDROCORTISONA, ACETATO DE UNGÜENTO OFTÁLMICO

Definición - El Ungüento Oftálmico de Acetato de Hidrocortisona debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de esteroides totales, calculada como $C_{23}H_{32}O_6$. Debe ser estéril y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetato de Hidrocortisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol y agua (180:15:1).

Solución muestra - Transferir una cantidad del Ungüento Oftálmico de Acetato de Hidrocortisona, equivalente 5 mg de acetato de hidrocortisona, a un erlenmeyer, agregar 5 ml de metanol y calentar en baño de vapor durante 5 minutos con agitación. Dejar enfriar hasta que se solidifique el ungüento base y filtrar.

Solución estándar - Preparar una solución de Acetato de Hidrocortisona SR-FA en las mismas condiciones que la *Solución muestra*.

Revelador - Preparar una solución metanólica de ácido sulfúrico al 70 %.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*, calentar a 90 °C durante 20 o 30 minutos, dejar enfriar y examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta, a 366 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico

principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido neto del envase
<220>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas metálicas en ungüentos oftálmicos
<660>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Acetato de Hidrocortisona*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Acetato de Hidrocortisona SR-FA con cloroformo saturado con agua para obtener una solución de aproximadamente 0,10 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Ungüento Oftálmico de Acetato de Hidrocortisona, equivalente a 2,5 mg de acetato de hidrocortisona, a un recipiente con tapa, agregar 25 ml de cloroformo saturado con agua y diez perlas de vidrio. Tapar el recipiente y agitar vigorosamente durante aproximadamente 15 minutos. Centrifugar y emplear la fase clorofórmica.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo volúmenes iguales de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{23}H_{32}O_6$ en el Ungüento Oftálmico de Acetato de Hidrocortisona, de acuerdo a la cantidad declarada.

HIDROCORTISONA, ACETATO DE UNGÜENTO TÓPICO

Definición - El Ungüento Tópico de Acetato de Hidrocortisona debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{23}H_{32}O_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetato de Hidrocortisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos de *Identificación A y B* en *Ungüento Oftálmico de Acetato de Hidrocortisona*.

Determinación del contenido neto del envase
<220>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración en Ungüento Oftálmico de Acetato de Hidrocortisona*.

HIDROCORTISONA, VALERATO DE CREMA DÉRMICA

Definición - La Crema Dérmica de Valerato de Hidrocortisona debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{26}H_{38}O_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Valerato de Hidrocortisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol y agua (180:15:1).

Solución estándar - Emplear la *Preparación estándar* obtenida en *Valoración*.

Solución muestra - Emplear la *Preparación muestra* obtenida en *Valoración*.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución estándar* y 10 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Examinar la placa bajo luz ultravioleta, a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Valerato de Hidrocortisona*.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada de la Crema Dérmica de Valerato de Hidrocortisona, equivalente a 1 mg de valerato de hidrocortisona, a un tubo con tapón, agregar 8,0 ml de una mezcla de metanol y agua (3:1) y agitar hasta dispersar la crema. Calentar hasta que funda, agitar nuevamente y dejar en reposo hasta que alcance la temperatura ambiente. Agregar 2,0 ml de la *Solución del estándar interno* y mezclar. Centrifugar durante 5 minutos y filtrar si fuera necesario para obtener un sobrenadante transparente.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{26}H_{38}O_6$ en la Crema Dérmica de Valerato de Hidrocortisona, de acuerdo a la cantidad declarada.

HIDROCORTISONA, VALERATO DE UNGÜENTO TÓPICO

Definición - El Ungüento Tópico de Valerato de Hidrocortisona debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{26}H_{38}O_6$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Valerato de Hidrocortisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos de *Identificación A y B* en *Crema Dérmica de Valerato de Hidrocortisona*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Crema Dérmica de Valerato de Hidrocortisona*.

HIDROXIUREA

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Hidroxiurea deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$, y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Hidroxiurea SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto, en ambiente seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460> *En fase sólida.* Transferir una porción del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración* equivalente a 30 mg de hidroxiurea a un tubo de centrifuga y agregar 10 ml de metanol. Mezclar y centrifugar durante 3 minutos. Transferir 1,0 ml del sobrenadante a un mortero conteniendo 500 mg de bromuro de potasio, triturar para obtener una mezcla homogénea, secar al vacío a 60 °C durante 3 horas: el espectro de absorción infrarroja debe presentar solo máximos a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de Hidroxiurea SR-FA.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua, 500 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad disuelta de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$ según se indica en *Valoración*.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución A, Solución B, Fase móvil, Solución de resolución, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Hidroxiurea*.

Preparación muestra - Extraer el contenido de no menos de 20 cápsulas de hidroxiurea, reducir a polvo fino y mezclar. Pesarse exactamente una cantidad de polvo equivalente a aproximadamente 200 mg de hidroxiurea y transferir a un matraz aforado de 500 ml. Agregar aproximadamente 300 ml de *Fase móvil*, sonicar durante 10 minutos, agitar mecánicamente durante 30 minutos, volver a sonicar durante 10 minutos y completar a volumen con el mismo solvente.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Hidroxiurea*. Calcular la cantidad de $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$ en las Cápsulas de Hidroxiurea, en base a la cantidad declarada.

HIOSCINA, BUTILBROMURO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Butilbromuro de Hioscina deben contener no menos de 92,5 por ciento y no más de 107,5 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{30}BrNO_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Butilbromuro de Hioscina SR-FA. Bromuro de Hioscina SR-FA

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Agitar una cantidad equivalente a 50 mg de butilbromuro de hioscina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración* con 20 ml de cloroformo, filtrar y evaporar hasta sequedad. Suspender el residuo con 5 ml de acetonitrilo. Evaporar hasta sequedad y secar el residuo a 50 °C durante 1 hora a presión reducida. El espectro de absorción infrarrojo del residuo obtenido se debe corresponder con el de una preparación similar de Butilbromuro de Hioscina SR-FA.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Límite de Hioscina

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución muestra - Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de Butilbromuro de Hioscina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*, transferir a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con *Diluyente*. Sonicar durante 15 minutos, centrifugar y filtrar.

Solución estándar - Emplear la *Preparación estándar B* obtenida en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, la respuesta del pico correspondiente a hioscina no debe ser mayor que la del pico principal en el cro-

matograma obtenido a partir de la *Solución estándar* (0,1 %).

Sustancias relacionadas

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Diluyente - Ácido clorhídrico 0,01 N.

Fase móvil - Diclorometano, alcohol absoluto, agua y ácido fórmico (9:9:1,5:0,5).

Revelador 1 - Mezclar volúmenes iguales de una solución de ioduro de potasio al 40 % y una solución preparada disolviendo 0,85 g de subnitrito de bismuto en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua. Diluir 1 volumen de la mezcla anterior con 2 volúmenes de ácido acético glacial y 10 volúmenes de agua inmediatamente antes de su uso.

Revelador 2 - Solución de nitrito de sodio al 5 %.

Solución madre de la muestra - Pesar una cantidad equivalente a 20 mg de butilbromuro de hioscina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Transferir a un recipiente apropiado, agregar 5 ml de *Diluyente*, agitar y centrifugar.

Solución muestra A - Diluir 3,0 ml de la *Solución madre de la muestra* a 100 ml con *Diluyente*.

Solución muestra B - Diluir 1,0 ml de la *Solución madre de la muestra* a 50 ml con *Diluyente*.

Solución muestra C - Diluir 1,0 ml de la *Solución madre de la muestra* a 400 ml con *Diluyente*.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 2 μ l de la *Solución madre de la muestra* y 2 μ l de las *Soluciones muestra A, B y C*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Secar a 60 °C durante 15 minutos y pulverizar sobre la placa con *Revelador 1*. Retirar la placa de la cámara, dejar secar al aire, pulverizar sobre la placa con *Revelador 2* y examinar inmediatamente: el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución madre de la muestra* es aproximadamente 0,45. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución madre de la muestra*, cualquier mancha secundaria con un valor de R_f menor que el de la mancha principal no debe ser más intensa que la mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra A* (3 %) y no más de dos de estas manchas deben ser más intensas que la mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra C* (0,25 %). Cualquier mancha secundaria con un valor de R_f mayor que el de la mancha principal no debe ser

más intensa que la mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra B* (2 %) y no más de una de estas manchas debe ser más intensa que la mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra C* (0,25 %).

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 210 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agregar 2,0 g de laurilsulfato de sodio a una mezcla de 370 ml de ácido clorhídrico 0,001 N y 680 ml de metanol. Filtrar y desgaseificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Ácido clorhídrico 0,001 N

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Butilbromuro de Hioscina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 40 mg de butilbromuro de hioscina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar aproximadamente 60 ml de *Diluyente*, sonicar y completar a volumen con el mismo solvente. Centrifugar y filtrar.

Preparación estándar A - Pesar exactamente alrededor de 20 mg de Butilbromuro de Hioscina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con *Diluyente*.

Preparación estándar B - Pesar exactamente alrededor de 1 mg de Bromuro de Hioscina SR-FA, transferir a una matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con *Diluyente*.

Solución de aptitud del sistema - Transferir 10 µl de la *Solución muestra* a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con *Preparación estándar B*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de hioscina y butilhioscina no debe ser menor de 5.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar A*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la

cantidad de $C_{21}H_{30}BrNO_4$, de acuerdo a la cantidad declarada.

HOMATROPINA, METILBROMURO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Metilbromuro de Homatropina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{24}BrNO_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Metilbromuro de Homatropina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Pesar una cantidad equivalente a 10 mg de metilbromuro de homatropina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Transferir a un recipiente apropiado, agregar 15 ml de una mezcla de volúmenes iguales de metanol y agua, agitar durante 10 minutos y filtrar. Evaporar el filtrado en un baño de vapor hasta sequedad y secar a 105 °C durante 1 hora. El punto de fusión del residuo así obtenido debe estar comprendido entre 190 y 198 °C (ver 260. *Determinación del punto de fusión*).

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{17}H_{24}BrNO_3$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 258 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Metilbromuro de Homatropina SR-FA.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{24}H_{32}O_4$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Metilbromuro de Homatropina SR-FA. Transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un segundo matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 100 µg por ml.

Solución muestra - Reducir a polvo fino un comprimido de Metilbromuro de Homatropina y transferir a un matraz aforado de una capacidad tal que al completar a volumen se obtenga una solución de aproximadamente 100 µg de metilbromuro de homatropina por ml. Agregar agua hasta completar aproximadamente la mitad del volumen del matraz y agitar durante 10 minutos. Completar a volumen con agua, mezclar y filtrar. Emplear el filtrado según se indica en *Procedimiento*.

Procedimiento - Transferir 2,0 ml de la *Solución muestra* y 2,0 ml de la *Solución estándar* a sendos erlenmeyers de 50 ml, agregar 0,1 ml de una solución de hidróxido de sodio (1 en 10) a cada uno y calentar en un baño de agua a 80 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente, agregar 2 ml de sulfato cérico amónico 0,2 M en ácido sulfúrico 1 N y mezclar. Agregar a sendos erlenmeyers 20,0 ml de hexano y agitar durante 15 minutos. Emplear las fases orgánicas para determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 242 nm, empleando hexano como blanco. Calcular la cantidad en mg de $C_{17}H_{24}BrNO_3$ en cada Comprimido de Metilbromuro de Homatropina.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Metilbromuro de Homatropina SR-FA. Transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Metilbromuro de Homatropina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 12,5 mg de metilbromuro de homatropina, transferir a un recipiente apropiado, agregar 10 ml de agua y agitar durante 30 minutos. Filtrar a presión reducida. Transferir el contenido del tubo a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Transferir 10,0 ml de la *Solución muestra* y 10,0 ml de la *Solución estándar* a sendos tubos de ensayo, agregar 1 ml de ácido sulfúrico 5 N y 2 ml de reineckato de amonio a cada uno, agitar y dejar reposar durante una hora. Filtrar, empleando porciones del filtrado para transferir totalmente el precipitado al filtro y lavar con tres porciones de 2 ml de agua enfriada previamente. Disolver completamente el precipitado transfiriendo sobre el mismo porciones de 1 ml de acetona apli-

cando succión. Recolectar la solución en un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con acetona y mezclar. Determinar las absorbancias de las soluciones obtenidas en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 525 nm, empleando acetona como blanco. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{24}BrNO_3$, de acuerdo a la cantidad declarada.

IBUPROFENO

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Ibuprofeno deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}O_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ibuprofeno SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>

Reducir a polvo fino un Comprimido de Ibuprofeno, agregar aproximadamente 5 ml de cloroformo y agitar. Filtrar la mezcla y evaporar el filtrado con la ayuda de una corriente de nitrógeno hasta sequedad: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión en aceite mineral del residuo obtenido se debe corresponder con el de Ibuprofeno SR-FA.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención relativo al estándar interno obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: Solución reguladora de fosfato de pH 7,2; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario y determinar la cantidad de $C_{13}H_{18}O_2$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 221 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Ibuprofeno SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}O_2$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 5,0 %. Los Comprimidos de Ibuprofeno con cubierta de gelatina están exentos de este requisito.

Límite de 4-isobutilacetofenona

Emplear los cromatogramas obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Solución estándar de 4-isobutilacetofenona* según se indica en *Valoración* y calcular el porcentaje de 4-isobutilacetofenona ($C_{12}H_{16}O$) en los Comprimidos de Ibuprofeno. No debe contener más de 0,1 %.

VALORACIÓN

Fase móvil, Solución del estándar interno y Preparación estándar - Proceder según se indica en *Valoración en Ibuprofeno*.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Solución estándar de 4-isobutilacetofenona - Disolver una cantidad exactamente pesada de 4-isobutilacetofenona en acetonitrilo para obtener una solución de aproximadamente 0,6 mg por ml. Agregar 2,0 ml de esta solución madre a 100,0 ml de *Solución del estándar interno* y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 12 μ g de 4-isobutilacetofenona por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Ibuprofeno. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 1,2 g de ibuprofeno, transferir a un recipiente apropiado, agregar 100,0 ml de *Solución del estándar interno* y agitar durante 10 minutos. [NOTA: cuando los Comprimidos de Ibuprofeno están recubiertos, colocar un número de comprimidos, equivalente a no menos de 1,2 g de ibuprofeno en un recipiente, agregar un volumen exactamente medido de *Solución del estándar interno* para obtener una solución de aproximadamente 12 mg de ibuprofeno por ml, agregar alrededor de 15 perlas de vidrio y agitar bien hasta que los comprimidos se desintegren]. Centrifugar una porción de la suspensión obtenida y emplear la solución sobrenadante transparente.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,75 para ibuprofeno y 1,0 para valerofenona; la resolución *R* entre los

picos de ibuprofeno y valerofenona no debe ser menor de 2,5; los factores de asimetría para los picos individuales no deben ser mayores de 2,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %. Cromatografiar la *Solución estándar de 4-Isobutilacetofenona* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 1,0 para valerofenona y 1,2 para 4-isobutilacetofenona; la resolución *R* entre los picos de valerofenona y 4-isobutilacetofenona no debe ser menor de 2,5; los factores de asimetría para los picos individuales no deben ser mayores de 2,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µl) de la *Preparación estándar*, la *Preparación muestra* y la *Solución estándar de 4-isobutilacetofenona*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{13}H_{18}O_2$ en los Comprimidos de Ibuprofeno, de acuerdo a la cantidad declarada.

IBUPROFENO

CREMA DÉRMICA

Definición - La Crema Dérmica de Ibuprofeno debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ibuprofeno SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - *n*-Hexano, acetato de etilo y ácido acético anhidro (75:25:5).

Revelador - Preparar una solución de permanganato de potasio en ácido sulfúrico 1 M al 1 %.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ibuprofeno SR-FA en diclorometano para obtener una solución de aproximadamente 5 mg por ml.

Solución muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada de la Crema Dérmica de Ibuprofeno, equivalente a 50 mg de ibuprofeno, a un recipiente apropiado, agregar 10 ml de diclorometano, agitar durante 5 minutos y filtrar.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 5 μ l de la *Solución estándar* y 5 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y secar a 120 °C durante 30 minutos. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar a 120 °C durante 20 minutos. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta, a 365 nm: el valor de R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector

ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 15 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto. Equilibrar la columna con *Fase móvil* durante 45 minutos antes de comenzar la cromatografía.

Fase móvil - Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido ortofosfórico (600:340:0,5). Dejar equilibrar esta solución y diluir a 1 litro con agua. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 100 mg de Ibuprofeno SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 5 ml de una solución de ácido 2-(4-butil fenil) propiónico en metanol de aproximadamente 60 μ g por ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Solución madre de la muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada de la Crema Dérmica de Ibuprofeno, equivalente a 100 mg de ibuprofeno, a un recipiente apropiado, agregar 25 ml de metanol y agitar durante 10 minutos. Transferir la solución a un matraz aforado de 50 ml, lavar el primer recipiente con 10 ml de metanol y combinar el lavado con la solución. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar.

Solución muestra - Transferir 1 ml de la *Solución madre de la muestra* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la relación entre la altura del pico de ácido 2-(4-butil fenil) propiónico y el valle entre este pico y el pico de ibuprofeno debe ser mayor de 1,5.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales de la *Solución estándar*, la *Solución madre de la muestra* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas durante al menos 1,5 veces el tiempo de retención del pico principal y medir las respuestas de los picos principales. El tiempo de retención del pico correspondiente a ibuprofeno debe ser aproximadamente 20 minutos; la respuesta de ningún pico correspondiente al ácido 2-(4-butil fenil) propiónico en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución madre de la muestra* debe ser mayor que el mismo pico en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar* (0,3 %); la respuesta de ningún otro pico secundario debe ser mayor a 0,3 veces la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* (0,3 %), y la suma de las respuestas de todos los picos, a excepción de los picos de ibuprofeno y del ácido

2-(4-butil fenil) propiónico no debe ser mayor a 0,7 veces la respuesta del pico principal obtenido a partir de la *Solución muestra* (0,7 %). Ignorar cualquier pico con una respuesta menor a 0,1 veces el área del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* (0,1 %).

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos de administración tópica.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 264 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol, agua y ácido ortofosfórico (750:247:3). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ibuprofeno SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir una porción exactamente medida de la Crema Dérmica de Ibuprofeno, equivalente a 50 mg de ibuprofeno, a un recipiente apropiado, agregar 25 ml de *Fase móvil* y agitar durante 10 minutos. Transferir a un matraz aforado de 50 ml, lavar el recipiente original con dos porciones de 10 ml de *Fase móvil*, combinar la solución con los lavados, completar a volumen con *Fase móvil* y filtrar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de C₁₃H₁₈O₂ en la Crema Dérmica de Ibuprofeno, de acuerdo a la cantidad declarada.

IBUPROFENO

SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Ibuprofeno debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ibuprofeno SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice de 0,25 mm de espesor, previamente activada calentando a 105 °C durante 30 minutos.

Fase móvil - *n*-Hexano, acetato de butilo y ácido acético glacial (17:3:1).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ibuprofeno SR-FA en cloroformo para obtener una solución de aproximadamente 20 mg por ml.

Solución muestra - Transferir un volumen de Suspensión Oral de Ibuprofeno, equivalente a 200 mg de ibuprofeno, a una ampolla de decantación que contenga 10 ml de cloroformo y agitar durante 1 minuto. Permitir que las fases se separen y filtrar la fase clorofórmica a través de un filtro conteniendo 2 g de sulfato de sodio anhidro. Emplear el filtrado. [NOTA: retener una porción del filtrado para el ensayo de *Identificación B*].

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de la *Solución estándar* y 10 µl de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida*.

Evaporar hasta sequedad aproximadamente 1 ml de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* obtenidas en ensayo de *Identificación A*.

C - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Pre-*

paración estándar se debe corresponder con el de la *Preparación muestra*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: Solución reguladora de fosfato de pH 7,2 (ver *Soluciones reguladoras en Reactivos y soluciones*); 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Determinar la cantidad de $C_{13}H_{18}O_2$ disuelta mediante la siguiente técnica cromatográfica.

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución del estándar interno - Preparar una solución de benzofenona en acetonitrilo de aproximadamente 0,3 mg por ml.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ibuprofeno SR-FA en *Medio* para obtener una solución de aproximadamente 0,2 mg por ml. Mezclar 10,0 ml de esta solución y 10,0 ml de la *Solución del estándar interno*.

Solución muestra - Filtrar una porción de la solución en ensayo, mezclar 10,0 ml del filtrado y 10,0 ml de la *Solución del estándar interno*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}O_2$ disuelta, relacionando las respuestas de los picos de ibuprofeno y las respuestas de los picos del estándar interno.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}O_2$ se debe disolver en 60 minutos.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,6 y 4,6

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Límite de 4-isobutilacetofenona

Fase móvil y Diluyente - Proceder según se indica en *Valoración*.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El

caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Solución madre del estándar - Disolver cuantitativamente una cantidad exactamente pesada de 4-isobutilacetofenona en acetonitrilo para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml.

Solución estándar - Transferir 3,0 ml de la *Solución madre del estándar* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 2,0 ml de esta solución a un segundo matraz aforado de 50 ml, agregar 20 ml de *Diluyente*, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Transferir 1,5 ml de la *Solución madre del estándar* y 9,0 ml de la *Preparación madre del estándar* preparada en *Valoración* a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar.

Solución muestra - Transferir 20,0 ml de la *Preparación madre de la muestra* preparada en *Valoración* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 1,3 para 4-isobutilacetofenona y 1,0 para ibuprofeno; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la resolución *R* entre los picos de ibuprofeno y 4-isobutilacetofenona no debe ser menor de 1,5. Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 35 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de 4-isobutilacetofenona en la Suspensión Oral de Ibuprofeno. No debe contener más de 0,25 %.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 220 nm y una columna de 15 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas de porosas sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Diluir 0,7 ml de ácido fosfórico con agua para obtener 1 litro de ácido fosfórico 0,01 M. Preparar una mezcla de esta solución y

acetonitrilo (63:37). Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Acetonitrilo y agua (1:1).

Solución del estándar interno - Preparar una solución de benzofenona en acetonitrilo de aproximadamente 3,2 mg por ml.

Preparación madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ibuprofeno SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 1,2 mg por ml.

Preparación estándar - Transferir 20,0 ml de la *Preparación madre del estándar* y 5,0 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,48 mg de Ibuprofeno SR-FA por ml.

Preparación madre de la muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oral de Ibuprofeno, equivalente a 60 mg de ibuprofeno, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. [NOTA: retener una porción de esta solución para emplear en el ensayo de *Límite de 4-isobutilacetofenona*].

Preparación muestra - Transferir 20,0 ml de la *Preparación madre de la muestra* y 5,0 ml de la *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con acetonitrilo, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,9 para benzofenona y 1,0 para ibuprofeno; la resolución *R* entre los picos de benzofenona e ibuprofeno no debe ser menor de 1,5; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{13}H_{18}O_2$ en la Suspensión Oral de Ibuprofeno, de acuerdo a la cantidad declarada.

IDARUBICINA, CLORHIDRATO DE PARA INYECCIÓN

Definición - Clorhidrato de Idarubicina para Inyección es una mezcla estéril de *Clorhidrato de Idarubicina* y *Lactosa*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{26}H_{27}NO_9 \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Idarubicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Precaución - Manipular el Clorhidrato de Idarubicina con sumo cuidado, evitando la inhalación de sus partículas y el contacto con la piel.

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido en la *Preparación estándar*.

Aspecto de la solución reconstituida

Reconstituir el Clorhidrato de Idarubicina para Inyección según se indica en el rótulo. La solución reconstituida debe cumplir con los requisitos en 280. *Disolución completa* y estar libre de partículas extrañas cuando se realiza una inspección visual.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,0; determinado sobre una solución reconstituida según se indica en el rótulo, excepto que debe emplearse agua como diluyente.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 4,0 %, excepto que la muestra debe transferirse empleando una jeringa seca para inyectar un volumen exactamente medido de metanol u otro disolvente, a un recipiente previamente pesado y agitado para disolver la muestra. Con la misma jeringa, retirar la solución anterior y transferirla al frasco de titulación.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 8,9 Unidades de Endotoxina por mg de clorhidrato de idarubicina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica el *Método de filtración por membrana*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución de resolución, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Clorhidrato de Idarubicina*.

Preparación muestra - Disolver el contenido de un envase de Clorhidrato de Idarubicina para Inyección en un volumen exactamente medido de *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg de clorhidrato de idarubicina por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Clorhidrato de Idarubicina*. Calcular la cantidad de $C_{26}H_{27}NO_9 \cdot HCl$ en el Clorhidrato de Idarubicina para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

iodo povidona

SOLUCIÓN DE LAVADO

Definición - La Solución de Lavado de Iodo Povidona es una solución de *Iodo Povidona* con uno o más agentes surfactantes. Debe contener no menos de 85,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de Iodo y una pequeña cantidad de alcohol. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Transferir 1 ml de almidón (SR) y 9 ml de agua a un erlenmeyer y mezclar. Transferir 1 ml de una dilución que contenga aproximadamente 0,05 % de Iodo, obtenida a partir de la Solución de Lavado de Iodo Povidona y mezclar: se debe desarrollar un color azul intenso.

B - Agregar 1 ml de aceite vegetal y 4 ml de agua a un tubo de ensayo que contenga 2 ml de Solución de Lavado de Iodo Povidona y agitar vigorosamente durante 10 segundos. Dejar en reposo durante 3 minutos: se debe formar una emulsión estable.

C - Detección de Iodo libre - Transferir 10 ml de la Solución de Lavado de Iodo Povidona a un erlenmeyer, evitando el contacto con el cuello del mismo. Cubrir la abertura con un papel de filtro e inmediatamente mojar el papel con una gota de almidón (SR): no se debe desarrollar color azul antes de 60 segundos.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 6,5.

Determinación de alcohol <130>

Entre 90,0 y 110,0 %; del valor declarado en el rótulo.

VALORACIÓN

Transferir un volumen exactamente medido de la Solución de Lavado de Iodo Povidona, equivalente a 50 mg de iodo, a un erlenmeyer y diluir con agua hasta un volumen no inferior a 30 ml. Titular con tiosulfato de sodio 0,02 N (SV), determinando el punto final potenciométricamente empleando un sistema de electrodos platino-calomel. Realizar una determinación con un blanco y las correcciones necesarias (ver 780. *Volimetría*). Cada ml de tiosulfato de sodio 0,02 N equivale a 2,538 mg de Iodo.

IOHEXOL

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Iohexol es una solución estéril de *Iohexol* en *Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de Iohexol (C₁₉H₂₆I₃N₃O₉) como iodo orgánicamente unido. La Solución Inyectable de Iohexol destinada para uso intravascular o intratecal no debe contener agentes antimicrobianos. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Iohexol SR-FA. Impureza A de Iohexol SR-FA: 5-(acetilamino)-*N,N'*-bis(2,3-dihidroxiopropil)-2,4,6-triiodo-1,3-bencenodicarboxamida. Impureza B de Iohexol SR-FA: 5-amino-*N,N'*-bis(2,3-dihidroxiopropil)-2,4,6-triiodo-1,3-bencenodicarboxamida. Impureza C de Iohexol SR-FA: *N,N'*-bis(2,3-dihidroxiopropil)-5-nitro-1,3-bencenodicarboxamida.

CONSERVACIÓN

En envases inactivo de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Evaporar hasta sequedad 1 ml de la Solución Inyectable de Iohexol y calentar el residuo obtenido en un crisol: se deben desprender vapores de color violeta.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Alcohol *n*-butílico, agua y ácido acético glacial (50:25:11).

Solución estándar - Disolver una cantidad apropiada de Iohexol SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 10 mg por ml.

Solución muestra - Diluir un volumen de Solución Inyectable de Iohexol con metanol para obtener una solución de aproximadamente 10 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, 10 µl de la *Solución muestra* y 10 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar bajo luz ultravioleta a

254 nm: se debe detectar la presencia de los isómeros *endo* y *exo* en la *Solución muestra* con la aparición de dos manchas; cada una de ellas se deben corresponder en tamaño e intensidad a la mancha principal correspondiente y al mismo valor de R_f de la *Solución estándar*. La mancha con el valor de R_f menor corresponde al isómero *endo*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,2 Unidades de Endotoxina por 50 mg de iodo.

Determinación del pH <250>

Entre 6,8 y 7,7.

Ioduro libre

Transferir 5,0 ml de la Solución Inyectable de Iohexol a un recipiente apropiado, agregar aproximadamente 20 ml de agua y titular con nitrato de plata 0,001 N (SV), determinando el punto final potenciométricamente (ver 780. *Volumetría*), empleando un electrodo de plata combinado con un electrodo de referencia apropiado. Cada ml de nitrato de plata 0,001 N equivale a 0,1269 mg de I (no más de 0,02 %, en base al contenido de Iohexol).

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

La Solución Inyectable de Iohexol destinada para vía intratecal debe cumplir con los requisitos para inyectables de pequeño volumen.

Metales pesados <590>

Método I. No más de 0,002 %.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Solución A, Solución B Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema- Proceder según se indica en *Sustancias relacionadas* en *Iohexol*.

Solución muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Iohexol, equivalente a 75 mg de iohexol, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 10 µl de la *Solución muestra*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de todos los picos. Calcular el porcentaje de sustancias *O*-alquiladas en la Solución Inyectable de Iohexol, en relación a la suma de las respuestas de todos los picos: no debe contener más de 0,1 % de cualquier impureza individual, no más de 0,6 % de sustancias *O*-alquiladas y la suma de todas las impurezas no debe ser mayor de 0,3 %.

VALORACIÓN DE IODO

Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Iohexol, equivalente a 300 mg de iodo, a un erlenmeyer de vidrio de 250 ml con tapón. Proceder según se indica en *Valoración en Iohexol*, comenzando donde dice: "*Agregar 25 ml de hidróxido de sodio 1,25 N...*".

ROTULADO

Indicar en el rótulo, que se debe descartar la porción no empleada; que no debe emplearse si se observara un cambio en la coloración o la formación de un precipitado. Indicar en el rótulo la vía de administración.

IOPANOICO, ÁCIDO

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Ácido Iopanoico deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{12}I_3NO_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Pesar una cantidad equivalente a 1 g de ácido iopanoico a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*, mezclar con dos porciones de 10 ml de éter de petróleo, decantar y descartar el líquido. Dejar que el residuo se seque espontáneamente, mezclar con 15 ml de acetona y filtrar. Repetir la operación con otra porción de 15 ml de acetona, evaporar los filtrados combinados en un baño de vapor a un volumen de no más de 1 ml, agregar con agitación constante 20 ml de agua, filtrar, lavar el precipitado con dos porciones de 5 ml de agua y secar a 105 °C durante 2 horas: el ácido iopanoico obtenido debe fundir entre 150 y 158 °C con descomposición y debe responder al ensayo de *Identificación en Ácido Iopanoico*.

Ensayo de disgregación <310>

Tiempo: 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Haluros

Pesar una cantidad equivalente a 500 mg de ácido iopanoico a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra en Valoración*: debe responder al ensayo para *Haluros en Ácido Iopanoico*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Ácido Iopanoico. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 1 g de ácido iopanoico y triturar con 10 ml de éter de petróleo. Dejar que la mezcla sedimente, decantar el éter a través de un filtro pequeño, repetir la trituration con 10 ml de éter de petróleo, filtrar a través del mismo filtro y descartar los filtrados. Calentar el residuo con 10 ml de alcohol neutralizado a 70 °C, filtrar a

través del mismo filtro y lavar el residuo no disuelto con cuatro porciones de 10 ml de alcohol neutralizado a 70 °C, pasando los lavados a través del mismo filtro. Enfriar el filtrado y los lavados combinados a temperatura ambiente, agregar 3 a 5 gotas de azul de timol (SR) y titular con hidróxido de sodio 0,1 N (SV). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 57,09 mg de $C_{11}H_{12}I_3NO_2$.

ISONIAZIDA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Isoniazida deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_7N_3O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Isoniazida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de isoniazida a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un matraz aforado de 500 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar una porción de la mezcla. Proceder según se indica para el ensayo de *Identificación B* en *Isoniazida*, comenzando donde dice "Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml...".

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario y determinar la cantidad de $C_6H_7N_3O$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 263 nm, comparando con una *Solución estándar* de Isoniazida SR-FA diluida en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_6H_7N_3O$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para la uniformidad de contenido

Diluyente - Ácido clorhídrico 0,1 N en agua (3 en 100).

Solución muestra - Reducir a polvo fino un Comprimido de Isoniazida, transferir a un matraz aforado de 500 ml con la ayuda de 200 ml de agua.

Agitar durante 30 minutos, completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar y descartar los primeros 20 ml del filtrado. Diluir una porción del filtrado cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 10 μ g de Isoniazida por ml.

Solución estándar - Pesar exactamente una cantidad de Isoniazida SR-FA, disolver con agua y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 10 μ g de isoniazida por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de ambas soluciones en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 263 nm, con un espectrofotómetro, empleando agua como blanco. Calcular la cantidad de $C_6H_7N_3O$ en cada Comprimido de Isoniazida.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosas de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Solución reguladora - Preparar una solución de fosfato monobásico de potasio 0,1 M, ajustar a pH 6,9 con hidróxido de sodio 10 N, agregar suficiente trietanolamina para obtener una solución de trietanolamina 0,2 mM y mezclar.

Fase móvil - *Solución reguladora* y metanol (95:5). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Isoniazida SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,32 mg de isoniazida por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Isoniazida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 32 mg de isoniazida, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 40 ml de *Fase móvil* y sonicar durante 10 minutos. Dejar reposar hasta que alcance la temperatura ambiente, completar a volumen con *Fase móvil* y centrifugar durante 5 minutos.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Pro-*

cedimiento: el factor de capacidad k' no debe ser menor de 2,35; la eficiencia de la columna no debe ser menor de 1.800 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_6H_7N_3O$ en los Comprimidos de Isoniazida, de acuerdo a la cantidad declarada.

KETAMINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Ketamina es una solución estéril de *Clorhidrato de Ketamina en Agua para Inyectables*. Debe contener una cantidad $C_{13}H_{16}ClNO \cdot HCl$ equivalente a no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de ketamina ($C_{13}H_{16}ClNO$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Ketamina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I, protegidos del calor.

ENSAYOS

Identificación

Absorción ultravioleta <470>. El espectro de absorción ultravioleta de una dilución de Solución Inyectable de Clorhidrato de Ketamina en hidróxido de sodio metanólico 0,01 N que contenga Clorhidrato de Ketamina, equivalente a 800 µg de ketamina por ml, medido entre 250 y 350 nm, debe presentar máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de Clorhidrato de Ketamina SR-FA, medida concomitantemente.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,5 y 5,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,4 Unidades de Endotoxina por mg de clorhidrato de ketamina.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Diluyente - Ácido sulfúrico 0,1 N (saturado con cloroformo).

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Ketamina, equivalente a 500 mg de clorhidrato de ketamina, a un matraz aforado de

200 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 20,0 ml de esta solución a una ampolla de decantación, agregar 3 ml de hidróxido de sodio 0,1 N y extraer con tres porciones de 15 ml de cloroformo. Recoger los extractos clorofórmicos en otra ampolla de decantación y extraer con tres porciones de 30 ml de ácido sulfúrico 0,1 N, recogiendo los extractos ácidos en un matraz aforado de 200 ml. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación estándar - Preparar una solución de Clorhidrato de Ketamina SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 250 µg por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 269 nm, con un espectrofotómetro, empleando *Diluyente* como blanco. Calcular la cantidad de ketamina ($C_{13}H_{16}ClNO$) en cada ml de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Ketamina, de acuerdo a la cantidad declarada.

KETOCONAZOL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Ketoconazol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Ketoconazol SR-FA.
Terconazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 270 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Ketoconazol SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 225 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 3,0 ml por minuto.

Fase móvil - Solución de diisopropilamina en metanol 1 en 500 y solución de acetato de amonio 1 en

200 (70:30).

Diluyente - Mezclar volúmenes iguales de metanol y cloruro de metileno.

Solución del estándar interno - Preparar una solución de Terconazol SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 1 mg por ml.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 20 mg de Ketoconazol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 5,0 ml de *Solución del estándar interno*, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Ketoconazol.

Pesar exactamente una cantidad equivalente a 200 mg de ketoconazol, transferir a un recipiente con tapa apropiado, agregar 50 ml de *Diluyente* mezclar durante 30 minutos y centrifugar. Transferir 5,0 ml del sobrenadante a un matraz aforado de 50 ml, agregar 5,0 ml de la *Solución del estándar interno*, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar los cromatogramas según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,6 para ketoconazol y 1,0 para terconazol; la resolución *R* entre ketoconazol y terconazol no debe ser menor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ en los Comprimidos de Ketoconazol, de acuerdo a la cantidad declarada.

LEUCOVORINA CÁLCICA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Leucovorina Cálcica deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de leucovorina ($C_{20}H_{23}N_7O_7$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Ácido 10-Formilfólico SR-FA. Leucovorina Cálcica SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460> *En fase sólida.*

Pesar una cantidad equivalente a 200 mg de leucovorina cálcica a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Transferir a un erlenmeyer, agregar 10 ml de agua, agitar, sonicar durante aproximadamente 10 minutos y filtrar. Transferir a un tubo de centrifuga con tapón, agregar aproximadamente 125 mg de oxalato de amonio, agitar y centrifugar hasta obtener un sobrenadante transparente. Transferir el sobrenadante a otro tubo de centrifuga con tapón, agregar 1 ml de metanol, 3 gotas de ácido clorhídrico y agitar. Si la solución presenta turbidez, agregar metanol hasta obtener una solución transparente y filtrar, si fuera necesario, para eliminar el material no disuelto. Enfriar a 0 °C hasta que se forme un precipitado y centrifugar entre 1 y 2 minutos. [NOTA: repetir los pasos de enfriar y centrifugar, si fuera necesario, para obtener una mayor cantidad de precipitado]. Decantar el sobrenadante, agregar 2 ml de metanol al tubo de centrifuga, agitar para disolver el precipitado y transferir a un vaso de precipitados. Evaporar hasta sequedad y secar el residuo a 50 °C durante 30 minutos: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión en bromuro de potasio del residuo obtenido debe presentar máximos solo a las mismas longitudes de onda que el de una solución preparada del mismo modo a partir de Leucovorina Cálcica SR-FA.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 284 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Leucovorina Cálcica SRFA.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Leucovorina Cálcica SR-FA en agua y diluir para obtener una solución de aproximadamente 10 µg de leucovorina cálcica por ml.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Leucovorina Cálcica a un matraz aforado apropiado disolver y diluir en agua hasta obtener una solución de aproximadamente 10 µg de leucovorina cálcica por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 284 nm, empleando agua como blanco. Calcular la cantidad de $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$ en cada Comprimido de Leucovorina Cálcica, en base a la cantidad declarada.

Pureza cromatográfica

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Preparación estándar y Preparación muestra - Proceder según se indica en *Valoración*.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración*. Calcular el porcentaje de cada impureza, en relación a la suma de las respuestas de todos los picos. No debe presentar más de 2,5 % de cualquier impureza individual ni más de 4,0 % del total de las impurezas.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Diluyente - Agua y metanol (50:20).

Fase móvil - Preparar una solución de fosfato de tetrabutilamonio en *Diluyente* 0,05 M. Ajustar a pH 7,5 con solución de hidróxido de sodio al 50 %. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Leucovorina Cálcica SR-FA y Ácido 10-Formilfólico SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 500 µg Leucovorina Cálcica SR-FA y 10 µg Ácido 10-Formilfólico SR-FA por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Leucovorina Cálcica. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de leucovorina, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 50 ml de agua, sonicar durante 30 minutos, completar a volumen con agua, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre la leucovorina y el ácido 10-formilfólico no debe ser menor de 1,5; los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 1,0 para la leucovorina y 2,3 para el ácido 10-formilfólico; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de leucovorina (C₂₀H₂₃N₇O₇) en los Comprimidos de Leucovorina Cálcica, de acuerdo a la cantidad declarada.

LEUCOVORINA CÁLCICA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Leucovorina Cálcica es una solución estéril de *Leucovorina Cálcica en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{20}H_{23}N_7O_7$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Leucovorina Cálcica SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Transferir un volumen de la Solución Inyectable de Leucovorina Cálcica, equivalente a 6 mg de leucovorina cálcica a un tubo de vidrio de centrífuga de 50 ml con tapón. Agregar 40 ml de acetona, mezclar, centrifugar durante algunos minutos, decantar y descartar la fase líquida. Repetir el proceso de lavado con otros 40 ml de acetona. Secar el precipitado así obtenido con una corriente de nitrógeno seco: el residuo debe responder al ensayo de *Identificación* en *Leucovorina Cálcica*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,5 y 8,5.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 1,95 Unidades de Endotoxina por mg de leucovorina cálcica.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

[NOTA: realizar este ensayo sin interrupciones, empleando agua recientemente desionizada cada vez que se indique agua y material de vidrio

inactínico para todas las soluciones que contengan Leucovorina Cálcica].

Sistema cromatográfico, Solución de hidróxido de tetrabutylamonio, Solución de fosfato monobásico de sodio 2 N, Fase móvil, Diluyente, Preparación estándar, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en la *Valoración en Leucovorina Cálcica*.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Leucovorina Cálcica, equivalente a 9 mg de leucovorina, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con el *Diluyente* y mezclar. Transferir 25 ml de esta solución a una ampolla de decantación de volumen adecuado, agregar 25 ml de cloruro de metileno, agitar la mezcla, dejar que las fases se separen y descartar la fase orgánica. Repetir la extracción con dos porciones más de 25 ml de cloruro de metileno, descartando los extractos de cloruro de metileno. Filtrar la capa acuosa, descartando los primeros 5 ml del filtrado y recoger el filtrado en un erlenmeyer con tapón de vidrio.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración en Leucovorina Cálcica*. Calcular la cantidad de $C_{20}H_{23}N_7O_7$ en la Solución Inyectable de Leucovorina Cálcica, de acuerdo a la cantidad declarada.

LEVOTIROXINA SÓDICA COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Levotiroxina Sódica deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Levotiroxina SR-FA. Liotironina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

[NOTA: emplear sólo envases de vidrio.]

ENSAYO 1

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N conteniendo lauril sulfato de sodio al 0,2 %; 500 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ disuelta mediante la técnica siguiente:

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 225 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y ácido fosfórico al 0,1 % (60:40). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Preparar una solución de Levotiroxina SR-FA en metanol de aproximadamente 0,1 mg por ml. Diluir esta solución con *Medio* para obtener una solución con una concentración similar a la *Solución muestra*.

Solución muestra - [NOTA: antes de usar, revisar el filtro, para evitar la pérdida de la droga]. Emplear una porción del filtrado como *Solución muestra*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 4,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 800 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ disuelta.

Tolerancia - No menos de 70 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ se debe disolver en 45 minutos.

ENSAYO 2

Aparato, Medio, Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución estándar, Solución muestra, Aptitud del sistema y Procedimiento - Proceder según se indica en *Ensayo 1*.

Tiempo: 15 minutos.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ se debe disolver en 15 minutos.

ENSAYO 3

Aparato, Medio, Tiempo, Solución estándar y Solución muestra - Proceder según se indica en *Ensayo 1*.

Determinar la cantidad de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ disuelta mediante la técnica siguiente:

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 225 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por grupos nitrilo químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto. Mantener la columna a 30 C

Fase móvil - Agua y acetonitrilo (65:35), conteniendo 0,5 ml de ácido fosfórico por litro. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 4,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ disuelta.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ se debe disolver en 45 minutos.

ENSAYO 4

[NOTA: no emplear mezcladores de paleta con recubrimiento sintético].

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 500 ml para comprimidos conteniendo entre 25 y 175 μ g de levotiroxina sódica; 900 ml para comprimidos conteniendo 200 o 300 μ g de levotiroxina sódica.

Tiempo: 45 minutos.

Determinar la cantidad de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ disuelta mediante la técnica siguiente:

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 225 nm y una columna de 12,5 cm \times 4,0 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Agua, acetonitrilo y ácido fosfórico (700:500:2). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 100 mg de Levotiroxina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar aproximadamente 80 ml de alcohol, 1 ml de ácido clorhídrico 1 N, sonicar durante 2 minutos, completar a volumen con alcohol y mezclar. Diluir esta solución con una mezcla de alcohol y agua (1:1) para obtener una solución de aproximadamente 0,01 mg de levotiroxina por ml. Diluir esta solución con *Medio* para obtener una solución con una concentración similar a la *Solución muestra*.

Solución muestra - Emplear una porción del filtrado como *Solución muestra*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 4,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 500 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ disuelta.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ se debe disolver en 45 minutos.

.Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de liotironina sódica

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Levotiroxina Sódica*.

Solución estándar - Proceder según se indica en *Preparación estándar* en *Valoración*.

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración* en *Levotiroxina Sódica*. Calcular el porcentaje de liotironina sódica ($C_{15}H_{11}I_3NNaO_4$) en los Comprimidos de Levotiroxina Sódica, relacionando las respuestas de los picos de liotironina obtenidos a partir de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. No debe contener más de 2,0 % de liotironina sódica.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Levotiroxina Sódica*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Levotiroxina Sódica. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 μ g de levotiroxina sódica, transferir a un tubo de centrifuga, agregar 2 perlas de vidrio y 10 ml de *Fase móvil* al tubo y mezclar durante 3 minutos. Centrifugar hasta obtener un sobrenadante transparente, filtrar si fuera necesario.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración* en *Levotiroxina Sódica*. Calcular la cantidad de $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4$ en los Comprimidos de Levotiroxina Sódica, de acuerdo a la cantidad declarada.

LIDOCAINA

AEROSOL TÓPICO

Definición - El Aerosol Tópico de Lidocaina es una solución de *Lidocaina*, en un vehículo apropiado, con propelentes en un envase presurizado equipado con una válvula dosificadora. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{14}H_{22}N_2O$, debe contener no menos de 85,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{14}H_{22}N_2O$ por descarga y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Lidocaina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases para aerosol.

ENSAYOS

Identificación

A - *Absorción infrarroja* <460>. Transferir 5 ml del Aerosol Tópico de Lidocaina a una ampolla de decantación, agregar aproximadamente 10 ml de agua, 3 ml de ácido clorhídrico diluido 1 en 2, lavar con dos porciones de 15 ml de cloroformo y descartar los lavados clorofórmicos. Alcalinizar la solución obtenida con 5 ó 6 ml de hidróxido de amonio, extraer con tres porciones de 20 ml de cloroformo y filtrar los extractos clorofórmicos a través de una torunda de algodón previamente humedecido con cloroformo. Evaporar los extractos combinados con ayuda de calor hasta sequedad y secar el residuo al vacío sobre sílica durante 24 horas: una dispersión en bromuro de potasio del residuo obtenido debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes de onda que la preparación de Lidocaina SR-FA.

B - Transferir alrededor de 2 ml del Aerosol Tópico de Lidocaina a un tubo de ensayo, agregar de 10 a 15 gotas de cloruro cobaltoso (SR) y agitar durante aproximadamente 2 minutos: se debe desarrollar color verde brillante y un precipitado fino.

C - Transferir alrededor de 2 ml del Aerosol Tópico de Lidocaina a un tubo de ensayo, agregar 5 ml de agua, 1 ml de ácido nítrico 2 N y 3 ml de nitrato mercúrico (SR): se debe desarrollar color amarillo pálido.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayos farmacotécnicos para aerosoles <390>

Debe cumplir con los requisitos de *Número total de descargas por envase* y *Peso de la dosis en Aerosoles dosificadores*.

VALORACIÓN

Pesar exactamente un envase de Aerosol Tópico de Lidocaina y su dosificador, transferir un número no menor a 10 dosis a un erlenmeyer de 125 ml, con la precaución de evitar la pérdida de material y de proteger la muestra de la humedad atmosférica. Pesar exactamente el envase y dosificador nuevamente para obtener el peso de la muestra en ensayo. Agregar 20 ml de cloroformo al erlenmeyer, mezclar, agregar 10 ml de dioxano y dos gotas de cristal violeta (SR). Titular con ácido perclórico 0,1 N en dioxano (SV) hasta punto final azul. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada ml de ácido perclórico 0,1 N equivale a 23,43 mg de $C_{14}H_{22}N_2O$.

LIDOCAÍNA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Lidocaína es una solución estéril de *Clorhidrato de Lidocaína en Agua para Inyectables* o una solución estéril de *Lidocaína*, empleando como coadyuvante *Ácido Clorhídrico en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{14}H_{22}N_2O \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Lidocaína SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Transferir a una ampolla de decantación un volumen de Solución Inyectable de Clorhidrato de Lidocaína, equivalente a 300 mg de clorhidrato de lidocaína, extraer con cuatro porciones de 15 ml de cloroformo, descartando los extractos clorofórmicos. Agregar 2 ml de hidróxido de sodio 2 N a la solución acuosa que permanece en la ampolla de decantación y extraer con cuatro porciones de 15 ml de cloroformo. Combinar los extractos clorofórmicos y evaporar hasta sequedad. Disolver los cristales obtenidos en éter de petróleo, evaporar mediante aire caliente y secar el residuo al vacío sobre gel de sílice durante 24 horas: el residuo obtenido debe responder al ensayo de *Identificación A en Lidocaína*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,0.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 1,1 Unidades de Endotoxina por mg de clorhidrato de lidocaína.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos para inyectables de pequeño volumen.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Solución de resolución - Proceder según se indica en *Valoración en Lidocaína*.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Clorhidrato de Lidocaína, equivalente a 100 mg de clorhidrato de lidocaína, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,5 %. Cromatografiar aproximadamente la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de lidocaína y metilparabeno no debe ser menor de 3,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{14}H_{22}N_2O \cdot HCl$ en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Lidocaína, de acuerdo a la cantidad declarada.

LIDOCAÍNA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN TÓPICA

Definición - La Solución Tópica de Clorhidrato de Lidocaína debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{14}H_{22}N_2O \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Lidocaína SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre hermético.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,0.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Mezclar 50 ml de ácido acético glacial y 930 ml de agua. Ajustar a pH 3,4 con hidróxido de sodio 1 N. Mezclar 4 volúmenes de esta solución con 1 volumen de acetonitrilo. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de resolución - Preparar una solución de metilparabeno en *Fase móvil* de aproximadamente 220 μg por ml. Mezclar 2 ml de esta solución y 20 ml de la *Preparación estándar*.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 85 mg de Lidocaína SR-FA, disolver en 0,5 ml ácido clorhídrico 1 N, calentando si fuera

necesario, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 1,7 mg de lidocaína por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Tópica de Clorhidrato de Lidocaína, equivalente a 100 mg de clorhidrato de lidocaína, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,5 %. Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de lidocaína y metilparabeno no debe ser menor de 3,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{14}H_{22}N_2O \cdot HCl$ en la Solución Tópica de Clorhidrato de Lidocaína, de acuerdo a la cantidad declarada.

LITIO, CARBONATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Carbonato de Litio deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de Li_2CO_3 y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Carbonato de Litio SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Una porción del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración* debe responder a los ensayos de *Identificación* en *Carbonato de Litio*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, diluir a 1 litro con agua el contenido de cada vaso. Transferir 20 ml de una alícuota filtrada a un matraz aforado de 1 litro y agregar 500 ml de agua, 1 gota de ácido clorhídrico y 20 ml de una solución de tensioactivo apropiadamente diluida. Completar a volumen con agua, mezclar y determinar la cantidad de Li_2CO_3 disuelta mediante fotometría de llama, registrando las lecturas de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* según se indica en *Valoración*.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de Li_2CO_3 se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 30 mg de Carbonato de Litio SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar aproximadamente 20 ml de agua y 0,5 ml de ácido clorhídrico, agitar hasta disolver, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 20 ml de esta solución a un matraz aforado de 1 litro, agregar aproximadamente 800 ml de agua y 20 ml de solu-

ción de un agente tensioactivo, diluida apropiadamente, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Carbonato de Litio. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 600 mg de carbonato de litio y transferir a un matraz aforado de 1 litro. Agregar 40 ml de agua y 5 ml de ácido clorhídrico, agitar hasta desintegrar completamente el sólido, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 1 litro, agregar aproximadamente 800 ml de agua y 20 ml de solución de un agente tensioactivo, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Emplear un fotómetro de llama y ajustar el instrumento con la solución del agente tensioactivo. Medir en el fotómetro de emisión, aproximadamente a 671 nm, la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*. Calcular la cantidad de Li_2CO_3 en los Comprimidos de Carbonato de Litio, de acuerdo a la cantidad declarada.

MAGNESIO, HIDRÓXIDO DE SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Hidróxido de Magnesio debe contener no menos de 7,0 g y no más de 8,5 g de $Mg(OH)_2$ cada 100 g de suspensión. Debe contener no más de 0,05 por ciento de aceites volátiles y saborizantes apropiados y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Transferir 1 ml de la Suspensión Oral de Hidróxido de Magnesio a un tubo de ensayo y agregar 2 ml de ácido clorhídrico 3 N: debe responder a los ensayos para *Magnesio* <410>.

Determinación del contenido extraíble del envase<210>

Debe cumplir con los requisitos.

Álcalis solubles

Filtrar 25 ml de la Suspensión Oral de Hidróxido de Magnesio, desechar los primeros mililitros del filtrado y transferir 5 ml a un erlenmeyer. Agregar 40 ml de agua, una gota de rojo de metilo y titular con ácido sulfúrico 0,1 N (SV) hasta color rosa persistente. No debe consumir más de 1 ml de ácido sulfúrico 0,1 N (SV).

Sales solubles

Transferir 5 ml del filtrado obtenido en *Álcalis solubles* a un crisol de porcelana previamente pesado, agregar tres gotas de ácido sulfúrico, evaporar hasta sequedad e incinerar a 550 °C hasta peso constante. El peso del residuo no debe ser mayor de 12 mg.

Carbonatos y sustancias insolubles en ácido

Transferir 1 ml de la Suspensión Oral de Hidróxido de Magnesio a un tubo de ensayo y agregar 2 ml de ácido clorhídrico 3 N: se debe desarrollar una ligera efervescencia y la solución debe ser ligeramente turbia.

Límite de arsénico <540>

No más de 0,6 ppm.

Solución muestra - Pesar 3,3 g de la Suspensión Oral de Hidróxido de Magnesio, transferir a un recipiente apropiado, disolver con 20 ml de ácido sulfúrico 7 N, agregar 35 ml de agua y mezclar.

Solución estándar - Preparar una solución de arsénico patrón de 1 µg por ml. Emplear 2 ml.

Límite de calcio <550>

No más de 0,07 %.

Límite de metales pesados <590>

No más de 5 ppm.

Solución muestra - Transferir 4 ml de la Suspensión Oral de Hidróxido de Magnesio a una cápsula de porcelana, agregar 6 ml de ácido clorhídrico 3 N y evaporar hasta sequedad con frecuente agitación. Disolver el residuo en 20 ml de agua y evaporar en las mismas condiciones. Redisolver en 20 ml de agua, filtrar y diluir a 25 ml con el mismo solvente.

Solución estándar - Preparar una solución patrón de plomo de 10 µg por ml. Emplear 2 ml.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Libre de patógenos, el recuento de organismos aerobios viables totales no debe ser mayor de 100 ufc por ml y el recuento total de hongos filamentosos y levaduras no debe ser mayor de 10 ufc por ml.

VALORACIÓN

Solución A - Pesar exactamente alrededor de 6,7 g de cloruro de amonio. Transferir a un matraz aforado de 1 litro, disolver con 300 ml de agua, agregar 570 ml de hidróxido de amonio, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Pesar una cantidad de la Suspensión Oral de Hidróxido de Magnesio, previamente agitada, equivalente a 250 mg de hidróxido de magnesio. Transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10 ml de ácido clorhídrico 3 N, agitar hasta disolución, completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar, transferir una alícuota de 25 ml a un vaso de precipitados que contenga 75 ml de agua y ajustar a pH 7,0 con hidróxido de sodio 1 N. Agregar 5 ml de la *Solución A*, 0,15 ml de negro de eriocromo T y titular con edetato disódico 0,05 M (SV) hasta punto final azul. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de edetato disódico 0,05 M equivale a 2,916 mg de $Mg(OH)_2$.

MAGNESIO, SULFATO DE

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Sulfato de Magnesio es una solución estéril de *Sulfato de Magnesio en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos para *Magnesio* <410> y para *Sulfato* <410>.

Determinación de pH <250>

Entre 5,5 y 7,0; determinado sobre una solución al 5 %.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,09 Unidades de Endotoxina por mg de sulfato de magnesio.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Sulfato de Magnesio, equivalente a 250 mg de sulfato de magnesio anhidro, a un recipiente apropiado y diluir a 100 ml con agua. Ajustar la solución a pH 7,0 empleando papel indicador de pH (ver *Indicadores, papeles y papeles indicadores* en *Reactivos y Soluciones*) con hidróxido de sodio 1 N, agregar 5 ml de solución reguladora de cloruro de amonio - hidróxido de amonio (SR) y 0,15 ml de negro de eriocromo T. Titular con edetato disódico 0,05 M (SV) hasta punto final azul. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de edetato disódico 0,05 M es equivalente a 12,32 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

ROTULADO

Indicar en el rótulo la concentración osmolar total en mosmol por litro. Cuando el contenido de la Solución Inyectable de Sulfato de Magnesio sea menor de 100 ml o cuando en el rótulo se indique que la misma no está destinada para su uso directo, pero si para su uso diluida, la concentración se puede expresar en mosmol por ml.

MEBENDAZOL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Mebendazol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{13}N_3O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Mebendazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol y ácido fórmico al 96 % (90:5:5).

Diluyente - Cloroformo y ácido fórmico al 96 % (19:1).

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 200 mg de mebendazol a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración* y mezclar con 20 ml de *Diluyente*. Calentar la suspensión en un baño de agua durante unos minutos, enfriar y filtrar.

Solución estándar - Preparar una solución de Mebendazol SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 10 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N conteniendo lauril sulfato de sodio al 1,0 %; 900 ml.

Tiempo: 120 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{16}H_{13}N_3O_3$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 3 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1 ml por minuto.

Solución reguladora - Disolver 8,0 g de hidróxido de sodio en 2 litros de agua, agregar 3,0 g de lauril sulfato de sodio y mezclar. Agregar 20 ml de ácido fosfórico y ajustar a pH 2,5 con ácido fosfórico.

Fase móvil - *Solución reguladora* y acetonitrilo (7:3). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Mebendazol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 10,0 ml de ácido fórmico y disolver. Completar a volumen con metanol y mezclar. Diluir una porción de esta solución cuantitativamente y en etapas con *Medio* para obtener una solución con una concentración similar a la concentración esperada de la alícuota en ensayo.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de las alícuotas en ensayo y la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{13}N_3O_3$ se debe disolver en 120 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 20 mg de Mebendazol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 10 ml. Agregar 4 ml de ácido fórmico al 96 % y mezclar hasta disolver. Completar a volumen con alcohol isopropílico y mezclar. Transferir 0,5 ml de esta solución a un matraz afo-

rado de 100 ml, completar a volumen con alcohol isopropílico y mezclar.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Mebendazol a un matraz aforado de 100 ml, agregar 20 ml de ácido fórmico al 96 %, mezclar y calentar en un baño de vapor durante 15 minutos. Enfriar, completar a volumen con alcohol isopropílico, mezclar y filtrar a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media. Transferir una porción exactamente medida, equivalente a 1 mg de mebendazol, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 310 nm, con un espectrofotómetro, empleando una solución de ácido fórmico al 96 % en alcohol isopropílico 1 en 500 como blanco. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{13}N_3O_3$ en cada Comprimidos de Mebendazol en ensayo, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 247 nm, una precolumna con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro y una columna analítica de 30 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por el mismo material y mantenida a 30 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y fosfato monobásico de potasio 0,05 M (60:40). Ajustar a pH 5,5 con ácido fosfórico 0,1 M o hidróxido de sodio 1 N. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Mebendazol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10 ml de ácido fórmico y calentar en un baño de agua a 50 °C durante 15 minutos. Agitar durante 5 minutos, agregar 90 ml de metanol y dejar enfriar. Completar a volumen con metanol y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Mebendazol. Pesar exactamente una cantidad equivalente

a 500 mg de mebendazol, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 50 ml de ácido fórmico y calentar en un baño de agua a 50 °C durante 15 minutos. Agitar durante 1 hora, completar a volumen con agua, mezclar y filtrar. Transferir 5,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con una solución de ácido fórmico en metanol (1:9) y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la eficiencia de la columna no debe ser menor de 2.500 platos teóricos; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 15 μl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{13}N_3O_3$ en los Comprimidos de Mebendazol, de acuerdo a la cantidad declarada.

MEBENDAZOL

SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Mebendazol es *Mebendazol* en un vehículo acuoso. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{13}N_3O_3$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Mebendazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos.

ENSAYOS

Identificación

Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil, Diluyente, Solución estándar - Proceder según se indica en *Identificación en Comprimidos de Mebendazol*.

Solución muestra - Transferir una cantidad de Suspensión Oral de Mebendazol, equivalente a 200 mg de mebendazol, a un recipiente apropiado y mezclar con 20 ml de *Diluyente*. Calentar la suspensión en un baño de agua durante unos minutos, enfriar y filtrar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Identificación B en Comprimidos de Mebendazol*: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,0 y 7,0.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Solución blanco - Transferir 90 ml de cloroformo a un matraz aforado de 100 ml, agregar 2 ml de ácido fórmico al 96 % y mezclar. Completar a volumen con alcohol isopropílico y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con alcohol isopropílico y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 10 mg de Mebendazol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 90 ml de cloroformo, 7 ml de alcohol isopropílico y 2 ml de ácido fórmico al 96 %. Agitar hasta disolución, completar a volumen con alcohol isopropílico y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta

solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con alcohol isopropílico y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 5 µg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oral de Mebendazol, equivalente a 1 g de mebendazol, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con ácido fórmico al 96 % y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta mezcla a un matraz aforado de 100 ml, agregar 40 ml de ácido fórmico al 96 % y calentar en un baño de agua a 50 °C durante 15 minutos. Enfriar, completar a volumen con agua, mezclar y filtrar. Transferir 10,0 ml del filtrado a una ampolla de decantación de 250 ml, agregar 50 ml de agua y 50 ml de cloroformo. Agitar durante 2 minutos, permitir que las fases se separen y transferir la fase clorofórmica a una ampolla de decantación de 250 ml. Lavar la fase acuosa con dos porciones de 10 ml de cloroformo, agregar los lavados clorofórmicos a la ampolla y descartar la fase acuosa. Lavar los extractos clorofórmicos combinados con una mezcla de 4 ml de ácido clorhídrico 1 N y 50 ml de una solución 1 en 10 de ácido fórmico al 96 % en agua y transferir la fase clorofórmica a un matraz aforado de 100 ml. Extraer los lavados acuosos con dos porciones de 10 ml de cloroformo, agregar estos extractos clorofórmicos al matraz aforado, agregar 2 ml de ácido fórmico al 96 %, 7 ml de alcohol isopropílico, completar a volumen con cloroformo y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a otro matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con alcohol isopropílico y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 247 nm, con un espectrofotómetro apropiado empleando la *Solución blanco* para llevar a cero la lectura del instrumento. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{13}N_3O_3$ en la Suspensión Oral de Mebendazol, de acuerdo a la cantidad declarada.

MEDROXIPROGESTERONA, ACETATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Acetato de Medroxiprogesterona deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{24}H_{34}O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetato de Medroxiprogesterona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad equivalente a 25 mg de acetato de medroxiprogesterona a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Suspender con 15 ml de cloroformo, filtrar, evaporar el cloroformo en un baño de vapor y secar el residuo a 105 °C durante 3 horas: el residuo obtenido debe responder al *Ensayo de identificación A* en *Acetato de Medroxiprogesterona*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: lauril sulfato de sodio al 0,5 %; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso y determinar la cantidad de $C_{24}H_{34}O_4$ disuelta, mediante la técnica empleada en *Uniformidad de unidades de dosificación*.

Tolerancia - No menos de 50 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{24}H_{34}O_4$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para la uniformidad de contenido.

Diluyente - Alcohol y agua (3:1).

Solución estándar - Disolver una porción exactamente pesada de Acetato de Medroxiprogesterona SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 15 µg por ml.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Acetato de Medroxiprogesterona a un matraz aforado de capacidad apropiada, diluir a volumen con *Diluyente* y agitar durante aproximadamente 15 minutos.

Filtrar y diluir cuantitativamente una porción del filtrado según sea necesario para obtener una solución de aproximadamente 15 µg por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 242 nm. Calcular la cantidad de $C_{24}H_{34}O_4$ cada Comprimido de Acetato de Medroxiprogesterona, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Acetato de Medroxiprogesterona*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Acetato de Medroxiprogesterona. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 25 mg de acetato de medroxiprogesterona, transferir a un tubo de centrifuga de vidrio de 50 ml. Agregar 25 ml de acetonitrilo, agitar para humedecer el polvo completamente, sonicar durante no menos de 10 minutos y centrifugar. Emplear el líquido sobrenadante transparente.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Acetato de Medroxiprogesterona*. Calcular la cantidad de $C_{24}H_{34}O_4$ en los Comprimidos de Acetato de Medroxiprogesterona, de acuerdo a la cantidad declarada.

MEDROXIPROGESTERONA, ACETATO DE SUSPENSIÓN INYECTABLE

Definición - La Suspensión Inyectable de Acetato de Medroxiprogesterona es una suspensión estéril de *Acetato de Medroxiprogesterona* en un medio acuoso apropiado. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{24}H_{34}O_4$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetato de Medroxiprogesterona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Transferir un volumen de Suspensión Inyectable de Acetato de Medroxiprogesterona, equivalente a 50 mg de acetato de medroxiprogesterona, a un tubo de centrífuga. Centrifugar, decantar el líquido sobrenadante y lavar el sólido con dos porciones de 15 ml de agua, descartando los lavados acuosos. Disolver los sólidos en 10 ml de cloroformo, transferir a un vaso de precipitados pequeño, evaporar el cloroformo en un baño de vapor y secar a 105 °C durante 3 horas: el residuo obtenido debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Acetato de Medroxiprogesterona*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 7,0.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm × 2 mm con fase estacionaria constituida por

partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Mezclar 700 ml de cloruro de *n*-butilo, 300 ml de hexano, ambos previamente saturados con agua y 80 ml de acetonitrilo. Filtrar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución del estándar interno - Preparar una solución de *Progesterona* en *Fase móvil* de aproximadamente 0,25 mg por ml.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 8 mg de Acetato de Medroxiprogesterona SR-FA, disolver en 20,0 ml de *Solución del estándar interno*.

Preparación muestra - Transferir a un recipiente apropiado un volumen exactamente medido de Suspensión Inyectable de Acetato de Medroxiprogesterona, equivalente a 50 mg de acetato de medroxiprogesterona. Agregar 25 ml de cloroformo, agitar durante aproximadamente 20 minutos y centrifugar. Transferir 4 ml de la fase clorofórmica a un recipiente apropiado y evaporar hasta sequedad. Disolver el residuo en 20,0 ml de *Solución del estándar interno*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de progesterona y medroxiprogesterona no debe ser menor de 5,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{24}H_{34}O_4$ en la Suspensión Inyectable de Acetato de Medroxiprogesterona, de acuerdo a la cantidad declarada.

MEGESTROL, ACETATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Acetato de Megestrol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{24}H_{32}O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetato de Megestrol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460> *En fase sólida*

Triturar una cantidad apropiada de los Comprimidos de Acetato de Megestrol en un volumen no menor de 10 ml de cloroformo para obtener una solución de aproximadamente 4 mg de acetato de megestrol por ml. Filtrar y transferir 0,6 ml del filtrado a un recipiente de acero inoxidable apropiado para molienda que contenga 500 mg de bromuro de potasio, secar, moler y granular: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión en bromuro de potasio de la muestra así obtenida debe presentar máximos solo a las mismas longitudes de onda que el de una solución preparada del mismo modo a partir de Acetato de Megestrol SR-FA.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: lauril sulfato de sodio al 1 %; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{24}H_{32}O_4$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 292 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Acetato de Megestrol SRFA.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{24}H_{32}O_4$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Acetato de Megestrol SR-FA, agregar metanol en caliente hasta obtener una solución de aproximadamente 10 µg por ml.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Acetato de Megestrol a un matraz aforado apropiado para obtener una solución cuya concentración final entre 0,2 y 1,0 mg de acetato de megestrol por ml. Agregar 1 ml de agua y agitar hasta que el comprimido se desintegre. Agregar metanol hasta tres cuartas partes del volumen del matraz y agitar durante 20 minutos. Completar a volumen con metanol, mezclar, filtrar y descartar los primeros 15 ml del filtrado. Diluir 5,0 ml del filtrado con metanol hasta obtener una solución de aproximadamente 10 µg de acetato de megestrol por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 288 nm, con un espectrofotómetro, empleando metanol como blanco y realizando el barrido desde 350 nm a 260 nm. Calcular la cantidad de $C_{24}H_{32}O_4$ en el Comprimido de Acetato de Megestrol.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución del estándar interno y Preparación estándar - Proceder según se indica en *Valoración* en *Acetato de Megestrol*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Acetato de Megestrol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 80 mg de acetato de megestrol, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10 ml de agua y agitar durante 10 minutos. Agregar 75 ml de agua, agitar durante 30 minutos y completar a volumen con acetonitrilo y mezclar. Transferir 25 ml a un tubo de centrifuga con tapón de vidrio, tapar y centrifugar durante 10 minutos. Transferir 5,0 ml del sobrenadante y 5,0 ml de la *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Acetato de Megestrol*. Calcular la cantidad de $C_{24}H_{32}O_4$ en los Comprimidos de Acetato de Megestrol, de acuerdo a la cantidad declarada.

MELFALÁN

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Melfalán deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Melfalán SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de vidrio bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 2 mg de melfalán a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Mezclar con 20 ml de alcohol y filtrar: 1 ml de esta solución debe responder al *Ensayo de Identificación B* en *Melfalán*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ disuelta, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Melfalán SR-FA en el mismo medio, empleando la técnica siguiente.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm, una columna de 5 cm x 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Agua, acetonitrilo, acetato de amonio, ácido acético glacial y trietilamina (1.500:500:2:2:0,4). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedi-*

miento: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 3,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ l) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Melfalán SR-FA en alcohol y diluir hasta obtener una solución de aproximadamente 10 μ g por ml.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Melfalán a un matraz aforado de 200 ml, agregar 10 ml de agua y 10 ml de alcohol, sonicar hasta disolver completamente. Completar a volumen con alcohol, mezclar y filtrar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 260 nm, empleando alcohol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ en cada Comprimido de Melfalán.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm x 4,2 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Diluyente - Agua y metanol (1:1).

Fase móvil - Preparar una solución de dietilamina en *Diluyente* 0,025 M. Ajustar a pH 5,5 con ácido clorhídrico 3,5 N. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Melfalán SR-FA en alcohol y diluir en el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,9 mg de clorhidrato de melfalán por ml. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de

100 ml que contenga 75 ml de alcohol y 2,0 ml de ácido acético glacial, completar a volumen con alcohol y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 90 µg de Clorhidrato de Melfalán SR-FA por ml (equivalente aproximadamente a 80 µg de melfalán por ml).

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Melfalán. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 8 mg de melfalán anhidro y transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 75 ml de alcohol y 2,0 ml de ácido acético glacial, sonicar durante 15 minutos, completar a volumen con alcohol y mezclar. Filtrar a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media y descartar los primeros mililitros del filtrado.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente entre 10 y 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ en los Comprimidos de Melfalán, de acuerdo a la cantidad declarada.

MENADIONA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Menadiona es una solución estéril de *Menadiona* en aceite. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_8O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Menadiona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Absorción ultravioleta <460>. Examinar los espectros de absorción ultravioleta obtenidos en *Valoración*. El espectro de absorción ultravioleta obtenido a partir de la *Preparación muestra* debe presentar máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 58,3 Unidades de Endotoxina por mg de menadiona.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

[NOTA: evitar la exposición a la luz de la *Menadiona* y de las soluciones preparadas en *Valoración*].

Diluyente - Alcohol y éter (50:50).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Menadiona SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en *Diluyente*, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Almacenar la *Preparación estándar* en un sitio bien cerrado, frío y oscuro. [NOTA: usar dentro de los 7 días de preparada].

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Menadiona, equivalente aproximadamente a 25 mg de menadiona, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento - Transferir 1,0 ml de la *Preparación estándar* y 1,0 ml de la *Preparación*

muestra a sendos matraces aforados de 50 ml, agregar a cada uno 4,0 ml de alcohol y mezclar. Luego agregar a cada matraz 1,0 ml de una solución preparada disolviendo 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina en 20 ml de una mezcla de 2 volúmenes de ácido clorhídrico 3 N y 1 volumen de agua. Colocar los matraces en un baño de agua entre 70 y 75°C durante 15 minutos, agitando aproximadamente cada 3 minutos. Inmediatamente después, enfriar los matraces aproximadamente a 25°C, luego agregar 5 ml de una mezcla de volúmenes iguales de alcohol e hidróxido de amonio. Agitar, completar a volumen con alcohol, mezclar, dejar reposar durante 15 minutos y descartar cualquier resto de fase oleosa. Determinar las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 635 nm, con un espectrofotómetro, empleando un blanco de reactivo apropiado. Calcular la cantidad de $C_{11}H_8O_2$ en la Solución Inyectable de Menadiona, de acuerdo a la cantidad declarada.

METFORMINA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Metformina deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Metformina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Pesar una cantidad equivalente a 20 mg de clorhidrato de metformina a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Transferir a un matraz, agregar 20 ml de alcohol absoluto y mezclar. Filtrar, evaporar el filtrado hasta sequedad y secar el residuo a 105 °C durante aproximadamente 1 hora: el espectro de absorción infrarroja se debe corresponder con el obtenido con una solución preparada del mismo modo empleando Clorhidrato de Metformina SR-FA.

B - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de metformina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Suspender con 10 ml de agua y filtrar. A 5 ml del filtrado agregar 1,5 ml de hidróxido de sodio 5 N, 1 ml de solución de 1-naftol (SR) y agregar gota a gota con agitación 0,5 ml de hipoclorito de sodio (SR): cuando se deja reposar en la oscuridad se debe producir un color rojo anaranjado.

C - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de metformina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Suspender con 10 ml de agua y filtrar: el filtrado debe responder al ensayo para *Cloruro* <410>.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: solución de fosfato monobásico de potasio al 0,68 % ajustada a pH 6,8 con hidróxido de sodio 1 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con agua, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 233 nm, comparando con una *Solución*

estándar de concentración conocida de Clorhidrato de Metformina SR-FA.

Tolerancia - No menos de 70 % (Q) de la cantidad declarada de $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación
<740>

Debe cumplir con los requisitos.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 218 nm y una columna de 12,5 cm × 4,7 mm con fase estacionaria constituida por grupos de ácido bencenosulfónico químicamente unidos a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Solución de fosfato monobásico de amonio al 1,7 % ajustada a pH 3,0 con ácido fosfórico. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*)

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 500 mg de clorhidrato de metformina a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Transferir a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con *Fase móvil*.

Solución estándar A - Disolver 20 mg de cianoguanidina en agua y diluir a 100 ml con el mismo solvente. Transferir 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 200 ml y completar a volumen con *Fase móvil*.

Solución estándar B - Transferir 1 ml de la *Solución muestra* a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con *Fase móvil*. Transferir 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 20 ml y completar a volumen con el mismo solvente.

Solución de resolución - Disolver 10 mg de melamina en aproximadamente 90 ml de agua, agregar 5 ml de la *Solución muestra* y diluir a 100 ml con agua. Transferir 1 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con *Fase móvil*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución R entre los picos de melamina y clorhidrato de metformina no debe ser menor de 10,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra*, la *Solución estándar A*, la *Solución estándar B* y la *Solución de resolución*, registrar los cromatogramas durante dos veces el tiempo de retención del clorhidrato de

metformina y medir las respuestas de todos los picos. A excepción del pico correspondiente a la cianoguanidina en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, ningún pico debe ser mayor que la respuesta del pico principal obtenida con la *Solución estándar A* (0,02 %); a excepción del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* la respuesta de ningún pico debe ser mayor que la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Solución estándar B* (0,1 %).

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Metformina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de clorhidrato de metformina. Transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 70 ml de agua y agitar durante aproximadamente 15 minutos. Completar a volumen con agua y filtrar, descartando los primeros 20 ml. Transferir 10 ml del filtrado a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con agua. Transferir 10 ml de esta solución a otro matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con el mismo solvente. Determinar la absorbancia de la solución resultante en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 232 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Metformina SR-FA.

METILDOPA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Metildopa deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{10}H_{13}NO_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Metildopa SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - A una porción de 10 mg del polvo fino obtenido a partir de la *Preparación muestra* en *Valoración*, agregar 3 gotas de una solución 1 en 250 de ninhidrina en ácido sulfúrico: se debe producir un color púrpura oscuro entre 5 y 10 minutos. Agregar 3 gotas de agua: el color debe cambiar a amarillo pardo pálido.

B - A 10 mg del polvo fino obtenido a partir de la *Preparación muestra* en *Valoración*, agregar 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 N y 2 ml de *Solución de tartrato ferroso*, preparada según se indica en *Valoración*, luego agregar 0,25 ml de hidróxido de amonio 6 N y mezclar: se debe producir de inmediato color púrpura oscuro.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 20 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{10}H_{13}NO_4$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 280 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Metildopa SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{10}H_{13}NO_4$ se debe disolver en 20 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Solución de tartrato ferroso - Disolver 1,0 g de sulfato ferroso, 2,0 g de tartrato de sodio y potasio y 100 mg de bisulfito de sodio en agua para obtener 100 ml. [NOTA: preparar esta solución en el día de su uso].

Solución reguladora - Disolver 50 g de acetato de amonio en 1 litro de alcohol al 20 %. Ajustar a pH 8,5 con hidróxido de amonio 6 N.

Preparación estándar - Disolver una cantidad apropiada de Metildopa SR-FA en ácido sulfúrico 0,1 N para obtener una solución de aproximadamente 1 mg de metildopa anhidra por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Metildopa. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de metildopa, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 50 ml de ácido sulfúrico 0,1 N, agitar durante 15 minutos, completar a volumen con ácido sulfúrico 0,1 N y mezclar. Filtrar la solución descartando los primeros 20 ml del filtrado.

Procedimiento - Transferir 5 ml de la *Preparación muestra* y 5 ml de la *Preparación estándar* a sendos matraces aforados de 100 ml y a un tercer matraz aforado de 100 ml agregar 5 ml de agua para preparar un blanco. Agregar a cada matraz 5,0 ml de *Solución de tartrato ferroso* y completar a volumen con *Solución reguladora*. Determinar las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra* en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente 520 nm, con un espectrofotómetro, empleando la solución contenida en el tercer matraz como blanco. Calcular la cantidad de $C_{10}H_{13}NO_4$ en los Comprimidos de Metildopa, de acuerdo a la cantidad declarada.

METOCLOPRAMIDA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Metoclopramida deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de metoclopramida ($C_{14}H_{22}ClN_3O_2$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Metoclopramida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de metoclopramida a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un recipiente apropiado y agregar 5 ml de agua. Agitar y filtrar. Agregar al filtrado 5 ml de una solución de *p*-dimetilaminobenzaldehído en ácido clorhídrico 1 N (1 en 100); se debe desarrollar un color de anaranjado a amarillo.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{14}H_{22}ClN_3O_2$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 309 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Metoclopramida SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{14}H_{22}ClN_3O_2$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 215 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 2,7 g de acetato de sodio en 500 ml de agua, agregar 500 ml de acetonitrilo y 2 ml de solución de hidróxido de tetrametilamonio en metanol (1 en 5) y mezclar. Ajustar a pH 6,5 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Metoclopramida SR-FA en ácido fosfórico 0,01 M para obtener una solución de aproximadamente 0,9 mg de clorhidrato de metoclopramida anhidra por ml.

Preparación estándar - Diluir la *Preparación madre del estándar* con ácido fosfórico 0,01 M para obtener una solución de aproximadamente 45 μ g de clorhidrato de metoclopramida por ml, equivalente a 40 μ g de metoclopramida anhidra por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Metoclopramida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 40 mg de clorhidrato de metoclopramida, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar aproximadamente 70 ml de ácido fosfórico y sonicar durante 5 minutos. Dejar reposar hasta alcanzar temperatura ambiente, completar a volumen con ácido fosfórico 0,01 M y mezclar.

Solución de Aptitud del Sistema - Pesar alrededor de 12,5 mg de bencenosulfonamida, transferir a un matraz aforado de 25 ml, agregar 15 ml de metanol, agitar hasta disolución, completar a volumen con ácido fosfórico 0,01 M y mezclar. Transferir 5 ml de esta solución y 5 ml de la *Preparación madre del estándar* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de Aptitud del Sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,7 para bencenosulfonamida y 1,0 para metoclopramida; la resolución *R* entre los picos de bencenosulfonamida y metoclopramida no debe ser menor de 1,5. Cromatografía

tografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{14}H_{22}ClN_3O_2$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Metoclopramida, de acuerdo a la cantidad declarada.

METOCLOPRAMIDA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Metoclopramida es una solución estéril de *Clorhidrato de Metoclopramida en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Metoclopramida ($C_{14}H_{22}ClN_3O_2$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Metoclopramida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis, vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

B - Mezclar un volumen de Solución Inyectable de Clorhidrato de Metoclopramida, equivalente a 50 mg de metoclopramida, con 5 ml de agua y 5 ml de una solución de *p*-dimetilaminobenzaldehído en ácido clorhídrico 1 N (1 en 100): se debe desarrollar un color amarillo anaranjado.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de pH <250>

Entre 2,5 y 6,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 2,5 Unidades de Endotoxina por mg de Metoclopramida.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 215 nm y una columna de 25 cm x 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El

caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 2,7 g de acetato de sodio en 500 ml de agua, agregar 500 ml de acetonitrilo, 2 ml de una solución de hidróxido de tetrametilamonio en metanol (1 en 5) y mezclar. Ajustar a pH 6,5 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de aptitud del sistema - Pesar exactamente alrededor de 12,5 mg de bencenosulfonamida, transferir a un matraz aforado de 25 ml, agregar 15 ml de metanol y agitar hasta disolver. Completar a volumen con ácido fosfórico 0,01 M y mezclar. Transferir 5 ml de esta solución y 5 ml de la *Preparación madre del estándar*, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con ácido fosfórico 0,01 M y mezclar.

Preparación madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Metoclopramida SR-FA en ácido fosfórico 0,01 M para obtener una solución de aproximadamente 0,9 mg de Clorhidrato de Metoclopramida en base anhidra por ml.

Preparación estándar - Diluir un volumen de la *Preparación madre del estándar* con ácido fosfórico 0,01 M para obtener una solución de aproximadamente 45 μ g de Clorhidrato de Metoclopramida SR-FA, en base anhidra, por ml (equivalente aproximadamente a 40 μ g de metoclopramida anhidra por ml).

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Metoclopramida, equivalente aproximadamente a 40 mg de metoclopramida, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con ácido fosfórico 0,01 M y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con ácido fosfórico 0,01 M y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,7 para bencenosulfonamida y 1,0 para Metoclopramida; la resolución *R* entre los picos de bencenosulfonamida y metoclopramida no debe ser menor de 1,5. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico correspondiente a metoclopramida no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2%.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente

20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{14}H_{22}ClN_3O_2$ en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Metoclopramida, de acuerdo a la cantidad declarada.

METOCLOPRAMIDA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Clorhidrato de Metoclopramida debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Metoclopramida ($C_{14}H_{22}ClN_3O_2$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Metoclopramida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 2,0 y 5,5.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles<90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Proceder según se indica en *Valoración en Solución Inyectable de Clorhidrato de Metoclopramida*.

Fase móvil - Disolver 2,7 g de acetato de sodio en 600 ml de agua, agregar 400 ml de acetonitrilo, 4 ml de una solución de hidróxido de tetrametilamonio en metanol 25 % y mezclar. Ajustar a pH 6,5 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100. Cromatografía*).

Diluyente - Ácido fosfórico 0,01 M.

Preparación madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Metoclopramida SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 9 mg de clorhidrato de metoclopramida por ml.

Preparación estándar - Transferir 5,0 ml de la *Preparación madre del estándar* a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 180 µg de Clorhidrato de Metocloprami-

da SR-FA en base anhidra (equivalente a 160 µg de metoclopramida) por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oral de Clorhidrato de Metoclopramida, equivalente a 4 mg de metoclopramida, a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Transferir alrededor de 125 mg de bencenosulfonamida a un matraz aforado de 25 ml, agregar 15 ml de metanol y agitar hasta disolución. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 15 ml de esta solución y 5 ml de la *Preparación madre del estándar* a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Solución Inyectable de Clorhidrato de Metoclopramida*. Los tiempos de retención relativa deben ser aproximadamente 0,2 para bencenosulfonamida y 1,0 para metoclopramida.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{14}H_{22}ClN_3O_2$ en la Solución Oral de Metoclopramida, de acuerdo a la cantidad declarada.

METOTREXATO

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Metotrexato deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{20}H_{22}N_8O_5$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Metotrexato SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Disolver un Comprimido de Metotrexato en 100 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100) y filtrar: el espectro de absorción ultravioleta de la solución obtenida debe presentar máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que el de una solución que contenga 2,5 mg de Metotrexato SR-FA en 100 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100).

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{20}H_{22}N_8O_5$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 306 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Metotrexato SRFA.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{20}H_{22}N_8O_5$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución reguladora de pH 6,0, Preparación estándar, Solu-

ción de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Metotrexato*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Metotrexato. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 25 mg de metotrexato y transferir a un matraz aforado de 250 ml. Agregar aproximadamente 200 ml de *Fase móvil*, sonicar y agitar. Completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Metotrexato*. Calcular la cantidad de $C_{20}H_{22}N_8O_5$ en los Comprimidos de Metotrexato, de acuerdo a la cantidad declarada.

METOTREXATO PARA INYECCIÓN

Definición - Metotrexato para Inyección es una preparación estéril y liofilizada de metotrexato sódico. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de metotrexato ($C_{20}H_{22}N_8O_5$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Metotrexato SR-FA.

Precaución - Evitar la inhalación y la exposición a la piel de partículas de Metotrexato.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Disolver una cantidad de Metotrexato para Inyección en agua para obtener una solución de aproximadamente 2,5 mg por ml. Ajustar a pH 4,0 con ácido clorhídrico 0,1 N. Colocar la suspensión en un tubo de centrífuga de 50 ml y centrifugar. Descartar el sobrenadante, agregar 25 ml de acetona, agitar y filtrar. Dejar secar al aire el precipitado: el metotrexato así obtenido debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Metotrexato*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Aspecto de la solución reconstituida

Reconstituir el Metotrexato para Inyección según se indica en el rótulo. La solución reconstituida debe cumplir con los requisitos en 280. *Disolución completa* y estar libre de partículas extrañas cuando se realiza una inspección visual.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 9,0; determinado sobre una solución reconstituida según se indica en el rótulo, excepto que se debe emplear agua como diluyente.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,4 Unidades de Endotoxina por mg de metotrexato sódico.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de pH 6,0, Fase móvil, Preparación estándar, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Metotrexato*.

Preparación muestra - Disolver el contenido de un envase de Metotrexato para Inyección en un volumen exactamente medido de *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Metotrexato*. Calcular la cantidad de $C_{20}H_{22}N_8O_5$ en Metotrexato para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

METRONIDAZOL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Metronidazol deben contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_9N_3O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Metronidazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad de los Comprimidos de Metronidazol reducidos a polvo fino, equivalente a 300 mg de metronidazol, agregar 20 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100), agitar durante varios minutos y filtrar: alícuotas apropiadas del filtrado deben responder al ensayo de *Identificación B* en *Metronidazol*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad disuelta de $C_6H_9N_3O_3$ a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, a 278 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Metronidazol SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_6H_9N_3O_3$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Diluyente - Ácido clorhídrico diluido (1 en 100).

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Metronidazol a un matraz aforado de 250 ml, agregar aproximadamente 100 ml de *Diluyente* y agitar durante 30 minutos. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Filtrar, descartando los

primeros 15 ml del filtrado. Diluir el filtrado con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,2 mg de Metronidazol por ml. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen *Diluyente* y mezclar.

Solución estándar - Preparar de modo similar a la *Solución muestra* una solución de Metronidazol SR-FA de aproximadamente 20 µg por ml.

Procedimiento - Determinar la absorbancia de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, a 278 nm, con un espectrofotómetro, empleando *Diluyente* como blanco. Calcular la cantidad de $C_6H_9N_3O_3$ en cada Comprimidos de Metronidazol en ensayo, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agua y metanol (80:20). Filtrar y degasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Metronidazol SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,5 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir diez Comprimidos de Metronidazol, enteros o molidos, a un matraz aforado de modo que al diluirlos con metanol se obtenga una solución de aproximadamente 10 mg por ml. Agregar metanol y agitar durante 30 minutos o hasta que los Comprimidos de Metronidazol se desintegren. Completar a volumen con metanol y dejar reposar la solución hasta que el material insoluble sedimente. Transferir 5,0 ml del líquido sobrenadante transparente a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar la respuesta de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser

mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular la cantidad de $C_6H_9N_3O_3$ en los Comprimidos de Metronidazol, de acuerdo a la cantidad declarada.

METRONIDAZOL

GEL TÓPICO

Definición - El Gel Tópico de Metronidazol debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_9N_3O_3$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Metronidazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica:

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol e hidróxido de amonio (6:3:1).

Solución muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Gel Tópico de Metronidazol, equivalente a 7,5 mg de metronidazol, a un erlenmeyer apropiado, agregar 15 ml de agua, agitar hasta dispersar y sonicar durante 10 minutos. Eluir una porción de esta solución a través de una columna cromatográfica con resina de intercambio iónico de 10 cm de longitud, empleando una torunda de lana de vidrio al inicio y al final de la columna. Recolectar el eluato en un recipiente apropiado.

Solución estándar - Preparar una solución de aproximadamente 0,5 mg de Metronidazol SR-FA por ml.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 5 μ l de la *Solución muestra* y 5 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Examinar los cromatogramas: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido neto del envase
<220>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH<250>

Entre 4,0 y 6,5.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas de sílice totalmente porosas, de 5 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 1,5 g de fosfato monobásico de potasio y 1,3 g de fosfato dibásico de sodio en 350 ml de agua, agregar 650 ml de metanol y mezclar. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Metronidazol SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,075 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada del Gel Tópico de Metronidazol, equivalente a 7,5 mg de metronidazol, a un matraz aforado de 100 ml, agregar 50 ml de *Fase móvil* y agitar durante 20 minutos. Completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Centrifugar y emplear el sobrenadante.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico analizado no debe ser menor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_6H_9N_3O_3$ en el Gel Tópico de Metronidazol.

METRONIDAZOL

ÓVULOS VAGINALES

Definición - Los Óvulos Vaginales de Metronidazol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_9N_3O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Metronidazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción ultravioleta <470>.

Diluyente 1 - Solución de ácido clorhídrico (1:100).

Diluyente 2 - Solución de ácido sulfúrico en metanol (1:350).

Solución estándar - Pesar una exactamente alrededor de 10 mg de Metronidazol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 1 ml de *Diluyente 1*, disolver y completar a volumen con *Diluyente 2*, para obtener una solución de aproximadamente 20 µg por de metronidazol por ml.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 250 mg de metronidazol a partir de la porción triturada obtenida en *Valoración*, transferir a un matraz aforado de 25 ml, agregar 15 ml de *Diluyente 1*, calentar hasta disolución, enfriar, completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y filtrar. Diluir una porción del filtrado con *Diluyente 2* para obtener una solución similar a la *Solución estándar*.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, empleando *Diluyente 2* como blanco. La *Solución muestra* debe presentar máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Sustancias relacionadas*. El valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Sustancias relacionadas

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, dimetilformamida y solución de ácido fórmico al 90 % v/v (16:4:1).

Diluyente - Cloroformo y metanol (1:1).

Solución de 2-metil-5-nitroimidazol A - Preparar una solución de 2-metil-5-nitroimidazol en *Diluyente* de aproximadamente 200 µg por ml.

Solución de 2-metil-5-nitroimidazol B - Preparar una solución de 2-metil-5-nitroimidazol en *Diluyente* de aproximadamente 80 µg por ml.

Solución estándar - Preparar una solución de Metronidazol SR-FA en *Diluyente* de aproximadamente 40 mg de metronidazol por ml.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 1,0 mg de metronidazol a partir de la porción triturada obtenida en *Valoración*, transferir a un vaso de precipitados de 100 ml, fundir, dejar enfriar, agregar 50 ml de éter de petróleo con un intervalo de destilación entre 40 y 60 °C, calentar en un baño de agua hasta disolución completa, filtrar y lavar el residuo con el mismo solvente, secar y disolver el residuo con *Diluyente*.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 µl de la *Solución estándar*, 20 µl de la *Solución muestra* y 20 µl de las *Soluciones A* y *B* de 2-metil-5-nitroimidazol. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Examinar la placa bajo luz ultravioleta, a 254 nm: la mancha correspondiente a 2-metil-5-nitroimidazol y no más de dos manchas, diferentes a la principal, obtenidas a partir de la *Solución muestra* no deben ser mayor en tamaño e intensidad que la mancha obtenida con la *Solución de 2-metil-5-nitroimidazol A*. Ignorar cualquier mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* que sea de menor tamaño e intensidad que la obtenida en el cromatograma a partir de la *Solución 2-metil-5-nitroimidazol B*.

Fusión

Proceder según se indica en 400. *Ensayos farmacotécnicos para supositorios*. El tiempo de fusión de los Óvulos Vaginales de Metronidazol no debe ser mayor de 15 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Pesar y triturar no menos de veinte Óvulos Vaginales de Metronidazol. Pesar una cantidad equivalente a 250 mg de metronidazol, transferir a un erlenmeyer, fundir con calentamiento suave y constante agitación. Agregar 60 ml de ácido acético glacial previamente neutralizado con ácido perclórico 0,1 N, agregar *p*-naftolbenceína (SR) y calentar a 30 °C durante

30 minutos, agitar durante 5 minutos y enfriar. Agregar 0,5 ml de *p*-naftolbenceína (SR) y titular con ácido perclórico 0,1 N en ácido acético (SV). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de ácido perclórico 0,1 N equivale a 17,12 mg de metronidazol.

METRONIDAZOL

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Metronidazol es una solución estéril, isotónica de *Metronidazol en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_9N_3O_3$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Metronidazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol, agua e hidróxido de amonio (70:28:4:2).

Solución estándar - Preparar una solución de Metronidazol SR-FA de aproximadamente 0,025 mg por ml.

Solución muestra - Emplear un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Metronidazol que contenga aproximadamente 0,025 mg de metronidazol por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de *Solución estándar* y 10 μ l de *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 7,0.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,35 Unidades de Endotoxina por mg de Metronidazol.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 320 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 0,68 g de fosfato monobásico de potasio en 930 ml de agua y agregar 70 ml de metanol. Filtrar y desgasificar. Ajustar a pH $4,0 \pm 0,5$ con ácido fosfórico 1 M. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en *100. Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Metronidazol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 25 ml, disolver en metanol, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 2,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml, agregar 2 ml de agua, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Metronidazol, equivalente a 25 mg de metronidazol, a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 2,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml, agregar 2 ml de metanol, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_6H_9N_3O_3$ en la Solución Inyectable de Metronidazol, de acuerdo a la cantidad declarada.

METRONIDAZOL, BENZOATO DE SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Benzoato de Metronidazol debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de metronidazol ($C_6H_9N_3O_3$) en un vehículo apropiado y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Benzoato de Metronidazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los espectros obtenidos en *Valoración*. El espectro ultravioleta obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Benceno y metanol (70:30).

Diluyente - Acetona y metanol (1:1).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Benzoato de Metronidazol SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 1,25 mg de metronidazol por ml.

Solución muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oral de Benzoato de Metronidazol previamente agitada, equivalente a 125 mg de metronidazol, a un matraz aforado de 100 ml, agregar 50 ml de *Diluyente*, agitar durante 15 minutos, completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y filtrar.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 100 μ l de la *Solución estándar* y 100 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta, a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Uniformidad de unidades de dosificación
<740>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 7,0.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad de Benzoato de Metronidazol SR-FA, equivalente a 12,5 mg de metronidazol. Transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver, completar a volumen con metanol y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 12,5 μ g de metronidazol por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oral de Benzoato de Metronidazol previamente agitada, equivalente a 125 mg de metronidazol, a un matraz aforado de 100 ml, agregar 70 ml de metanol, agitar durante 15 minutos, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir un volumen de esta solución a un tubo de centrifuga y centrifugar durante 10 minutos. Transferir 1,0 ml del sobrenadante a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con metanol y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* a la longitud de onda de máxima absorción, 310 nm, empleando metanol como blanco. Calcular la cantidad de metronidazol ($C_6H_9N_3O_3$) en la Suspensión Oral de Benzoato de Metronidazol, de acuerdo a la cantidad declarada.

MICONAZOL, NITRATO DE CREMA DÉRMICA

Definición - La Crema Dérmica de Nitrato de Miconazol debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O \cdot HNO_3$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Nitrato de Miconazol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Transferir aproximadamente 25 ml de la *Preparación muestra* obtenida en *Valoración* a un recipiente 50 ml y evaporar en baño de vapor hasta sequedad. Secar el residuo a 105°C durante 10 minutos.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos de administración tópica.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 225 nm y una columna de 25 cm x 4,6 mm con fase estacionaria constituida por grupos fenilo químicamente unidos a partículas de porositas sílice, de 5 a 10 µm de diámetro. Mantener la columna a 45°C. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución reguladora de pH 2,5 - Transferir 10 ml de trietilamina a un erlenmeyer, diluir a 1 litro con agua, ajustar con ácido fosfórico a pH 2,5 y mezclar.

Fase móvil - *Solución reguladora de pH 2,5*, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano (8:5:4:3). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Nitrato de Miconazol SR-FA y ácido benzoico en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,28 mg de nitrato de miconazol y 0,02 mg de ácido benzoico por ml.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada de la Crema Dérmica de Nitrato de Miconazol, equivalente a 14 mg de nitrato de miconazol, a un matraz aforado de 50 ml, disolver con *Fase móvil*, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Sonicar hasta que la muestra se disperse completamente y mezclar. Dejar reposar hasta que alcance la temperatura ambiente, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna para el pico de nitrato de miconazol no debe ser menor de 7.500 platos teóricos; la resolución *R* entre los picos de nitrato de miconazol y ácido benzoico no debe ser menor de 13; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O \cdot HNO_3$ en la Crema Dérmica de Nitrato de Miconazol, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo cuando la Crema Dérmica de Nitrato de Miconazol este destinada para uso vaginal.

MORFINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Morfina es una solución estéril de *Clorhidrato de Morfina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de Clorhidrato de Morfina $C_{17}H_{19}NO_3 \cdot HCl \cdot 3H_2O$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Morfina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Absorción ultravioleta <470>

Solución muestra - Transferir un volumen de Solución Inyectable de Clorhidrato de Morfina, equivalente a 0,04 g de clorhidrato de morfina, a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Transferir 5 ml de la *Solución muestra* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Determinar el espectro de absorción de esta solución: debe presentar un máximo de absorbancia entre 283 y 287 nm. Transferir 5 ml de *Solución muestra* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con hidróxido de sodio (SR) y mezclar. Determinar el espectro de absorción: debe presentar un máximo de absorbancia entre 296 y 300 nm.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 2,5 y 5,0.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 285 nm y una columna de 25 cm x 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de aproximadamente 5 μ m de diámetro. Mantener la columna a 40°C. El caudal debe ajustarse de manera que el tiempo de retención de la Morfina sea de aproximadamente 10 minutos.

Fase móvil - Disolver 1,0 g de laurilsulfato de sodio en 500 ml de ácido fosfórico diluido (1 en 1000) y ajustar a pH 3,0 con hidróxido de sodio (SR). A 240 ml de esta solución agregar 70 ml de tetrahydrofurano y mezclar.

Solución del estándar interno - Preparar una solución de Clorhidrato de Etilerfina 1 en 500.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 0,025 g de Clorhidrato de Morfina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 10 ml de *Solución de estándar interno* y completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Morfina, equivalente aproximadamente a 0,08 g de clorhidrato de morfina, a un recipiente apropiado y diluir a 20 ml con agua. Transferir 5 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, agregar exactamente 10 ml de *Solución de estándar interno*, completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de morfina y estándar interno no debe ser menor de 3,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{19}NO_3 \cdot HCl \cdot 3H_2O$ en la Solución Inyectable de Sulfato de Morfina, de acuerdo a la cantidad declarada.

NALIDÍXICO, ÁCIDO

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Ácido Nalidíxico deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{12}N_2O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ácido Nalidíxico SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 60 rpm.

Solución reguladora de pH 8,6 - Mezclar 2,3 volúmenes de hidróxido de sodio 0,2 N con 2,5 volúmenes de fosfato monobásico de potasio 0,2 M y 2,0 volúmenes de metanol, enfriar y mezclar con agua para obtener 10 volúmenes y ajustar a pH $8,60 \pm 0,05$, si fuera necesario, con hidróxido de sodio 1 N.

Medio: *Solución reguladora de pH 8,6*; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con hidróxido de sodio 0,01 N, si fuera necesario, y determinar la cantidad disuelta de $C_{12}H_{12}N_2O_3$ a partir de las absorbancias en el ultravioleta medidas a la longitud de onda de máxima absorción, a 258 nm, en comparación con una *Solución estándar* de concentración conocida de Ácido Nalidíxico SR-FA en hidróxido de sodio 0,01 N, empleando como blanco una mezcla de *Medio* e hidróxido de sodio 0,01 N en las mismas proporciones que en las alícuotas en ensayo.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{12}H_{12}N_2O_3$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser de aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Preparar una solución de 784 mg de fosfato dibásico de potasio en 325 ml de agua. Agregar una solución de 2,62 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio en 350 ml de metanol. Agregar 325 ml de metanol y mezclar. Filtrar y desgasificar. Esta solución debe tener un pH de 10,0. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del Sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución del estándar interno - Preparar una solución de ácido sulfanílico en *Fase Móvil* de aproximadamente 0,8 mg por ml.

Preparación estándar - Preparar una solución de Ácido Nalidíxico SR-FA en metanol de aproximadamente 0,18 mg por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución y 1,0 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Ácido Nalidíxico. Transferir una porción, exactamente pesada, equivalente aproximadamente a 150 mg de ácido nalidíxico, a un matraz aforado de 500 ml. Agregar 400 ml de metanol y someter a ultrasonido durante 70 minutos. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar. Transferir 3,0 ml del filtrado transparente y 1,0 ml de la *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,7 para ácido sulfanílico y 1,0 para ácido nalidíxico; la resolución *R* entre el pico de ácido sulfanílico y el de ácido nalidíxico no debe ser menor de 1,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{12}N_2O_3$ en los Comprimidos de Ácido Nalidíxico, de acuerdo a la cantidad declarada.

NALOXONA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Naloxona es una solución estéril isotónica de *Clorhidrato de Naloxona en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{19}H_{21}NO_4 \cdot HCl$. Puede contener conservantes apropiados y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Naloxona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Límite de 2,2'-bisnaloxona

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución de cloruro férrico - Transferir 4 ml de cloruro férrico (SR) a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de identificación - Disolver 10 mg de *Naloxona* en 100 ml de ácido clorhídrico 0,1 N. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml y agregar 0,5 ml de la *Solución de cloruro férrico*. Calentar en un baño de vapor durante 10 minutos, enfriar, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución estándar - Transferir 2,0 ml de la *Preparación estándar*, preparada según se indica en *Valoración*, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 μ l) de la *Solución de identificación*, la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de naloxona y 2,2'-bisnaloxona. Los tiempos de retención deben ser aproximadamente 2,8 para el dímero de naloxona y 1,0 para la naloxona. Calcular el porcentaje de 2,2'-bisnaloxona en la

porción de Solución Inyectable de Clorhidrato de Naloxona en ensayo: no debe contener más de 4,0 %.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 6,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 500 Unidades de Endotoxina por mg de Clorhidrato de Naloxona.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 229 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1 ml por minuto.

Fase móvil - Preparar una mezcla que contenga 1,36 g de 1-octanosulfonato de sodio, 1,0 g de cloruro de sodio, 580 ml de agua, 420 ml de metanol y 1,0 ml de ácido fosfórico. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en *Cromatografía*).

Diluyente - Pesar 150 mg de edetato disódico, transferir a un matraz aforado de 2 litros y agregar 0,9 ml de ácido clorhídrico. Completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Naloxona SR-FA en *Diluyente* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 10 μ g por ml.

Preparación muestra 1 (para soluciones inyectables cuyo rótulo indique que no contienen más de 100 μ g de clorhidrato de naloxona por ml) - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Clorhidrato de Naloxona, equivalente a 100 μ g de clorhidrato de naloxona, a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación muestra 2 (para soluciones inyectables cuyo rótulo indique que contienen más de 100 μ g de clorhidrato de naloxona por ml) - Transferir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Clorhidrato de Naloxona, equivalente a 2 mg de clorhidrato de naloxona, a un

matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Preparar una solución de aproximadamente 10 µg de Naloxona SR-FA y 1,25 µg de paracetamol por ml en *Diluyente*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,5 para el paracetamol y 1,0 para la naloxona; la resolución *R* entre los picos de paracetamol y naloxona no debe ser menor de 8,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* no debe ser mayor de 1,5 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{19}H_{21}NO_4 \cdot HCl$ en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Naloxona en ensayo, en base a la cantidad declarada.

NEOSTIGMINA, BROMURO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Bromuro de Neostigmina deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{19}BrN_2O_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Bromuro de Neostigmina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Pesar una cantidad equivalente a 300 mg de bromuro de neostigmina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración* y transferir a una ampolla de decantación. Extraer con tres porciones de 10 ml de alcohol, filtrando después de cada extracción. Evaporar los filtrados combinados bajo una corriente de nitrógeno hasta sequedad. Disolver el residuo en 10 ml de agua, transferir a una ampolla de decantación de 125 ml con la ayuda de 5 ml de agua, realizar una extracción con 15 ml de éter y proseguir con los siguientes ensayos.

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Evaporar hasta sequedad 3 ml de la fase acuosa bajo una corriente de nitrógeno. Disolver el residuo en 1 ml de alcohol, calentando si fuera necesario. Agregar 5 ml de cloroformo, filtrar, evaporar hasta sequedad el filtrado bajo una corriente de nitrógeno y secar el residuo a 105 °C durante 30 minutos: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión en bromuro de potasio del residuo de bromuro de neostigmina así obtenido debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de una preparación similar de Bromuro de Neostigmina SR-FA.

B - Una porción de la fase acuosa debe responder a los ensayos para *Bromuro* <410>.

Ensayo de disolución <320>

Procedimiento para muestreo unificado

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 500 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y reunir en un recipiente apropiado. Transferir en sendas ampollas de decantación de 125 ml, 10,0 ml de la porción reunida y 10,0 ml de una *Solución estándar* con una

concentración conocida de Bromuro de Neostigmina SR-FA y 10,0 ml de agua para preparar un blanco. Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración*, comenzando donde dice: "Agregar 15 ml de una solución...".

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{12}H_{19}BrN_2O_2$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad de Bromuro de Neostigmina SR-FA, disolver en agua y diluir cuantitativamente y en etapas para obtener una solución de aproximadamente 40 µg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Bromuro de Neostigmina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de bromuro de neostigmina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar aproximadamente 50 ml de agua, agitar durante aproximadamente 30 minutos, completar a volumen con agua, mezclar y filtrar. Transferir 4 ml del filtrado transparente a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Transferir 10 ml de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* en sendas ampollas de decantación de 125 ml y tratar cada solución del siguiente modo. Agregar 15 ml de una solución preparada disolviendo 25 mg de hexanitrodifenilamina en cloruro de metileno para obtener 250 ml. Luego agregar 10 ml de hidróxido de sodio 5 N y agitar durante 30 segundos. Transferir la fase orgánica a un matraz aforado de 100 ml y extraer la fase acuosa con tres porciones de 15 ml de cloruro de metileno, transfiriendo los extractos a cada matraz respectivo. Completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Determinar las absorbancias de ambas soluciones en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 420 nm, con un espectrofotómetro, empleando cloruro de metileno como blanco. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{19}BrN_2O_2$ en los Comprimidos de Bromuro de Neostigmina, de acuerdo a la cantidad declarada.

NEOSTIGMINA, METILSULFATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Metilsulfato de Neostigmina es una solución estéril de *Metilsulfato de Neostigmina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{13}H_{22}N_2O_6S$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Metilsulfato de Neostigmina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I

ENSAYOS

Identificación

A - Proceder según se indica en *valoración*. El espectro de absorción ultravioleta obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Transferir un volumen de Solución Inyectable de Sulfato de Neostigmina, equivalente a 1 mg de metilsulfato de neostigmina, a una cápsula de porcelana pequeña. Evaporar hasta 2 ml, si fuera necesario, agregar 0,5 ml de solución de hidróxido de sodio (2 en 5) y proceder según se indica en el ensayo de *Identificación B* en *Metilsulfato de Neostigmina*, comenzando donde dice: "evaporar en un baño de vapor...".

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 6,5.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad apropiada de Metilsulfato de Neostigmina SR-FA, disolver en agua, diluir cuantitativamente y en etapas con el mismo solvente hasta obtener una solución de aproximadamente 40 µg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Metilsulfato de Neostigmina, equivalente a 25 mg

de metilsulfato de neostigmina, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25 mg de Metilsulfato de Neostigmina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, en celdas de 1 cm, a 260 nm, con un espectrofotómetro apropiado (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*). Calcular la cantidad de $C_{13}H_{22}N_2O_6S$ la Solución Inyectable de Metilsulfato de Neostigmina, de acuerdo a la cantidad declarada.

NICOTINAMIDA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Nicotinamida deben contener no menos de 92,5 por ciento y no más de 107,5 por ciento de la cantidad declarada de $C_6H_6N_2O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Nicotinamida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Pesar una cantidad equivalente a 0,1 g de nicotinamida a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Agitar con 25 ml de alcohol absoluto durante aproximadamente 15 minutos, filtrar y evaporar el filtrado hasta sequedad sobre un baño de agua.

B - Absorción ultravioleta <470>

El espectro de absorción ultravioleta de la solución obtenida en *Valoración*, entre 230 y 350 nm, debe presentar solo un máximo a 262 nm y dos picos más bajos a 258 y 269 nm.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Sustancias relacionadas

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, alcohol y agua (48:45:10).

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 0,1 g de nicotinamida a partir del polvo fino obtenido en *Valoración*. Agitar con 15 ml de alcohol durante 15 minutos y filtrar. Evaporar hasta sequedad sobre un baño de agua y disolver completamente el residuo en 1 ml de alcohol absoluto.

Solución estándar- Diluir un volumen de la *Solución muestra* a 400 volúmenes con alcohol absoluto.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 5 μ l de la *Solución muestra* y 5 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y des-

arrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Dejar secar la placa al aire. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de aproximadamente 254 nm. Ninguna mancha secundaria en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe ser más intensa que la mancha obtenida con la *Solución estándar* (0,25 %)

VALORACIÓN

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Nicotinamida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de nicotinamida. Transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 50 ml de alcohol y agitar durante aproximadamente 15 minutos. Completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y filtrar. Transferir 5 ml del filtrado a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con alcohol.

Preparación estándar - Preparar una solución de Nicotinamida SR-FA en alcohol de concentración similar a la de la *Preparación muestra*.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* con un espectrofotómetro, a la longitud de onda de máxima absorción, 262 nm, empleando alcohol como blanco. Calcular el contenido de $C_6H_6N_2O$ en los Comprimidos de Nicotinamida, de acuerdo a la cantidad declarada.

NIFEDIPINA

CÁPSULAS

Definición - Las cápsulas de Nifedipina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{18}N_2O_6$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Nifedipina SR-FA. Impureza A de Nifedipina SR-FA: 2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)piridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo. Impureza B de Nifedipina SR-FA: 2,6-dimetil-4-(2-nitrosfenil)piridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, entre 15 y 25°C.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,5 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo y ciclohexano (1:1).

Revelador - Transferir 3 g de subnitrito de bismuto y 30 g de yoduro de potasio a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 10 ml de ácido clorhídrico 3 N y disolver. Completar a volumen con agua y mezclar. Previo a su uso, transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10 ml de ácido clorhídrico 3 N, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución estándar - Disolver una cantidad apropiada de Nifedipina SR-FA en cloruro de metileno para obtener una solución de aproximadamente 1,2 mg por ml.

Solución muestra - Empleando el *Procedimiento para la uniformidad de contenido* en *Uniformidad de unidades de dosificación*, transferir el contenido de tres Cápsulas de Nifedipina a un tubo de centrifuga, agregando aproximadamente 20 ml de hidróxido de sodio 0,1 N. Agregar 25 ml de cloruro de metileno, tapar e invertir varias veces liberando cuidadosamente la presión. Colocar nuevamente el tapón y agitar suavemente durante una hora. Centrifugar durante 10 minutos a una velocidad entre 2.000 y 2.500 rpm. Remover el sobrenadante acuoso y transferir 5,0 ml de la capa inferior clarificada a un recipiente apropiado.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 500 μ l de la *Solución muestra* y 500 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente de solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Marcar el frente de solvente y dejar secar al aire. Examinar las manchas de color azul oscuro bajo luz ultravioleta, a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en los cromatogramas obtenidos a partir de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* se deben corresponder y deben ser aproximadamente 0,3. Pulverizar la placa con *Revelador*: las manchas de cada solución deben desarrollar un color naranja claro en un fondo amarillo.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: fluido gástrico simulado (SR); 900 ml.

Tiempo: 20 minutos.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Nifedipina SR-FA en y diluir con *Medio* para obtener una solución de concentración apropiada.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{17}H_{18}N_2O_6$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 340 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Nifedipina SR-FA en el mismo medio. [NOTA 1: puede emplearse una cantidad de metanol que no exceda el 2 % del volumen final para disolver la *Sustancia de referencia*.]

[NOTA 2: controlar los filtros para verificar si hay pérdida de absorción del Nifedipina.]

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{17}H_{18}N_2O_6$ se debe disolver en 20 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Nifedipina SR-FA en metanol y diluir con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 50 μ g por ml.

Solución muestra - Realizar un pequeño orificio en el extremo de una Cápsula de Nifedipina. Transferir el contenido a un matraz aforado de 200 ml,

cortar la Cápsula de Nifedipina a la mitad y colocar en el matraz. Enjuagar la tijera empleada para realizar el orificio y cortar la cápsula, cuantitativamente con 20 ml de metanol recolectando el lavado, completar a volumen con metanol y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 350 nm, empleando metanol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{18}N_2O_6$ en cada Cápsula de Nifedipina, en base a la cantidad declarada.

Sustancias relacionadas

[NOTA: emplear material de vidrio inactínico. Realizar este ensayo rápidamente luego de preparar las soluciones.]

Sistema cromatográfico - Proceder según se indica en *Valoración*.

Fase móvil, Solución estándar de Nifedipina, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Sustancias relacionadas* en *Nifedipina*.

Solución estándar A - Proceder según se indica en *Solución estándar A* en *Sustancias relacionadas* en *Nifedipina*, excepto que la concentración final debe ser de aproximadamente 6 µg por ml.

Solución estándar B - Proceder según se indica en *Solución estándar B* en *Sustancias relacionadas* en *Nifedipina*, excepto que la concentración final debe ser aproximadamente 1,5 µg por ml.

Solución estándar - Transferir 5,0 ml de la *Solución estándar A* y 5,0 ml de la *Solución estándar B* a un recipiente apropiado, agregar 5,0 ml de *Fase móvil* y mezclar.

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de cada impureza en las Cápsulas de Nifedipina, relacionando las respuestas de los picos de cada sustancia relacionada obtenidas a partir de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. No debe contener más de 2,0 % de Impureza A de Nifedipina y no más de 0,5 % de Impureza B de Nifedipina.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

[NOTA: emplear material de vidrio inactínico. Realizar este ensayo rápidamente luego de preparar la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*].

Sistema cromatográfico - Proceder según se indica en *Valoración* en *Nifedipina*, excepto que el detector ultravioleta debe ser ajustado a 265 nm.

Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Nifedipina*

Preparación muestra - Transferir el contenido de cinco Cápsulas de Nifedipina, con la ayuda de una pequeña cantidad de metanol, a un recipiente apropiado. Diluir cuantitativamente con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{18}N_2O_6$ en las Cápsulas de Nifedipina, de acuerdo a la cantidad declarada.

NISTATINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Nistatina deben contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 130,0 por ciento de la cantidad declarada de Unidades de Nistatina y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Nistatina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto y en un sitio fresco.

ENSAYOS

Identificación

Absorción ultravioleta <470>.

Reducir a polvo fino los Comprimidos de Nistatina y transferir una cantidad equivalente a 300.000 Unidades de Nistatina, a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 50 ml de metanol y 5 ml de ácido acético glacial y agitar. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar. Transferir 1,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con metanol y mezclar. Determinar la absorción ultravioleta de la solución anterior, en el rango de 250 a 350 nm, empleando una solución preparada de la misma manera sin el agregado del polvo de los Comprimidos de Nistatina como blanco: debe exhibir máximos a 291, 305 y 319 nm. La relación (A_{291}/A_{305}) debe estar comprendida entre 0,61 y 0,73 y la relación (A_{319}/A_{305}) debe estar comprendida entre 0,83 y 0,96.

Ensayo de disgregación <310>

Tiempo: 120 minutos, si posee cubierta simple.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de los Comprimidos de Nistatina reducidos a polvo fino. Secar en un recipiente con tapa capilar al vacío, a una presión que no exceda 5 mm Hg a 60 °C durante 3 horas: con cubierta simple, no debe perder más de 5,0 % de su peso; con cubierta filmica, no debe perder más de 8,0 % de su peso.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para *Nistatina* en 770. *Valoraciones microbiológicas de antibióticos*, mezclando no menos de cinco Comprimidos de Nistatina durante 3 a 5 minutos en una mezcladora

con recipiente de vidrio de alta velocidad con un volumen suficiente, exactamente medido, de dimetilformamida para obtener una solución con una concentración apropiada. Diluir una porción exactamente medida de esta solución con dimetilformamida para obtener una solución madre de aproximadamente 400 Unidades de Nistatina por ml. Diluir esta solución madre con *Solución reguladora No. 6* para obtener las soluciones de ensayo.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que los Comprimidos de Nistatina están destinados al uso oral para distinguirlos de los *Comprimidos Vaginales de Nistatina*.

NISTATINA

COMPRIMIDOS VAGINALES

Definición - Los Comprimidos Vaginales de Nistatina están compuestos por *Nistatina* y diluyentes y lubricantes apropiados. Deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 140,0 por ciento de la cantidad declarada de Unidades de Nistatina y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Nistatina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto y cuando lo indique en el rótulo, en refrigerador.

ENSAYOS

Absorción ultravioleta <470>.

Reducir a polvo fino los Comprimidos Vaginales de Nistatina y transferir una cantidad equivalente a 300.000 Unidades de Nistatina, a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 50 ml de metanol y 5 ml de ácido acético glacial y agitar. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar. Transferir 1,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con metanol y mezclar. Determinar la absorción ultravioleta de la solución anterior, en el rango de 250 a 350 nm, empleando una solución preparada de la misma manera sin el agregado del polvo de los Comprimidos Vaginales de Nistatina como blanco: debe exhibir máximos a 291, 305 y 319 nm. La relación (A_{291}/A_{305}) debe estar comprendida entre 0,61 y 0,73 y la relación (A_{319}/A_{305}) debe estar comprendida entre 0,83 y 0,96.

Ensayo de disgregación <310>

Tiempo: 60 minutos.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 100 mg de los Comprimidos Vaginales de Nistatina reducidos a polvo. Secar en un recipiente con tapa capilar al vacío, a una presión que no exceda 5 mm Hg a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 5,0 % de su peso.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración en Comprimidos de Nistatina*.

NISTATINA

CREMA DÉRMICA

Definición - La Crema Dérmica de Nistatina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 130,0 por ciento de la cantidad declarada de Unidades de Nistatina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Nistatina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para Nistatina en 770.
Valoración microbiológica de antibióticos.

Mezclar una porción exactamente pesada de la Crema Dérmica de Nistatina, libre de burbujas, con un volumen exactamente medido de dimetilformamida durante 3 a 5 minutos a alta velocidad para obtener una solución de aproximadamente 400 Unidades de Nistatina por ml. Diluir cuantitativamente esta solución con *Solución reguladora N° 6* para obtener las soluciones de ensayo.

NISTATINA

SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Nistatina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 130,0 por ciento de la cantidad declarada de Unidades de Nistatina. Puede contener dispersantes apropiados, saborizantes, conservantes y agentes estabilizantes de la suspensión y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Nistatina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Absorción ultravioleta <470>.

Transferir un volumen de Suspensión Oral de Nistatina, equivalente a 300.000 Unidades de Nistatina, a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 50 ml de metanol y 5 ml de ácido acético glacial y agitar. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar. Transferir 1,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con metanol y mezclar. Determinar la absorción ultravioleta de la solución anterior, en el rango de 250 a 350 nm, empleando una solución preparada de la misma manera sin el agregado de la Suspensión Oral de Nistatina como blanco: debe exhibir máximos a 291, 305 y 319 nm. La relación (A_{291}/A_{305}) debe estar comprendida entre 0,61 y 0,73 y la relación (A_{319}/A_{305}) debe estar comprendida entre 0,83 y 0,96.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 4,9 y 5,5; determinado sobre la suspensión reconstituida según se indica en el rótulo.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Proceder según se indica para Nistatina en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos.*

Mezclar un volumen apropiado exactamente medido de la Suspensión Oral de Nistatina, libre de burbujas, con un volumen suficiente de dimetilformamida durante 3 a 5 minutos a alta velocidad para obtener una concentración apropiada. Diluir una porción exactamente medida

de esta solución con dimetilformamida para obtener una solución madre de aproximadamente 400 Unidades de Nistatina por ml. Diluir cuantitativamente esta solución con *Solución reguladora N° 6* para obtener las soluciones de ensayo.

NISTATINA

UNGÜENTO TÓPICO

Definición - El Ungüento Tópico de Nistatina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 130,0 por ciento de la cantidad declarada de Unidades de Nistatina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Nistatina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 0,5 %. Emplear 20 ml de una mezcla de tolueno y metanol (7:3) en lugar de metanol en el recipiente de titulación.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos de administración tópica.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Crema Dérmica de Nistatina*, empleando Ungüento Tópico de Nistatina en lugar de Crema Dérmica de Nistatina.

NITROFURANTOÍNA

SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Nitrofurantoína es una suspensión de *Nitrofurantoína* en un vehículo apropiado. Debe contener no menos de 92,0 por ciento y no más de 108,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_8H_6N_4O_5$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Nitrofurantoína SR-FA. Impureza A de Nitrofurantoína SR-FA: *N*-(aminocarbonil)-*N*-[[5-nitro-2-furanil]metileno]amino]glicina.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos herméticos.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En suspensión*
Transferir 10 ml de la Suspensión Oral de Nitrofurantoína a un recipiente apropiado, agregar 15 ml de acetona y calentar a 50 °C con agitación para coagular los excipientes. Filtrar, evaporar hasta sequedad, agregar 10 ml de ácido acético, calentar hasta ebullición y filtrar en caliente. Enfriar a temperatura ambiente, filtrar la nitrofurantoína precipitada y secar a 105 °C durante 1 hora: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión del precipitado en aceite mineral debe presentar máximos de absorbancia a las mismas longitudes de onda que una dispersión estándar de Nitrofurantoína SR-FA en las mismas condiciones

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con obtenido con la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 6,5

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Límite de Impureza A de Nitrofurantoína

Fase móvil y Solución reguladora de fosfato pH 7,0 - Proceder según se indica en *Valoración*.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 375 nm y una columna de

30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,2 ml por minuto.

Solución estándar - Disolver cuantitativamente una cantidad exactamente pesada de Impureza A de Nitrofurantoína SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 125 µg por ml. Transferir 2,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oral de Nitrofurantoína recientemente mezclada, equivalente a 5 mg de nitrofurantoína, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Centrifugar y filtrar el sobrenadante.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención del pico principal debe estar comprendido entre 3 y 6 minutos y la altura del mismo aproximadamente el 10 % de la escala completa.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (entre 30 µl y 60 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales: la respuesta del pico correspondiente a impureza A de Nitrofurantoína en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* no debe ser mayor de 5 % de la de la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*.

VALORACIÓN

Fase móvil y Solución reguladora de fosfato pH 7,0 - Proceder según se indica en *Valoración* en *Nitrofurantoína*.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,2 ml por minuto.

Solución del estándar interno - Disolver alrededor de 13 mg de acetanilida en *Fase móvil*, diluir con el mismo solvente hasta un volumen de 200 ml y mezclar.

Preparación estándar - Transferir aproximadamente 25 mg de Nitrofurantoína SR-FA exactamente medidos a un matraz aforado de 100 ml,

agregar 50 ml de dimetilformamida, 20 ml de agua y enfriar a temperatura ambiente. Completar a volumen con dimetilformamida. Transferir 4,0 ml de esta solución a un recipiente de vidrio con tapón, agregar 15,0 ml de *Solución del estándar interno* y mezclar.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oral de Nitrofurantoína recientemente mezclada, equivalente a 25 mg de nitrofurantoína, a un matraz aforado de 100 ml, agregar 20 ml de agua y mezclar. Agregar 50 ml de dimetilformamida y agitar durante 20 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, completar a volumen con dimetilformamida, centrifugar y transferir 4,0 ml del sobrenadante a un recipiente de vidrio. Agregar 15,0 ml de la *Solución del estándar interno*, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de acetanilida y nitrofurantoína no debe ser menor de 3,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 15 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_8H_6N_4O_5$ en la Suspensión Oral de Nitrofurantoína, de acuerdo a la cantidad declarada.

NORETISTERONA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Noretisterona deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{20}H_{26}O_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Noretisterona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de noretisterona a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Mezclar con 15 ml de éter de petróleo y agitar ocasionalmente durante 15 minutos. Centrifugar la mezcla, dejar decantar y descartar el éter de petróleo. Extraer el residuo con dos porciones de 10 ml de éter de petróleo, centrifugar, dejar decantar y descartar el éter. Agregar 25 ml de cloroformo al residuo, agitar entre 1 y 2 minutos y filtrar. Evaporar el filtrado aproximadamente a 3 ml, agregar unos pocos ml de éter de petróleo para inducir la cristalización y evaporar hasta sequedad: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión en bromuro de potasio del residuo así obtenido debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de una preparación similar de Noretisterona SR-FA.

Ensayo de desintegración <310>

No más de 15 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Reactivo de Isoniazida - Disolver 1,0 g de Isoniazida en 1 litro de metanol anhidro, agregar 1,3 ml de ácido clorhídrico y mezclar.

Preparación estándar - Preparar una solución de Noretisterona SR-FA en metanol de aproximadamente 14 µg de noretisterona por ml. Agregar 2 ml de *Reactivo de Isoniazida*, mezclar, tapar y dejar reposar durante 30 minutos.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Noretisterona. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 0,7 mg de noretisterona, transferir a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con metanol anhidro. Mezclar y dejar reposar aproximadamente 10 minutos, agitando ocasionalmente. Filtrar y transferir 10 ml del filtrado a un recipiente apropiado. Agregar 2 ml de *Reactivo de Isoniazida*, mezclar, tapar y dejar reposar durante 30 minutos.

Blanco de muestra - Transferir 10 ml del filtrado de la *Preparación muestra* a un recipiente apropiado, agregar 2 ml de metanol y mezclar.

Blanco de reactivo - Transferir 10 ml de metanol a un recipiente apropiado, agregar 2 ml de *Reactivo de Isoniazida*, mezclar, tapar y dejar reposar durante 30 minutos.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 380 nm, con un espectrofotómetro, empleando metanol para llevar a cero la lectura del instrumento. Calcular la cantidad de $C_{20}H_{26}O_2$ en los Comprimidos de Noretisterona, a partir de la absorbancia de la *Preparación muestra* corregida por la absorbancia del *Blanco de muestra* y la del *Blanco del reactivo* y la *Preparación estándar* corregida por la absorbancia del *Blanco de reactivo*.

NORETISTERONA, ACETATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Acetato de Noretisterona deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{22}H_{28}O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Acetato de Noretisterona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Proceder según se indica en *Identificación* en *Comprimidos de Noretisterona*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico diluido 1 en 100 que contenga 0,02 % de lauril sulfato de sodio; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{22}H_{28}O_3$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 248 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Acetato de Noretisterona SR-FA en el mismo medio. [NOTA: la *Solución estándar* puede ser preparada disolviendo la *Sustancia de referencia* en un volumen de metanol, que no exceda 0,5 % del volumen final de la solución, y diluir cuantitativamente con medio.]

Tolerancia - No menos de 70 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{22}H_{28}O_3$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Solución estándar - Emplear la *Preparación estándar* preparada en *Valoración*.

Solución muestra - Reducir a polvo fino un Comprimido de Acetato de Noretisterona, transferir a un matraz aforado de 100 ml con la ayuda de aproximadamente 75 ml de alcohol. Calentar el alcohol a ebullición y dejar que la mezcla permanezca a una temperatura por debajo del punto de ebullición durante aproximadamente 15 minutos,

agitar ocasionalmente por rotación. Enfriar a temperatura ambiente, completar a volumen con alcohol, mezclar y centrifugar hasta que la solución se torne transparente. Diluir una porción de la solución sobrenadante cuantitativamente y en etapas con alcohol para obtener una solución de aproximadamente 10 μg de acetato de noretisterona por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 240 nm, con un espectrofotómetro, empleando alcohol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{28}O_3$ en cada Comprimido de Acetato de Noretisterona, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación estándar - Preparar una solución de Acetato de Noretisterona SR-FA en alcohol de aproximadamente 10 μg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Acetato de Noretisterona. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 20 mg de acetato de noretisterona, transferir a una ampolla de decantación, agregar 10 ml de agua y extraer con tres porciones de 25 ml de cloroformo, filtrando cada extracto a través de una torunda de algodón lavada con cloroformo. Evaporar los extractos clorofórmicos combinados en un baño de vapor hasta sequedad, reduciendo la temperatura cuando la muestra esté prácticamente seca. Disolver el residuo en alcohol, transferir la solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con alcohol y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 240 nm, con un espectrofotómetro, empleando alcohol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{28}O_3$ en los Comprimidos de Acetato de Noretisterona, de acuerdo a la cantidad declarada.

NORFLOXACINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Norfloxacinina deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Norfloxacinina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol, tolueno, dietilamina y agua (40:40:20:14:8).

Diluyente - Preparar una mezcla conteniendo 1 litro de metanol y 9 ml de ácido clorhídrico. Emplear dicha mezcla y cloruro de metileno (1:1).

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 400 mg de Norfloxacinina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar 2 ml de agua, someter a ultrasonido, diluir con 100 ml de *Diluyente*. Completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Centrifugar 25 ml de esta solución y emplear el sobrenadante.

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Norfloxacinina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 25 ml, agregar 15 ml de *Diluyente* y completar a volumen con el mismo solvente.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 50 μ l de la *Solución muestra* y 50 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore.

Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta, a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Solución reguladora pH 4,0 - Transferir 900 ml de agua a un matraz aforado de 1 litro, agregar 2,9 ml de ácido acético glacial, 1,0 ml de una solución de hidróxido de sodio al 50 % (p/p), completar a volumen con agua y mezclar. Ajustar a pH 4,0 con ácido acético glacial o hidróxido de sodio según sea necesario.

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: *Solución reguladora pH 4,0*; 750 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 16 μ g de Norfloxacinina por ml. Determinar la cantidad de $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, a 313 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Norfloxacinina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 275 nm y una columna de 30 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. Mantener la columna aproximadamente a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto. Preacondicionar la columna con fosfato monobásico de sodio 0,01 M ajustado a pH 4,0 con ácido fosfórico durante 8 horas bajo un caudal de 0,5 ml por minuto.

Fase móvil - Solución de ácido fosfórico 1 en 1.000 y acetonitrilo (85:15). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad de Norfloxacinina SR-FA, transferir a un matraz apropiado y diluir cuantitativamente y en etapas en *Fase móvil*, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 0,2 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino menos de veinte Comprimidos de Norfloxacinina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg

de Norfloxacin, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar 80 ml de *Fase móvil*, sonicar durante 10 minutos, completar a volumen con Solución de ácido fosfórico 1 en 1.000, mezclar y filtrar. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml y completar a volumen con *Fase móvil*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ en los Comprimidos de Norfloxacin, de acuerdo a la cantidad declarada.

PARACETAMOL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Paracetamol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_8H_9NO_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Paracetamol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloruro de metileno y metanol (4:1).

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de paracetamol a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y filtrar.

Solución estándar - Preparar una solución de Paracetamol SR-FA en metanol para obtener una solución con la misma concentración que la *Solución muestra*.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara y marcar el frente del solvente. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: Solución reguladora de fosfato de pH 5,8.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_8H_9NO_2$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 243 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Paracetamol SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_8H_9NO_2$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 243 nm y una columna de 30 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Agua y metanol (3:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Paracetamol SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,01 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Paracetamol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de paracetamol, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar aproximadamente 100 ml de *Fase móvil* y sonicar durante 10 minutos, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor de 1.000 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente

10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*; registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_8H_9NO_2$ en los Comprimidos de Paracetamol, de acuerdo a la cantidad declarada.

PARACETAMOL

SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Paracetamol debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_8H_9NO_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Paracetamol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto, a 25 °C.

ENSAYOS

Identificación

A- Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B- Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil y Solución estándar - Proceder según se indica en *Ensayo de Identificación C* en *Paracetamol*.

Solución muestra - Diluir una cantidad de la Solución Oral de Paracetamol cuantitativamente en metanol para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Ensayo de Identificación C* en *Paracetamol*: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

Determinación de alcohol <130>

Método II. Entre 90,0 y 115,0 % de la cantidad de C_2H_5OH declarada en el rótulo, determinada por cromatografía gaseosa empleando acetona como estándar interno.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,8 y 6,1.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder

según se indica en *Valoración en Comprimidos de Paracetamol*.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oral de Paracetamol, equivalente a 500 mg de paracetamol, a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 25,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración en Comprimidos de Paracetamol*. Calcular la cantidad de $C_8H_9NO_2$ en la Solución Oral de Paracetamol, de acuerdo a la cantidad declarada.

PARACETAMOL

SUPOSITORIOS

Definición - Los Supositorios de Paracetamol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_8H_9NO_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Paracetamol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto, en un sitio fresco.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria, Fase móvil, Solución estándar y Procedimiento - Proceder según se indica en el ensayo de *Identificación C* en *Paracetamol*.

Solución muestra - Transferir una cantidad exactamente pesada de Supositorios de Paracetamol, equivalente a 20 mg de paracetamol, a un vaso de precipitados, agregar 20 ml de metanol y calentar en un baño de agua aproximadamente a 50 °C hasta que funda. Dejar enfriar y filtrar.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Ensayos farmacotécnicos para supositorios <400>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 243 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Agua y metanol (3:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Paracetamol SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,01 mg por ml.

Preparación muestra - Colocar 5 Supositorios de Paracetamol en una cápsula con la ayuda de una varilla de vidrio. Calentar en baño de agua a aproximadamente 50 °C hasta que fundan, mezclar

y enfriar. Transferir una porción exactamente pesada, equivalente a 100 mg de paracetamol, a una ampolla de decantación, agregar 30 ml de éter de petróleo, y mezclar hasta disolver. Agregar 30 ml de agua, agitar y dejar que las fases se separen. [NOTA: si se forma una emulsión dejar reposar hasta que las fases se separen]. Transferir la fase acuosa a un matraz aforado de 200 ml, lavar la fase etérea de la ampolla de decantación con tres porciones de 30 ml de agua, agregar los lavados al matraz, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 5 ml de esta solución a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar la respuesta de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no debe ser menor de 1.000 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular la cantidad de $C_8H_9NO_2$ en los Supositorios de Paracetamol, de acuerdo a la cantidad declarada.

PILOCARPINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Clorhidrato de Pilocarpina es una solución acuosa, regulada y estéril de *Clorhidrato de Pilocarpina*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{16}N_2O_2 \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Pilocarpina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 3,5 y 5,5.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 220 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por partículas porosas de sílice de 5 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Mezclar *n*-hexano con una solución 1 en 50 de hidróxido de amonio en alcohol isopropílico (7:3). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad de Clorhidrato de Pilocarpina SR-FA y diluir cuantitativamente para obtener una solución de aproximadamente 1,6 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Clorhidrato de Pilocarpina, equivalente a 80 mg de clorhidrato de pilocarpina, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en

Procedimiento: el tiempo de retención para el clorhidrato de pilocarpina debe ser aproximadamente de 16 minutos, la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{11}H_{16}N_2O_2 \cdot HCl$ en la Solución Oftálmica de Clorhidrato de Pilocarpina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: “Descartar una vez finalizado el tratamiento”.

PILOCARPINA, NITRATO DE SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Nitrato de Pilocarpina es una solución acuosa, regulada y estéril de *Nitrato de Pilocarpina*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{16}N_2O_2.HNO_3$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia – Nitrato de Pilocarpina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH<250>

Entre 4,0 y 5,5.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Aptitud del sistema, Preparación muestra y Preparación estándar - Proceder según se indica en *Valoración en Solución Oftálmica de Clorhidrato de Pilocarpina*.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Solución Oftálmica de Clorhidrato de Pilocarpina*. Calcular la cantidad de $C_{11}H_{16}N_2O_2.HNO_3$ en la Solución Oftálmica de Nitrato de Pilocarpina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda:
“*Descartar una vez finalizado el tratamiento*”.

PIRANTEL, PAMOATO DE SUSPENSIÓN ORAL

Definición - La Suspensión Oral de Pamoato de Pirantel es una suspensión de *Pamoato de Pirantel* en un vehículo apropiado. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Pirantel ($C_{11}H_{14}N_2S$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Pamoato de Pirantel SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

[NOTA: emplear material de vidrio inactínico. Realizar la *Identificación* y la *Valoración* en el menor tiempo posible, sin interrupciones].

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,50 mm de espesor.

Diluyente - Transferir 0,8 ml de hidróxido de amonio a un matraz aforado de 250 ml, agregar 100 ml de metanol, completar a volumen con metanol y mezclar.

Fase móvil - Metil isobutil cetona, ácido fórmico y agua (2:1:1).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Pamoato de Pirantel SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 8 mg por ml. Agitar y centrifugar. Emplear la solución clarificada.

Solución muestra - Diluir un volumen apropiado de la Suspensión Oral de Pamoato de Pirantel con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 8 mg por ml. Agitar y centrifugar. Emplear la solución clarificada.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 100 μ l de la *Solución estándar* y 100 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta a 366 nm: el valor de R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos para suspensiones orales en envases multidosis.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 6,0.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos para suspensiones orales en envases monodosis.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

[NOTA: emplear material de vidrio inactínico. Completar la *Valoración* en el menor tiempo posible].

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 288 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por partículas porosas de sílice de 5 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Acetonitrilo, ácido acético, agua y dietilamina (92,8:3:3:1,2). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en *100. Cromatografía*). [NOTA: al aumentar la cantidad de acetonitrilo en la *Fase móvil* aumentan los tiempos de retención. Al aumentar la cantidad de ácido acético, agua y dietilamina reduce los tiempos de retención. Si es necesario realizar algún ajuste en la *Fase móvil*, mantener la proporción entre ácido acético, agua y dietilamina (1:1:0,4)].

Preparación estándar - Preparar una solución en *Fase móvil* de aproximadamente 80 μ g de Pamoato de Pirantel SR-FA por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Suspensión Oral de Pamoato de Pirantel, equivalente a 200 mg de pamoato de pirantel, a un matraz aforado de 100 ml, dispersar y completar a volumen con agua. Agitar la dispersión y transferir de inmediato 1,0 ml a un matraz aforado de 25 ml. Disolver, completar a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar

las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos para el ácido pamoico y para el pirantel deben ser de aproximadamente 0,6 y 1,0 respectivamente; la resolución R entre pirantel y ácido pamoico no debe ser menor de 10; el número de platos teóricos para el pico de pirantel no debe ser menor de 8.000; el factor de asimetría para el pico de pirantel no debe ser mayor de 1,3; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas durante al menos de 2,5 veces el tiempo de retención de pirantel y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de Pirantel ($C_{11}H_{14}N_2S$) la Suspensión Oral de Pamoato de Pirantel, de acuerdo a la cantidad declarada.

PIRAZINAMIDA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Pirazinamida deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_5H_5N_3O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Pirazinamida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En suspensión.*

Pesar una cantidad equivalente a 1,0 g de pirazinamida a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Agregar aproximadamente 75 ml de alcohol isopropílico, calentar en un baño de vapor y filtrar en caliente. Dejar enfriar, separar los cristales formados y secar a 105 °C durante 1 hora: el espectro de absorción infrarroja de una dispersión en aceite mineral de los cristales secos así obtenidos, debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes que una preparación similar de Pirazinamida SR-FA. Si apareciera una diferencia, disolver en acetona porciones de los cristales secos y de la *Sustancia de referencia*, evaporar las soluciones hasta sequedad y repetir el ensayo.

B - Los cristales secos obtenidos en el ensayo de *Identificación A* deben responder al ensayo de *Identificación B* en *Pirazinamida*.

C - A 20 mg de los cristales secos obtenidos en el ensayo de *Identificación A*, agregar 5 ml de hidróxido de sodio 5 N y calentar suavemente a la llama: se debe percibir olor a amoníaco.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_5H_5N_3O$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 268 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Pirazinamida SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_5H_5N_3O$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 270 nm y una columna de 15 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato pH 3,0 - Preparar 1 litro de solución reguladora de fosfato pH 8,0 (ver *Soluciones reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*) y ajustar a pH 3,0 con ácido fosfórico.

Fase móvil - Mezclar 1 litro de la *Solución reguladora de fosfato pH 3,0* con 10 ml de acetonitrilo. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Transferir una cantidad exactamente pesada de Pirazinamida SR-FA a un matraz aforado de capacidad apropiada, disolver en agua, sonicar, completar a volumen con agua y mezclar para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml. Transferir 20,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Pirazinamida. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de pirazinamida, transferir a un matraz aforado de 500 ml, agregar 300 ml de agua y sonicar durante 10 minutos. Completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar una porción de esta solución, descartando los primeros mililitros del filtrado. Transferir 20,0 ml de la solución filtrada a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de aptitud de sistema - Transferir 1,0 ml de ácido clorhídrico a un matraz aforado de 5 ml, completar a volumen con *Preparación estándar* y mezclar. Mantener esta solución en un baño de agua a ebullición durante 5 minutos y enfriar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,3; la eficiencia de la columna no debe ser me-

nor de 2.500 platos teóricos. Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente de 0,45 para el ácido pirazinoico y 1,0 para la pirazinamida; la resolución R entre los picos de pirazinamida y ácido pirazinoico no debe ser menor de 6,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_5H_5N_3O$ en los Comprimidos de Pirazinamida, de acuerdo a la cantidad declarada.

PIRIDOXINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Piridoxina es una solución estéril de *Clorhidrato de Piridoxina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Piridoxina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Evaporar un volumen de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Piridoxina, equivalente a 50 mg de clorhidrato de piridoxina, en baño de vapor hasta sequedad. Agregar 5 ml de alcohol absoluto y evaporar nuevamente hasta sequedad. Secar el residuo a $105^\circ C$ durante 3 horas: el residuo obtenido debe responder a los *Ensayos de identificación A y B en Clorhidrato de Piridoxina*.

Determinación del pH <250>

Entre 2,0 y 3,8.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,4 Unidades de Endotoxina por mg de clorhidrato de piridoxina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Solución reguladora de Cloruro de amonio-hidróxido de amonio - Disolver 16 g de cloruro de amonio en 70 ml de agua, agregar 16 ml de hidróxido de amonio y diluir con agua hasta 100 ml. Mezclar y filtrar.

Solución de Clorimida - Disolver 40 mg de 2,6-dicloroquinona-clorimida en 100 ml de alcohol isopropílico. [NOTA: esta solución puede conservarse en refrigerador durante un mes. No emplear si presenta coloración rosada].

Preparación madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Piridoxina SR-FA en ácido clorhídrico 0,1 N para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml. [NOTA: conservar la solución en envase color ámbar en un sitio frío].

Preparación estándar - Transferir 10,0 ml de la *Preparación madre del estándar* a un matraz aforado de 100,0 ml, completar a volumen con agua y mezclar. [NOTA: preparar la solución en el día de su uso].

Preparación muestra - Diluir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Piridoxina, equivalente a 100 mg de clorhidrato de piridoxina, cuantitativamente y en etapas, con agua para obtener una solución de aproximadamente 10 μg de clorhidrato de piridoxina por ml.

Procedimiento -

a) Transferir 5,0 ml de la *Preparación muestra* a un recipiente apropiado, agregar 25,0 ml de alcohol isopropílico y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un tubo de ensayo y agregar sucesivamente 1,0 ml de *Solución reguladora de Cloruro de amonio-hidróxido de amonio*, 1,0 ml de solución de acetato de sodio (1 en 5) y 1,0 ml de agua, mezclando después de cada adición. Enfriar hasta aproximadamente $25^\circ C$, agregar 1,0 ml de *Solución de Clorimida*, agitar durante exactamente 10 segundos. Sesenta segundos después de la adición de la *Solución de Clorimida*, determinar la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción, 650 nm, con un espectrofotómetro apropiado empleando agua como blanco. [NOTA: realizar la lectura inmediatamente para evitar errores debido a la pérdida de color].

b) Repetir el procedimiento (a) pero sustituir 1,0 ml de agua por 1,0 ml de solución de ácido bórico (1 en 20).

c) Repetir el procedimiento (a) empleando la *Preparación estándar*.

d) Repetir el procedimiento (b) empleando la *Preparación estándar*.

Calcular la cantidad de $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Piridoxina, relacionando las diferencias de absorbancias obtenidas para la *Preparación muestra* ($A_a - A_b$) con las diferencias de absorbancias obtenidas para la *Preparación estándar* ($A_c - A_d$).

PIRIMETAMINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Pirimetamina deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{13}ClN_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Pirimetamina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción ultravioleta <460>. El espectro de absorción ultravioleta de la *Preparación muestra* obtenida según se indica en *Valoración*, debe presentar máximos a las mismas longitudes de onda que el de una solución similar preparada con Pirimetamina SR-FA.

B - Pesar una cantidad equivalente a 250 mg de pirimetamina a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Agregar 25 ml de acetona, calentar a ebullición durante 2 minutos y filtrar a través de un crisol de vidrio sinterizado. Repetir este procedimiento tres veces con porciones de 25 ml de acetona. Evaporar los filtrados combinados cuidadosamente en un baño de vapor con la ayuda de una corriente de aire hasta sequedad: el residuo debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Pirimetamina* y debe fundir entre 237 y 242 °C (ver 260. *Determinación del punto de fusión*).

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{12}H_{13}ClN_4$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 273 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Pirimetamina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{12}H_{13}ClN_4$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Pirimetamina a un matraz aforado de 100 ml, agregar 25 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N, mezclar y filtrar, descartando los primeros mililitros del filtrado. Transferir una porción del filtrado transparente, equivalente a 2,5 mg de pirimetamina, a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N y mezclar.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Pirimetamina SR-FA en ácido clorhídrico 0,1 N, diluir con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 10 µg por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 273 nm, con un espectrofotómetro, empleando ácido clorhídrico 0,1 N como blanco. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{13}ClN_4$ en cada Comprimido de Pirimetamina, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Proceder con los Comprimidos de Pirimetamina y la *Sustancia de referencia* según se indica en 710. *Sales de bases orgánicas nitrogenadas*, para *Solución muestra* y *Solución estándar*, respectivamente. Diluir 5,0 ml de la *Solución estándar* y 5,0 ml de la *Solución muestra* a 200,0 ml con ácido sulfúrico 0,5 N y determinar las absorbancias de ambas soluciones en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 273 nm. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{13}ClN_4$ en los Comprimidos de Pirimetamina, de acuerdo a la cantidad declarada.

PLATA, NITRATO DE SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Nitrato de Plata es una solución acuosa de *Nitrato de Plata*. Debe contener no menos de 0,95 por ciento y no más de 1,05 por ciento de AgNO_3 y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos para *Plata* <410> y *Nitratos* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 6,0.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Transferir 5,0 ml Solución Oftálmica de Nitrato de Plata exactamente medidos a un erlenmeyer, diluir con 20 ml de agua, agregar 1 ml de ácido nítrico, 1 ml de sulfato férrico amónico (SR) y titular con tiocianato de amonio 0,02 N (SV). Cada ml de tiocianato de amonio 0,02 N equivale a 3,397 mg de AgNO_3 .

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda:
“*Descartar una vez finalizado el tratamiento*”.

PRAZICUANTEL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Prazicuantel deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{19}H_{24}N_2O_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Prazicuantel SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N con 2,0 mg de lauril sulfato de sodio por ml; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Prazicuantel SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente diez veces la concentración de la solución en ensayo. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Medio* y mezclar.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio* si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{19}H_{24}N_2O_2$ disuelta a partir de la absorbancia en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 263 nm, comparando con la *Solución estándar*.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{19}H_{24}N_2O_2$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Prazicuantel*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Prazicuantel SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con *Fase móvil* hasta obtener una solución de aproximadamente 0,18 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Prazicuantel. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 150 mg de prazicuantel, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 70 ml de *Fase móvil*, sonicar durante 5 minutos, completar a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar. Transferir 3,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Prazicuantel*. Calcular la cantidad de $C_{19}H_{24}N_2O_2$ en los Comprimidos de Prazicuantel, de acuerdo a la cantidad declarada.

PREDNISOLONA, FOSFATO SÓDICO DE SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Fosfato Sódico de Prednisolona es una solución estéril de Fosfato Sódico de Prednisolona en un medio acuoso apropiado. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{27}Na_2O_8P$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Fosfato Sódico de Prednisolona SR-FA. Prednisolona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto, a una temperatura no mayor de 25°C.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica:

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. Cromatografía) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Butanol, ácido acético glacial y agua (60:20:20).

Solución estándar - Disolver una cantidad de Fosfato Sódico de Prednisolona SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Solución muestra - Diluir una porción de la Solución Oftálmica de Fosfato Sódico de Prednisolona con agua para obtener una solución de aproximadamente 1 mg por ml.

Solución mezcla - Mezclar volúmenes iguales de *Solución estándar* y *Solución muestra*.

Solución de resolución - Mezclar volúmenes iguales de *Solución estándar* y una solución de Fosfato Sódico de Betametasona en agua de aproximadamente 1 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 10 µl de cada una de las soluciones preparadas. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Calentar a 110 °C durante 10 minutos y examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta, a 254 nm: los valores de R_f de las manchas principales en los cromatogramas obtenidos a partir de la *Solución muestra*, la *Solución estándar* y la *Solución mezcla* se deben corresponder. El

cromatograma obtenido a partir de la *Solución de resolución* debe presentar dos manchas principales con valores de R_f muy similares.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

C - Transferir un volumen de la Solución Oftálmica de Fosfato Sódico de Prednisolona, equivalente a 0,2 mg de fosfato sódico de prednisolona, a un recipiente apropiado. Agregar lentamente 1 ml de ácido sulfúrico y dejar reposar durante 2 minutos: se debe desarrollar un color rojo.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 8,2.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Prednisolona libre

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de pH 5,0 y Fase móvil - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Prednisolona SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 4 µg por ml.

Solución muestra - Diluir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Fosfato Sódico de Prednisolona con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 100 µg de Fosfato Sódico de Prednisolona por ml.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. El área del pico correspondiente a prednisolona en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* no debe ser mayor que el área del pico principal obtenido a partir de la *Solución estándar* (4,0 %).

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 247 nm y una columna de 20 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Solución reguladora de pH 5,0 - Mezclar 48,5 ml de ácido cítrico 0,1 M y diluir a 100 ml con fosfato dibásico de sodio.

Fase móvil - *Solución reguladora de pH 5,0* y metanol (55:45). Filtrar y desgasificar. Hacer los

ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación madre del estándar - Pesar exactamente alrededor de 10 mg de Fosfato Sódico de Prednisolona SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver con agua, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Preparación estándar - Transferir 10 ml de la *Preparación madre del estándar* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Diluir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Fosfato Sódico de Prednisolona con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 10 µg de Fosfato Sódico de Prednisolona por ml.

Solución de resolución - Transferir 10 ml de la *Preparación madre del estándar* a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10 ml de una solución de *Fosfato Sódico de Betametasona* en agua de aproximadamente 100 µg por ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de fosfato sódico de betametasona y fosfato sódico de prednisolona no debe ser menor de 3,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{27}Na_2O_8P$ en la Solución Oftálmica de Fosfato Sódico de Prednisolona.

PREDNISONA

COMPRIMIDOS

Definición - Los comprimidos de Prednisona deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{21}H_{26}O_5$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Prednisona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad equivalente a 10 mg de prednisona a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un vaso de precipitados de 50 ml, agregar 10 ml de agua y mezclar para formar una suspensión. Transferir a una columna de 13 cm \times 3 cm con fase estacionaria constituida por tierra de diatomeas y dejar absorber aproximadamente 10 minutos. Eluir la columna con 60 ml de éter lavado con agua, evaporar el eluato en un baño de vapor hasta sequedad. Enjuagar el residuo con tres porciones de 20 ml de heptano y filtrar. Secar el residuo a 105 °C durante 30 minutos: los cristales deben responder a los *Ensayos de Identificación A y B* en *Prednisona*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; emplear 500 ml de medio para comprimidos cuyo valor declarado sea de 10 mg o menos de prednisona, y 900 ml de medio para más de 10 mg de prednisona.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{21}H_{26}O_5$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 242 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Prednisona SR-FA en el mismo medio. [NOTA: la *Solución estándar* puede ser preparada disolviendo la *Sustancia de referencia* en un volumen de alcohol que no exceda el 5 % del volumen final de la solución.]

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{21}H_{26}O_5$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Prednisona*.

Solución muestra - Reducir a polvo fino un Comprimido de Prednisona, transferir a un matraz aforado, diluir a volumen con metanol hasta obtener una solución de aproximadamente 0,2 mg por ml. Agregar 5 ml de agua, agitar y sonicar durante 1 minuto. Agregar un volumen de metanol igual a la mitad de la capacidad del matraz aforado y sonicar nuevamente durante 1 minuto. Completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución y 5,0 ml de la *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Filtrar y descartar los primeros 20 ml del filtrado.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración* en *Prednisona*. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{26}O_5$ en cada Comprimido de Prednisona, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Prednisona*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Prednisona. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 20 mg de prednisona, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 5 ml de agua, sonicar durante 1 minuto, agregar 50 ml de metanol, sonicar durante 1 minuto, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución y 5,0 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Filtrar y descartar los primeros 20 ml del filtrado.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración* en *Prednisona*. Calcular la cantidad de $C_{21}H_{26}O_5$ en los Comprimidos de Prednisona, de acuerdo a la cantidad declarada.

PRIMAQUINA, FOSFATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Fosfato de Primaquina deben contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{15}H_{21}N_3O \cdot 2H_3PO_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Fosfato de Primaquina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad equivalente a 25 mg de fosfato de primaquina a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Mezclar con 10 ml de agua durante 15 minutos y filtrar. Diluir 0,1 ml del filtrado con 1 ml de agua y agregar 1 gota de cloruro de oro (SR): se debe producir inmediatamente color violeta azulado. [NOTA: retener una porción del filtrado obtenido para el ensayo de *Identificación B*.]

B - Agregar al resto del filtrado obtenido en *Identificación A*, 5 ml de trinitrofenol (SR): se debe formar un precipitado amarillo. Lavar el precipitado con agua fría y secar a 105 °C durante 2 horas: el picrato funde entre 208 y 215 °C.

Precaución - Los picratos pueden estallar.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{15}H_{21}N_3O \cdot 2H_3PO_4$ disuelta, mediante la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Solución de 1-pentanosulfonato de sodio - Agregar aproximadamente 960 mg de 1-pentanosulfonato de sodio y 1 ml de ácido acético glacial a 400 ml de agua y mezclar.

Fase móvil - Metanol y *Solución de 1-pentanosulfonato de sodio* (60:40). Filtrar y

desgasificar. Hacer ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Preparar una solución de Fosfato de Primaquina SR-FA de concentración similar a la de las alícuotas en ensayo, en el mismo *Medio*

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 3,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μl) de las alícuotas filtradas y de la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{21}N_3O \cdot 2H_3PO_4$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Pesar y reducir a polvo fino un Comprimido de Fosfato de Primaquina, transferir a un vaso de precipitados, agregar 5 ml de ácido clorhídrico y alrededor de 25 g de hielo molido, luego agregar agua para completar a volumen total, aproximadamente 50 ml. Proceder según se indica en 730. *Titulación con nitritos*, comenzando donde dice: "*titular lentamente...*" y empleando como titulante nitrito de sodio 0,01 M (SV), recientemente preparado a partir de nitrito de sodio 0,1 M (SV). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada ml de nitrito de sodio 0,01 M equivale a 4,553 mg de $C_{15}H_{21}N_3O \cdot 2H_3PO_4$.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Pesar y reducir a polvo fino no menos de treinta Comprimidos. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 700 mg de fosfato de primaquina y transferir a un vaso de precipitados. Agregar 50 ml de agua y ácido clorhídrico suficiente para proporcionar un exceso de aproximadamente 5 ml y proceder según se indica en 730. *Titulación con nitritos*, comenzando donde dice: "*enfriar hasta aproximadamente 15 °C...*". Cada ml de nitrito de sodio 0,1 M equivale a 45,53 mg de $C_{15}H_{21}N_3O \cdot 2H_3PO_4$.

PROMETAZINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Prometazina es una solución estéril de *Clorhidrato de Prometazina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{20}N_2S \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Prometazina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

[NOTA: en todos los procedimientos siguientes, proteger las muestras, la *Sustancia de referencia* y las soluciones que las contengan, realizando los procedimientos rápidamente, bajo luz de baja intensidad o empleando material de vidrio inactínico].

Identificación

Agregar un volumen de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Prometazina, equivalente a 50 mg de clorhidrato de prometazina, a 20 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 1.000) dentro de una ampolla de decantación. Lavar la solución con una porción de 20 ml de cloruro de metileno, descartando el lavado. Agregar 2 ml de hidróxido de sodio 1 N y 20 ml de cloruro de metileno y agitar durante 2 minutos. Evaporar el extracto de cloruro de metileno en un baño de vapor hasta sequedad con la ayuda de una corriente de nitrógeno. Disolver el residuo en 4 ml de disulfuro de carbono, filtrar si fuera necesario y proceder según se indica en 490. *Identificación de bases orgánicas nitrogenadas*.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 5,5.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 5,0 Unidades de Endotoxina por mg de Clorhidrato de Prometazina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por grupos fenilo unidos químicamente a partículas porosas de sílice de 5 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 1,0 g de 1-pentanosulfonato de sodio en 500 ml de agua, agregar 500 ml de acetonitrilo y 5 ml de ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Prometazina SR-FA en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Prometazina, equivalente a 50 mg de clorhidrato de prometazina, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Disolver una cantidad apropiada de fenotiazina en la *Preparación estándar* para obtener una solución que contenga aproximadamente 10 μ g de fenotiazina por ml.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de prometazina y fenotiazina no debe ser menor de 3,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 30 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Los tiempos de retención relativos deben ser 1,0 para la prometazina y aproximadamente 1,6 para la fenotiazina. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{20}N_2S \cdot HCl$ en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Prometazina. De acuerdo a la cantidad declarada.

PROPRANOLOL, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Propranolol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Propranolol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de clorhidrato de propranolol a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, diluir a 20 ml con agua, filtrar, alcalinizar con hidróxido de sodio 1 N y extraer con tres porciones de 10 ml de éter. Lavar los extractos con agua hasta que esté libre de álcali, secar con sulfato de sodio anhidro, filtrar, evaporar el filtrado hasta sequedad y secar el residuo a 50 °C a 15 mm Hg durante aproximadamente 1 hora: el espectro de absorción infrarroja del residuo obtenido se debe corresponder con el de una preparación similar de Propranolol SR-FA.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: Ácido clorhídrico diluido (1 en 100); 1 litro.

Tiempo: 30 minutos.

Procedimiento - Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 290 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Propranolol SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Clorhidrato de Propranolol a un matraz aforado de 100 ml, agregar 5 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100) y dejar en reposo, agitar ocasionalmente por rotación, hasta que se desintegre. Agregar 70 ml de metanol y sonicar durante 1 minuto. Completar a volumen con metanol, mezclar y centrifugar una porción de esta solución. Diluir cuantitativamente una alícuota del sobrenadante transparente con metanol hasta obtener una solución de aproximadamente 40 µg de clorhidrato de propranolol por ml.

Solución estándar - Preparar una solución de Clorhidrato de Propranolol SR-FA en metanol de aproximadamente 40 µg por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 290 nm, con un espectrofotómetro, empleando metanol como blanco. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ en cada Comprimido de Clorhidrato de Propranolol, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación madre del estándar, Preparación estándar, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Clorhidrato de Propranolol*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Propranolol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de propranolol, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar 40 ml de metanol, agitar y sonicar durante 5 minutos. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Clorhidrato de Propranolol*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Propranolol, de acuerdo a la cantidad declarada.

PROPRANOLOL, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Solución Inyectable de Clorhidrato de Propranolol,
de acuerdo a la cantidad declarada.

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Propranolol es una solución estéril de *Clorhidrato de Propranolol en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Propranolol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 2,8 y 4,0.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 55,6 Unidades de Endotoxina por mg de Clorhidrato de Propranolol.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar del estándar, Preparación estándar, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Clorhidrato de Propranolol*.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Propranolol, equivalente a 5 mg de clorhidrato de propranolol, a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con metanol y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración en Clorhidrato de Propranolol*. Calcular la cantidad de $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ en la

QUINIDINA, SULFATO DE CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Sulfato de Quinidina están compuestas por sulfato de quinidina y sulfato de dihidroquinidina. Deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Sulfato de Quinidina calculada como $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Sulfato de Quinidina SR-FA. Quininona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de sulfato de quinidina obtenida a partir del contenido de las Cápsulas de Sulfato de Quinidina en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Mezclar con 10 ml de ácido sulfúrico diluido 1 en 350, agitar y filtrar: una dilución apropiada del filtrado debe presentar una fluorescencia azul intensa, la cual debe desaparecer con el agregado de unas pocas gotas de ácido clorhídrico.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

C - Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de sulfato de quinidina obtenida a partir del contenido de las Cápsulas de Sulfato de Quinidina en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Mezclar con ácido clorhídrico diluido 1 en 100, agitar y filtrar: debe responder a los ensayos para *Sulfato* <410>.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 248 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Sulfato de Quinidina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (Q) de la cantidad declarada de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido.

Diluyente - Ácido clorhídrico diluido 1 en 100.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Sulfato de Quinidina SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 40 µg por ml.

Solución muestra - Transferir el contenido de una Cápsula de Sulfato de Quinidina a un matraz aforado de 250 ml, agregar aproximadamente 175 ml de *Diluyente*. Agitar aproximadamente 30 minutos, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Filtrar una porción de la mezcla, descartando los primeros 20 ml del filtrado.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra*, diluida cuantitativamente, si fuera necesario, y la *Solución estándar*, en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 345 nm, con un espectrofotómetro apropiado, empleando agua como blanco. Calcular la cantidad de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ en cada Cápsula de Sulfato de Quinidina, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Pureza cromatográfica

Fase estacionaria, Fase móvil, Solución estándar, Solución estándar diluida, Solución de sustancias relacionadas, Revelador 1, Revelador 2 y Procedimiento - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica* en *Sulfato de Quinidina*.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 150 mg de sulfato de quinidina obtenida a partir del contenido de las Cápsulas de Sulfato de Quinidina en la *Preparación muestra* en *Valoración*, mezclar con 25 ml de alcohol diluido, agitar durante 10 minutos y filtrar. Emplear el filtrado como *Solución muestra*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución de ácido metanosulfónico, Solución de dietilamina, Fase móvil, Solución de aptitud de sistema, Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Límite de sulfato de dihidroquinidina* en *Sulfato de Quinidina*.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 20 mg de Sulfato de Quinidina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver

en *Fase móvil*, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación muestra - Extraer el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Sulfato de Quinidina y mezclar. Pesar una cantidad equivalente a 160 mg de sulfato de quinidina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 80 ml de metanol y agitar durante 30 minutos. Completar a volumen con metanol, filtrar y descartar los primeros 10 ml del filtrado. Transferir 3,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 25 ml, disolver, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ en las Cápsulas de Sulfato de Quinidina como la suma de las respuestas de los picos sulfato de quinidina y sulfato de dihidroquinidina obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*.

QUINIDINA, SULFATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Sulfato de Quinidina están compuestos por sulfato de quinidina y sulfato de dihidroquinidina. Deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Sulfato de Quinidina calculada como $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$, y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Sulfato de Quinidina SR-FA. Quininona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de sulfato de quinidina a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Mezclar con 10 ml de ácido sulfúrico diluido (1 en 350) y filtrar: debe presentar una fluorescencia azul intensa, la cual debe desaparecer con el agregado de unas pocas gotas de ácido clorhídrico.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

C - Pesar una cantidad equivalente a 100 mg de sulfato de quinidina a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Mezclar con ácido clorhídrico diluido (1 en 100) y filtrar: el filtrado debe responder a los ensayos para *Sulfato* <410>.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 248 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Sulfato de Quinidina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (*Q*) de la cantidad declarada de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido.

Diluyente - Ácido clorhídrico diluido (1 en 100).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Sulfato de Quinidina SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 40 µg por ml.

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino un Comprimido de Sulfato de Quinidina, transferir a un matraz aforado de 250 ml, agregar aproximadamente 175 ml de *Diluyente* y agitar aproximadamente 30 minutos. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Filtrar y descartar los primeros 20 ml del filtrado.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 345 nm, con un espectrofotómetro, empleando agua como blanco. Calcular la cantidad de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ en cada Comprimido de Sulfato de Quinidina, en base a la cantidad declarada.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Pureza cromatográfica

Fase estacionaria, Fase móvil, Solución de sustancias relacionadas, Revelador 1, Revelador 2, Solución estándar y Procedimiento - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica* en *Sulfato de Quinidina*.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 150 mg de sulfato de quinidina a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Agitar con 25 ml de alcohol diluido durante 10 minutos y filtrar.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución de ácido metanosulfónico, Solución de dietilamina, Fase móvil, Solución de aptitud de sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Límite de sulfato de dihidroquinidina* en *Sulfato de Quinidina*.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 20 mg de Sulfato de Quinidina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en *Fase móvil*, completar a volumen con la mismo solvente y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Sulfato de Quinidina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 160 mg de sulfato de quinidina, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 80 ml de

metanol y agitar durante 30 minutos. Completar a volumen con metanol, filtrar y descartar los primeros 10 ml del filtrado. Transferir 3,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 25 ml, disolver, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ en los Comprimidos de Sulfato de Quinidina como la suma de las respuestas de los picos sulfato de quinidina y sulfato de dihidroquinidina obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*.

QUININA, SULFATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Sulfato de Quinina están compuestos por sulfato de quinina y sulfato de dihidroquinina. Deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Sulfato de Quinina calculada como $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Sulfato de Quinina SR-FA. Quininona SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza cromatográfica*. El valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 20 mg de sulfato de quinina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Agitar con 10 ml de ácido clorhídrico diluido (1 en 100) y filtrar: el filtrado debe responder los ensayos para *Sulfato <410>*.

C - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 248 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Sulfato de Quinina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación
<740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido.

Diluyente - Ácido clorhídrico diluido (1 en 100).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Sulfato de Quinina SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 40 µg por ml.

Solución muestra - Reducir a polvo fino un Comprimido de Sulfato de Quinina, transferir a un matraz aforado de 250 ml, agregar aproximadamente 175 ml de *Diluyente* y agitar durante aproximadamente 30 minutos. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Filtrar y descartar los primeros 20 ml del filtrado.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 345 nm, con un espectrofotómetro, empleando agua como blanco. Calcular la cantidad de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ en cada Comprimido de Sulfato de Quinina, en base a la cantidad declarada.

Pureza cromatográfica

Fase estacionaria, Fase móvil, Solución de sustancias relacionadas, Revelador 1, Revelador 2, Solución estándar y Procedimiento - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica* en *Sulfato de Quinina*.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 150 mg de sulfato de quinina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Agitar con 25 ml de alcohol diluido durante aproximadamente 10 minutos y filtrar.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución de ácido metanosulfónico, Solución de dietilamina, Fase móvil, Solución de aptitud de sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Límite de sulfato de dihidroquinona* en *Sulfato de Quinina*.

Preparación estándar - Pesarse exactamente alrededor de 20 mg de Sulfato de Quinina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en *Fase móvil*, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Preparación muestra - Pesarse y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Sulfato de Quinina. Pesarse una cantidad equivalente a 160 mg de sulfato de quinina, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 80 ml de metanol y agitar

durante 30 minutos. Completar a volumen con metanol, filtrar y descartar los primeros 10 ml del filtrado. Transferir 3,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 25 ml, disolver, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ en los Comprimidos de Sulfato de Quinina como la suma de las respuestas de los picos sulfato de quinina y sulfato de dihidroquinina obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*.

RANITIDINA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Ranitidina deben contener el equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de ranitidina ($C_{13}H_{22}N_4O_3S$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Ranitidina SR-FA. Impureza A de Ranitidina SR-FA: hemifumarato de 5-[[2-aminoetil]tio]metil]-*N,N*-dimetil-2-furanmetanamina. Impureza C de Ranitidina SR-FA: *N*-[2-[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]sulfonil]etil]-*N*-metil-2-nitro-1,1-etenodiamina.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza cromatográfica*. El valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

C - Pesar y reducir a polvo fino un Comprimido de Clorhidrato de Ranitidina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de clorhidrato de ranitidina, agitar con 2 ml de agua y filtrar: el filtrado debe responder a los ensayos para *Cloruro* <410>.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{13}H_{22}N_4O_3S$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 314 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Ranitidina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{13}H_{22}N_4O_3S$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Pureza cromatográfica

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, alcohol isopropílico, hidróxido de amonio y agua (25:15:5:1).

Solución muestra - Agitar una cantidad de los Comprimidos de Clorhidrato de Ranitidina en un volumen apropiado de metanol para que se desintegren completamente y filtrar. Preparar una solución en metanol de aproximadamente 20 mg por ml (equivalente a 22,4 mg de clorhidrato de ranitidina por ml).

Solución estándar - Pesar exactamente una cantidad Clorhidrato de Ranitidina SR-FA y disolver en metanol para obtener una solución de aproximadamente 0,22 mg por ml.

Solución estándar diluida A - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con metanol para obtener una solución de aproximadamente 110 µg por ml.

Solución estándar diluida B - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con metanol para obtener una solución de aproximadamente 66 µg por ml.

Solución estándar diluida C - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con metanol para obtener una solución de aproximadamente 22 µg por ml.

Solución estándar diluida D - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con metanol para obtener una solución de aproximadamente 11 µg por ml.

Solución de resolución - Disolver una cantidad de Impureza A de Ranitidina SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 1,27 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de la *Solución muestra*, 10 µl de la *Solución estándar* y 10 µl de las *Soluciones estándar diluidas A, B, C y D*. Además, aplicar por separado sobre la misma placa 10 µl de la *Solución muestra* y sobre esta aplicación 10 µl de la *Solución*

de resolución. Dejar secar las aplicaciones. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Exponer la placa a vapores de yodo en una cámara cerrada hasta que el cromatograma se revele completamente. Examinar la placa y comparar las intensidades de cualquier mancha secundaria observada en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* con las intensidades de las manchas principales en los cromatogramas obtenidos con la *Solución estándar* y las *Soluciones estándar diluidas A, B, C y D*: el ensayo sólo es válido si existe resolución *R* completa entre las manchas primarias en el cromatograma de la *Solución muestra* combinada con la de *Solución de resolución* y si se observa una mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar diluida D*. Ninguna mancha secundaria debe presentar mayor intensidad que la de la *Solución estándar diluida A* (0,5 %) y ninguna otra mancha secundaria debe ser más intensa que la de la *Solución estándar diluida B* (0,3 %). La suma de las intensidades de todas las manchas secundarias obtenidas a partir de la *Solución muestra* no debe ser mayor de 2,0 %.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 322 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y acetato de amonio acuoso 0,1 M (85:15). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de aptitud del sistema - Disolver cantidades exactamente pesadas de Clorhidrato de Ranitidina SR-FA e Impureza C de Ranitidina en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,112 mg por ml y 0,01 mg por ml, respectivamente.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Ranitidina SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 0,112 mg por ml (equivalente 0,100 mg de ranitidina base).

Preparación muestra - Transferir diez Comprimidos de Clorhidrato de Ranitidina a un matraz aforado de 250 ml, agregar *Fase móvil* y agitar hasta que los comprimidos se hayan desintegrado

completamente. Completar a volumen con *Fase móvil* y filtrar. Diluir el filtrado con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración similar a la *Preparación estándar*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de ranitidina e impureza C de ranitidina no debe ser menor de 1,5. Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico de clorhidrato de ranitidina no debe ser mayor de 2; la eficiencia de la columna no debe ser menor de 700 platos teóricos; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de C₁₃H₂₂N₄O₃S en los Comprimidos de Clorhidrato de Ranitidina, de acuerdo a la cantidad declarada.

RANITIDINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Ranitidina es una solución estéril de *Clorhidrato de Ranitidina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de ranitidina ($C_{13}H_{22}N_4O_3S$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Ranitidina SR-FA. Impureza A de Ranitidina SR-FA: hemifumarato de 5-[[[2-aminoetil]tio]metil]-*N,N*-dimetil-2-furanmetanamina]. Impureza C de Ranitidina SR-FA: [*N*-[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil] sulfínil]etil]-*N*-metil-2-nitro-1,1-etenodiamina].

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I. Almacenar a una temperatura por debajo de 30 °C. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza cromatográfica*. El valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Pureza cromatográfica

Fase estacionaria, Fase móvil y Solución de resolución - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica en Comprimidos de Clorhidrato de Ranitidina*.

Solución muestra - Diluir cuantitativamente la Solución Inyectable de Clorhidrato de Ranitidina con agua, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 25 mg de ranitidina por ml.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Ranitidina SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 0,56 mg por ml.

Solución estándar diluida A - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución*

estándar con agua para obtener una solución de aproximadamente 280 µg por ml.

Solución estándar diluida B - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con agua para obtener una solución de aproximadamente 140 µg por ml.

Solución estándar diluida C - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con agua para obtener una solución de aproximadamente 84 µg por ml.

Solución estándar diluida D - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con agua para obtener una solución de aproximadamente 28 µg por ml.

Solución estándar diluida E - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con agua para obtener una solución de aproximadamente 14 µg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de la *Solución estándar*, 10 µl de las *Soluciones estándar diluidas A, B, C, D y E* y el volumen requerido de *Solución muestra*, equivalente a 250 µg de ranitidina. Además, aplicar por separado una carga adicional del mismo volumen de la *Solución muestra* sobre la misma placa y sobre ésta, aplicar 10 µl de la *Solución de resolución*. Dejar secar las aplicaciones. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Exponer la placa a vapores de yodo en una cámara cerrada hasta que el cromatograma se revele completamente. Examinar la placa y comparar las intensidades de cualquier mancha secundaria observada en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* con las intensidades de las manchas principales en los cromatogramas obtenidos con la *Solución estándar* y las *Soluciones estándar diluidas A, B, C, D y E*: el ensayo sólo es válido si existe resolución *R* completa entre las manchas primarias de la *Solución muestra* combinada con la *Solución de resolución* y si se observa una mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar diluida E*. Ninguna mancha secundaria debe presentar mayor intensidad que la de la mancha principal obtenida con la *Solución estándar* (2,0 %) y ninguna otra mancha secundaria debe ser mayor en tamaño o intensidad que la mancha principal obtenida con la *Solución estándar diluida A* (1,0 %). La suma de las intensidades de todas las manchas secundarias obtenidas a partir de la *Solución muestra* no debe ser mayor de 5,0 %.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 6,7 y 7,3.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 7,00 Unidades de Endotoxina por mg de ranitidina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en Valoración en Comprimidos de Clorhidrato de Ranitidina.

Preparación muestra - Diluir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Ranitidina con Fase móvil, cuantitativamente y en etapas si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg de ranitidina por ml.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la Preparación estándar y la Preparación muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{13}H_{22}N_4O_3S$ en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Ranitidina, de acuerdo a la cantidad declarada.

RANITIDINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Clorhidrato de Ranitidina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de ranitidina ($C_{13}H_{22}N_4O_3S$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Ranitidina SR-FA. Impureza A de Ranitidina SR-FA: hemifumarato de [5-[[2-(aminoetil)tio]metil]-N,N-dimetil-2-fumaranmetanamina.

Impureza B de Ranitidina SR-FA: [N,N'-bis[2-[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]tio]etil]-2-nitro-1,1-etenediamina.

Impureza C de Ranitidina SR-FA: N-[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]sufinil]etil]-N'-metil-2-nitro-1,1-etendiamina

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto. Conservar a 25 °C, evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza cromatográfica*. El valor de R_f de la mancha principal obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,7 y 7,5.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles<90>

Debe cumplir con los requisitos del ensayo para la ausencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* y el recuento aerobios viables no debe ser mayor de 100 ufc.

Pureza cromatográfica

Fase estacionaria, Fase móvil y Solución de resolución - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica* en *Comprimidos de Clorhidrato de Ranitidina*.

Diluyente - Metanol y agua (50:50).

Solución muestra - Diluir cuantitativamente la Solución Oral de Clorhidrato de Ranitidina con *Diluyente*, si fuera necesario, para obtener una solu-

ción de aproximadamente 10 mg de ranitidina por ml.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Ranitidina SR-FA *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 448 µg por ml.

Solución estándar diluida A - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 224 µg por ml.

Solución estándar diluida B - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 112 µg por ml.

Solución estándar diluida C - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 56 µg por ml.

Solución estándar diluida D - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 22 µg por ml.

Solución estándar diluida E - Diluir cuantitativamente una porción de la *Solución estándar* con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 11 µg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de la *Solución estándar*, 10 µl de las *Soluciones estándar diluidas A, B, C, D y E* y 20 µl de la *Solución muestra*. Además, aplicar por separado 10 µl de la *Solución muestra* y sobre ésta, aplicar 10 µl de la *Solución de resolución*. Dejar secar las aplicaciones. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Exponer la placa a vapores de yodo en una cámara cerrada hasta que el cromatograma se revele completamente. Examinar la placa y comparar las intensidades de cualquier mancha secundaria observada en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* con las intensidades de las manchas principales en los cromatogramas obtenidos con la *Solución estándar* y las *Soluciones estándar diluidas A, B, C, D y E*: el ensayo sólo es válido si existe resolución *R* completa entre las manchas primarias de la *Solución muestra* combinada con la *Solución de resolución* y si se observa una mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar diluida E*. Ninguna mancha secundaria debe presentar mayor intensidad que la de la mancha principal obtenida con la *Solución estándar* (2,0 %) y ninguna otra mancha secundaria debe ser mayor en tamaño o intensidad que la mancha principal obtenida con la *Solución estándar diluida A* (1,0 %). La

suma de las intensidades de todas las manchas secundarias obtenidas a partir de la *Solución muestra* no debe ser mayor de 5,0 %.

VALORACIÓN

Fase móvil, Solución de aptitud del sistema, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Comprimidos de Clorhidrato de Ranitidina*.

Sistema cromatográfico - Proceder según se indica en *Sistema cromatográfico en Valoración en Comprimidos de Clorhidrato de Ranitidina*, excepto que debe emplearse una precolumna rellena con fase estacionaria también constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro.

Preparación muestra - Diluir una cantidad exactamente pesada de la Solución Oral de Clorhidrato de Ranitidina, cuantitativamente y en etapas si fuera necesario, con *Fase móvil* para obtener una solución de 0,1 mg de ranitidina por ml.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ en la Solución Oral de Clorhidrato de Ranitidina, de acuerdo a la cantidad declarada.

RIFAMPICINA

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Rifampicina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Rifampicina SR-FA. Quinona de Rifampicina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo y metanol (90:10).

Solución estándar - Disolver una cantidad apropiada de Rifampicina SR-FA en cloroformo para obtener una solución de aproximadamente 10 mg por ml.

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de rifampicina a partir del contenido de las Cápsulas de Rifampicina obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, mezclar con 5 ml de cloroformo y filtrar.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 3 μ l de la *Solución muestra* y 3 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar la placa, localizando las manchas rojas: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se deben corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con

Medio, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 475 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Rifampicina SR-FA, en el mismo medio, mantenida a 37 °C.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para la uniformidad de contenido.

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de fosfato de pH 3,1, Fase móvil, Diluyente 1, Diluyente 2 y Solución de Resolución - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Proceder según se indica en *Preparación estándar* en *Valoración*.

Solución muestra - Transferir el contenido de una Cápsula de Rifampicina a un matraz aforado para obtener una solución de aproximadamente 1,5 mg de rifampicina por ml. Lavar la cubierta de la Cápsula de Rifampicina con una pequeña cantidad de *Diluyente 1* y agregar el lavado obtenido al matraz. Agregar *Diluyente 1* hasta cuatro quintos del volumen del matraz. Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*, comenzando donde dice: "sonicar durante aproximadamente 5 minutos..."

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*. Calcular la cantidad de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ en cada Cápsula de Rifampicina, en base a la cantidad declarada.

Pérdida por secado <680>

Secar aproximadamente 100 mg del contenido de las Cápsulas de Rifampicina al vacío a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 3,0 % de su peso.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 10 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato de pH 3,1 - Transferir 136,1 g de fosfato monobásico de potasio a un matraz aforado de 1 litro. Disolver en 500 ml de agua y agregar 6,3 ml de ácido fosfórico. Completar a volumen con agua y mezclar (pH 3,1±0,1).

Fase móvil - Agua, acetonitrilo, *Solución reguladora de fosfato de pH 3,1*, ácido cítrico 1,0 M y perclorato de sodio (51:35:10:2:2). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente 1 - Acetonitrilo y metanol (1:1).

Diluyente 2 - Agua, acetonitrilo, fosfato dibásico de sodio 1,0 M, fosfato monobásico de potasio y ácido cítrico 1,0 M (640:250:77:23:10).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Rifampicina SR-FA en *Diluyente 1* para obtener una solución de aproximadamente 1,5 mg por ml, sonicar, si fuera necesario, para asegurar la disolución. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar. [NOTA: emplear esta solución dentro de las 5 horas de su preparación.]

Preparación estándar diluida - Transferir 5,0 ml de *Preparación estándar* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente 2* y mezclar. La solución obtenida contiene aproximadamente 0,03 mg de Rifampicina SR-FA por ml. [NOTA: Inyectar la *Preparación estándar diluida* en el cromatógrafo entre 30 y 60 segundos luego de su preparación.]

Preparación muestra - Extraer el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Rifampicina y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 300 mg de rifampicina, transferir a un matraz aforado de 200 ml y agregar aproximadamente 180 ml de *Diluyente 1*. Sonicar durante aproximadamente 5 minutos, dejar equilibrar a temperatura ambiente, completar a volumen con *Diluyente 1* y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con acetonitrilo y mezclar. [NOTA: emplear esta solución dentro de las 5 horas de su preparación.] Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente 2* y mezclar. [NOTA: inyectar la *Preparación muestra* en el cromatógrafo entre 30 y 60 segundos luego de su preparación.]

Solución de resolución - Disolver una cantidad exactamente pesada de Quinona de Rifampicina SR-FA en *Diluyente 1* para obtener una solución de aproximadamente 0,1 mg por ml. Transferir 1,5 ml de esta solución y 5,0 ml de *Preparación estándar* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,6 para quinona de rifampicina y 1,0 para rifampicina; la resolución *R* entre los picos de quinona de rifampicina y rifampicina no debe ser menor de 4,0. Cromatografiar la *Preparación estándar diluida* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 1,0%.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de C₄₃H₅₈N₄O₁₂ en las Cápsulas de Rifampicina, de acuerdo a la cantidad declarada.

RIFAMPICINA

PARA INYECCIÓN

Definición - La Rifampicina para Inyección debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias	de	referencia	-
Rifampicina SR-FA.		Quinona	de
Rifampicina SR-FA.			

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo y metanol (90:10).

Solución muestra - Disolver el contenido de un envase de Rifampicina para Inyección en cloroformo para obtener una solución de aproximadamente 10 mg por ml.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Rifampicina SR-FA en cloroformo para obtener una solución de aproximadamente 10 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 3 μ l de la *Solución muestra* y 3 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore: el valor de *R_f* de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico de principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 1,0 %.

Determinación del pH <250>

Entre 7,8 y 8,8; determinado sobre una solución de aproximadamente 60 mg por ml.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Disolver Rifampicina para Inyección en *Agua para Inyectables* para obtener una solución de aproximadamente 10 mg por ml. Diluir esta solución cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con *Agua para Inyectables* para obtener una solución de aproximadamente 0,12 mg de rifampicina por ml: debe contener menos de 0,5 Unidades de Endotoxina por mg de Rifampicina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica en *Método de filtración por membrana*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos para inyectables de pequeño volumen.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de fosfato, Fase móvil, Diluyente, Preparación estándar, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Rifampicina*.

Preparación muestra 1 (cuando se presenta en envases monodosis) - Reconstituir un envase de Rifampicina para Inyección en un volumen exactamente medido de agua, correspondiente al volumen de diluyente especificado en el rótulo [NOTA: emplear esta solución dentro de las 2 horas de preparación]. Retirar todo el contenido extraíble y transferir a un matraz aforado de capacidad apropiada para que al diluir a volumen con acetonitrilo, se obtenga una solución de aproximadamente 6 mg por ml. [NOTA: emplear esta solución madre dentro de las 5 horas de preparación]. Diluir un volumen exactamente medido de esta solución madre cuantitativamente y en etapas con *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 0,02 mg de rifampicina por ml. [NOTA: preparar esta solución inmediatamente antes de su inyección].

Preparación muestra 2 (cuando en el rótulo se indique la cantidad de Rifampicina en un volumen dado de solución reconstituida) - Reconstituir un envase de Rifampicina para Inyección en un volumen exactamente medido de agua, equivalente al volumen de diluyente especificado en el rótulo. [NOTA: emplear esta solución dentro de las 2 horas de preparación]. Diluir un volumen exactamente medido de la solución reconstituida cuantitativamente y en etapas con acetonitrilo para obtener una solución de aproximadamente 0,2 mg de rifampicina por ml. [NOTA: emplear esta

solución madre dentro de las 5 horas de preparación]. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. [NOTA: preparar esta solución inmediatamente antes de su inyección].

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Rifampicina*. Calcular la cantidad de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ en la Rifampicina para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

RINGER LACTATO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición – La Solución Inyectable Ringer Lactato es una solución estéril de Cloruro de Sodio, Cloruro de Potasio, Cloruro de Calcio Dihidrato y Lactato de Sodio en *Agua para Inyectables*, en envases monodosis no mayores a 1 litro, esterilizada en su envase final. Debe contener 0,6 % de Cloruro de sodio, 0,03 % de Cloruro de Potasio, 0,02 % de Cloruro de Calcio Dihidrato y 0,31 % de Lactato de sodio. No debe contener conservantes ni otras sustancias agregadas.

Debe contener cada 100 ml no menos de 285,0 mg y no más de 315,0 mg de sodio (Na^+ como NaCl y $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$), no menos de 14,2 mg y no más de 17,3 mg de potasio (K^+ equivalentes a no menos de 27,0 mg y no más de 33,0 mg de KCl), no menos de 4,90 mg y no más de 6,00 mg de calcio (Ca^{+2} equivalentes a no menos de 18,0 mg y no más de 22,0 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), no menos de 368,0 mg y no más de 408,0 mg de cloruro (como NaCl, KCl, y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y no menos de 231,0 mg y no más de 261,0 mg de lactato ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^-$ equivalentes a no menos de 290,0 mg y no más de 330,0 mg de $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$). Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

[NOTA: Los contenidos de iones calcio, potasio, sodio, cloruro y lactato de la Solución Inyectable de Ringer Lactato son aproximadamente 2,7; 4; 130; 109,3 y 27,4 miliequivalentes por litro, respectivamente.]

Sustancia de Referencia - Lactato de Sodio SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de vidrio Tipo I o Tipo II o de plástico.

ENSAYOS

Identificación

Responde a los ensayos para *Sodio, Potasio, Calcio, Cloruro y Lactato* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 6,0 y 7,5.

Límite de metales pesados <590>

Método I. Evaporar 67 ml de Solución Inyectable Ringer Lactato a un volumen de aproximadamente 20 ml, agregar 2 ml de ácido acético 1 N y diluir a 25 ml con agua. El límite es 0,3 ppm.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,5 Unidades de Endotoxina por ml.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Para calcio

Transferir 50,0 ml exactamente medidos de Solución Inyectable Ringer Lactato a un erlenmeyer, agregar 5 ml de hidróxido de sodio (SR), 0,05 g de azul de hidroxinaftol y titular con edetato disódico 0,01 M (SV). Cada ml de edetato disódico 0,01 M equivale a 1,4701 mg de Cloruro de Calcio Dihidrato.

Para potasio

Preparación madre del estándar - Pesar exactamente alrededor de 191 mg de cloruro de potasio, previamente secado a 105 °C durante 2 horas. Transferir a un matraz aforado de 1 litro, disolver con 50 ml de agua, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Cada ml de esta solución contiene 100 µg de potasio.

Preparaciones estándar - Pesar exactamente alrededor de 1,093 g de cloruro de sodio, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver y completar a volumen con agua. Transferir 5 porciones de 10,0 ml de esta solución a sendos matraces aforados de 100 ml conteniendo 10 ml de un agente humectante no iónico (1:500). Completar a volumen con agua uno de los matraces para obtener un blanco. A los matraces restantes, agregar 5,0; 10,0; 15,0 y 20,0 ml, de *Preparación madre del estándar*, respectivamente, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Transferir 10,0 ml de Solución Inyectable Ringer Lactato a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10,0 ml de un agente humectante no iónico (1:500), completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento – Emplear un fotómetro de llama a la longitud de onda de máxima transmitancia, 766 nm. Ajustar el equipo a transmitancia cero con el blanco y a transmitancia 100% con la *Preparación estándar* más concentrada. Determinar las transmitancias del resto de las *Preparaciones estándar*, realizar un gráfico de transmitancia en función de la concentración de potasio y calcular la recta que mejor se ajuste. Determinar el porcentaje de transmitancia de la *Preparación muestra* y calcular el contenido de potasio en mg por 100 ml en la Solución Inyectable Ringer Lactato.

Para Sodio

Preparación madre del estándar - Pesar exactamente alrededor de 254 mg de cloruro de sodio, previamente secado a 105 °C durante 2 horas. Transferir a un matraz aforado de 1 litro, disolver en 50 ml de agua, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Cada ml de esta solución contiene 100 µg de sodio.

Preparaciones estándar - Transferir cinco porciones de 10,0 ml de una solución de un agente humectante no iónico (1 en 500) a sendos matraces aforados de 100 ml. Completar a volumen con agua uno de los matraces para obtener un blanco y mezclar. A los matraces restantes agregar 5,0; 10,0; 15,0 y 20,0 ml de *Preparación madre del estándar*, respectivamente, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Transferir 5,0 ml de Solución Inyectable Ringer Lactato a un matraz aforado de 1 litro, agregar 100 ml de una solución de un agente humectante no iónico (1 en 500), completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento – Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración Para Potasio*, ajustando el fotómetro de llama a la longitud de onda de máxima transmitancia, 589 nm. Calcular el contenido de sodio en mg por 100 ml en la Solución Inyectable Ringer Lactato.

Para cloruro

Transferir 10,0 ml de Solución Inyectable Ringer Lactato a un erlenmeyer, agregar agua hasta 50 ml. Titular con nitrato de plata 0,1 N (SV), determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de nitrato de plata 0,1 N equivale a 3,545 mg de cloruro.

Para Lactato

Sistema cromatográfico (ver <100> Cromatografía) - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 210 nm y una columna de 10 cm x 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1 ml por minuto.

Fase móvil - Transferir 1 ml de ácido fórmico y 1 ml de diclohexilamina a un matraz aforado de 1 litro y completar a volumen con agua. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes

necesarios (ver *Aptitud del sistema* en <100>. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Lactato de sodio SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 3 mg por ml.

Preparación muestra - Emplear la Solución Inyectable Ringer Lactato.

Solución de aptitud del sistema - Disolver cantidades adecuadas de acetato de sodio anhidro y Lactato de sodio SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 3 mg de cada una por ml.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía)- Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de acetato y lactato no debe ser menor de 2. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar la respuesta de los picos según se indica en *procedimiento*: el factor de asimetría para el pico del analito no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad *L* de lactato (C₃H₅O₃⁻) en mg cada 100 ml en la Solución Inyectable Ringer Lactato por la siguiente fórmula:

$$L = C \times (89,1 / 112,1) \times (r_M/r_E) \times 100$$

donde *C* es la concentración en mg por ml de Lactato de sodio SR-FA en la *Preparación estándar*, 89,07 y 112,06 son los pesos moleculares de lactato (C₃H₅O₃⁻) y lactato de sodio anhidro (C₃H₅O₃Na), respectivamente, y *r_M* y *r_E* son las respuestas de los picos de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la concentración osmolar total en mOsmoles por litro. Cuando el volumen de Solución Inyectable Ringer Lactato sea menor a 100 ml el rótulo puede indicar la concentración osmolar total en mOsmoles por ml.

RINGER

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición – La Solución Inyectable Ringer es una solución estéril de Cloruro de sodio, Cloruro de Potasio y Cloruro de Calcio Dihidrato en *Agua para Inyectables* en envases monodosis no mayores a 1 litro, esterilizada en su envase final. Debe contener 0,860 % p/v de Cloruro de Sodio, 0,030 % p/v de Cloruro de Potasio y 0,033 % p/v de Cloruro de Calcio Dihidrato. No debe contener conservantes ni otras sustancias agregadas.

Debe contener cada 100 ml no menos de 323,0 mg y no más de 354,0 mg de Sodio; no menos de 14,9 mg y no más de 16,5 mg de Potasio; no menos de 8,2 mg y no más de 9,8 mg de Calcio; y no menos de 523,0 mg y no más de 580,0 mg de Cloruro. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

[NOTA: los contenidos de iones de calcio, cloruro, potasio y sodio de Solución Inyectable Ringer son aproximadamente 4,5; 156,0; 4,0 y 147,5 miliequivalentes por litro, respectivamente].

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de plástico (ver 420. *Envases primarios de plástico*) o de vidrio Tipo I o II.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos para *Sodio, Potasio, Calcio y Cloruro* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,5.

Límite de metales pesados <590>

Evaporar 67 ml de Solución Inyectable Ringer a un volumen de aproximadamente 20 ml, agregar 2 ml de ácido acético 1 N y diluir a 25 ml con agua. Proceder según se indica en *Método I*. El límite es 0,3 ppm.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,5 Unidades de Endotoxina por ml.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Para calcio

Transferir 50,0 ml exactamente medidos de Solución Inyectable Ringer a un erlenmeyer, agregar 5 ml de hidróxido de sodio 2 M y 0,05 g de indicador azul de hidroxinaftol (SR).

Titular con EDTA disódico 0,01 M (SV) hasta viraje del indicador de rojo púrpura al azul neto. Cada ml de la solución valorada de EDTA disódico 0,01 M es equivalente a 1,4701 mg de Cloruro de Calcio dihidrato.

Para potasio

Preparación madre del estándar – Transferir 190,7 mg de cloruro de potasio, previamente secado a 105 °C durante 2 horas, a un matraz aforado de 1 litro. Disolver en 50 ml de agua, diluir a volumen con el mismo solvente y mezclar. Cada ml de esta solución contiene 100 µg de potasio.

Preparaciones estándar – Transferir 1,093 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 100 ml, disolver y completar a volumen con agua. Transferir 10,0 ml de esta solución a cada uno de cinco matraces aforados de 100 ml conteniendo 10,0 ml de una solución de Octoxinol 9 (1:500). Completar a volumen con agua, el contenido de uno de los matraces para tener un blanco. A los matraces restantes agregar, respectivamente, 5,0; 10,0; 15,0; y 20,0 ml de *Preparación madre del estándar*, diluir a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra – Transferir 10,0 ml de Solución Inyectable Ringer a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10,0 ml de una solución de Octoxinol 9 (1:500), diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento – Emplear un fotómetro de llama a la longitud de onda de máxima transmitancia para potasio, 766 nm. Ajustar el equipo a transmitancia cero con el blanco y a transmitancia 100 % con la *Preparación estándar* más concentrada. Determinar las transmitancias del resto de las *Preparaciones estándar*, realizar un gráfico de transmitancia en función de la concentración de potasio y trazar la recta que mejor se ajuste. Determinar el porcentaje de transmitancia de la *Preparación muestra* y calcular el contenido de potasio en mg por 100 ml en la Solución Inyectable Ringer.

Para sodio

Preparación madre del estándar – Transferir 254,2 mg de cloruro de sodio, previamente secado a 105 °C durante 2 horas, a un matraz aforado de 1 litro. Disolver en 50 ml de agua, diluir a volumen con el mismo solvente y mezclar. Cada ml de esta solución contiene 100 µg de sodio.

Preparaciones estándar – Transferir 10,0 ml de una solución de Octoxinol 9 (1:500) a cada uno de cinco matraces aforados de 100 ml. Completar a

volumen con agua, el contenido de uno de los matraces para tener un blanco. A los matraces restantes agregarles, respectivamente, 5,0; 10,0; 15,0; y 20,0 ml de *Preparación madre del estándar*, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra – Transferir 5,0 ml de Solución Inyectable Ringer a un matraz aforado de 1 litro, agregar 100,0 ml de una solución de Octoxinol 9 (1:500), completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento – Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración para potasio*, ajustando el fotómetro de llama a la longitud de onda de máxima transmitancia para sodio, 589 nm. Calcular el contenido de sodio en mg por 100 ml de Solución Inyectable Ringer.

Para cloruro

Transferir 10,0 ml de Solución Inyectable Ringer a un erlenmeyer, agregar agua hasta 50 ml. Titular con nitrato de plata 0,1 N (SV) determinando potenciométricamente el punto final. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de nitrato de plata 0,1 N equivale a 3,545 mg de Cl.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la concentración osmolar total en mOsmoles por litro. Cuando el volumen de Solución Inyectable Ringer sea menor a 100 ml, el rótulo puede indicar la concentración osmolar total en mOsmoles por ml.

SALBUTAMOL

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Salbutamol deben contener una cantidad de Sulfato de Salbutamol $[C_{13}H_{21}NO_3]_2 \cdot H_2SO_4$ equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Salbutamol ($C_{13}H_{21}NO_3$) y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Salbutamol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 4 mg de salbutamol a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Agitar con 10 ml de agua y filtrar: el filtrado debe responder a los ensayos para *Sulfato* <410>.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 500 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{13}H_{21}NO_3$ disuelto mediante la técnica siguiente.

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución muestra - Emplear las alícuotas filtradas.

Solución estándar - Diluir la *Preparación estándar* obtenida en *Valoración*, si fuera necesario, con una mezcla de agua y metanol (6:4) para obtener una solución con una concentración de Sulfato de Salbutamol SR-FA similar a la *Solución muestra*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{13}H_{21}NO_3$ disuelta comparando la respuesta del pico principal obtenido a partir de la *Solución*

muestra con la respuesta del pico principal obtenida a partir de la *Solución estándar*

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{13}H_{21}NO_3$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Sustancias relacionadas

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, 2-propanol, agua y amoníaco (50:30:16:5).

Solución estándar - Disolver una porción de Sulfato de Salbutamol SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 100 μ g por ml.

Solución madre de la muestra - Pesar exactamente una cantidad equivalente 10 mg de salbutamol partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, a un recipiente apropiado. Transferir a un recipiente apropiado, agregar 30 ml de alcohol diluido (1 en 2), agitar durante 30 minutos y filtrar. Lavar el filtro con porciones pequeñas de alcohol, combinando los lavados con el filtrado. Evaporar hasta sequedad bajo presión reducida. Disolver el residuo en 0,5 ml de agua.

Solución muestra - Diluir un volumen de la *Solución madre de la muestra* a 200 volúmenes con agua.

Revelador 1 - Solución al 0,1 % de clorhidrato de metilbenzotiazolona-hidrazona en metanol 90 %.

Revelador 2 - Solución al 2 % de hexacianoferrato de potasio en una mezcla de agua y amoníaco 18 M (3:1).

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 5 μ l de la *Solución madre de la muestra*, la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1* y secar durante 10 minutos. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 2* y nuevamente con *Revelador 1*. Ninguna mancha secundaria en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución madre de la muestra* debe ser más intensa que la obtenida a partir de la *Solución muestra* (0,5 %).

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,9 ml por minuto.

Solución de hexanosulfonato de sodio - Disolver 565 mg de 1-hexanosulfonato de sodio en 600 ml de agua. Agregar 6 ml de ácido acético glacial y mezclar.

Fase móvil - *Solución de hexanosulfonato de sodio* y metanol (57:43). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del Sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 24 mg de Sulfato de Salbutamol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 60 ml de ácido acético glacial al 1,0 %, sonicar durante 10 minutos, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Salbutamol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 10 mg de salbutamol, transferir a un matraz aforado de 50 ml. Agregar 30 ml de ácido acético glacial al 1,0 %, agitar durante 45 minutos y sonicar durante 10 minutos. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna determinada a partir del pico de salbutamol no debe ser menor a 800 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de C₁₃H₂₁NO₃ en los Comprimidos de Salbutamol, de acuerdo a la cantidad declarada.

SALBUTAMOL

SOLUCIÓN PARA NEBULIZAR

Definición - La Solución para Nebulizar de Salbutamol es una solución de *Sulfato de Salbutamol en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Salbutamol ($C_{13}H_{21}NO_3$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfato de Salbutamol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Diluir una porción de la Solución para Nebulizar de Salbutamol, cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, con agua para obtener una solución de aproximadamente 250 µg de salbutamol por ml. La solución así obtenida debe responder a los ensayos para *Sulfato <410>*.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 5,0.

Sustancias relacionadas

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, 2-propanol, agua y amoníaco (50:30:16:5).

Solución estándar - Disolver una porción de Sulfato de Salbutamol SR-FA en agua para obtener una solución de aproximadamente 100 µg por ml.

Solución madre de la muestra - Transferir un volumen de la Solución para Nebulizar de Salbutamol, equivalente a 10 mg de salbutamol, a un recipiente apropiado. Evaporar a 0,5 ml a presión reducida.

Solución muestra - Diluir un volumen de la *Solución madre de la muestra* a 200 volúmenes con agua.

Revelador 1 - Solución al 0,1 % de clorhidrato de metilbenzotiazolona-hidrazona en metanol 90 %.

Revelador 2 - Solución al 2 % de hexacianoferrato de potasio en una mezcla de agua y amoníaco 18 M (3:1).

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 5 µl de la *Solución madre de la muestra*, la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1* y secar durante 10 minutos. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 2* y nuevamente con *Revelador 1*. Ninguna mancha secundaria en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución madre de la muestra* debe ser más intensa que la obtenido a partir de la *Solución muestra* (0,5 %).

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,9 ml por minuto.

Solución de hexanosulfonato de sodio - Disolver 565 mg de 1-hexanosulfonato de sodio en 600 ml de agua. Agregar 6 ml de ácido acético glacial y mezclar.

Fase móvil - Solución de hexanosulfonato de sodio y metanol (57:43). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del Sistema en 100. Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 24 mg de Sulfato de Salbutamol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 60 ml de ácido acético glacial al 1,0 %, sonicar durante 10 minutos, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación muestra - Medir exactamente un volumen de solución equivalente a alrededor de 10,0 mg de Salbutamol y transferir a un matraz aforado de 50 ml. Agregar 30 ml de ácido acético glacial 1%, agitar 10 minutos, completar a volumen con metanol y filtrar.

Aptitud del sistema (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna determinada a partir del pico de salbutamol no debe ser menor a 800 platos teóricos; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la

Preparación estándar y la Preparación muestra.
Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{13}H_{21}NO_3$ en la Solución para Nebulizar de Salbutamol, de acuerdo a la cantidad declarada.

SALES PARA REHIDRATACIÓN ORAL POLVO

Definición – Las Sales para Rehidratación Oral son una mezcla seca de Cloruro de Sodio, Cloruro de Potasio, Carbonato Sódico Hidrogenado y Glucosa (anhidra) fraccionadas en envases monodosis o que contengan la cantidad de dosis necesarias para un día de tratamiento. Puede contener Citrato de Sodio (anhidro o dihidrato) en lugar de Carbonato Sódico Hidrogenado. Puede contener Glucosa monohidrato en lugar de Glucosa anhidra, siempre que el Carbonato Sódico Hidrogenado o el Citrato de Sodio se encuentren en un sobre separado. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de sodio (Na^+), potasio (K^+), cloruro (Cl^-) y carbonato ácido (HCO_3^-) o citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$), calculado sobre el contenido declarado de Cloruro de Sodio, Cloruro de Potasio y Carbonato Sódico Hidrogenado o Citrato de Sodio (anhidro o dihidrato). Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento del contenido declarado de Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Puede contener edulcorantes, colorantes y saborizantes permitidos en el Código Alimentario Argentino y sustancias que otorguen fluidez. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En sobres cerrados que impidan la entrada de la humedad, evitando la exposición a temperaturas mayores de 30° C.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder a los ensayos para *Sodio* <410>.

B - Debe responder a los ensayos para *Potasio* <410>.

C - Debe responder a los ensayos para *Cloruro* <410>.

D - Cuando contiene Carbonato Sódico Hidrogenado, debe responder a los ensayos para *Bicarbonato* <410>.

E - Cuando contiene Citrato de Sodio, debe responder a los ensayos para *Citrato* <410>. Utilizar de 3 a 5 gotas de la solución reconstituida según se indica en el rótulo y 20,0 ml de la mezcla de piridina y anhídrido acético.

F - Agregar a 5 ml de tartrato cúprico alcalino (SR) algunas gotas de solución reconstituida según se indica en el rótulo, calentar: se debe formar un precipitado rojo copioso de óxido cuproso (presencia de glucosa).

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 8,8; empleando la solución reconstituida según se indica en el rótulo.

Pérdida por secado <680>

Secar al vacío a 50° C hasta peso constante: no debe perder más de 1,0 % de su peso.

Determinación del contenido neto del envase <220>

Proceder según se indica, excepto que deben cumplirse los siguientes requerimientos “El contenido neto promedio de los diez envases no debe ser menor que el declarado y el contenido neto de cualquier envase individual no debe ser menor de 95,0 % y no mayor de 105,0 % de la cantidad declarada. Si el contenido de no más de un envase es menor de 95,0 % pero no menor de 90,0 % de la cantidad declarada o es mayor de 105,0 % pero no mayor de 110,0 % de la cantidad declarada, determinar el contenido neto de veinte envases adicionales. El contenido neto promedio de los treinta envases no debe ser menor que el declarado y el contenido neto de no más de un envase individual puede ser menor de 95,0 % pero no debe ser menor de 90,0 % de la cantidad declarada o puede ser mayor de 105,0 % pero no debe ser mayor de 110,0 % de la cantidad declarada.

VALORACIÓN

[NOTA: al realizar la *Valoración para sodio y potasio*, la *Valoración para carbonato ácido* y la *Valoración para citrato*, calcular las cantidades totales equivalentes de sodio, potasio, cloruro y carbonato ácido [o citrato] a partir de las cantidades declaradas de cloruro de sodio, cloruro de potasio y carbonato ácido de sodio o citrato de sodio, mediante la siguiente tabla:

Compuesto	Na^+	K^+	Cl^-	HCO_3^-	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$
	mg equivalente por g de compuesto				
Cloruro de sodio	393,4		606,6		
Cloruro de potasio		524,4	475,6		

Carbonato ácido de sodio	273,6	726,4
Citrato de sodio anhidro	267,2	732,8
Citrato de sodio dihidrato	234,5	643,0

Preparación madre de la muestra - Mezclar el contenido de la misma cantidad de sobres de Sales para Rehidratación Oral empleados en *Determinación del contenido neto del envase* y transferir el equivalente contenido de un sobre a un matraz aforado de 100 ml. Diluir a volumen con agua y mezclar.

PARA GLUCOSA

Preparación muestra - Transferir 50,0 ml de *Preparación madre de la muestra* a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 0,2 ml de hidróxido de amonio 6 N y diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Determinar la rotación angular en un tubo polarimétrico (ver 170. *Determinación de la rotación óptica*). Calcular la cantidad en g de $C_6H_{12}O_6$ por sobre de Sales para Rehidratación Oral en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$(200/52,9) a/L$$

en la cual 52,9 es el punto medio del rango de rotación específica para glucosa anhidra en grados; L es 100 mm dividido por la longitud del tubo polarimétrico en mm; y a es la rotación observada en grados.

PARA SODIO Y POTASIO

Preparación estándar de sodio - Pesar exactamente alrededor de 14,61 g de cloruro de sodio, previamente secado a 105 °C durante 2 horas, transferir a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar de potasio - Pesar exactamente alrededor de 18,64 g de cloruro de potasio, previamente secado a 105 °C durante 2 horas, transferir a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Diluyente - Transferir 1,04 g de nitrato de litio a un matraz aforado de 1 litro, agregar un surfactante no iónico, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar - Transferir 5,0 ml de la *Preparación estándar de sodio* y 5,0 ml de la *Preparación estándar de potasio* a un matraz aforado de 500 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar. Cada ml de esta solución contiene 0,01150 mg de sodio y 0,01955 mg de potasio.

Preparación muestra A - Diluir un volumen exactamente medido de la *Preparación madre de la muestra* con agua, en etapas si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 0,23 mg

de sodio por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación muestra B - Diluir un volumen exactamente medido de la *Preparación madre de la muestra* con agua, en etapas si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 0,39 mg de potasio por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento - Emplear un fotómetro de llama a la longitud de onda de máxima emisión de sodio, 589 nm. Ajustar el equipo a cero con *Diluyente*. Determinar la lectura de emisión a la llama de la *Preparación estándar* y de la *Preparación muestra A*. Calcular el contenido de Na^+ en mg en los sobres de Sales para Rehidratación Oral en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$0,23(T_{Na}/C_{Na})(L_M/L_E)$$

en la cual T_{Na} es la cantidad en mg de sodio en la porción de Sales para Rehidratación Oral en ensayo, calculada a partir de la cantidad declarada de cloruro de sodio y carbonato de sodio hidrogenado (o citrato de sodio); C_{Na} es la concentración en mg por ml de sodio en la *Preparación muestra A*, calculada a partir del volumen de *Preparación madre de la muestra* empleado y el factor de dilución; y L_M y L_E son las lecturas de emisión a la llama de la *Preparación muestra A* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

De igual modo determinar la lectura de emisión a la llama de la *Preparación estándar* y de la *Preparación muestra B* a la longitud de onda de máxima emisión del potasio, 766 nm. Calcular el contenido en mg de K^+ en los sobres de Sales para Rehidratación Oral en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$0,23(T_K/C_K)(L_M/L_E)$$

en la cual T_K es la cantidad en mg de potasio en la porción de Sales para Rehidratación Oral en ensayo, calculada a partir de la cantidad declarada de cloruro de potasio; C_K es la concentración en mg por ml de potasio en la *Preparación muestra B*, calculada a partir del volumen de *Preparación madre de la muestra* empleado y el factor de dilución; y L_M y L_E son las lecturas de emisión a la llama de la *Preparación muestra B* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

PARA CLORURO

Transferir un volumen exactamente medido de *Preparación madre de la muestra*, equivalente aproximadamente a 55 mg de cloruro, a un erlenmeyer y titular con nitrato de plata 0,1 N (SV) empleando cromato de potasio (SR) como indicador. Titular hasta que precipite el cloruro de plata y el color de la mezcla sea rosa pálido. Cada ml de nitrato de plata 0,1 N equivale a 3,545 mg de Cl⁻.

PARA CARBONATO ÁCIDO (si se encuentra presente)

Transferir un volumen exactamente medido de *Preparación madre de la muestra*, equivalente aproximadamente a 100 mg de carbonato ácido, a un erlenmeyer, agregar 25 ml de agua y 3 gotas de naranja de metilo (SR) y titular con ácido clorhídrico 0,1 N (SV). Cada ml de ácido clorhídrico 0,1 N equivale a 6,102 mg de HCO₃⁻.

PARA CITRATO (si se encuentra presente)

Pesar exactamente alrededor de 2,8 g de Sales para Rehidratación Oral y dispersar en 80 ml de ácido acético glacial. Calentar aproximadamente a 50 °C, enfriar y completar a 100 ml con el mismo solvente. Transferir 20 ml del sobrenadante a un erlenmeyer de capacidad apropiada, agregar solución de *p*-naftolbenceína en ácido acético glacial de 2 g por litro como indicador y titular con solución de ácido perclórico 0,1 M (SV). Cada ml de solución ácido perclórico 0,1 M equivale a 6,303 mg de C₆H₅O₇. Cada mg de citrato de sodio equivale a 0,6430 mg de C₆H₅O₇.

ROTULADO

Indicar en el rótulo si contiene Carbonato Sódico Hidrogenado. Indicar la forma de reconstitución. Deben figurar las siguientes leyendas: “*Abrir y preparar en el momento de su uso*”; “*Mantener la solución reconstituída en heladera y consumir dentro de las 24 horas de su preparación*”.

SALICÍLICO, ÁCIDO

GEL TÓPICO

Definición - El Gel Tópico de Ácido Salicílico es *Ácido Salicílico* en un vehículo viscoso hidrofílico apropiado. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_7H_6O_3$, debe contener alcohol y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Filtrar 5 ml de la solución obtenida por titulación en *Valoración* y agregar 1 ml de cloruro férrico (SR) al filtrado: se debe desarrollar un color violeta. Agregar 1 ml de ácido acético 6 N: el color violeta no debe cambiar. Agregar 1 ml de ácido clorhídrico 6 N: el color violeta debe desaparecer y debe aparecer una pequeña cantidad de precipitado blanco.

Determinación de alcohol <130>

Entre 90,0 % y 110 % de la cantidad declarada de etanol.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración tópica.

VALORACIÓN

A 25 ml de alcohol diluido agregar una gota de fenoltaleína (SR) y suficiente hidróxido de sodio 0,1 N para desarrollar un color débilmente rosa. Agregar 5,0 g del Gel Tópico de Ácido Salicílico exactamente pesados y agitar. Titular la dispersión con hidróxido de sodio 0,1 N (SV) hasta la aparición de un color rosa. [NOTA: emplear esta solución para el *Ensayo de Identificación*]. Cada ml de hidróxido de sodio 0,1 N es equivalente a 13,81 mg de $C_7H_6O_3$.

SODIO, CLORURO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Cloruro de Sodio es una solución estéril de *Cloruro de Sodio en Agua para Inyectables*, esterilizada en su envase final y envasada en envases monodosis no mayores a 1 litro. No debe contener conservantes ni otras sustancias agregadas. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de NaCl y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de plástico o de vidrio tipo I o II.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos para *Sodio* <410> y *Cloruro* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 7,0.

Límite de hierro <580>

Diluir 5,0 ml de Solución Inyectable de Cloruro de Sodio con agua hasta 45 ml y agregar 2 ml de ácido clorhídrico. El límite es 2 ppm.

Límite de metales pesados <590>

Transferir un volumen de Solución Inyectable de Cloruro de Sodio, equivalente a 1,0 g de cloruro de sodio, en un vaso de precipitados, si fuera necesario evaporar hasta un volumen de aproximadamente 20 ml. Agregar 2 ml de ácido acético 1 N y diluir a 25 ml con agua. Proceder según se indica en *Método I*, excepto que se debe emplear 1 ml de *solución estándar de plomo* (10 ppm) en la preparación estándar y en la preparación control. El límite es 0,001 %, en base a la cantidad de cloruro de sodio.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe cumplir con los requisitos. Cuando la concentración de la Solución Inyectable de Cloruro de Sodio esté comprendida entre 0,5 y 0,9 % de cloruro de sodio no debe contener más de 0,5 Unidades de Endotoxina por ml. Cuando la concentración de la Solución Inyectable de Cloruro de Sodio esté comprendida entre 3,0 y 24,3 % de cloruro de sodio no debe contener más de 3,6 Unidades de Endotoxina por ml.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Transferir un volumen de Solución Inyectable de Cloruro de Sodio, equivalente a 50 mg de cloruro de sodio, a un erlenmeyer y agregar agua, si fuera necesario, hasta aproximadamente 50 ml. Titular con nitrato de plata 0,1 N (SV), determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de nitrato de plata 0,1 N equivale a 5,844 mg de NaCl.

SODIO, CLORURO DE SOLUCIÓN ISOTÓNICA ESTÉRIL PARA IRRIGACIÓN

Definición - La Solución Isotónica Estéril para Irrigación de Cloruro de Sodio es una solución estéril de *Cloruro de Sodio* al 0,9 por ciento en *Agua para Inyectables*, esterilizada en su envase final y envasada en envases monodosis que pueden contener más de 1 litro. No debe contener conservantes ni otras sustancias agregadas. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de NaCl y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de plástico o de vidrio tipo I o II. [NOTA: el diseño del envase debe permitir el vaciado rápido].

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos para *Sodio* <410> y *Cloruro* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 7,0.

Límite de hierro <580>

Proceder según se indica en *Solución Inyectable de Cloruro de Sodio*.

Límite de metales pesados <590>

Proceder según se indica en *Solución Inyectable de Cloruro de Sodio*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330 >

No debe contener más de 0,5 Unidades de Endotoxinas por ml de Solución Isotónica Estéril para Irrigación de Cloruro de Sodio.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Solución Inyectable de Cloruro de Sodio*.

ROTULADO

En el rótulo deben figurar las leyendas: “*No emplear como inyectable*”; “*Usar solo para irrigación*”.

SODIO, CLORURO DE SOLUCIÓN ISOTÓNICA ESTÉRIL PARA NEBULIZAR

Definición - La Solución Isotónica Estéril para Nebulizar de Cloruro de Sodio es una solución estéril de *Cloruro de Sodio* al 0,9 por ciento en *Agua Purificada*, esterilizada y envasada en envases monodosis no mayores de 20 ml. No debe contener conservantes ni otras sustancias agregadas. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de NaCl y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de plástico o de vidrio tipo I o II.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos para *Sodio* <410> y *Cloruro* <410>.

Determinación del pH <250 >

Entre 4,5 y 7,0.

Límites de metales pesados <590>

Proceder según se indica en *Solución Inyectable de Cloruro de Sodio*.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Solución Inyectable de Cloruro de Sodio*.

ROTULADO

En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: “*No emplear como inyectable*”; “*Usar solo para nebulizar*”; “*Una vez abierta, desechar el remanente*”.

SODIO, CLORURO DE SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Cloruro de Sodio es una solución estéril y regulada de *Cloruro de Sodio*, conteniendo agentes antimicrobianos apropiados. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de NaCl y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Calentar una porción de la Solución Oftálmica de Cloruro de Sodio hasta ebullición, filtrar en caliente y enfriar. El filtrado debe responder a los ensayos para *Sodio* <410> y *Cloruro* <410>.

Determinación del pH<250>

Entre 6,0 y 8,0.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Cloruro de Sodio, equivalente a 90 mg de cloruro de sodio, a un erlenmeyer. Agregar 10 ml de ácido acético glacial, 75 ml de metanol y 0,5 ml de eosina (SR). Titular con nitrato de plata 0,1 N (SV), mediante agitación hasta punto final rosa. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de nitrato de plata 0,1 N equivale a 5,844 mg de NaCl.

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda:
“*Descartar una vez finalizado el tratamiento*”.

SODIO, CLORURO DE UNGÜENTO OFTÁLMICO

Definición - El Ungüento Oftálmico de Cloruro de Sodio debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de NaCl. Debe ser estéril y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Pesar exactamente una cantidad del Ungüento Oftálmico de Cloruro de Sodio, equivalente a 200 mg de cloruro de sodio. Transferir a una ampolla de decantación que contenga 25 ml de éter y extraer con 5 ml de agua: la fase acuosa obtenida debe responder a los ensayos para *Cloruro* <410> y para *Sodio* <410>.

Determinación del contenido neto del envase
<220>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas metálicas en ungüentos oftálmicos
<660>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Pesar exactamente una cantidad del Ungüento Oftálmico de Cloruro de Sodio, equivalente a 100 mg de cloruro de sodio. Transferir a una ampolla de decantación que contenga 50 ml de éter y extraer con cuatro porciones de 20 ml de agua. Combinar los extractos acuosos en un erlenmeyer y evaporar hasta un volumen de 10 ml. Agregar 10 ml de ácido acético glacial, 75 ml de metanol y 0,5 ml de Eosina (SR). Titular, con agitación, con nitrato de plata 0,1 N (SV) hasta punto final rosa. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias 8ver 780. *Volumetría*). Cada ml de nitrato de plata 0,1 N equivale a 5,844 mg de NaCl.

SODIO, NITRITO DE

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Nitrito de Sodio es una solución estéril de *Nitrito de Sodio* en *Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de NaNO_2 y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos de *Identificación* en *Nitrito de Sodio*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 9,0.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,33 Unidades de Endotoxina por mg de Nitrito de Sodio.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Nitrito de Sodio, equivalente aproximadamente a 150 mg de nitrito de sodio, a un recipiente apropiado que contenga una mezcla de 50,0 ml de permanganato de potasio 0,1 N (SV), 100,0 ml de agua y 5,0 ml de ácido sulfúrico, sumergir la punta de la pipeta debajo de la superficie de la mezcla durante la adición. Calentar el líquido a 40 °C, dejar reposar durante 5 minutos y agregar 25 ml de ácido oxálico 0,1N (SV). Calentar la mezcla aproximadamente a 80 °C y titular con permanganato de potasio 0,1 N (SV). Cada ml de permanganato de potasio 0,1 N equivale a 3,450 mg de NaNO_2 .

SODIO, TIOSULFATO DE

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Tiosulfato de Sodio es una solución estéril de *Tiosulfato de Sodio en Agua para Inyectables* recientemente sometida a ebullición. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos para *Tiosulfato y Sodio* <410>.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de pH <250>

Entre 6,0 y 9,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,03 Unidades de Endotoxina por mg de tiosulfato de sodio.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Tiosulfato de Sodio, equivalente a 1 g de tiosulfato de sodio, a un recipiente apropiado y ajustar a un pH entre 6,2 y 6,7 agregando ácido clorhídrico 3 N. Diluir aproximadamente a 20 ml con agua y titular con yodo 0,1 N (SV), agregando 3 ml de almidón (SR) cerca del punto final. Cada ml de yodo 0,1 N (SV) es equivalente a 24,82 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

SULFADIAZINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Sulfadiazina deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfadiazina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Pesar una cantidad del polvo fino obtenido a partir de la *Preparación muestra* en *Valoración*, equivalente a 500 mg de sulfadiazina, y suspender con 5 ml de cloroformo. Transferir a un filtro pequeño, lavar con otra porción de 5 ml de cloroformo y descartar el filtrado. Suspender el residuo con 10 ml de hidróxido de amonio 6 N durante 5 minutos, agregar 10 ml de agua y filtrar. Calentar el filtrado hasta que la mayor parte del amonio sea expulsado, enfriar y agregar ácido acético 6 N hasta que la reacción ácida: se debe producir un precipitado de sulfadiazina. Transferir el precipitado a un filtro, lavar con agua fría y secar a 105°C durante 1 hora.

A - La sulfadiazina obtenida anteriormente debe fundir entre 250 y 254 °C, determinado por el *Método I* en 260. *Determinación del punto de fusión*.

B - La sulfadiazina obtenida anteriormente debe responder al *Ensayo de Identificación A* en *Sulfadiazina*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 ml.

Tiempo: 90 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con hidróxido de sodio 0,01 N y determinar la cantidad de $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 254 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Sulfadiazina SR-FA, en el mismo medio.

Tolerancia - No menos del 70 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ se debe disolver en 90 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Sulfadiazina*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Sulfadiazina. Transferir una porción exactamente pesada, equivalente a 100 mg de sulfadiazina, a un matraz aforado de 100 ml, agregar 75 ml de hidróxido de sodio 0,025 N, agitar durante 30 minutos, completar a volumen con el mismo solvente, mezclar y centrifugar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración en Sulfadiazina*. Calcular la cantidad de $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ en los Comprimidos de Sulfadiazina, de acuerdo a la cantidad declarada.

SULFASALAZINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Sulfasalazina deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{18}H_{14}N_4O_5S$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Sulfasalazina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

Absorción ultravioleta <470>

El espectro de absorción obtenido a partir de la *Preparación muestra* según se indica en *Valoración*, presenta máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: solución reguladora de fosfato pH 7,5 (ver *Soluciones Reguladoras en Reactivos y Soluciones*); 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{18}H_{14}N_4O_5S$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 358 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Sulfasalazina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{18}H_{14}N_4O_5S$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Sulfasalazina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 150 mg de sulfasalazina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 50 ml de hidróxido de sodio 0,1 N y mezclar. Completar a volumen con

hidróxido de sodio 0,1 N, mezclar y filtrar, descartando los primeros 20 ml del filtrado. Transferir 5,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 1 litro que contenga aproximadamente 750 ml de agua, mezclar y agregar 20,0 ml de ácido acético 0,1 N. Completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar - Emplear una solución de Sulfasalazina SR-FA de aproximadamente 7,5 μg por ml, tratada de la misma manera.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorción, 359 nm, con un espectrofotómetro, empleando agua como blanco. Calcular la cantidad de $C_{18}H_{14}N_4O_5S$ en los Comprimidos de Sulfasalazina, de acuerdo a la cantidad declarada.

TEOFILINA

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Teofilina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de teofilina anhidra $C_7H_8N_4O_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Teofilina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Pesar una cantidad equivalente a 500 mg de teofilina a partir del contenido de las Cápsulas de Teofilina obtenido en la *Preparación muestra en Valoración*. Transferir a un recipiente apropiado, suspender con porciones de 5 ml y 10 ml de éter de petróleo y descartar el éter de petróleo. Agregar al residuo dos porciones de 10 ml de una mezcla de volúmenes iguales de agua e hidróxido de amonio 6 N y filtrar. Evaporar los filtrados combinados aproximadamente a 5 ml, neutralizar con ácido acético 6 N, si fuera necesario, empleando papel de tornasol, enfriar aproximadamente a 15 °C y agitar. Recolectar el precipitado en un filtro, lavar con agua fría y secar a 105 °C durante 2 horas. El espectro de absorción infrarroja de la dispersión del residuo obtenido debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de una preparación similar de Teofilina SR-FA tratada del mismo modo.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido en la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con ácido clorhídrico 0,1 N, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_7H_8N_4O_2$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 268 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Teofilina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_7H_8N_4O_2$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm x 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agua, metanol y ácido acético glacial (64:35:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Teofilina SR-FA en metanol para obtener una solución de aproximadamente 400 μ g por ml.

Preparación muestra para cápsulas duras - Extraer el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Teofilina y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de Teofilina anhidra, transferir a un matraz aforado de 250 ml, agregar 150 ml de metanol y agitar hasta disolver. Completar a volumen con metanol, mezclar y filtrar.

Preparación muestra para cápsulas blandas - Extraer el contenido de veinte Cápsulas de Teofilina y transferir a un matraz aforado de 200 ml. Agregar 50 ml de hidróxido de amonio 6 N, agitar hasta disolver y completar a volumen con agua. Mezclar, filtrar y descartar los primeros 20 ml de filtrado. Transferir un volumen de filtrado exactamente medido, equivalente a 100 mg de teofilina anhidra, a un matraz aforado de 250 ml y completar a volumen con metanol. Mezclar y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para tres inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_7H_8N_4O_2$ en las Cápsulas de Teofilina, de acuerdo a la cantidad declarada.

TEOFILINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Teofilina deben contener no menos de 94,0 por ciento y no más de 106,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_7H_8N_4O_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Teofilina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Pesar y reducir a polvo fino tres Comprimidos de Teofilina. Pesar una cantidad equivalente a 500 mg de teofilina, agitar con sendas porciones de 5 ml y 10 ml de éter de petróleo y descartar el éter de petróleo. Mezclar el residuo con dos porciones de 10 ml de una mezcla de volúmenes iguales de agua e hidróxido de amonio 6 N y filtrar cada vez. Evaporar los filtrados combinados aproximadamente a 5 ml, neutralizar, si fuera necesario, con ácido acético 6 N, empleando papel de tornasol y luego enfriar aproximadamente a 15 °C y agitar. Recolectar el precipitado en un filtro, lavar con agua fría y secar a 105 °C durante 2 horas. El espectro de absorción infrarroja de la dispersión del residuo obtenido debe presentar máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de una preparación similar de Teofilina SR-FA tratada del mismo modo.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. Los tiempos de retención, relativos al estándar interno, de los picos principales en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se deben corresponder con los de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_7H_8N_4O_2$ disuelta a partir de las absorbancias medidas en el ultravioleta, a la longitud de onda de máxima absorción, 272 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Teofilina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_7H_8N_4O_2$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Teofilina*.

Preparación muestra - Transferir diez Comprimidos de Teofilina a un matraz aforado de 500 ml, agregar 50 ml de agua. Cuando los comprimidos se hayan desintegrado, agregar 50 ml de hidróxido de amonio 6 N y agitar hasta disolver. Completar a volumen con agua, mezclar y filtrar a través de un filtro seco con la ayuda de vacío, si fuera necesario, en un matraz, descartando los primeros 20 ml del filtrado. Transferir una alícuota exactamente medida de la solución anterior, equivalente a 10 mg de teofilina, a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 20,0 ml de *Solución del estándar interno*, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Teofilina*. Calcular la cantidad de $C_7H_8N_4O_2$ en los Comprimidos de Teofilina, de acuerdo a la cantidad declarada.

TETRACICLINA, CLORHIDRATO DE CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Clorhidrato de Tetraciclina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 125,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Tetraciclina SR-FA. Clorhidrato de 4-Epianhidrotetraciclina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm. Mantener una distancia de 45 ± 5 mm entre la paleta y el interior del fondo del vaso.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos; 90 minutos para Cápsulas de Clorhidrato de Tetraciclina de 500 mg.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 276 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Tetraciclina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 80 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ se debe disolver en 60 minutos; 90 minutos para Cápsulas de Clorhidrato de Tetraciclina de 500 mg.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 100 mg a partir del contenido de las Cápsulas de Clorhidrato de Tetraciclina obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Secar al vacío a una presión que no exceda los 5 mm de Hg, a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 4,0 % de su peso.

Límite de 4-epianhidrotetraciclina

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de 4-Epianhidrotetraciclina SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 10 µg por ml.

Solución muestra - Emplear la *Preparación muestra* preparada en *Valoración*.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*. Calcular el porcentaje de clorhidrato de 4-epianhidrotetraciclina en las Cápsulas de Clorhidrato de Tetraciclina, relacionando las respuestas del pico de 4-epianhidrotetraciclina obtenidas a partir de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. No debe contener más de 3,0 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Preparación estándar, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Clorhidrato de Tetraciclina*.

Preparación muestra - Transferir el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Clorhidrato de Tetraciclina a un mortero y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de tetraciclina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar aproximadamente 50 ml de *Diluyente*, mezclar y sonicar durante 5 minutos. Dejar enfriar, completar a volumen con *Diluyente*, mezclar y filtrar.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en *Valoración* en *Clorhidrato de Tetraciclina*. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ en las Cápsulas de Clorhidrato de Tetraciclina, de acuerdo a la cantidad declarada.

TETRACICLINA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Tetraciclina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 125,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Tetraciclina SR-FA. Clorhidrato de 4-Epianhidrotetraciclina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 75 rpm. Mantener una distancia de 45 ± 5 mm entre la paleta y el interior del fondo del vaso.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Procedimiento - Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ disuelta a partir de las absorbancias en el ultravioleta a la longitud de onda de máxima absorción, 276 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Tetraciclina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 85 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 100 mg del polvo fino obtenido en *Valoración*. Secar al vacío a una presión que no exceda los 5 mm de Hg a $60^\circ C$ durante 3 horas: no debe perder más de 3,0 % de su peso.

Límite de 4-epianhidrotetraciclina

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente y Aptitud del sistema- Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de 4-Epianhidrotetraciclina SR-FA en *Diluyente* para obtener una solución de aproximadamente 15 μg por ml.

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*. Calcular el porcentaje de clorhidrato de 4-epianhidrotetraciclina en los Comprimidos de Clorhidrato de Tetraciclina, en base a la cantidad de Clorhidrato de Tetraciclina declarada en el rótulo y a las respuestas de los picos de clorhidrato de 4-epianhidrotetraciclina obtenidos a partir de la *Solución muestra* y *Solución estándar*. No debe contener más de 3,0 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Diluyente, Preparación estándar, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Clorhidrato de Tetraciclina*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Tetraciclina. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 50 mg de clorhidrato de tetraciclina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 50 ml de *Diluyente*, mezclar y sonicar durante 5 minutos. Dejar enfriar, completar a volumen con *Diluyente*, mezclar y filtrar.

Procedimiento - Proceder según se indica para *Procedimiento* en *Valoración* en *Clorhidrato de Tetraciclina*. Calcular la cantidad de $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Tetraciclina, de acuerdo a la cantidad declarada.

TIAMINA, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Tiamina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}O_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Tiamina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Pesar una cantidad equivalente a 10 mg de clorhidrato de tiamina a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*. Suspender con 10 ml de agua y filtrar. Emplear porciones de 2 ml del filtrado: se debe producir un precipitado marrón rojizo con iodo (SR), un precipitado blanco con cloruro mercuríco (SR) y debe responder al ensayo para *Cloruro* <410>.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ disuelta empleando la siguiente técnica

[NOTA: emplear material de vidrio inactínico].

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 30 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agua, metanol y ácido acético glacial (73:27:1) conteniendo 140 mg de 1-hexanosulfonato de sodio cada 100 ml. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Tiamina SR-FA en *Medio* para obtener una solución de concentración similar a la de la *Solución muestra*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 3,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μl) de la *Solución estándar* y las soluciones en ensayo, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ disuelta.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 244 nm, una columna de 10 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 1 g de 1-heptanosulfonato de sodio en una mezcla de 180 ml de metanol y 10 ml de trietilamina, diluir a 1 litro con agua y ajustar a pH 3,2 ácido fosfórico. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 30 mg de Clorhidrato de Tiamina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 500 ml, agregar 50 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y agitar durante 20 minutos. Completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Tiamina Pesar exactamente una cantidad equivalente a 30 mg de clorhidrato de tiamina, transferir a un matraz aforado de 500 ml, agregar 50 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y agitar durante 20 minutos. Completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{12}O_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Tiamina, de acuerdo a la cantidad declarada.

TIAMINA, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Tiamina es una solución estéril de *Clorhidrato de Tiamina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Tiamina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos monodosis o multidosis, de vidrio Tipo I.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe producir un precipitado blanco frente al agregado de cloruro mercúrico (SR) y un precipitado castaño rojizo frente al agregado de iodo (SR). Debe producir un precipitado frente al agregado de iodomercuriato de potasio (SR) y de trinitrofenol (SR).

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

C - Debe responder a los ensayos para *Cloruro* <410>.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 2,5 y 4,5.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 3,5 Unidades de Endotoxina por mg de Clorhidrato de Tiamina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 30 cm x 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de

diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Fosfato monobásico de potasio 0,04 M y metanol (55:45). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución del estándar interno - Preparar una solución de metilparabeno en *Fase móvil* de aproximadamente 100 μg por ml.

Preparación estándar - Preparar una solución de Clorhidrato de Tiamina SR-FA en *Fase móvil* de aproximadamente 500 μg por ml. Transferir 10,0 ml de esta solución y 10,0 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación muestra - Diluir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Tiamina con *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 500 μg de por ml. Transferir 10,0 ml de esta solución y 10,0 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,35 para tiamina y 1,0 para metilparabeno; la resolución *R* entre los picos de metilparabeno y tiamina no debe ser menor de 6,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 μl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Tiamina, de acuerdo a la cantidad declarada.

TIMOLOL, MALEATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Maleato de Timolol deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{13}H_{24}N_4O_3S \cdot C_4H_4O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Maleato de Timolol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, metanol e hidróxido de amonio (80:20:1).

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 30 mg de maleato de timolol a partir del polvo fino obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*, transferir a un matraz aforado de 50 ml, agregar aproximadamente 2 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y agitar. Agregar aproximadamente 30 ml de metanol, agitar durante 20 minutos, completar a volumen con metanol, mezclar y centrifugar.

Solución estándar - Preparar una solución de aproximadamente 0,6 mg de Maleato de Timolol SR-FA por ml, del mismo modo que la *Solución muestra*.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: los valores de R_f de las manchas principales obtenidas a partir de la *Solución muestra* se deben corresponder con los de la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Procedimiento para muestreo unificado

Aparato 1: 100 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 500 ml.

Tiempo: 20 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrarlas y determinar la cantidad de $C_{13}H_{24}N_4O_3S \cdot C_4H_4O_4$ disuelta según se indica en *Valoración*, realizando los ajustes necesarios, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Maleato de Timolol SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de un 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{13}H_{24}N_4O_3S \cdot C_4H_4O_4$ se debe disolver en 20 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación
<740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 295 nm y una columna de 30 cm \times 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,8 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato de pH 2,8 - Transferir 22,08 g de fosfato monobásico de potasio a un matraz aforado de 2 litros completar a volumen con agua, ajustar a pH 2,80 \pm 0,05 con ácido fosfórico y filtrar.

Fase móvil - *Solución reguladora de fosfato de pH 2,8* y metanol (3:2) Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Maleato de Timolol SR-FA, transferir a un matraz aforado de 500 ml, agregar 50 ml de fosfato monobásico de sodio 0,05 M y sonicar hasta disolver. Agregar 100 ml de acetonitrilo, agitar, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de diez Comprimidos de Maleato de Timolol. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 10 mg de maleato de timolol, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 10 ml de fosfato monobásico de sodio 0,05 M, sonicar durante 5 minutos y agregar 20 ml de acetonitrilo. Sonicar durante 5 minutos, agregar 20 ml de agua, agitar durante 10 minutos, completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y

registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 15 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{13}H_{24}N_4O_3S \cdot C_4H_4O_4$ en los Comprimidos de Maleato de Timolol, de acuerdo a la cantidad declarada.

TIMOLOL, MALEATO DE SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Maleato de Timolol es una solución acuosa estéril de *Maleato de Timolol*. Debe no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de timolol ($C_{13}H_{24}N_4O_3S$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Maleato de Timolol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - Absorción ultravioleta <470>

Diluir un volumen apropiado de la Solución Oftálmica de Maleato de Timolol con agua para obtener una solución de aproximadamente 20 μ g de timolol por ml: el espectro de absorción ultravioleta de la solución obtenida debe presentar máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de Maleato de Timolol SR-FA.

Determinación del pH<250>

Entre 6,5 y 7,5.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

[NOTA: proteger la sustancia de referencia y las soluciones de la exposición directa a la luz].

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 295 nm y una columna de 15 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 μ m de diámetro. Mantener la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1,2 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato de pH 2,8 - Disolver 11,1 g de fosfato monobásico de sodio en 1 litro de agua y ajustar a pH 2,80 \pm 0,05.

Diluyente - Acetonitrilo y *Solución reguladora de fosfato de pH 2,8* (2:1)

Fase móvil - *Solución reguladora de fosfato de pH 2,8* y metanol (65:35). Filtrar y desgasificar.

Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 34 mg de Maleato de Timolol SR-FA y transferir a un matraz aforado de 25 ml. Disolver con agua, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, agregar 15 ml de *Diluyente*, completar a volumen con agua y mezclar.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Maleato de Timolol, equivalente a 5 mg de timolol, a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen *Diluyente* y mezclar. .

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la eficiencia de la columna no debe ser menor de 3.600 platos teóricos; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de timolol ($C_{13}H_{24}N_4O_3S$) en la Solución Oftálmica de Maleato de Timolol, de acuerdo la cantidad declarada.

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: "*Descartar una vez finalizado el tratamiento*".

TIOPENTAL SÓDICO

PARA INYECCIÓN

cantidad de $C_{11}H_{17}N_2NaO_2S$ en Tiopental Sódico para Inyección, de acuerdo a la cantidad declarada.

Definición - El Tiopental Sódico para Inyección es una mezcla estéril de *Tiopental Sódico* y *Carbonato de Sodio* anhidro como solución reguladora. Debe contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 107,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{11}H_{17}N_2NaO_2S$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Tiopental Sódico SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de vidrio Tipo I o II

ENSAYOS

Identificación

Debe cumplir con los ensayos de *Identificación B y C* en *Tiopental Sódico*.

Disolución completa <280>

Mezclar 800 mg de Tiopental Sódico para Inyección con 10 ml de agua libre de dióxido de carbono y dejar un minuto en reposo: debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 10,2 y 11,2, determinado en la solución preparada en *Disolución completa*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 1,0 Unidades de Endotoxina por mg de Tiopental Sódico.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

Uniformidad de contenido <740>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Diluyente y Preparación estándar - Proceder según se indica en *Valoración* en *Tiopental Sódico*.

Preparación muestra - Disolver el contenido de 10 envases de Tiopental Sódico para Inyección en agua y diluir un volumen exactamente medido con agua para obtener una solución de aproximadamente 50 mg por ml. Diluir esta solución, cuantitativamente y en etapas, con solución de hidróxido de sodio (1 en 250) para obtener una solución de aproximadamente 5 µg por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración* en *Tiopental Sódico*. Calcular la

TROPICAMIDA

SOLUCIÓN OFTÁLMICA

Definición - La Solución Oftálmica de Tropicamida es una solución acuosa estéril de *Tropicamida*, conteniendo un agente antimicrobiano apropiado. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{17}H_{20}N_2O_2$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Tropicamida SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto. Evitar el congelamiento.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Extraer 10 ml de la Solución Oftálmica de Tropicamida con 25 ml de cloroformo, filtrar el extracto clorofórmico y evaporar hasta sequedad.

B - Absorción ultravioleta <470>

El espectro de absorción ultravioleta de la *Preparación muestra* en *Valoración* debe presentar máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 5,8.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Diluyente - Ácido sulfúrico diluido 1 en 6.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Tropicamida SR-FA en *Diluyente* y diluir cuantitativamente y en etapas con el mismo solvente para obtener una solución de aproximadamente 30 µg por ml.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oftálmica de Tropicamida, equivalente a 30 mg de tropicamida, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a una ampolla de decantación, agregar 2 ml de una solución de carbonato de calcio 1 en 10, extraer con cuatro porciones de 20 ml de cloroformo y combinar los extractos en una segunda ampolla de decantación. Lavar los extractos combinados con una porción de 25 ml de solución reguladora de fosfato pH 6,5 (ver. *Soluciones reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*) y transferir a otra ampolla de decantación. Lavar la fase acuosa con 10 ml de cloroformo y agregarlo a

los extractos. Extraer la solución clorofórmica con cuatro porciones de 20 ml de *Diluyente*, combinar los extractos ácidos en un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra* en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorbancia, 253 nm, con un espectrofotómetro, empleando *Diluyente* como blanco. Calcular la cantidad de $C_{17}H_{20}N_2O_2$ en la Solución Oftálmica de Tropicamida, de acuerdo a la cantidad declarada.

ROTULADO

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: “*Descartar una vez finalizado el tratamiento*”.

VALPROICO, ÁCIDO

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Ácido Valproico deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_8H_{16}O_2$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ácido Valproico SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. Los cocientes entre los tiempos de retención de los picos de ácido valproico y del estándar interno obtenido a partir de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra* no deben diferir más de 2 %.

B - Extraer el contenido de tres Cápsulas de Ácido Valproico y mezclar. Pesar una cantidad equivalente a 250 mg de ácido valproico, transferir a una ampolla de decantación, agregar 20 ml de hidróxido de sodio 1 N, agitar y permitir que las fases se separen. Transferir la fase acuosa a una segunda ampolla de decantación, agregar 4 ml de ácido clorhídrico, mezclar y extraer con 40 ml de *n*-heptano. Filtrar la fase orgánica a través de lana de vidrio en un vaso de precipitados y evaporar el solvente completamente en un baño de vapor. Transferir dos gotas del residuo a un tubo de ensayo conteniendo 0,5 ml de solución de yoduro de potasio 1 en 50 y 0,5 ml de solución de iodato de potasio 1 en 25. Mezclar. Se debe desarrollar color amarillo.

Ensayo de disgregación <310>

Proceder según se indica en *Cápsulas blandas*, observando las cápsulas a los 15 minutos.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: solución conteniendo 5,0 mg de lauril sulfato de sodio por ml de fluido intestinal simulado (SR) (preparada sin la enzima y con fosfato monobásico de sodio en lugar de fosfato monobásico de potasio), ajustando a pH 7,5 con hidróxido de sodio 5 M; 900 ml.

Tiempo: 60 minutos.

Solución del estándar interno y *Sistema cromatográfico* - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución estándar - Pesar exactamente una cantidad apropiada de Ácido Valproico SR-FA para obtener una solución de concentración similar a la solución en ensayo. Transferir 10,0 ml de esta solución a un recipiente apropiado, agregar aproximadamente 3,0 g de cloruro de sodio y agitar durante 5 minutos. Agregar aproximadamente 1 ml de ácido clorhídrico 6 N, 5,0 ml de *Solución del estándar interno* y agitar durante 2 minutos. Permitir que las fases se separen, remover la fase de *n*-heptano y filtrar. Descartar la fase acuosa.

Solución muestra - Transferir 10,0 ml de la solución en ensayo a un recipiente apropiado. Proceder según se indica en *Solución estándar*, comenzando donde dice "agregar aproximadamente 3,0 g de cloruro de sodio..."

Procedimiento - Proceder según se indica en *Valoración*.

Tolerancia - No menos de 85 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_8H_{16}O_2$ se debe disolver en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos. Emplear cloroformo como solvente en el procedimiento de *Cápsulas blandas*.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama y una columna de vidrio de 1,8 m x 2 mm con fase estacionaria constituida por 10 % de poliéster de succinato de dietilenglicol estabilizado con ácido fosfórico sobre un soporte formado por tierra silíceo para cromatografía de gases que ha sido calcinada mezclando diatomea con Na_2CO_3 y calcinada a 900°C con un tamaño de malla de 80 a 100. [NOTA: la tierra de sílice se lava con ácido, luego se lava con agua hasta neutralidad, pero no se lava con bases. La tierra de sílice puede ser silanizada al tratarla con un agente como dimetilclorosilano para bloquear los grupos silanoles superficiales]. Mantener la columna aproximadamente a 150 °C y el inyector y el detector a 250 °C. Se debe emplear helio seco como gas transportador con un caudal de aproximadamente 40 ml por minuto.

Solución del estándar interno - Disolver una cantidad de bifenilo en *n*-heptano para obtener una solución de aproximadamente 5,0 mg por ml.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Ácido Valproico SR-FA en *n*-heptano para obtener una solución de aproximadamente 2,5 mg por ml. Transferir 5,0 ml de esta solución a un recipiente apropiado con tapa, agregar 2,0 ml de *Solución del estándar interno*, tapar el recipiente y mezclar.

Preparación muestra - Transferir no menos de veinte Cápsulas de Ácido Valproico a un recipiente apropiado, agregar aproximadamente 150 ml de cloruro de metileno y enfriar en una mezcla de dióxido de carbono sólido-acetona hasta que el contenido se haya solidificado. Si fuera necesario, transferir la mezcla de las Cápsulas de Ácido Valproico y cloruro de metileno a un recipiente apropiado, y mezclar a alta velocidad hasta que todos los sólidos se reduzcan a partículas finas. Transferir la mezcla a un matraz aforado de 500 ml, completar a volumen con *n*-heptano, mezclar y permitir que los sólidos decanten. Transferir un volumen exactamente medido de esta solución, equivalente a 250 mg de ácido valproico, a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *n*-heptano y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un recipiente con tapa, agregar 2,0 ml de la *Solución del estándar interno*, tapar el recipiente y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,5 para ácido valproico y 1,0 para bifenilo; la resolución *R* entre los picos de ácido valproico y bifenilo no debe ser menor de 3,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 2 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de ácido valproico y del estándar interno. Calcular la cantidad de $C_8H_{16}O_2$ en las Cápsulas de Ácido Valproico, de acuerdo a la cantidad declarada.

VALPROICO, ÁCIDO

SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Ácido Valproico debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_8H_{16}O_2$. Debe ser preparado con la ayuda de hidróxido de sodio y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ácido Valproico SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. Los cocientes entre los tiempos de retención del pico de ácido valproico relativo al pico del estándar interno obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* no deben diferir en más de 2,0 %.

B - Transferir un volumen de la Solución Oral de Ácido Valproico, equivalente a 250 mg de ácido valproico, a una ampolla de decantación. Agregar 40 ml de agua y 2 ml de ácido clorhídrico, mezclar y extraer con 40 ml de *n*-heptano. Filtrar la fase de *n*-heptano a través de lana de vidrio a un vaso de precipitados y evaporar el solvente por completo en un baño de. Transferir dos gotas del residuo a un tubo de ensayo que contenga 0,5 ml de solución de yoduro de potasio (1 en 50) y 0,5 ml de solución de iodato de potasio (1 en 25) y mezclar: se debe desarrollar un color amarillo.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 8,0.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución del estándar interno, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración en Cápsulas de Ácido Valproico*.

Preparación muestra - Transferir una cantidad exactamente medida de la Solución Oral de Ácido Valproico, equivalente a 250 mg de ácido valproico, a una ampolla de decantación. Agregar

40 ml de agua, 2 ml de ácido clorhídrico y mezclar. Extraer con 80 ml de *n*-heptano hasta que la fase acuosa se torne transparente. Filtrar la fase de *n*-heptano a través de lana de vidrio, recolectando el filtrado en un matraz aforado de 100 ml. Lavar la ampolla de decantación y la lana de vidrio con pequeñas porciones de *n*-heptano, agregar los lavados al matraz, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un recipiente con tapa, agregar 2,0 ml de la *Solución del estándar interno*, tapar el recipiente y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 2 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de ácido valproico y bifenilo. Calcular la cantidad de $C_8H_{16}O_2$ en la Solución Oral de Ácido Valproico, de acuerdo a la cantidad declarada.

VERAPAMILO, CLORHIDRATO DE COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Clorhidrato de Verapamilo deben contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Verapamilo SR-FA. Impureza A de Verapamilo SR-FA: Monoclorhidrato de 3,4-dimetoxi- α -[3-(metilamino)propil]- α -(1-metiletil)bencenoacetonitrilo. Impureza B de Verapamilo SR-FA: Monoclorhidrato de α -[2-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]etil-3,4-dimetoxi- α -(1-metiletil)bencenoacetonitrilo.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En Fase sólida.*

Pesar una cantidad equivalente a 25 mg de clorhidrato de verapamilo a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración* y transferir a una ampolla de decantación. Agregar 25 ml de agua y agitar durante 30 minutos. Agregar 1 ml de hidróxido de sodio 1 N y extraer con 25 ml de cloroformo, agitando durante 10 minutos. Filtrar el extracto clorofórmico a través de un filtro que contenga sulfato de sodio anhidro. Triturar el extracto clorofórmico con 400 mg de bromuro de potasio y evaporar hasta sequedad. Secar a 105 °C durante 2 horas.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: ácido clorhídrico 0,01 N; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$ disuelta a partir de la diferencia entre las absorbancias medidas en el ultravioleta, a 278 y 300 nm, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Clorhidrato de Verapamilo SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Diluyente - Ácido clorhídrico 0,01 N.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Clorhidrato de Verapamilo a un vaso de precipitados de capacidad apropiada. Agregar 50 ml de *Diluyente* y calentar en un baño de vapor durante 50 minutos. Sonicar durante 10 minutos, enfriar y transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml. Completar a volumen con *Diluyente*, mezclar y filtrar. Diluir una porción exactamente medida del filtrado con *Diluyente* hasta obtener una solución de aproximadamente 48 µg de clorhidrato de verapamilo por ml.

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Verapamilo SR-FA en *Diluyente* hasta obtener una solución de aproximadamente 48 µg de clorhidrato de verapamilo por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en un espectrofotómetro, en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, 278 nm, y la absorbancia de la *Solución muestra* a 300 nm, empleando *Diluyente* como blanco. Corregir la lectura de absorbancia de la *Solución muestra* a 278 nm sustrayendo la lectura obtenida a 300 nm. Calcular la cantidad de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$ en cada Comprimido de Clorhidrato de Verapamilo, en base a la cantidad declarada.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Solución de acetato de sodio, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica* en *Clorhidrato de Verapamilo*.

Solución estándar - Disolver cantidades exactamente pesadas de Clorhidrato de Verapamilo SR-FA, Impureza A de Verapamilo SR-FA, 3,4-dimetoxibenzaldehído y alcohol 3,4-dimetoxibencílico en *Fase móvil* hasta obtener una solución de aproximadamente 1,6 mg de clorhidrato de verapamilo por ml y 4,8 µg de impureza A de verapamilo, de 3,4-dimetoxibenzaldehído y de alcohol 3,4-dimetoxibencílico por ml.

Solución muestra - Preparar según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente

10 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas durante al menos cuatro veces el tiempo de retención del verapamilo y medir las respuestas de todos los picos. [NOTA: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,4 para alcohol 3,4-dimetoxibencílico, 0,5 para impureza A de verapamilo, 0,7 para 3,4-dimetoxibenzaldehído y 1,0 para verapamilo]. Calcular la cantidad de cada impureza individual en los Comprimidos de Clorhidrato de Verapamilo, relacionando las respuestas de los picos a tiempos de retención correspondientes en la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. No debe presentar más de 0,3 % de cualquier impureza específica y la suma de todas las impurezas no debe ser mayor de 1,0 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución de acetato de sodio, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Pureza cromatográfica en Clorhidrato de Verapamilo*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Verapamilo SR-FA en *Fase móvil* hasta obtener una solución de aproximadamente 1,6 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Clorhidrato de Verapamilo. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 40 mg de clorhidrato de verapamilo, transferir a un tubo de centrifuga con tapa y agregar 25 ml de *Fase móvil*. Agitar durante 15 minutos, centrifugar y filtrar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas durante al menos cuatro veces el tiempo de retención del verapamilo y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$ en los Comprimidos de Clorhidrato de Verapamilo, de acuerdo a la cantidad declarada.

VERAPAMILO, CLORHIDRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Clorhidrato de Verapamilo es una solución estéril de *Clorhidrato de Verapamilo en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Clorhidrato de Verapamilo SR-FA. Impureza A de Verapamilo SR-FA: Monoclorhidrato de 3,4-dimetoxi- α -[3-(metilamino)propil]- α -(1-metiletil)bencenoacetnitrilo. Impureza B de Verapamilo SR-FA: Monoclorhidrato de α -[2-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]etil-3,4-dimetoxi- α -(1-metiletil)bencenoacetnitrilo.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe cumplir con los requisitos en 490. *Identificación de bases nitrogenadas*. Emplear un volumen de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Verapamilo, equivalente a 100 mg de clorhidrato de verapamilo, empleando cloroformo en lugar de disulfuro de carbono y una celda de 0,1 mm en lugar de una celda de 1 mm.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

C - Debe responder al ensayo para *Cloruros* <410>.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 6,5.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de acetato de sodio, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en el ensayo de *Pureza cromatográfica en Clorhidrato de Verapamilo*.

Solución estándar - Disolver cantidades exactamente pesadas de Clorhidrato de Verapamilo SR-FA, Impureza A de Clorhidrato de Verapamilo SR-FA, 3,4-dimetoxibenzaldehído y alcohol 3,4-dimetoxibencílico en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 2,5 mg

de Clorhidrato de Verapamilo SR-FA por ml y 0,0075 mg de la Impureza A de Clorhidrato de Verapamilo SR-FA, del 3,4-dimetoxibenzaldehído y de alcohol 3,4-dimetoxibencílico por ml.

Solución muestra - Preparar según se indica en *Preparación muestra en Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*. Cromatografiar la *Solución muestra* durante al menos cuatro veces el tiempo de retención del pico de clorhidrato de verapamilo. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,4 para alcohol 3,4-dimetoxibencílico, 0,5 para impureza A de clorhidrato de verapamilo, 0,7 para 3,4-dimetoxibenzaldehído y 1,0 para verapamilo. Calcular la cantidad de cada impureza individual en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Verapamilo, relacionando las respuestas de las impurezas a tiempos de retención correspondientes en la *Solución muestra* y en la *Solución estándar*. No debe contener más de 0,3 % de cada impureza y la suma de todas las impurezas no debe ser mayor de 1,0 %.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 16,7 Unidades de Endotoxina por mg de Clorhidrato de Verapamilo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución de acetato de sodio, Solución de aptitud del sistema y Aptitud del sistema - Preparar según se indica en el ensayo de *Pureza cromatográfica en Clorhidrato de Verapamilo*.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Clorhidrato de Verapamilo SR-FA en *Fase móvil* para obtener una solución de aproximadamente 2,5 mg por ml.

Preparación muestra - Diluir con *Fase móvil*, si fuera necesario, un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Clorhidrato de Verapamilo para obtener una solución de aproximadamente 2,5 mg por ml.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la

cantidad de $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$ en la Solución Inyectable de Clorhidrato de Verapamilo, de acuerdo a la cantidad declarada.

WARFARINA SÓDICA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Warfarina Sódica deben contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{19}H_{15}NaO_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Warfarina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

B - *Absorción infrarroja <460>. En fase sólida.* Pesar una cantidad equivalente a 200 mg de warfarina sódica a partir del polvo fino obtenido en la *Preparación muestra* en *Valoración*, mezclar con 50 ml de agua, centrifugar y filtrar el líquido sobrenadante. Extraer con 50 ml de éter, transferir la fase acuosa a una ampolla de decantación y descartar el éter. Ajustar a pH menor de 3,0 con ácido clorhídrico y extraer con 50 ml de cloroformo. Transferir la fase clorofórmica a otra ampolla de decantación, extraer con 50 ml de solución de hidróxido de sodio 1 en 250 y descartar el cloroformo. Transferir la fase acuosa a un vaso de precipitados y ajustar a pH menor de 3,0 con ácido clorhídrico para precipitar la warfarina. Agitar la mezcla y dejar que coagule el precipitado. Filtrar y lavar el precipitado con cuatro porciones de 5 ml de agua. Si el precipitado no es blanco disolverlo en el mínimo volumen de solución de hidróxido de sodio 1 en 250, diluir a 50 ml con agua y repetir el procedimiento previo, comenzando donde dice: "*Extraer con 50 ml de éter...*". Secar la warfarina obtenida de este modo, al vacío sobre pentóxido de fósforo durante 4 horas.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y determinar la cantidad de $C_{19}H_{15}NaO_4$ disuelta mediante la siguiente técnica.

Sistema cromatográfico y Fase móvil - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución del estándar interno - Preparar una solución de *Propilparabeno* de aproximadamente 0,0025 veces la cantidad declarada en mg de Warfarina Sódica en cada comprimido por ml de agua. [NOTA: se puede emplear un pequeño volumen de metanol, si fuera necesario, para disolver el *Propilparabeno*].

Solución madre del estándar - Preparar una solución de Warfarina SR-FA de aproximadamente 0,0011 veces la cantidad declarada en mg de $C_{19}H_{15}NaO_4$ en cada comprimido por ml de agua. [NOTA: emplear un pequeño volumen de hidróxido de sodio 0,1 N para favorecer la disolución].

Solución estándar - Agregar 1,0 ml de *Solución del estándar interno* a 3,0 ml de *Solución madre del estándar* y mezclar.

Solución muestra - A una alícuota filtrada de 3,0 ml agregar 1,0 ml de *Solución del estándar interno* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 40 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales.

Tolerancia - No menos del 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{19}H_{15}NaO_4$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 25 cm \times 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,4 ml por minuto.

Solución reguladora de pH 7,4 - Pesar exactamente alrededor 1,36 g de fosfato monobásico de potasio, transferir a un matraz aforado de 200 ml y disolver en 50 ml de agua. Agregar 39,1 ml de hidróxido de sodio 0,2 N y completar a volumen con agua. Ajustar a pH $7,4 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio o ácido fosfórico.

Fase móvil - Metanol, agua y ácido acético glacial (68:32:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los

ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - *Solución reguladora de pH 7,4* y acetonitrilo (85:15).

Solución del estándar interno - Preparar una solución de *Propilparabeno* en acetonitrilo de aproximadamente 1 mg por ml.

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 62,5 mg de Warfarina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 200 ml y disolver en 78 ml de hidróxido de sodio 0,1 N. Agregar 50 ml de fosfato monobásico de potasio 0,2 M, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 15,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml. Agregar 5,0 ml de *Solución del estándar interno* y completar a volumen con *Diluyente*.

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte Comprimidos de Warfarina Sódica. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 5 mg de warfarina sódica, transferir a un matraz aforado de 50 ml y agregar 5 ml de *Solución del estándar interno* y aproximadamente 30 ml de *Diluyente*. Sonicar durante 10 minutos y agitar durante 60 minutos. Completar a volumen con *Diluyente* y filtrar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,75 para propilparabeno y 1,0 para warfarina; la resolución *R* entre los picos de propilparabeno y warfarina no deben ser menor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{19}H_{15}NaO_4$ en los Comprimidos de Warfarina Sódica, de acuerdo a la cantidad declarada.

ZALCITABINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Zalcitabina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_9H_{13}N_3O_3$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Zalcitabina SR-FA. Impureza A de Zalcitabina SR-FA: 2',3'-Didehidro-2',3'-dideoxicitidina.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Precaución - Manipular la Zalcitabina evitando su inhalación y el contacto con la piel.

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 20 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrar y diluir las mismas con *Medio*, si fuera necesario, y determinar la cantidad de $C_9H_{13}N_3O_3$ disuelta empleando la técnica siguiente.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 270 nm, una columna de 15 cm × 3,9 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato pH 6,8 - Disolver 8,7 g de fosfato dibásico de potasio en 1 litro de agua, ajustar a pH 6,8 con ácido fosfórico y mezclar.

Fase móvil - Solución reguladora de fosfato pH 6,8, metanol y acetonitrilo (96:4:3). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 10 mg de Zalcitabina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 250 ml, agregar aproximadamente 200 ml de *Medio* y sonicar hasta disolución. Completar a volumen con *Medio* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las

respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 150 µl) de la *Solución estándar* y las soluciones en ensayo, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de zalcitabina disuelta.

Tolerancia - No menos de 80 % (Q) de la cantidad declarada de $C_9H_{13}N_3O_3$ se debe disolver en 20 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm, un guardacolumna con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Solución reguladora de fosfato - Disolver 3,4 g de fosfato monobásico de potasio en 1 litro de agua, ajustar a pH 2,2 con ácido fosfórico. Agregar 1,08 g de ácido 1-octanosulfónico de sodio y mezclar.

Fase móvil - Solución reguladora de fosfato y acetonitrilo (85:15). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Agua y acetonitrilo (17:3).

Solución de resolución - Disolver una cantidad exactamente pesada de Zalcitabina SR-FA y de Impureza A de Zalcitabina SR-FA en *Diluyente* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 0,02 mg de zalcitabina por ml y 0,002 mg de impureza A de zalcitabina por ml.

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Zalcitabina SR-FA en *Diluyente* y diluir cuantitativamente y en etapas, si fuera necesario, para obtener una solución de aproximadamente 0,008 mg por ml.

Preparación muestra - Transferir cinco Comprimidos de Zalcitabina a un matraz aforado apropiado para obtener una solución de aproximadamente

0,008 mg de zalcitabina por ml. Agregar un volumen de *Diluyente* equivalente a tres quintas partes del volumen del matraz, sonicar durante 15 minutos y agitar durante 10 minutos. Completar a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de zalcitabina e impureza A de zalcitabina no debe ser menor de 1,1 y el factor de asimetría no debe ser mayor de 1,5. Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_9H_{13}N_3O_3$ en los Comprimidos de Zalcitabina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ZIDOVUDINA

CÁPSULAS

Definición - Las Cápsulas de Zidovudina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Zidovudina SR-FA. Impureza B de Zidovudina SR-FA: Timina.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción ultravioleta <470>.

Solvente - Metanol y agua (75:25).

Solución muestra - Pesar una cantidad equivalente a 300 mg de zidovudina a partir del contenido de las Cápsulas de Zidovudina obtenido en *Preparación muestra* en *Valoración*. Transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar 50 ml de *Solvente* y mezclar. Sonicar durante 5 minutos, completar a volumen con metanol y mezclar. Dejar que los sólidos insolubles sedimenten, transferir 1 ml del sobrenadante a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Solvente* y mezclar. La solución debe contener aproximadamente 15 µg de zidovudina por ml.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 45 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrarlas y determinar la cantidad de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ disuelta según se indica en *Procedimiento* en *Valoración*, realizando los ajustes necesarios, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Zidovudina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (Q) de la cantidad declarada de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ se debe disolver en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución madre del estándar y Solución madre de Impureza B de Zidovudina - Proceder según se indica en *Valoración* en *Zidovudina*.

Solución estándar - Proceder según se indica en *Preparación estándar* en *Valoración*.

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de Impureza B de Zidovudina en las Cápsulas de Zidovudina. No debe presentar más de 3,0 % de Impureza B de Zidovudina.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Fase móvil, Solución madre del estándar y Solución madre de Impureza B de Zidovudina - Proceder según se indica en *Valoración* en *Zidovudina*.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 265 nm y una columna de 25 cm x 4,0 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro y un guardacolumna de 1,5 cm x 3,2 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Diluyente - Metanol y agua (75: 25).

Preparación estándar - Transferir 10,0 ml de la *Solución madre del estándar* y 1,0 ml de la *Solución madre de la Impureza B de Zidovudina* a un matraz aforado de 100 ml, agregar 25 ml de agua y mezclar. Completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación muestra - Extraer el contenido de no menos de veinte Cápsulas de Zidovudina y mezclar. Pesar exactamente una cantidad equivalente a 100 mg de zidovudina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar una porción de *Diluyente* para disolver, sonicar durante aproximadamente 20 minutos y completar a volumen con *Diluyente*. Dejar que los sólidos sedimenten, transferir 10,0 ml del sobrenadante a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con *Diluyente*.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,2 para la impureza B de zidovudina y 1,0 para zidovudina; la resolución *R* entre los picos de la zidovudina y la impureza B de zidovudina no debe ser menor de 5,0; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ en las Cápsulas de Zidovudina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ZIDOVUDINA

COMPRIMIDOS

Definición - Los Comprimidos de Zidovudina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Zidovudina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción infrarroja <460>. *En fase sólida.*

Solución muestra - Reducir a polvo fino un Comprimido de Zidovudina, remover la cubierta filmica y emplear 5 mg del polvo.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Ensayo de disolución <320>

Aparato 2: 50 rpm.

Medio: agua; 900 ml.

Tiempo: 30 minutos.

Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, filtrarlas y determinar la cantidad de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ disuelta según se indica en *Procedimiento* en *Valoración*, realizando los ajustes necesarios, comparando con una *Solución estándar* de concentración conocida de Zidovudina SR-FA en el mismo medio.

Tolerancia - No menos de 75 % (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ se debe disolver en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <740>

Debe cumplir con los requisitos.

Procedimiento para uniformidad de contenido

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 265 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro, desactivada para bases. El caudal debe ser aproximadamente 2,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agua y metanol (4:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución estándar - Proceder según se indica en *Preparación estándar* en *Valoración*.

Solución muestra - Transferir un Comprimido de Zidovudina a un matraz aforado de 100 ml, agregar aproximadamente 20 ml de agua y agitar hasta dispersar el comprimido. Agregar aproximadamente 30 ml de metanol y sonicar durante 10 minutos. Completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 4,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Filtrar descartando los primeros 2 ml del filtrado.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μl) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ en cada Comprimido de Zidovudina.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Fase móvil y Solución estándar - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución muestra - Emplear la *Preparación muestra* preparada en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μl) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de cada impureza en los Comprimidos de Zidovudina, relacionando la respuesta del pico de cada impureza en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* y la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*. Multiplicar la respuesta del pico de cada impureza por el factor de corrección *F* según corresponda, *F* igual a 0,59 para el pico que eluya a un tiempo de retención relativo a la zidovudina de aproximadamente 0,17 e igual a 1,00 para los otros picos. No debe contener más de 1,5 % de impurezas con un tiempo de retención relativo de 0,17, no más de 0,2 % de cualquier otra impureza y no más de 2,0 % de impurezas totales.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 265 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro, desactivada para bases. El caudal debe ser aproximadamente 1,3 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 3,0 g de acetato de sodio y 1,3 g de 1-octanosulfonato de sodio en 900 ml de agua. Agregar 90 ml de metanol y 40 ml de acetonitrilo y mezclar. Ajustar a pH 5,3 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente una cantidad de Zidovudina SR-FA, disolver en un volumen de metanol, diluir a volumen con agua para obtener una solución de aproximadamente 0,12 mg por ml y mezclar.

Preparación muestra - Transferir una cantidad de los Comprimidos de Zidovudina, equivalente a 1.500 mg de zidovudina, a un matraz aforado de 500 ml. Agregar aproximadamente 50 ml de agua, agitar durante 30 minutos hasta dispersar los comprimidos. Agregar aproximadamente 150 ml de metanol y sonicar durante 10 minutos. Completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 4,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de la zidovudina y el correspondiente a un tiempo de retención relativo de aproximadamente 1,2 no debe ser menor de 2,5; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de C₁₀H₁₃N₅O₄ en los Comprimidos de Zidovudina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ZIDOVUDINA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Zidovudina es una solución estéril de *Zidovudina* en *Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Zidovudina SR-FA. Impureza B de Zidovudina SR-FA: Timina.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Absorción ultravioleta <470>

Solvente: metanol y agua (75:25).

Concentración: 15 µg por ml. Obtener la *solución muestra* del siguiente modo: mezclar un volumen de la Solución Inyectable de Zidovudina, equivalente a 20 mg de zidovudina, con 50 ml de *Solvente* en un matraz aforado de 200 ml y completar a volumen con *Solvente*. Diluir la solución resultante 15 en 100 con *Solvente* y mezclar.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 3,5 y 7,0; determinado sobre una mezcla que contenga un volumen de la Solución Inyectable de Zidovudina, equivalente a 150 mg de zidovudina, y 5 ml de cloruro de potasio 0,12 M.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución madre del estándar, Solución madre de la Impureza B de Zidovudina y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Zidovudina*.

Solución estándar - Transferir 10,0 ml de la *Solución madre del estándar* y 1,0 ml de la *Solución madre de la Impureza B de Zidovudina* a un matraz aforado de 100 ml, agregar 25 ml de agua, mezclar, completar a volumen con metanol y mezclar.

Solución muestra - Proceder según se indica para *Preparación muestra* en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los todos picos. Calcular la cantidad de la Impureza B de Zidovudina en la Solución Inyectable de Zidovudina. No debe contener más de 1,0 %.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 1,0 Unidad de Endotoxina por mg de Zidovudina.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, según se indica en *Método de filtración por membrana*.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Solución madre del estándar, Solución madre estándar de la Impureza B de Zidovudina y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Zidovudina*.

Preparación estándar - Transferir 10,0 ml de la *Solución madre del estándar* y 2,0 ml de *Solución madre de la Impureza B de Zidovudina*, a un matraz aforado de 100 ml, agregar 25 ml de agua, mezclar, completar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Inyectable de Zidovudina, equivalente a 25 mg de zidovudina, a un matraz aforado de 250 ml, disolver y completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ en la Solución Inyectable de Zidovudina, de acuerdo a la cantidad declarada.

ZIDOVUDINA

SOLUCIÓN ORAL

Definición - La Solución Oral de Zidovudina deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de zidovudina ($C_{10}H_{13}N_5O_4$) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Zidovudina SR-FA. Impureza B de Zidovudina SR-FA: Timina.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos impermeables.

ENSAYOS

Identificación

A - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Alcohol butílico, acetona, *n*-heptano e hidróxido de sodio (40:30:30:10).

Solución estándar - Preparar una solución de Zidovudina SR-FA en una mezcla de metanol y agua (75:25) de aproximadamente 5 mg por ml.

Solución muestra - Preparar una solución de Zidovudina en metanol de aproximadamente 5 mg por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 5 μ l de la *Solución estándar* y 5 μ l de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: el valor de R_f de la mancha principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el obtenido en la *Solución estándar*.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 4,0, determinado sobre una solución que contenga un volumen de Solución Oral de Zidovudina equivalente a 150 mg de zidovudina y 5 ml de cloruro de potasio 0,12 M (3:1).

Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico, Fase móvil, Aptitud del sistema y Solución madre del estándar de Impureza B de Zidovudina - Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución madre del estándar - Proceder según se indica en *Preparación madre del estándar* en *Valoración*.

Solución estándar - Proceder según se indica en *Preparación estándar* en *Valoración*.

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Calcular el porcentaje de impureza B de zidovudina en la Solución Oral de Zidovudina. No debe contener más de 3,0 %.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos para productos terminados de administración oral.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 240 nm, una columna de 12,5 cm \times 4,0 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μ m de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Acetato de sodio 0,04 M, metanol, acetonitrilo y ácido acético glacial (900:90:10:2). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución madre del estándar de la Impureza B de Zidovudina - Pesar exactamente 20 mg de Impureza B de Zidovudina SR-FA, transferir a un matraz aforado de 200 ml, agregar 150 ml de *Fase móvil*, sonicar durante 10 minutos, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de Zidovudina SR-FA en *Fase móvil*, y diluir cuantitativamente para obtener una solución de aproximadamente 1,0 mg por ml.

Preparación estándar - Transferir 10,0 ml de *Preparación madre del estándar* y 2,0 ml de *Solución madre del estándar de la Impureza B de Zidovudina* a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación muestra - Transferir un volumen exactamente medido de la Solución Oral de Zidovudina, equivalente a 100 mg de zidovudina, a un matraz

aforado de 100 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,12 para la impureza B de zidovudina y 1,0 para zidovudina, la resolución *R* entre los picos de zidovudina y la impureza B de zidovudina no debe ser menor de 4,0; el factor de asimetría no debe ser mayor de 2,0 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{10}H_{13}N_5O_4$ en la Solución Oral de Zidovudina, de acuerdo a la cantidad declarada.

MEDICAMENTOS HERBARIOS

APARTADO DE MEDICAMENTOS HERBARIOS

ÍNDICE

Métodos Generales de Análisis

<480> - Grasas y aceites fijos

<630> - Métodos de farmacognosia

Monografías

Ajo, Polvo

Alcachofa, Hoja

Anís, Fruto

Bálsamo de Perú

Bálsamo de Tolú

Belladona, Hoja

Boldo, Hoja

Caléndula, Flor

Canela de Ceilán, Corteza

Cardo Mariano, Fruto

Cáscara Sagrada, Corteza

Castaño de Indias, Semilla

Cedrón, Hoja

Centella, Hierba

Cola, Nuez de

Eucalipto, Hoja

Ginkgo, Hoja

Ginseng Oriental, Raíz

Hamamelis, Hoja

Hipérico, Hierba

Ipecacuana, Raíz y Rizoma

Manzanilla, Flores

Menta, Hoja

Podófilo, Resina de

Regaliz, Raíz

Sen, Hoja

Uva Ursi, Hoja

Valeriana, Raíz y Rizoma

Yerba Mate, Hoja y Tallo

480. GRASAS Y ACEITES FIJOS

Definiciones generales -

Indice de acidez - Es la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos libres presentes en 1,0 g de muestra.

Indice de esterificación - Es la cantidad, en mg., de hidróxido de potasio necesaria para saponificar los ésteres presentes en 1,0 g de muestra.

Indice de hidroxilo - Es la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio equivalente al contenido de hidroxilo de 1,0 g de muestra.

Indice de yodo - Es la cantidad, en g, de yodo capaz de ser fijado, bajo las condiciones indicadas, por 100 g de muestra.

Indice de saponificación - Es la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos libres y saponificar los ésteres presentes en 1,0 g de muestra.

Preparación muestra -

Si la muestra se presenta turbia debido a la presencia de estearina, calentar el envase en un baño de agua a 50 °C hasta que quede límpida; si el aceite no se clarifica por calentamiento, filtrarlo a través de un papel de filtro seco en un embudo que se pueda mantener caliente. Mezclar y pesar, de una vez, tantas porciones como se necesiten para las distintas determinaciones. Mantener la muestra fundida hasta que se hayan tomado las porciones necesarias.

Densidad relativa -

Determinar la densidad relativa de una grasa o aceite según se indica en <160>. *Determinación de la densidad relativa.*

Temperatura de fusión

Determinar la temperatura de fusión según se indica para el *Método II* en <260>. *Determinación del punto de fusión.*

Temperatura de solidificación de ácidos grasos

Aislamiento de los ácidos grasos - Calentar en un vaso de precipitados de 800 ml a 150 °C, 75 ml de solución de hidróxido de potasio-glicerina, preparada disolviendo 25 g de hidróxido de potasio en 100 ml de glicerina, y agregar 50 ml de la grasa clarificada. Calentar la mezcla durante 15 minutos con agitación frecuente, evitando que la temperatura sobrepase los 150 °C. La saponificación se considera completa cuando la mezcla se presenta homogénea, sin partículas adheridas al vaso en el menisco. Verter el contenido del vaso de precipitados en 500 ml de

agua próxima a hervir en un segundo vaso de precipitados o en una cápsula de 800 ml. Agregar lentamente 50 ml de ácido sulfúrico diluido, preparado mezclando 3 partes de agua con 1 parte de ácido sulfúrico, y calentar la solución, con agitación frecuente, hasta que los ácidos grasos se separen como una capa transparente. Lavarlos con agua hirviendo hasta que estén exentos de ácido sulfúrico y recolectarlos en un vaso de precipitados. Calentar en un baño de vapor hasta que el agua se separe y los ácidos grasos formen una capa clara; filtrar en un vaso de precipitados seco mientras se calienta y secar a 105 °C durante 20 minutos. Transferir los ácidos grasos aún calientes a un recipiente apropiado y enfriar en un baño de hielo hasta que se produzca la solidificación.

Ensayo de saponificación completa - Transferir 3 ml de los ácidos grasos aislados a un erlenmeyer y agregar 15 ml de alcohol. Calentar la solución a ebullición y agregar un volumen igual de hidróxido de amonio 6 N. La solución deberá permanecer límpida.

Procedimiento - Proceder según se Indica para el *Procedimiento* en <180>. *Determinación de la temperatura de solidificación.* El promedio de no menos de cuatro lecturas consecutivas de la mayor temperatura observada, es la temperatura de solidificación de los ácidos grasos.

Determinación del índice de acidez (ácidos grasos libres)

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, disolver aproximadamente 10,0 g de muestra exactamente pesados en 50 ml de una mezcla de volúmenes iguales de alcohol y éter, previamente neutralizados frente a la fenoltaleína con hidróxido de sodio 0,1 N. Si la muestra no se disuelve en el solvente frío, adaptar al erlenmeyer un condensador apropiado y calentar suavemente, agitando hasta disolución. Agregar 1 ml de fenoltaleína (SR). Titular con hidróxido de sodio 0,1 N (SV) hasta coloración rosada persistente durante 30 segundos. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Calcular el *Indice de acidez* o el volumen de álcali 0,1 N requerido para neutralizar 10,0 g de muestra (ácidos grasos libres), según corresponda.

Si el volumen de hidróxido de sodio 0,1 N (SV) requerido para la titulación es menor de 2 ml, puede emplearse un titulante más diluido o ajustarse convenientemente el tamaño de la muestra. Los resultados pueden expresarse en función del

volumen de titulante empleado o en función del volumen equivalente de hidróxido de sodio 0,1 N.

Si el aceite ha sido saturado con dióxido de carbono para su conservación, calentar a reflujo suavemente la solución de alcohol-éter durante 10 minutos antes de la titulación. El dióxido de carbono presente en el aceite puede eliminarse también colocándolo en un cristizador dentro de un desecador al vacío durante 24 horas antes de pesar la muestra.

Determinación del índice de saponificación

Transferir 1,5 a 2 g de muestra, exactamente pesados, a un erlenmeyer de 250 ml, previamente pesado, y agregar 25,0 ml de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N (SV). Calentar en un baño de vapor, con un refrigerante apropiado para mantener el reflujo durante 30 minutos, agitando por rotación frecuentemente. Agregar 1 ml de fenolftaleína (SR) y titular el hidróxido de potasio en exceso con ácido clorhídrico 0,5 N (SV). Realizar una determinación con un blanco (ver *Titulaciones residuales* en 780. *Volumetría*). La diferencia entre los volúmenes, en ml, de ácido clorhídrico 0,5 N consumido por la muestra y el blanco, multiplicado por 28,05 y dividido por el peso, en g, de la muestra, es el *Índice de saponificación*.

Si el aceite ha sido saturado con dióxido de carbono para su conservación, colocarlo en un cristizador dentro de un desecador al vacío durante 24 horas antes de pesar la muestra para el ensayo.

Determinación del índice de esterificación

[NOTA: si se han determinado el *Índice de saponificación* y el *Índice de acidez*, por diferencia entre estos se obtiene el *Índice de esterificación*.]

Transferir entre 1,5 y 2 g de muestra, exactamente pesados, a un erlenmeyer de 250 ml, previamente pesado. Agregar entre 20 y 30 ml de alcohol neutralizado, agitar y agregar 1 ml de fenolftaleína (SR). Titular con hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N (SV) hasta neutralizar totalmente los ácidos grasos, libres. Agregar 25,0 ml de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N (SV) y proceder según se indica en *Índice de saponificación*, comenzando donde dice "Calentar en un baño de vapor..." pero omitiendo el agregado adicional de fenolftaleína (SR). Realizar una determinación con un blanco. La diferencia entre los volúmenes, en ml, de ácido clorhídrico 0,5 N consumido por la muestra y el blanco, multiplicado

por 28,05 y dividido por el peso, en g, de la muestra tomada, es el *Índice de esterificación*.

Determinación del índice de hidroxilo

Reactivo piridina-anhídrido acético - Antes de comenzar el ensayo, mezclar 3 volúmenes de piridina recientemente destilada con 1 volumen de anhídrido acético recientemente destilado.

Procedimiento - Transferir una cantidad de muestra (determinada según la *Tabla 1*), exactamente pesada, a un erlenmeyer de 250 ml con tapón de vidrio y agregar 5,0 ml de *Reactivo piridina-anhídrido acético*. Transferir 5,0 ml de *Reactivo piridina-anhídrido acético* a un segundo erlenmeyer de 250 ml con tapón de vidrio, que será empleado como blanco. Acoplar a ambos erlenmeyers refrigerantes apropiados con juntas esmeriladas. Calentar en un baño de vapor durante 1 hora, agregar 10 ml de agua a través de cada refrigerante y calentar en el baño de vapor durante 10 minutos adicionales. Enfriar y agregar, a cada erlenmeyer, 25 ml de alcohol butílico previamente neutralizado frente a fenolftaleína (SR) con hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N; vertiendo los primeros 15 ml a través de cada refrigerante y, luego de retirar los refrigerantes, lavar las paredes de ambos erlenmeyers con la porción restante de 10 ml. A cada erlenmeyer agregar 1 ml de fenolftaleína (SR) y titular con hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N (SV). Registrar el volumen consumido por el ácido residual en la solución muestra como T y el consumido por el blanco como B. Transferir aproximadamente 10 g de muestra, exactamente pesados, a un erlenmeyer de 125 ml y mezclar con 10 ml de piridina recientemente destilada, neutralizada previamente frente a fenolftaleína (SR). Agregar 1 ml de fenolftaleína (SR) y titular con hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N (SV). Registrar el volumen constituido por los ácidos grasos libres presentes en la muestra como A, o emplear el *Índice de acidez* para obtener A. Calcular el *Índice de hidroxilo* por la fórmula siguiente:

$$(56,11N/P)[B + (PA/C) - T]$$

en la cual *P* y *C* son los pesos de la muestra, en g, tomados para la acetilación y para la determinación de ácidos libres, respectivamente, *N* es la normalidad exacta del hidróxido de potasio alcohólico, 56,11 es el peso molecular del hidróxido de potasio y los otros términos son los definidos anteriormente.

Tabla 1.

Intervalo de índice de hidroxilo	Peso de muestra (g)
0 a 20	10
20 a 50	5
50 a 100	3
100 a 150	2
150 a 200	1,5
200 a 250	1,25
250 a 300	1
300 a 350	0,75

Determinación del índice de iodo

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, determinar el *Índice de iodo* por el *Método I*.

Método I

Procedimiento - Transferir aproximadamente 800 mg de grasa sólida o 200 mg de aceite, exactamente pesados, a un matraz para iodo de 250 ml. Disolver en 10 ml de cloroformo, agregar 25,0 ml de bromuro de iodo (SR), tapar perfectamente y dejar en reposo durante 30 minutos al abrigo de la luz, agitando ocasionalmente. Agregar 30 ml de ioduro de potasio (SR) y 100 ml de agua, en ese orden. Titular el iodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N (SV), agitando vigorosamente después de cada agregado de tiosulfato. Cuando el color del iodo se toma muy pálido, agregar 3 ml de almidón (SR) y continuar la titulación con tiosulfato de sodio 0,1 N (SV) hasta que el color azul desaparezca. Realizar una determinación con un blanco (Ver *Titulaciones residuales* en 780. *Volumetría*). La diferencia entre los volúmenes, en ml, de tiosulfato de sodio 0,1 N (SV) consumido por la muestra y el blanco, multiplicado por 1,269 y dividido por el peso, en g, de la muestra, es el *Índice de iodo*.

[NOTA: si más de la mitad del bromuro de yodo (SR) es absorbido por la porción de muestra tomada, repetir la determinación, empleando una muestra de menor tamaño.]

Método II

Solución de ioduro de potasio - Disolver 10,0 g de ioduro de potasio en agua para obtener 100 ml. Almacenar en envases inactivos.

Solución indicadora de almidón - Mezclar 1 g de almidón soluble con cantidad suficiente de agua fría para hacer una pasta fina. Agregar esta pasta, con agitación, a 100 ml de agua hirviendo, mezclar y enfriar. Emplear solamente la solución clara.

Procedimiento - Fundir la muestra, si es sólida. [NOTA: la temperatura no debe ser mayor que el punto de fusión de la muestra en más de 10 °C.] Filtrar a través de dos piezas de papel de filtro para eliminar las impurezas sólidas y las trazas de humedad. La filtración puede realizarse en una estufa a 100 °C pero debe completarse en no más de 5 minutos \pm 30 segundos. La muestra debe estar totalmente seca. Todos los materiales de vidrio deben estar limpios y completamente secos. Luego de la filtración, dejar que la muestra filtrada alcance una temperatura entre 68 y 71 \pm 1 °C, antes de pesarla. Una vez que la muestra ha alcanzado la temperatura indicada, pesar de inmediato en un matraz para iodo de 500 ml. Emplear los pesos y exactitud de pesaje indicados en la *Tabla 2*. [NOTA: el peso de la muestra debe ser tal que el exceso de cloruro de iodo (SR) sea entre 50 y 60 % de la cantidad agregada, o sea, entre 100 y 150 o de la cantidad absorbida.] Agregar 15 ml de una mezcla de ciclohexano y ácido acético (1:1) y agitar hasta disolución. Agregar 25,0 ml de cloruro de yodo (SR), tapar perfectamente el matraz y mezclar. Dejar reposar, al abrigo de la luz, a 25 \pm 5 °C, con agitación ocasional, durante 1 hora para un índice de iodo menor a 150 o durante 2 horas para un índice de iodo mayor o igual a 150. Dentro de los 3 minutos después del tiempo de reacción indicado, agregar, 20 ml de *Solución de ioduro de potasio* y 150 ml de agua recientemente hervida y enfriada en ese orden y mezclar. Dentro de los siguientes 30 minutos, titular el iodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N (SV), agitando mecánicamente después de cada agregado de tiosulfato. Cuando el color amarillo del iodo casi haya desaparecido, agregar 1 a 2 ml de *Solución indicadora de almidón* y continuar la titulación con tiosulfato de sodio 0,1 N (SV) hasta que el color azul desaparezca. Realizar una determinación con un blanco (ver *Titulaciones residuales* en 780. *Volumetría*). La diferencia entre los volúmenes de tiosulfato de

sodio 0,1 N consumidos por el blanco y la muestra, multiplicada por 1,269 y dividido por el peso, en g,

de la muestra, es el *Índice de iodo*.

Tabla 2.

Índice de iodo esperado	Peso de muestra (g ± 0,001)
< 5	3
5-20	1
21-50	0,4
51-100	0,2
101-150	0,13
151-200	0,1

Materia insaponificable

Materia insaponificable - En aceites o grasas se refiere a aquellas sustancias que no son saponificables por hidróxidos alcalinos pero son solubles en los solventes grasos comunes y a productos de saponificación que son solubles en dichos solventes.

Procedimiento - Transferir aproximadamente 5,0 g, exactamente pesados, del aceite o grasa, a un erlenmeyer de 250 ml. Agregar 50 ml de una solución de hidróxido de potasio alcohólico, preparada disolviendo 12 g de hidróxido de potasio en 10 ml de agua y diluyendo con alcohol a 100 ml. Calentar el erlenmeyer en un baño de vapor con un refrigerante apropiado para mantener el reflujo durante 1 hora, agitando por rotación frecuentemente. Enfriar a una temperatura por debajo de 25 °C, transferir el contenido del erlenmeyer a una ampolla de decantación con un robinete de politetrafluoretileno y lavar el erlenmeyer con dos porciones de 50 ml de agua que se agregan a la ampolla de decantación. [NOTA: no emplear grasa en el robinete.] Extraer con tres porciones de 100 ml de éter, combinando los extractos etéreos en otra ampolla de decantación que contenga 40 ml de agua. Agitar suavemente la ampolla de decantación durante algunos minutos. [NOTA: una agitación violenta puede provocar la formación de una emulsión difícil de separar.] Dejar que la mezcla se separe y descartar la fase acuosa inferior. Lavar el extracto etéreo con dos porciones de 40 ml de agua adicionales y descartar la fase acuosa inferior. Lavar el extracto etéreo sucesivamente con una porción de 40 ml de una solución de hidróxido de potasio (3 en 100) y una porción de 40 ml de agua. Repetir tres veces la secuencia de lavado con solución de hidróxido de potasio y agua. Lavar el extracto etéreo con porciones de 40 ml de agua hasta que el último

lavado no se colorea por el agregado de 2 gotas de fenolftaleína (SR). Transferir el extracto etéreo a un erlenmeyer previamente pesado y lavar la ampolla de decantación con 10 ml de éter, agregando los lavados al erlenmeyer. Evaporar el éter en un baño de vapor y agregar al residuo 6 ml de acetona. Eliminar la acetona bajo una corriente de aire y secar el residuo a 105 °C hasta peso constante. Calcular el porcentaje de materia insaponificable en la porción de aceite o grasa tomada, por la fórmula siguiente:

$$100(P_R / P_M)$$

en la cual P_R es el peso, en g, del residuo y P_M es el peso, en g, del aceite o grasa tomado para el ensayo.

Disolver el residuo en 20 ml de alcohol, previamente neutralizado hasta punto final frente a fenolftaleína. Agregar fenolftaleína (SR) y titular con hidróxido de sodio alcohólico 0,1 N (SV) hasta la aparición de un débil color rosado que persista por no menos de 30 segundos. Si el volumen de hidróxido de sodio alcohólico 0,1 N es mayor de 0,2 ml, la separación de las fases ha sido incompleta y, por lo tanto, el residuo pesado no puede considerarse como materia insaponificable. En tales casos se debe repetir el ensayo.

Composición de ácidos grasos

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama, un sistema de inyección sin división (splitless) y una columna capilar de sílice fundida de 30 m × 0,53 mm rellena con una fase estacionaria constituida por polietilenglicol (PM aproximadamente 15.000), de 1,0 μm de espesor. Mantener el inyector y el detector a aproximadamente 220 y 260 °C, respectivamente. Mantener la columna a 70 °C durante aproximadamente 2 minutos después de la inyección; aumentar, a razón de 5 °C por minuto,

hasta 240 °C y mantener a esta temperatura durante 5 minutos. Se emplea helio como gas transportador con una velocidad lineal de aproximadamente 50 cm por segundo.

Solución estándar - Preparar una mezcla de ésteres de composición conocida que contenga los ésteres que se especifiquen en la monografía correspondiente. Esta solución puede contener otros componentes. [NOTA: en el comercio existen mezclas de ésteres que pueden emplearse para este propósito.]

Solución muestra - Transferir aproximadamente 100 mg de muestra, exactamente pesados, a un erlenmeyer de 50 ml. [NOTA: si la muestra contiene ácidos grasos con más de dos dobles enlaces, purgar el erlenmeyer con nitrógeno.] Adosar un refrigerante y una barra de agitación magnética, agregar 4 ml de solución de hidróxido de sodio 0,5 N en metanol y calentar a reflujo entre 5 y 10 minutos, hasta que desaparezcan los glóbulos de aceite. Agregar 5 ml de una solución preparada disolviendo 14 g de trifluoruro de boro en 100 ml de metanol. Agitar por rotación para mezclar y calentar a reflujo durante 2 minutos. Agregar 4 ml de *n*-heptano a través del refrigerante y calentar a reflujo durante 1 minuto. Enfriar, retirar el refrigerante, agregar aproximadamente 15 ml de solución saturada de cloruro de sodio, agitar y dejar que las fases se separen. Filtrar la fase de *n*-heptano a través de 0,1 g de sulfato de sodio anhidro (previamente lavado con *n*-heptano). Transferir 1,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 10 ml, diluir a volumen con *n*-heptano y mezclar.

Solución de aptitud del sistema - Transferir aproximadamente 20 mg de ácido esteárico, 20 mg de ácido palmítico y 20 mg de ácido oleico, exactamente pesados, a un erlenmeyer de 25 ml adaptado a un refrigerante y con una barra de agitación magnética. Proceder según se indica para la *Solución muestra*, comenzando donde dice "Agregar 5 ml de una solución preparada disolviendo...".

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre los picos de estearato de metilo y oleato de metilo no es menor de 1,5; los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,87 para palmitato de metilo, 0,99 para estearato de metilo y 1,0 para el oleato de metilo; la desviación estándar relativa de las respuestas de los picos de palmitato de metilo y estearato de metilo para inyecciones repetidas no es mayor de 6,0 % y la desviación estándar relativa del cociente entre las

respuestas de los picos del palmitato y el estearato para inyecciones repetidas no es mayor de 1,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos de los ésteres de los ácidos grasos. Comparar los tiempos de retención de los picos de los ésteres de los ácidos grasos en el cromatograma de la *Solución muestra* con los obtenidos en el cromatograma de la *Solución estándar*. Calcular el porcentaje de cada ácido graso presente en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$100(A/B)$$

en la cual *A* es la respuesta del pico obtenido para cada éster de ácido graso individual y *B* es la suma de las respuestas de todos los picos, excluyendo el pico del solvente, en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*.

Agua y sedimento en aceites fijos

Aparato - Emplear una centrífuga con un diámetro de giro (*d* = distancia entre los extremos de los tubos cuando están girando) de 38 a 43 cm y emplearla a una velocidad de aproximadamente 1500 rpm. Si se emplea una centrífuga de diferentes dimensiones, calcular la velocidad requerida, por la fórmula siguiente:

$$V (rpm) = 1.500 \sqrt{40,6/d}$$

Emplear tubos de centrífuga cónicos graduados y con tapones. La capacidad total de cada tubo debe ser de aproximadamente 125 ml. Las graduaciones deben ser claras y diferenciadas, empezando desde el fondo del tubo hacia arriba según la escala que se indica en la *Tabla 3*.

Procedimiento - Transferir 50,0 ml de benceno a dos tubos de centrífuga y, a cada tubo, agregar una porción de 50,0 ml del aceite previamente calentado a 25 °C y agitado, si fuera necesario, para incorporar nuevamente la estearina separada. Tapar perfectamente los tubos, agitarlos vigorosamente hasta que el contenido se mezcle completamente y luego sumergirlos en un baño de agua a 50 °C durante 10 minutos. Centrifugar durante 10 minutos. Leer el volumen combinado de agua y sedimento en el fondo de cada tubo. Centrifugar nuevamente durante períodos de 10 minutos hasta que el volumen combinado de agua y sedimento permanezca constante en tres lecturas sucesivas. La suma de los volúmenes de agua y sedimento combinado en los dos tubos representa el

porcentaje, en volumen, de agua y sedimento en el aceite.

Tabla 3.

Volumen (ml)	División de la escala (ml)
0 a 3	0,1
3 a 5	0,5
5 a 10	1
10 a 25	5
25 a 50	25
50 a 100	50

630. MÉTODOS DE FARMACOGNOSIA

Definición de Droga Vegetal - Se denomina así a las plantas o sus partes enteras, molidas o pulverizadas (flores, frutos, semillas, tubérculos, cortezas, etc.) frescas o secas, así como los jugos, gomas, látex, aceites esenciales o fijos y otros componentes similares, que se emplean puras o mezcladas en la elaboración de medicamentos.

Debido a las características de las drogas vegetales, en particular su falta de homogeneidad, se requieren procedimientos especiales en relación a los ensayos a realizar.

MUESTREO

Los siguientes procedimientos de muestreo constituyen las consideraciones mínimas aplicables a las drogas vegetales. Algunos productos o ensayos pueden requerir procedimientos más estrictos que incluyan el muestreo de mayor número de envases y/o más muestras por envase.

Si el examen externo de los envases y rótulos indica que puede considerarse el lote como homogéneo, tomar muestras individuales de un número de envases seleccionados aleatoriamente según se indica a continuación. Si el lote no puede considerarse homogéneo, fraccionarlo en sublotes que sean lo más homogéneos posible y realizar el muestreo con cada uno como un lote homogéneo.

N° de envases por lote (<i>N</i>)	N° de envases a Muestrear (<i>n</i>)
1 a 5	todos
6 a 50	5
> a 50*	10 % de los envases

* Redondear *N* al múltiplo de diez próximo superior.

Las muestras se deben tomar de las secciones superior, media e inferior de cada envase y en diferentes sitios. En el caso de los polvos o material compuesto por fragmentos de 1 cm o menos en cualquier dimensión, retirar la muestra a través de un dispositivo de muestreo que permita tomar el material desde la parte superior hasta el fondo del envase. Si el material está compuesto por fragmentos mayores de 1 cm en cualquier dimensión, retirar las muestras en forma manual. En el caso de fardos o bolsas grandes, las muestras deben tomarse a más de 10 cm de los bordes porque el contenido de humedad de la capa superficial puede ser diferente que el de las capas internas.

Combinar y mezclar las muestras tomadas de cada envase abierto, evitando aumentar el grado de fragmentación o modificar significativamente el contenido de humedad. Disponer la muestra así

preparada en forma de cuadrado y fraccionarla diagonalmente en cuatro partes iguales. Tomar luego dos partes opuestas y mezclarlas cuidadosamente. Repetir el procedimiento, si fuera necesario, hasta obtener la cantidad requerida para realizar todos los ensayos necesarios (cuarteo).

Sólo si se indica, moler la muestra para que pase a través de un tamiz N° 20 y mezclar el polvo resultante. Si el material no puede ser molido, reducirlo al estado más fino posible.

ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Cortes y coloración

Hidratación o ablandamiento - Colocar en un vaso de precipitados una cantidad apropiada de material con 20 a 30 veces su volumen de agua. Colocar sobre una plancha calefactora o una tela metálica, calentar suavemente hasta ebullición y mantenerla durante 5 minutos. Si el material no puede ser cortado después de hidratarlo, se procede a ablandarlo hirviéndolo durante 5 minutos en agua con detergente y ensayando su consistencia. Si se considera que aún no está lo suficientemente blando como para ser cortado, colocar una cantidad apropiada del material en un vaso de precipitados que contenga un volumen apropiado de etilenglicol. Ensayar periódicamente la consistencia del material. Para futuros análisis, determinar el tiempo que tarda cada material en adquirir una consistencia tal que permita su corte.

Cortes - Obtener secciones transversales delgadas del material vegetal. Esto se logra cortando a mano alzada o mediante el empleo de micrótopo. [NOTA: en el caso de la obtención de transcortes de hoja, resulta necesario el empleo de un soporte para poder cortar. Generalmente se coloca la hoja entre dos semicilindros de médula de sauco o de hinojo y se procede a cortar todo junto.]

Los instrumentos cortantes pueden ser hoja de afeitar, bisturí o cuchilla para histología.

Los cortes se colocan en un recipiente con agua (vidrios de reloj, vasos de precipitados de 30 ml). Se seleccionan los más delgados para observación al microscopio a 10x.

Coloración - Sumergir los cortes en solución de hipoclorito de sodio al 50 % para eliminar el contenido celular. Dejar actuar hasta que los cortes se vuelvan transparentes (no más de 10 a 15 minutos). Lavar los cortes con agua hasta eliminación del hipoclorito de sodio, pH neutro. Colocar los cortes en solución de azul de toluidina al 0,05 %, durante 10 segundos. Lavar con agua luego con solución de ácido acético al 0,5 % y por

último nuevamente con agua. Colocar entre porta y cubreobjetos con 2 a 3 gotas de una mezcla de glicerina-agua (1:1) y observar al microscopio a 10x y 40x. Las paredes celulósicas se tiñen de rosa púrpura. Las paredes lignificadas y las paredes con tanino se tiñen de color azul verdoso brillante. [NOTA: la coloración así obtenida no es estable.]

Observación de la droga en polvo

Observación directa - Colocar 2 a 10 mg de la droga en polvo sobre un portaobjetos. Agregar 2 ó 3 gotas de solución de ácido láctico al 5 % (diafanizante) y colocar el cubreobjetos. Observar al microscopio a 10x y 40x.

Reacciones histoquímicas -

Detección de almidón - Colocar 2 a 10 mg de la droga en polvo sobre un portaobjetos. Verter 2 ó 3 gotas de Solución de Lugol (SR) diluida (1:5) en agua. Colocar el cubreobjetos y observar al microscopio a 10x y 40x. Los granos de almidón se colorean de azulvioláceo intenso.

Detección de lípidos y aceites esenciales - Colocar 2 a 10 mg de la droga en polvo sobre un portaobjetos. Verter 2 ó 3 gotas de solución de Sudan III (SR) y dejar actuar durante 2 ó 3 minutos. Escurrir el líquido y lavar bien con alcohol 70 %. Colocar el cubreobjetos y observar al microscopio a 10x y 40x. Los lípidos aparecen como gotas de color rojo.

Detección de concreciones de carbonato de calcio (cistolitos) y de cristales de oxalato de calcio - Colocar 2 a 10 mg de la droga en polvo sobre un portaobjetos. Verter 2 ó 3 gotas de ácido clorhídrico 2 M, con la precaución de que el reactivo esté en íntimo contacto con todos los componente del polvo. Colocar el cubreobjetos y observar inmediatamente al microscopio a 10x. La presencia de carbonato de calcio está indicada por la aparición de burbujas. Los cristales de oxalato de calcio, que en general tardan más tiempo en disolverse, no desprenden burbujas.

Detección de taninos - Colocar 2 a 3 mg de la droga en polvo sobre un portaobjetos. Verter 2 ó 3 gotas de solución de cloruro férrico al 5 %. Colocar el cubreobjetos y observar al microscopio a 10x y 40x. La presencia de taninos se traduce en la aparición de masas oscuras de color pardo, azul o negro.

Obtención de disociados

Disociación, leve o débil - Este método se emplea principalmente para el análisis de hojas, tallos herbáceos y cortezas. Los cristales se conservan. Los almidones pierden su estructura característica.

Colocar en un vaso de precipitados de 30 ml una porción del material vegetal. Agregar 10 ml de solución de hidróxido de sodio al 5 % y llevar a ebullición durante 5 minutos. Enfriar. Trasvasar a un tubo de centrifuga. Centrifugar durante 2 minutos a 3000 rpm. Descartar la solución sobrenadante. Lavar con agua. Colocar una porción del centrifugado sobre un portaobjetos con 2 ó 3 gotas de una mezcla de glicerina-agua (1:1). Colocar el cubreobjetos y terminar la disgregación ejerciendo presión. Observar al microscopio a 10x y 40x.

Disociación fuerte - Este método se emplea principalmente para el análisis de leños, tegumentos de semillas y endocarpios esclerosados-carozos. No se conservan los cristales ni los almidones.

Colocar en un vaso de precipitados de 30 ml una porción del material vegetal. Agregar 10 ml de solución de hidróxido de potasio al 10 % y llevar a ebullición durante 10 minutos. Enfriar. Eliminar cuidadosamente la solución sobrenadante. Lavar con agua. Colocar el material vegetal en un tubo de centrifuga. Agregar 10 ml de solución de ácido crómico al 25 % y dejar actuar durante un tiempo no inferior a 30 minutos a temperatura ambiente. Ensayar la consistencia del material vegetal con una varilla de vidrio. Cuando esté lo suficientemente blando, centrifugar durante 2 minutos a 3000 rpm. Descartar el sobrenadante y lavar con agua hasta eliminar totalmente el color amarillo del ácido crómico. Colocar una porción del centrifugado sobre un portaobjetos con 2 ó 3 gotas de una mezcla de glicerina-agua (1:1). Colocar el cubreobjetos y terminar la disgregación ejerciendo presión. Observar al microscopio a 10x y 40x.

Determinación del índice de estomas

(Se emplea para hojas). Es el número de estomas por cada 100 células epidérmicas en un área fija.

Delimitar sobre una hoja de papel, con ayuda de una cámara clara, de un tubo de dibujo o de un ocular de dibujo, un área de 2 mm de lado empleando un micrómetro objetivo, observando con objetivo de 5x y ocular de 8x.

Colocar un trozo de hoja de 0,5 cm x 0,5 cm en un vaso de precipitados de 30 ml. Agregar 10 ml de una mezcla de hidrato de cloral y agua (5:2). Llevar a ebullición durante 10 a 15 minutos o hasta que el trozo se vuelva transparente. Esta operación se realiza bajo campana.

Colocar el trozo de hoja sobre un portaobjetos con la epidermis inferior hacia arriba. Agregar 2 ó 3 gotas de la mezcla de hidrato de cloral y agua y colocar el cubreobjetos. Contar las células epidérmicas y los estomas que aparecen en el área

delimitada empleando un objetivo de 40x. Las dos células estomáticas se cuentan como una sola.

El índice de estomas se calcula por la fórmula siguiente:

$$\frac{S}{S + E} 100$$

en la cual *S* es el número de estomas y *E* el número de células epidérmicas en el área delimitada.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Materia extraña

Se considera materia extraña a cualquier parte de la planta medicinal que no esté comprendida en la definición o en la descripción de la monografía correspondiente; cualquier organismo, parte o producto de un organismo no comprendido en la definición o en la descripción; o residuos minerales, como por ej., tierra, piedras, arena o polvo.

Durante el almacenamiento, los productos deben mantenerse en un área limpia, de modo de evitar su contaminación. Deben tomarse precauciones especiales para evitar la proliferación de hongos dado que algunos de ellos pueden generar aflatoxinas.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, obtener por cuarteo las siguientes cantidades de muestra:

<i>Raíces, rizomas, cortezas</i>	
<i>y plantas enteras.....</i>	500 g
<i>Hojas, flores, semillas y frutos.....</i>	250 g
<i>Drogas vegetales en fragmentos</i>	
<i>de 0,5 g o menores.....</i>	50 g

Extender la muestra en una capa delgada y separar la materia extraña a mano, en la forma más completa posible. Pesarla y determinar el porcentaje de materia extraña a partir de la cantidad de droga empleada.

Cenizas totales

Pesar exactamente una cantidad de muestra, obtenida según se indica en *Muestreo*, que represente de 2 a 4 g del material; molerla para que pase a través de un tamiz N° 20 y secarla al aire en un crisol previamente pesado. Someter a calcinación, suavemente al principio, y aumentar gradualmente la temperatura hasta 675 ± 25 °C. Continuar la calcinación hasta eliminar el residuo carbonoso y determinar el peso de las cenizas. Si de esta forma no se obtienen cenizas libres de residuo carbonoso, extraer la masa carbonizada con agua caliente. Recolectar el residuo insoluble en un papel de filtro libre de cenizas, calcinar el residuo y el papel de filtro hasta que las cenizas sean blancas

o casi blancas. Luego, agregar el filtrado, evaporarlo hasta sequedad y calentar a 675 ± 25 °C. Si de esta forma no se obtienen cenizas libres de residuo carbonoso, enfriar el crisol, agregar 15 ml de alcohol, disgregar las cenizas con una varilla de vidrio, quemar el alcohol y calentar nuevamente a 675 ± 25 °C. Enfriar en un desecador, pesar las cenizas y calcular el porcentaje de cenizas totales a partir de la cantidad de droga empleada.

Cenizas insolubles en ácido

Calentar a ebullición las cenizas obtenidas según se indica en *Cenizas totales*, con 25 ml de ácido clorhídrico 3 M durante 5 minutos. Recolectar el material insoluble en un crisol filtrante previamente pesado o en un filtro libre de cenizas lavado con agua caliente, llevar a temperatura de calcinación y pesar. Determinar el porcentaje de cenizas insolubles en ácido a partir del peso de droga empleada.

Extracto alcohólico

Método I (método de extracción caliente) - Transferir a un erlenmeyer con tapón de vidrio aproximadamente 4 g, exactamente pesados, del material en polvo grueso y secado al aire. Agregar 100 ml de alcohol y pesar el erlenmeyer. Agitar y dejar en reposo durante 1 hora. Conectar un refrigerante al erlenmeyer y calentar suavemente a ebullición durante 1 hora, enfriar y pesar. Ajustar nuevamente al peso original mediante el agregado de alcohol. Agitar y filtrar rápidamente a través de un filtro seco. Transferir 25 ml del filtrado a un cristizador y evaporar hasta sequedad en baño de agua. Secar a 105 °C durante 6 horas, enfriar en un desecador durante 30 minutos y pesar inmediatamente. Calcular el contenido, en mg por g, de materia extraíble en alcohol en la muestra empleada.

Método II (método de extracción fría) - Transferir a un erlenmeyer con tapón de vidrio aproximadamente 4 g, exactamente pesados, de material en polvo grueso y secado al aire. Agregar 100 ml de alcohol, tapar el erlenmeyer y macerar durante 24 horas, agitando frecuentemente durante las primeras 8 horas y luego dejar reposar. Filtrar rápidamente, tomando precauciones para evitar la pérdida de alcohol. Evaporar 25 ml del filtrado hasta sequedad en un cristizador previamente pesado y secar a 105 °C hasta peso constante. Calcular el contenido, en mg por g, de la materia extraíble en alcohol en la muestra empleada.

Extracto acuoso

Método I (método de extracción caliente) - Proceder según se indica para el *Método I* en

Procedimiento - Llevar a cabo el ensayo de acuerdo con la naturaleza de la droga a ser examinada. Transferir al balón el volumen de líquido indicado en la monografía correspondiente, agregar algunos trozos de plato poroso y colocar el condensador. Introducir agua a través del tubo de llenado *N* hasta el nivel *B*. Quitar el tapón *K'* y transferir la cantidad indicada de xileno empleando una pipeta con su extremo en la parte inferior del tubo *K*. Colocar el tapón *K'* asegurándose que los orificios de *K* y *K'* coincidan entre sí. Calentar el líquido en el balón hasta ebullición y ajustar la velocidad de extracción a aproximadamente 2 ml

por minuto, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Para determinar la velocidad de extracción, disminuir el nivel de agua por medio de la válvula de tres vías hasta que el menisco se encuentre en la marca inferior *a* (ver *Figura 2*). Cerrar la válvula y medir el tiempo que toma el líquido en alcanzar la marca superior *b*. Abrir la válvula y continuar con la extracción, modificando el calentamiento para regular la velocidad de extracción. Extraer durante 30 minutos. Detener el calentamiento y leer el volumen de xileno en el tubo graduado después de por lo menos 10 minutos.

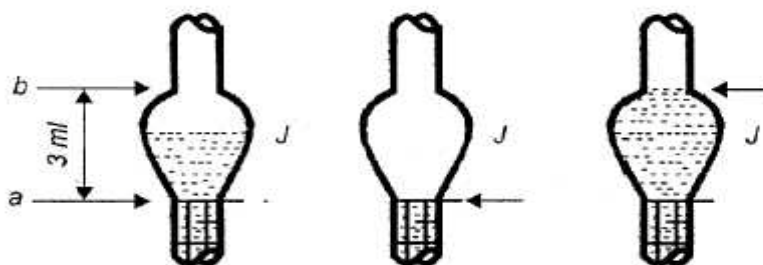


Figura 2.

Transferir el balón la cantidad de muestra especificada en la monografía correspondiente y continuar la extracción como se ha descrito anteriormente en tiempo y velocidad según se indique. Detener el calentamiento y después de 10 minutos leer el volumen de líquido recolectado en el tubo graduado y restarle el volumen de xileno anteriormente medido. Calcular el resultado en ml por cada 100 g de droga.

Cuando un aceite esencial se emplee para propósitos analíticos, la obtención de la mezcla de xileno y aceite esencial libre de agua se realiza como se detalla a continuación: quitar el tapón *K'* y transferir 1,1 ml de una solución de fluoresceinato de sodio al 0,1 % y 0,5 ml de agua. Disminuir el volumen de la mezcla de xileno y aceite esencial dentro del tubo *L* por medio de la válvula de tres vías; dejar en reposo durante 5 minutos y descargar la mezcla lentamente hasta alcanzar justo el nivel de la válvula *M*. Abrir la válvula en el sentido contrario a las agujas del reloj de manera tal que el agua fluya fuera del tubo de conexión *BM*. Lavar el tubo, primero con acetona y luego con tolueno, introducidos por el tubo de llenado *N*. Girar la llave en el sentido contrario a las agujas del reloj de manera tal que se pueda recuperar la mezcla de xileno y aceite esencial en un recipiente apropiado.

Pérdida por secado

Reducir 10 g de muestra a fragmentos de aproximadamente 3 mm de espesor. Las semillas o frutos más pequeños de 3 mm se deben fragmentar. Evitar el empleo de molinos de gran velocidad para preparar la muestra y tomar las precauciones necesarias para no modificar el contenido de humedad de la muestra. Pesar exactamente 10 g de droga en un cristizador previamente pesado. Secar a 105 °C durante 5 horas y pesar. Repetir el procedimiento de secado y pesado a intervalos de 1 hora hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas corresponda a no más de 0,25 % de muestra.

RESIDUOS DE PESTICIDAS

La lista de pesticidas consignada para este ensayo es de carácter orientativo. Para mayor información consultar las resoluciones que a tal efecto emita la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación.

Definición - Para los propósitos de esta Farmacopea, un pesticida es aquella sustancia o mezcla de sustancias empleadas para prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, especies de plantas o animales indeseables que puedan causar daño o interferir en la producción, procesamiento,

almacenamiento, transporte o comercialización de las drogas vegetales. El término incluye a sustancias empleadas como reguladores del crecimiento, desfoliantes o desecantes y cualquier otra sustancia aplicada para brindar una protección antes o después de la cosecha, o para prevenir el deterioro de la droga vegetal durante el almacenamiento o transporte.

Límites - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente la muestra debe cumplir con los límites expresados en la *Tabla 1*. Los pesticidas que no figuren en la misma deben cumplir con las especificaciones dadas por las resoluciones que a tal efecto emita la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación. Los límites para los pesticidas que no figuran en la *Tabla 1* se calculan por la fórmula siguiente:

$$\frac{IDA \times M}{DDD \times 100}$$

en la cual *IDA* es la ingesta diaria admisible, recomendada por la FAO, expresada en mg por kg de peso corporal, *M* es el peso corporal en kilogramo (considerar 60 kg) y *DDD* es la dosis diaria de la droga en kg.

Si la droga vegetal es empleada en la preparación de extractos, tinturas u otras formas farmacéuticas cuyo método de preparación modifique el contenido del pesticida en el producto final, el límite se calcula por la fórmula siguiente:

$$\frac{IDA \times M \times E}{DDD \times 100}$$

en la cual *E* es el factor de extracción del método de preparación, determinado experimentalmente.

Tabla 1.

Pesticida	Límite
Alaclor	0,02
Aldrin y dieldrin, suma de	0,05
Azinfos, metil	1
Bromopropilato	3
Cipermetrina (e isómeros)	1
Clordano (suma de cis-, trans- y oxiclordano)	0,05
Clorfenvinfos	0,5
Clorpirifos	0,2
Clorpirifos, metil	0,1
DDT (suma de p,p'-DDT, o, p'-DDE y p,p'-TDE)	1
Deltametrina	0,5
Diazinon	0,5
Diclorvos	1
Ditiocarbamatos (expresado como CS ₂)	2
Endosulfan (suma de isómeros y sulfato de endosulfano)	3
Endrin	0,05
Etion	2
Fenitrothion	0,5
Fenvalerato	1,5
Fonofos	0,05
Fosalono	0,1
Heptacloro (suma de heptacloro y heptacloro epóxido)	0,05
Hexaclorobenceno	0,1
Hexaclorociclohexano, isómeros (distintos de γ)	0,3
Lindano (γ-hexaclorociclohexano)	0,6
Malation	1
Metidation	0,2
Paration	0,5
Paration, metil	0,2
Permetrina	1
Piperonil, butóxido	3
Piretrinas, suma de	3
Pirimifos, metil	4

Análisis cualitativo y cuantitativo de residuos de pesticidas

Los procedimientos analíticos empleados deben satisfacer los siguientes criterios: el método de extracción elegido debe ser apropiado para la combinación de pesticidas que se pretende

investigar y no provocar interferencias. Los límites de detección y cuantificación deben determinarse para cada combinación de pesticidas a ser analizada. La recuperación debe estar entre el 70 y 110 %. La repetitividad y reproducibilidad del método no debe ser menor que la indicada en la *Tabla 2*.

Tabla 2.

Concentración de pesticida (mg/kg)	Repetitividad (\pm mg/kg)	Reproducibilidad (\pm mg/kg)
0,01	0,005	0,01
0,1	0,025	0,05
1	0,125	0,25

Pesticidas organoclorados, organofosforados y piretroides

Los ensayos que se describen a continuación se emplean para el análisis de pesticidas, a menos que se especifique lo contrario en la monografía correspondiente. Dependiendo de la sustancia a analizar, puede ser necesario, en algunos casos, introducir modificaciones en los procedimientos descritos. En cualquier caso, puede ser necesario emplear otra columna con diferente polaridad u otro método de detección (espectrometría de masa, etc.) o un método diferente para confirmar los resultados obtenidos (métodos inmunoquímicos, etc.).

Este ensayo es válido solamente para el análisis de drogas vegetales con un contenido de agua menor de 15 %. Las muestras con mayor humedad pueden secarse, teniendo en cuenta que el procedimiento empleado no afecte significativamente el contenido de pesticida.

Extracción - A 10 g de muestra, en forma de polvo grueso, agregar 100 ml de acetona y dejar reposar durante 20 minutos. Agregar 1 ml de solución que contenga 1,8 μ g por 1 ml de carbofenotion en tolueno. Homogeneizar empleando un agitador de alta velocidad durante 3 minutos. Filtrar y lavar el residuo con dos porciones de acetona de 25 ml. Combinar el filtrado y los lavados en un balón y evaporar hasta casi sequedad en un evaporador rotatorio a una temperatura no mayor a 40 °C. Al residuo así obtenido, agregarle unos ml de tolueno y continuar con el calentamiento a la temperatura especificada anteriormente hasta evaporación total de la acetona. Disolver el residuo en 8 ml de tolueno. Filtrar a través de una membrana

filtrante de 45 μ m, lavar el balón y el filtrado de tolueno. Diluir a 10 ml con el mismo solvente. Denominar esta solución como *Solución A*.

Purificación -

Pesticidas organoclorados, o ganofosforados y piretroides - Emplear una columna de 30 cm x 7,8 mm para cromatografía (ver *100. Cromatografía*) con fase estacionaria constituida por copolímero rígido, esférico de divinilbenceno y estireno, de 5 μ m de diámetro. Emplear tolueno como fase móvil. El caudal es de aproximadamente 1 ml por minuto.

Para verificar la aptitud de la columna, inyectar 100 μ l de una solución en tolueno que contenga 0,5 mg por ml de rojo de metilo y 0,5 mg por ml de azul de oracet 2R y proceder con la cromatografía. La columna es apta si los colores del eluato cambian de anaranjado a azul en un volumen de eluato de aproximadamente 10,3 ml. Calibrar la columna, si fuera necesario, empleando una solución en tolueno que contenga una concentración apropiada del pesticida a ser analizado de menor peso molecular (por ej., diclorvos) y aquél de mayor peso molecular (por ej., deltametrina). Determinar en qué fracción del eluato se encuentran ambos pesticidas.

Purificación de la solución - Inyectar un volumen apropiado de *Solución A* (100 a 500 μ l) y proceder con la cromatografía. Recolectar las fracciones según se indicó anteriormente e identificarlas como *Solución B*. Los pesticidas organofosforados generalmente eluyen entre 8,8 y 10,9 ml, y los organoclorados y piretroides lo hacen entre 8,5 y 10,3 ml.

Pesticidas organoclorados y piretroides - Emplear una columna cromatográfica de 10 cm x 5 mm. Introducir un trozo de lana de vidrio y 0,5 g de gel de sílice para cromatografía tratada según se indica a continuación: calentar el gel de sílice para

cromatografía en una estufa a 150 °C durante 4 horas. Dejar enfriar y agregar gota a gota una cantidad de agua equivalente a 1,5 % de la masa de gel de sílice empleada, agitar vigorosamente hasta que desaparezcan los grumos y continuar agitando durante 2 horas empleando un agitador mecánico. Acondicionar la columna empleado 1,5 ml de hexano. [NOTA: pueden emplearse columnas empacadas con 0,5 g de gel de sílice apropiado si su empleo ha sido previamente validado].

Concentrar la *Solución B* hasta casi sequedad bajo una corriente de helio o nitrógeno libre de oxígeno y diluir a un volumen apropiado con tolueno (200 µl a 1 ml de acuerdo con el volumen inyectado en la preparación de la *Solución B*). Transferir cuantitativamente a la columna y eluir con 1,8 ml de tolueno. Recolectar el eluato e indentificarlo como *Solución C*.

Análisis cuantitativo

Pesticidas organofosforados -

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de gases con un detector de nitrógeno-fósforo o un detector de ionización a la llama y una columna de sílice fundida de 30 m x 0,32 mm con una fase estacionaria constituida por una capa de dimetilpolisiloxano de 0,25 µm de espesor. Mantener la columna a 80 °C durante 1 minuto, luego aumentar la temperatura a razón de 30 °C por minuto hasta 150 °C, mantener a esa temperatura durante 3 minutos. Aumentar la

temperatura a razón de 4 °C por minuto hasta 280 °C y mantener a esta temperatura durante 1 minuto. Mantener el inyector y el detector a 250 y 275 °C, respectivamente. Se emplea hidrógeno como gas transportador.

[NOTA 1: pueden emplearse otros gases transportadores como nitrógeno o helio si su empleo ha sido previamente validado].

[NOTA 2: emplear carbofenotion como estándar interno; en ciertos casos puede ser necesario emplear un segundo estándar interno para identificar una posible interferencia con el pico correspondiente al carbofenotion].

Soluciones estándar - Preparar al menos tres soluciones en tolueno, que contengan los insecticidas a determinar y carbofenotion en concentraciones apropiadas para obtener una curva de calibración.

Solución muestra - Concentrar la *Solución B* bajo una corriente de helio o nitrógeno libre de oxígeno hasta casi sequedad y diluir a 100 µl con tolueno.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo los volúmenes elegidos para cada solución, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Los tiempos de retención relativos aproximados se indican en la *Tabla 3*. [NOTA: los valores tabulados son orientativos y se transcriben para dar una idea de la secuencia en que eluyen las sustancias].

Calcular el contenido de pesticida a partir de las respuestas de los picos y las concentraciones de las soluciones empleadas.

Tabla 3.

Sustancia	Tiempos de retención relativos
Diclorvos	0,20
Fonofos	0,50
Diazinon	0,52
Paration, metil	0,59
Cloropirifos, metil	0,60
Pirimifos, metil	0,66
Malation	0,67
Paration	0,69
Cloropirifos	0,70
Metidation	0,78
Etion	0,96
Carbofenotion	1,00
Azinfos, metil	1,17
Fosalon	1,18

Pesticidas organoclorados y piretroides -

Sistema cromatográfico - Emplear un cromatógrafo de gases equipado con un detector de captura electrónica y una columna de sílice fundida de 30 m x 0,32 mm con fase estacionaria constituida por una capa de dimetilfenilpolisiloxano de 0,25 µm de espesor. Mantener la columna a

80 °C durante 1 minuto, aumentar la temperatura a razón de 30 °C por minuto hasta 150 °C, mantener esa temperatura durante 3 minutos. Aumentar la temperatura a razón de 4 °C por minuto hasta 280 °C y mantener a esta temperatura durante de 1 minuto. Mantener el inyector y el detector a 250

y 275 °C, respectivamente. Se emplea hidrógeno como gas transportador.

[NOTA 1: pueden emplearse otros gases transportadores como nitrógeno o helio si su empleo ha sido previamente validado].

[NOTA 2: emplear carbofenotion como estándar interno, en ciertos casos puede ser necesario emplear un segundo estándar interno para identificar una posible interferencia con el pico correspondiente al carbofenotion).

Soluciones estándar - Preparar al menos tres soluciones en tolueno, que contengan los pesticidas a determinar y carbofenotion en concentraciones apropiadas para obtener una curva de calibración.

Solución muestra - Concentrar la *Solución C* bajo una corriente de helio o nitrógeno libre de oxígeno hasta casi sequedad y diluir a 500 µl con tolueno.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo los volúmenes elegidos para cada solución, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Los tiempos de retención relativos aproximados se indican en la *Tabla 4*. [NOTA: los valores tabulados son orientativos y se transcriben para dar una idea de la secuencia en que eluyen-las sustancias].

Calcular el contenido de pesticida a partir de las respuestas de los picos y las concentraciones de las soluciones empleadas.

Tabla 4.

Sustancia	Tiempos de retención relativos
α-Hexaclorociclohexano	0,44
Hexaclorobenceno	0,45
β-Hexaclorociclohexano	0,49
Lindano	0,49
δ-Hexaclorociclohexano	0,54
ε-Hexaclorociclohexano	0,56
Heptacoloro	0,61
Aldrin	0,68
cis-Heptacoloro epóxido	0,76
p,p'-DDE	0,81
α-Endosulfan	0,82
Dieldrin	0,87
p,p'-DDE	0,87
o,p'-DDD	0,89
Endrin	0,91
β-Endosulfan	0,92
o,p'-DDT	0,95
Carbofenotion	1,00
p,p'-DDT	1,02
cis-Permetrina	1,29
trans-Permetrina	1,31
Cipermetrina*	1,40
Fenvalerato*	1,47
	1,49
Deltametrina	1,54

La sustancia presenta varios picos

CONTROL HIGIÉNICO

Proceder según se indica en <90>. *Control higiénico de productos no obligatoriamente*

estériles y en <110>. Determinación de aflatoxinas. Los límites permitidos son los establecidos en la *Tabla 5*.

Tabla 5.

	Materias primas y productos terminados destinados a la preparación de infusiones	Productos terminados de uso tópico	Productos terminados de uso oral
Recuento de aerobios viables	No más de 10^7 ufc/g	No más de 10^4 uf/g	No más de 10^4 uf/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en un gramo	Ausencia en un gramo	Ausencia en un gramo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Ausencia en un gramo	-
<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia en un gramo	-	Ausencia en un gramo
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en un gramo	-	Ausencia en un gramo
Anaerobios sulfito-reductores	Ausencia en un gramo	-	Ausencia en un gramo
Recuento de Enterobacteriaceae	No más de 10^4 ufc/g	No mas de 10^2 ufc/g	No mas de 10^2 ufc/g
Recuento de hongos y levaduras	No más de 10^4 ufc/g	No mas de 10^2 ufc/g	No mas de 10^2 ufc/g
Aflatoxinas	No más de 20 μ g/kg*	Ausencia en un gramo	Ausencia en un gramo

*siempre que B₁ no supere los 5 μ g por kg.

AJO, polvo

Definición - Ajo se obtiene a partir de los bulbos de *Allium sativum* L. (Liliaceae) cortados, liofilizados y secados, a una temperatura que no debe exceder los 65 °C y reducidos a polvo. Debe contener no menos de 0,45 por ciento de *allicina*, calculado sobre la droga seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Alanina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, almacenados en un sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - *Características macroscópicas* - El polvo es blanco amarillento; de olor fuerte y característico; sabor pungente y persistente.

B - *Características microscópicas* - Presenta fragmentos de parénquima con algunas células que contienen cristales prismáticos de oxalato de calcio; fragmentos de vasos espiralados; fragmentos de epidermis con células alargadas de paredes gruesas y perforadas. Ocasionalmente aparecen estomas.

C - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Alcohol, ácido acético glacial, propanol y agua (40:20:20:20).

Solución estándar - Disolver 5 mg de Alanina SR-FA en 10 ml de agua y diluir hasta 20 ml con metanol.

Solución muestra - A 1 g de Ajo, polvo agregar 5,0 ml de metanol, agitar durante 1 minuto y filtrar.

Revelador - Disolver 0,2 g de Ninhidrina en 100 ml de una mezcla de butanol y ácido acético glacial (95:5).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, en bandas, 20 µl de la *Solución muestra* y 10 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar en estufa durante 5 a 10 minutos entre 105 y 110 °C. Examinar la placa bajo luz visible. El cromatograma obtenido con la *Solución estándar* debe presentar una mancha de

color violeta correspondiente a alanina en el tercio central. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar una mancha de color entre violeta y rojo parduzco en posición similar correspondiente a la *allicina*. Con valores de R_f mayores y menores de la misma se pueden apreciar otras manchas semejantes, generalmente más débiles.

Almidón

Examinar la droga al microscopio utilizando agua. Agregar Solución de yodo (SR): no se debe desarrollar color azul.

Cenizas insolubles en ácido (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 1 %.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 5,0 %.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No debe contener más de 0,001 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe perder más de 7,0 % de su peso, determinado sobre 1,0 g de droga pulverizada secada en estufa entre 100 y 105°C durante 2 horas.

Residuos de pesticidas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm con una precolumna de 20 cm × 4 mm y una columna de 25 cm × 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,8 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol y solución de ácido fórmico anhidro al 1 % v/v (60:40).

Solución del estándar interno - Disolver aproximadamente 20 mg de butilparabeno en 100 ml de una mezcla de metanol y agua (1:1).

Preparación muestra - A 0,8 g de Ajo polvo agregarle 20 ml de agua y homogeneizar la mezcla en un baño con ultrasonido a 4 °C durante 5 minutos. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Centrifugar durante 30 minutos. Transferir 10,0 ml del sobrenadante y diluir con *Fase móvil* a 25 ml. Agitar y centrifugar durante 5 minutos. Transferir 0,5 ml de la *Solución del estándar interno* a un matraz aforado y completar a 10 ml con la solu-

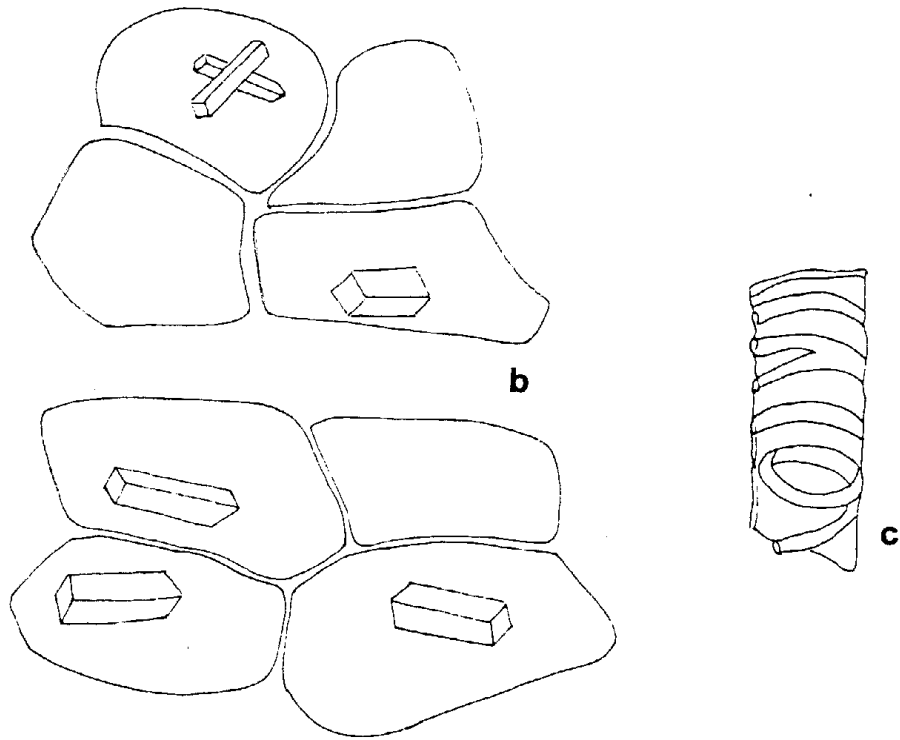
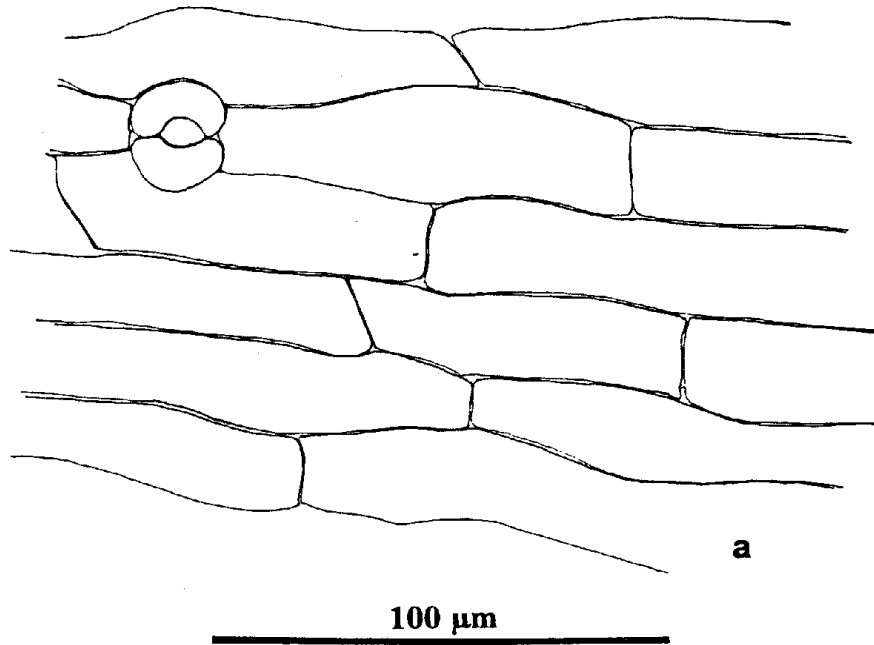
ción preparada anteriormente.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución del estándar interno* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*. La desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar 1 µl de la *Solución de estándar interno*, registrar el cromatograma hasta un tiempo equivalente al doble del correspondiente al pico principal que se registre. Proceder del mismo modo con 10 µl de la *Preparación muestra*. Ajustar los parámetros operativos de modo que el pico obtenido a partir del estándar interno en la *Preparación muestra* sea aproximadamente el 50 % de la escala completa del registrador. Calcular el contenido en porcentaje de *Allicina* en la porción de Ajo en ensayo por la fórmula siguiente:

$$\frac{22,75S_1m_2}{S_2m_1}$$

en la cual S_1 es la respuesta del pico correspondiente a la *allicina* (pico más grande), S_2 es la respuesta del pico correspondiente al *butilparabeno* obtenido en el cromatograma de la *Preparación muestra*, m_1 es la masa de la droga en gramos y m_2 es la masa de *butilparabeno* en gramos, en 100 ml de *Solución de estándar interno*. Cada miligramo de *butilparabeno* equivale a 8,65 mg de *Allicina*.



Allium sativum

Bulbo a: vista superficial de la epidermis, b: parénquima con cristales, c: vaso xilemático

ALCACHOFA, Hoja

Definición - Alcachofa está constituida por las hojas frescas o desecadas, enteras o divididas, de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). Debe contener no menos de 0,8 por ciento de ácido clorogénico, calculado sobre la materia seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Ácido Clorogénico SR-FA.

CONSERVACION

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio seco y fresco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Hojas simples, las basales arrosietadas, de hasta 1 m de longitud y 30 cm de ancho. Pecíolo de 1 a 2 cm de longitud. Lámina pinatinervada, lobulada o pinatífida con segmentos agudos, marcadamente dentados en el margen; la cara superior de color verde grisáceo y cubierta de pelos blanquecinos; la inferior de color verde pálido, densamente tomentosa, con largos pelos enmarañados. Pecíolo y nervios principales planos en la cara superior, y prominentes, con estrías longitudinales, en la cara inferior. Olor característico y sabor amargo.

B - Características microscópicas: en vista superficial, ambas epidermis presentan células poligonales con paredes rectas y estomas de tipo anomicítico; pelos de dos tipos: simples, flageliformes, pluricelulares, uniseriados, con una porción basal compuesta de 2 a 6 o más células de diferentes tamaños y una larga célula terminal; y glandulares, constituidos por un pie 4 a 5 celular y cabezuela secretora bicelular; los pelos simples son más numerosos y predominan en la epidermis inferior formando un denso indumento. La sección transversal del limbo presenta la epidermis superior con células rectangulares aplanadas tangencialmente y la epidermis inferior con células cuadrangulares, ambas cubiertas por una fina cutícula, además de los pelos descriptos; mesófilo dorsiventral con 2 estratos de parénquima en empalizada y 3 a 4 estratos de parénquima esponjoso; colénquima angular-laminar, en 3 a 4 capas de células y en relación con ambas epidermis; nervadura central constituida por 1 a 3 haces vasculares colaterales, y escasas fibras.

C - Droga en polvo: el polvo es de color verde grisáceo. Se observan fragmentos de epidermis con estomas, pelos glandulares, pelos pluricelulares aislados o unidos a porciones de tejido epidérmico,

restos de parénquima clorofiliano y fragmentos de nervaduras donde se distinguen vasos anillados y espiralados.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica:

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta de gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, agua, ácido acético y ácido fórmico (100:26:11: 11). [NOTA: preparar inmediatamente antes de su uso].

Solución estándar - Disolver 2 mg de Ácido Clorogénico SR-FA en 10 ml de metanol.

Solución muestra - A 2 g de Alcachofa finamente pulverizada, agregar 20 ml de alcohol 60 %, macerar durante dos horas, agitando de vez en cuando y filtrar.

Revelador - Reactivo de Productos naturales-polietilenglicol.

Procedimiento - Aplicar en bandas por separado 5 µl de la *Solución estándar* y 10 µl de la *Solución muestra*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar de la cámara, marcar el frente de solvente y dejar secar. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y dejar secar. Examinar la placa con luz ultravioleta a 365 nm. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar una banda de fluorescencia celeste correspondiente al ácido clorogénico que se corresponde en posición y fluorescencia a la obtenida con la *Solución estándar* (R_f 0,47). El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar además una banda amarilla brillante a R_f 0,50, correspondiente a luteolina-7-glucósido y entre otras, bandas de fluorescencia celeste entre R_f 0,8 y 0,9.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe contener no más de 2,0 % de materias extrañas.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No más de 20,0 %, determinado sobre 1,0 g de Alcachofa finamente pulverizado.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No más de 12,0 %, determinado sobre 10 g de Alcachofa desecada reducida a polvo fino, colocada en estufa a una temperatura comprendida entre 100 y 105 °C durante 2 horas.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Aflatoxinas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Metales pesados (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Método 1. No más de 0,001 %.

Residuo de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACION

Sistema cromatográfico - Emplear un cromatógrafo de líquidos equipado con un detector ultravioleta ajustado a 330 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosa de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,2 ml por minuto. El cromatógrafo se debe programar del siguiente modo:

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0 - 1	92	8
1 - 20	92 → 75	8 → 25
20 - 33	75	25
33 - 35	0	100
35 - 37	0 → 92	100 → 8
37 - 47	92	8

Solución A - Agua y ácido fosfórico (99,5:0,5).

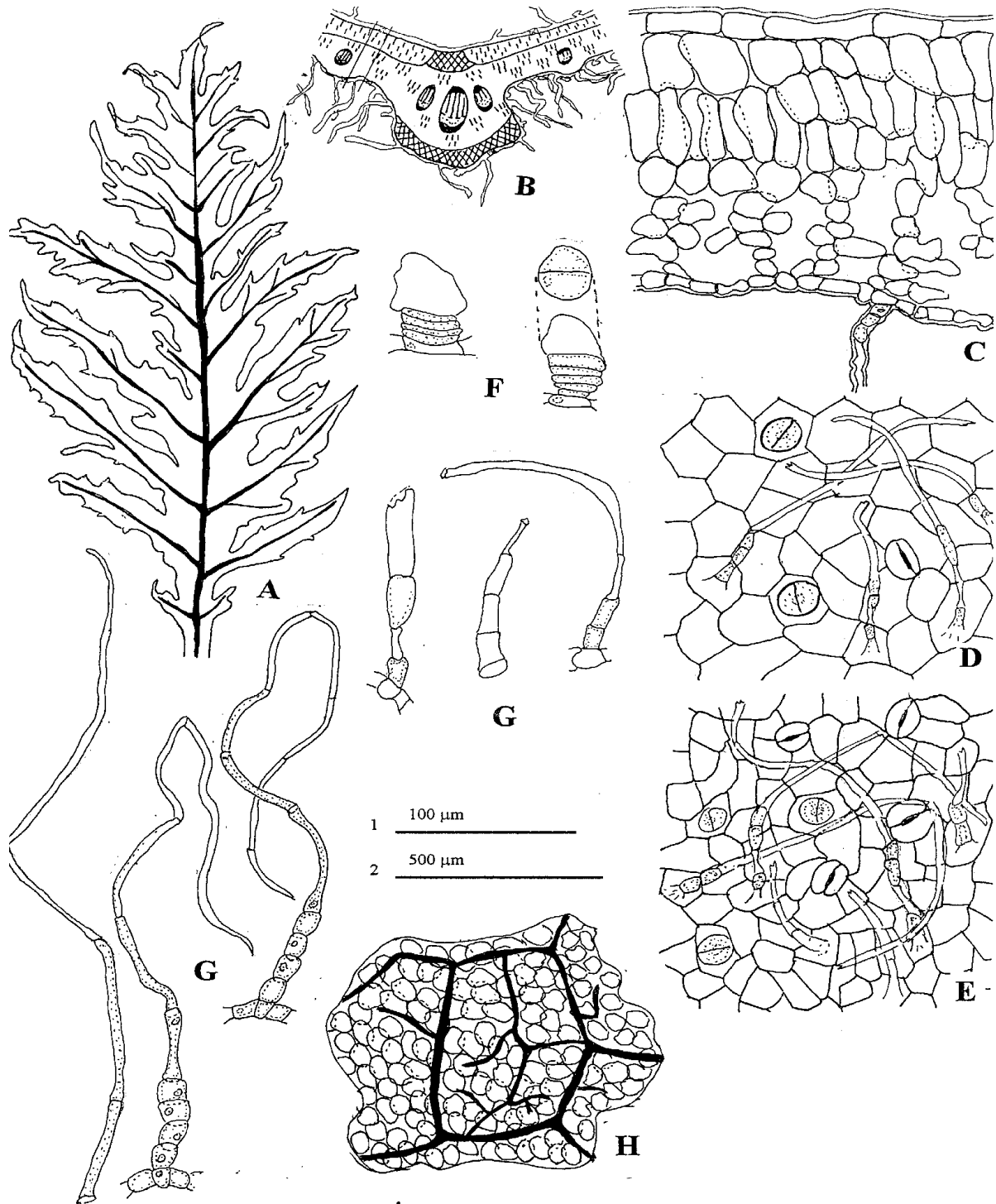
Solución B - Acetonitrilo y ácido fosfórico (99,5:0,5).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 5,0 mg de Ácido Clorogénico SR-FA, transferir a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 30 ml de una mezcla de agua y metanol (6:4) y agitar hasta disolver. Completar a volumen con el mismo solvente.

Preparación muestra - Reducir a polvo fino aproximadamente 5 g de Alcachofa y transferir aproximadamente 500 mg a un erlenmeyer de 100 ml. Agregar 50 ml de una mezcla de agua y metanol (6:4) y agitar magnéticamente durante 30 minutos. Extraer el sobrenadante y repetir la operación sobre el residuo. Combinar los extractos obtenidos, transferir a un matraz aforado de 100 ml y filtrar. Completar a volumen con el mismo solvente y filtrar.

Procedimiento- Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los pi-

cos correspondientes al ácido clorogénico. Calcular la cantidad en porcentaje de ácido clorogénico en la porción de Alcachofa en ensayo.



Cynara scolymus L. A-H: A, hoja morfología. B-C: corte transversal del limbo: B, representación esquemática del nervio medio; C, detalle de los indicado en B. D-E: vista superficial de la epidermis: D, superior; E, inferior. F-G: tricomas: F, glandulares con cabeza secretora bicelular; G, simples, pluricelulares, flageliformes (algunos rotos). H, vista superficial de una porción de la lámina mostrando la arquitectura foliar y el parénquima en empalizada. Las reglillas corresponden a 1 a C-H; 2 a B.

ANÍS, fruto

Definición - Anís es el fruto desecado de *Pimpinella anisum* L. (Apiaceae). Debe contener no menos de 2,0 por ciento de aceite esencial, calculado sobre la droga seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - El fruto es de forma ovoide, oblonga y ligeramente comprimido lateralmente, terminado en un estilopodio, con dos ramas estilares reflejas; de color verde grisáceo o verde amarillento; de 2 a 3 mm de ancho. Consta de 2 mericarpos que persisten con frecuencia adosados por sus ápices al carpóforo; los que poseen una cara comisural plana y otra dorsal convexa, recorrida de la base al ápice por 5 costillas delgadas, algunas poco salientes y presenta pelos cortos y gruesos. Posee olor a anetol, agradable, aromático y sabor dulce y ardiente, característico.

B - Características microscópicas - En sección transversal es octogonal o redondeado, con diez costillas poco salientes en la cara dorsal y la cara comisural ligeramente cóncava. La epidermis muestra pelos cortos, unicelulares, no glandulares, de paredes gruesas y cutícula verrugosa; el pericarpo se caracteriza por la presencia de numerosos canales secretores pequeños (15 a 45) dispuestos en forma circular, sobre la cara dorsal de cada mericarpo, y unos pocos (2 a 4) canales grandes sobre la cara comisural. La epidermis interna del pericarpo está constituida por una capa de células de paredes delgadas, tangencialmente alargadas, excepto cerca de la línea media de la cara comisural, donde las células pueden tener paredes gruesas, porosas o reticuladas. La cubierta de la semilla está constituida por células con paredes gruesas, de color pardo amarillento, íntimamente unidas con la epidermis del pericarpo, excepto a lo largo de la cara comisural, donde se separa por una gran cavidad; el endosperma es de células poligonales, de paredes gruesas, llenas de granos esféricos o elipsoidales de aleurona, micro rosetas de oxalato de calcio y aceite fijo.

C - Droga en polvo - Es de color verde amarillento a pardo verdoso; se observan partículas irregulares de pericarpo, que muestran porciones de canales secretores; células del endosperma, con granos de aleurona, micro rosetas de oxalato de calcio y aceite fijo; pelos no glandulares; haces de fibras escleren-

quimáticas del carpóforo y fragmentos de haces vasculares. No debe contener almidón.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Tolueno.

Solución estándar - Mezclar 3 µl de anetol y 40 µl de aceite de oliva con 1 ml de tolueno.

Solución muestra - Agitar 100 mg de Anís pulverizado con 2 ml de cloruro de metileno durante 15 minutos. Filtrar y evaporar con precaución el filtrado a sequedad en baño de agua a 60 °C. Disolver el residuo en 0,5 ml de tolueno.

Revelador - Ácido fosfomolibdico al 20 % en etanol, recientemente preparado.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 2 µl y 3 µl de la *Solución muestra* y 1 µl, 2 µl y 3 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm: los cromatogramas deben presentar, sobre un fondo claro una banda correspondiente al anetol con un valor de R_f de aproximadamente 0,60. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar en estufa a 120 °C durante 5 minutos. Observar a la luz natural: las bandas correspondientes al anetol deben presentar color azul sobre fondo amarillo. La intensidad de la banda correspondiente al anetol, en el cromatograma obtenido con 2 µl de *Solución muestra* es intermedia respecto de las intensidades obtenidas con 1 µl y 3 µl de la *Solución estándar*. Los cromatogramas obtenidos con la *Solución muestra* deben presentar una banda azul correspondiente a triacilglicéridos con un valor de R_f comprendido entre 0,20 y 0,30, semejante al obtenido con la *Solución estándar*.

Cenizas insolubles en ácido (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 2,5 %.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 12,5 %, determinado sobre 1,0 g de droga finamente pulverizada.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de agua <120>

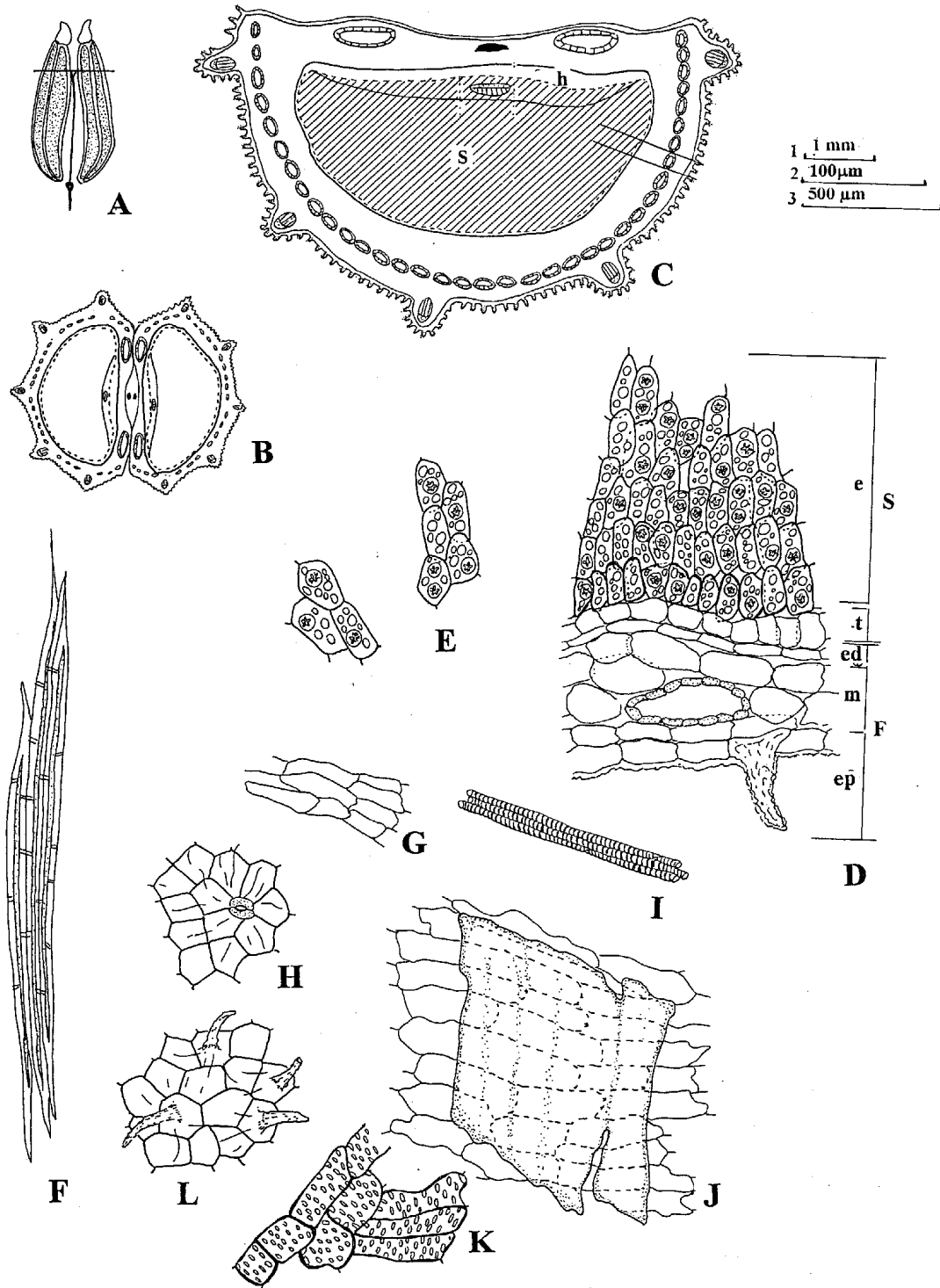
Determinada sobre 10,0 g por destilación azeotrópica. No debe contener más de 7,0 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 3 %.

VALORACION

Realizar la determinación de aceites esenciales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*). Pesar 10,0 g de Anís en polvo y transferir a un balón de 250 ml. Destilar con 100 ml de agua y recolectar el destilado empleando 0,5 ml de xileno en un tubo graduado, a una velocidad de 3 a 4 ml por minuto durante 2 horas. Pesar y calcular el contenido de Anís en porcentaje.



Pimpinella anisium L., A-L: A, morfología del fruto. B-D, sección transversal. B, fruto según lo indicado en A, esquema. C, representación esquemática del pericarpio. D, fruto y semilla detalle de lo indicado en C. E-I, polvo. E, fragmento de endosperma con células con aceites fijos y granos de aleuronas conteniendo 1-2 rosetas de oxalato de calcio. F, cordones de fibras del carpóforo y pedicelo. G, células de la testa de paredes delgadas. H, porción de la pared del fruto mostrando un estoma anomocítico y cutícula estriada. I, fragmento de tejido vascular, vasos espiralados. J, porción del mesocarpio con un canal secretos ramificado. K, esclereidas de la cara comisural. L, porción de la pared del fruto con tricomas enteros y fragmentados, cutícula estriada. e, endosperma; ed, endocarpio; ep, epicarpio; Fr, fruto. h, hueco; m, mesocarpio; S, semilla; t, tegumento de la semilla. Las reglillas corresponden a: 1 a B; 2 a D-L; 3 a C.

BÁLSAMO DE PERÚ

Definición - Bálsamo de Perú es el líquido obtenido por contusión y quemadura superficial de la corteza de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms var. *pereirae* (Royle) Harms (Fabaceae). Debe contener no menos de 45,0 por ciento y no más de 70,0 por ciento de ésteres, principalmente benzoato de bencilo y cinamato de bencilo y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Líquido viscoso, de color pardo oscuro a pardo rojizo, transparente cuando se observa en capa delgada. No se espesa ni solidifica por contacto con el aire. Posee olor balsámico agradable similar al de la vainilla; con sabor acre y ligeramente amargo. Fácilmente soluble en su peso de alcohol absoluto, clorofórmico y ácido acético; parcialmente soluble en éter, éter de petróleo y aceites fijos; prácticamente insoluble en agua, a la que confiere reacción ácida al tornasol.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Disolver 200 mg de Bálsamo de Perú en 10 ml de alcohol. Agregar 0,2 ml de cloruro férrico: se debe desarrollar una coloración verde a verde oliva.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Hexano, acetato de etilo, ácido acético glacial (90:10:0,5).

Solución muestra - Disolver 500 mg de Bálsamo de Perú en 10 ml de acetato de etilo.

Solución estándar - Disolver 4 mg de timol, 30 mg de cinamato de bencilo y 80 µl de benzoato de bencilo en 5 ml de acetato de etilo.

Revelador - Ácido fosfomolibdico al 20 % en alcohol, recientemente preparado.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de la *Solución estándar* y 10 µl de la *Solución muestra*, en forma de bandas. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Secar al aire y desarrollar nuevamente en las mismas condiciones. Secar la placa al aire nuevamente y examinar bajo luz

ultravioleta a 254 nm. El cromatograma obtenido con la *Solución estándar* presenta, en su tercio superior, dos bandas: la superior correspondiente al benzoato de bencilo y la inferior al cinamato de bencilo. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar dos bandas con R_f similar y prácticamente del mismo tamaño. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*, calentar entre 100 y 105 °C durante 5 a 10 minutos. Examinar los cromatogramas bajo luz natural. Las bandas correspondientes al benzoato de bencilo y al cinamato de bencilo deben presentar color azul sobre fondo amarillo. El cromatograma obtenido con la *Solución estándar* presenta, cerca de su parte media, una banda gris-violeta correspondiente al timol. En el cromatograma obtenido con la *Solución muestra* se debe observar una banda azul correspondiente al nerolidol inmediatamente por debajo de la banda correspondiente al timol en el cromatograma obtenido con la *Solución estándar*. Examinar bajo luz ultravioleta a 254 nm. Inmediatamente por debajo de la banda correspondiente al nerolidol, no debe aparecer ninguna banda azul correspondiente a colofonia. En las partes superior e inferior del cromatograma obtenido con la *Solución muestra* pueden aparecer otras bandas de color azul pálido.

Aceites fijos

Agitar 1 g de Bálsamo de Perú con una solución preparada con 3 g de hidrato de cloral (SR) y 2 ml de agua: se debe obtener una solución transparente (ausencia de aceites fijos).

Colofonia y bálsamo de copaiba

Agitar enérgicamente 1 g de Bálsamo de Perú con 10 ml de éter de petróleo, durante dos minutos. Filtrar y agregar 10 ml de una solución recientemente preparada de acetato cúprico al 0,5 %; agitar bien y dejar separar las fases: no se debe producir coloración verde en la capa de éter de petróleo.

Determinación de la densidad relativa <160>

Entre 1,140 y 1,170.

Determinación del índice de acidez (ver 480. *Grasas y aceites fijos*)

Disolver 1 g de Bálsamo de Perú, en 100 ml de alcohol neutralizado; agregar 1 ml de fenoltaleína y titular la mezcla con hidróxido de sodio 0,1 N: el índice de acidez debe estar comprendido entre 56 y 84.

Determinación del índice de saponificación (ver 480. *Grasas y aceites fijos*)

Disolver el residuo obtenido en *Valoración* en 20 ml de alcohol; agregar 20,0 ml de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N; calentar a reflujo durante media hora y titular la solución con ácido sulfúrico

0,5 N (SV), en presencia de fenolftaleína como indicador: el índice de saponificación debe estar comprendido entre 230 y 255.

VALORACIÓN

[NOTA: emplear éter etílico libre de peróxidos].

Agregar a 2,5 g de Bálsamo de Perú, contenidos en una ampolla de decantación, 7,5 ml de solución de hidróxido de sodio al 8,5 % y 40 ml de éter etílico y agitar vigorosamente durante 10 minutos. Separar la capa inferior y agitar con tres porciones de 15 ml de éter etílico. Reunir los extractos etéreos, secar con 10 g de sulfato de sodio anhidro y filtrar. Lavar el sulfato de sodio con dos porciones de 10 ml de éter etílico. Reunir los extractos etéreos y evaporar a sequedad. Secar el residuo entre 100 y 105 °C durante 30 minutos y pesar. Expresar el peso obtenido en porcentaje.

BÁLSAMO DE TOLÚ

Definición - Bálsamo de Tolú es obtenido por incisiones practicadas en la corteza de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms (Fabaceae).

Caracteres generales - Semisólido amarillo o amarillo pardo, que endurece con el tiempo, presentándose entonces como una masa resinosa, dura, friable, que se ablanda al entibiarse; de color pardo claro a pardo rojizo, traslúcido en capa delgada; de olor balsámico agradable que recuerda al de la vainilla; con sabor aromático, dulce al principio luego acre. Soluble en etanol, cloroformo, éter y ácido acético; prácticamente insoluble en agua y éter de petróleo.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - Preparar una solución alcohólica de Bálsamo de Tolú al 5 %. La solución debe ser ácida frente al tornasol; se debe enturbiar fuertemente por adición de agua, formando una emulsión de color blanco amarillento que por agregado de cloruro férrico se debe desarrollar color verde.

B - Calentar hasta ebullición 1 g de Bálsamo de Tolú con 5 ml de agua; filtrar; agregar al filtrado 30 mg de permanganato de potasio y calentar: debe producirse olor a benzaldehído.

Colofonia, esencia de trementina y copaiba

Transferir a un mortero 1 g de Bálsamo de Tolú, pulverizado o molido y agregar 10 ml de éter de petróleo. Triturar durante 1 a 2 minutos, filtrar, transferir a un tubo de ensayo, y agregar al filtrado 10 ml de una solución recientemente preparada de acetato cúprico al 0,5 %. Agitar y dejar separar las fases: la capa etérea no debe presentar color verde.

Determinación del índice de acidez (ver 480. *Grasas y Aceites Fijos*)

Disolver 1 g de Bálsamo de Tolú en 50 ml de alcohol neutralizado, agregar 1 ml de fenolftaleína como indicador y titular con hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N: el índice de acidez se debe encontrar entre 112 y 168.

Determinación del índice de saponificación (ver 480. *Grasas y Aceites Fijos*)

Agregar lentamente 20,0 ml de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N al líquido neutralizado obtenido en el ensayo para *Determinación del índice de acidez*; calentar el líquido en un baño de vapor durante

30 minutos bajo un refrigerante y enfriar. Agregar aproximadamente 200 ml de agua destilada y titular el hidróxido de potasio en exceso con ácido clorhídrico 0,5 N. Realizar una determinación con un blanco (ver 780. *Volumetría en Titulaciones residuales o Titulación por retorno*). El volumen total de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N consumido, incluyendo aquél requerido para neutralizar el ácido libre en la *determinación del índice de acidez*, el índice de saponificación debe estar entre 154 y 220.

BELLADONA, hoja

Definición - Belladona está constituida por las hojas desecadas o mezcladas con sumidades floridas y a veces con frutos, de *Atropa belladonna* L. (Solanaceae). Belladona debe contener no menos de 0,3 por ciento de alcaloides totales expresados como hiosciamina y debe cumplir con las siguientes especificaciones

Sustancias de referencia - Sulfato de Hiosciamina SR-FA. Bromhidrato de Hioscina SR-FA (Bromhidrato de Escopolamina).

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas. Hoja levemente discolor, verde a verde pardusco en el haz y más clara en el envés, entera o rota, a menudo arrugada, enrollada o aglomerada; limbo anchamente ovado u oval-lanceolado, ápice acuminado y atenuado, borde entero; pecíolo de hasta 4 mm de longitud, deprimido, pubescente cuando joven, al igual que la lámina. Ejes de las inflorescencias comprimidos, con brácteas opuestas de tamaño desigual y flores solitarias u ocasionalmente frutos en sus axilas. Las flores, cuando presentes, tienen cáliz gamosépalo y corola gamopétala campanulada. El fruto es una baya globosa, de color verdoso a negro, rodeado por el cáliz persistente con lóbulos ampliamente extendidos, y contiene numerosas semillas comprimidas, reniformes.

B - Características microscópicas. En vista superficial de la lámina foliar, ambas epidermis presentan células con paredes sinuosas, cutícula delgada y estriada y numerosos estomas (anisocíticos y ocasionalmente algunos anomocíticos), con mayor densidad en la inferior; pelos tectores uniseriados, 2 a 6 celulares, con paredes lisas y finas; pelos secretores de dos tipos: a) con cabezuela unicelular y pie uniseriado pluricelular y b) con cabezuela pluricelular y pie unicelular. Mesófilo con parénquima en empalizada uniestratificado y 4 a 5 capas de parénquima esponjoso con células repletas con arena cristalina. Nervadura media biconvexa, con colénquima subepidérmico hacia ambas superficies, grupos de haces bicolaterales, aproximados entre sí y dispuestos en forma de arco muy abierto.

C - Droga en polvo. Polvo verde o verde pardusco, con olor fétido. Presenta vasos reticulados y algunos anulares y espiralados; fibras procedentes de los tallos; células características conteniendo

arena cristalina; cristales pequeños aislados; células epidérmicas con cutícula estriada y estomas anisocíticos y eventualmente anomocíticos; escasos pelos de los tipos anteriormente descritos; granos de polen subesféricos a elipsoides, triaperturados; fragmentos de la corola con células epidérmicas papilosas y/o pelos tectores o secretores de los tipos descritos anteriormente; fragmentos pardos-amarillentos de las semillas, con células del tegumento irregularmente esclerificadas y con punteaduras.

D - Agitar 1,0 g de Belladona, previamente reducida a polvo con 10 ml de ácido sulfúrico 0,05 M durante 2 minutos y filtrar. Agregar 1,0 ml de amoníaco concentrado y 5,0 ml de agua. Agitar con precaución para evitar la formación de emulsión, con 15,0 ml de éter. Dejar separar las fases, extraer la fase etérea y desecar sobre sulfato de sodio anhidro. Filtrar y evaporar el éter en una cápsula de porcelana. Agregar 0,5 ml de ácido nítrico fumante y evaporar a sequedad en baño de agua. Agregar 10 ml de acetona y, gota a gota, una solución de hidróxido de potasio en alcohol al 3 %. Debe desarrollarse una intensa coloración violeta.

E - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta de gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetona, agua y amoníaco concentrado (90:7:3).

Solución estándar - Disolver 50 mg de Sulfato de Hiosciamina SR-FA en 9,0 ml de metanol y agregar 1,8 ml de una solución de Bromhidrato de Hioscina SR-FA, preparada disolviendo 15 mg de Bromhidrato de Hioscina SR-FA en 10,0 ml de metanol.

Solución muestra - A 600 mg de Belladona reducida a polvo, agregar 15 ml de ácido sulfúrico 0,05 M y agitar durante 15 minutos y filtrar. Lavar el filtro con ácido sulfúrico 0,05 M hasta obtener 20 ml de filtrado. Agregar 1 ml de hidróxido de amonio concentrado y realizar dos extracciones con 10 ml de éter libre de peróxidos. Dejar separar las fases, por centrifugación si es necesario y reunir las fases etéreas. Secar sobre sulfato de sodio anhidro, filtrar y evaporar la solución resultante hasta sequedad. Disolver el residuo obtenido en 0,5 ml de metanol.

Revelador I - Solución de iodobismutato de potasio (SR).

Revelador II - Nitrito de sodio 0,1 M (SV).

Procedimiento - Aplicar en bandas por separado, 10 μ l y 20 μ l de la *Solución estándar* y 10 μ l y 20 μ l de la *Solución muestra*. Desarrollar los cro-

matogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente de solvente y secar entre 100 y 105 °C durante 15 minutos. Pulverizar sobre la placa con *Revelador I*. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se deben observar bandas anaranjadas o pardas sobre fondo amarillo que se corresponden en color y valor de R_f con las de los cromatogramas obtenidos a partir de la *Solución estándar* (hiosciamina en el tercio inferior e hioscina en el tercio superior). El tamaño e intensidad de las bandas obtenidas a partir de la *Solución muestra* no debe ser menor al de las bandas obtenidas con el mismo volumen de la *Solución estándar*. Pueden observarse además bandas débiles secundarias en el centro o cerca del origen en el cromatograma obtenido con la *Solución muestra*. Pulverizar sobre la placa con *Revelador II* hasta decoloración del fondo de la placa. Dejar secar durante 15 minutos y examinar nuevamente la placa. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* deben desaparecer las eventuales bandas secundarias. El color de las bandas correspondientes a hiosciamina en los cromatogramas obtenidos a partir de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, pueden virar del pardo al pardo-rojizo, pero no al azul grisáceo (correspondiente a atropina).

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No más de 4 %.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No más de 16 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No más de 0,001 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe contener no más de 3 % de tallos de diámetro superior a 5 mm.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe perder más de 10 % de su peso, determinado sobre 2 g de Belladonna reducida a polvo, por secado en estufa a una temperatura comprendida entre 100 y 105 °C durante 4 horas.

Residuos de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

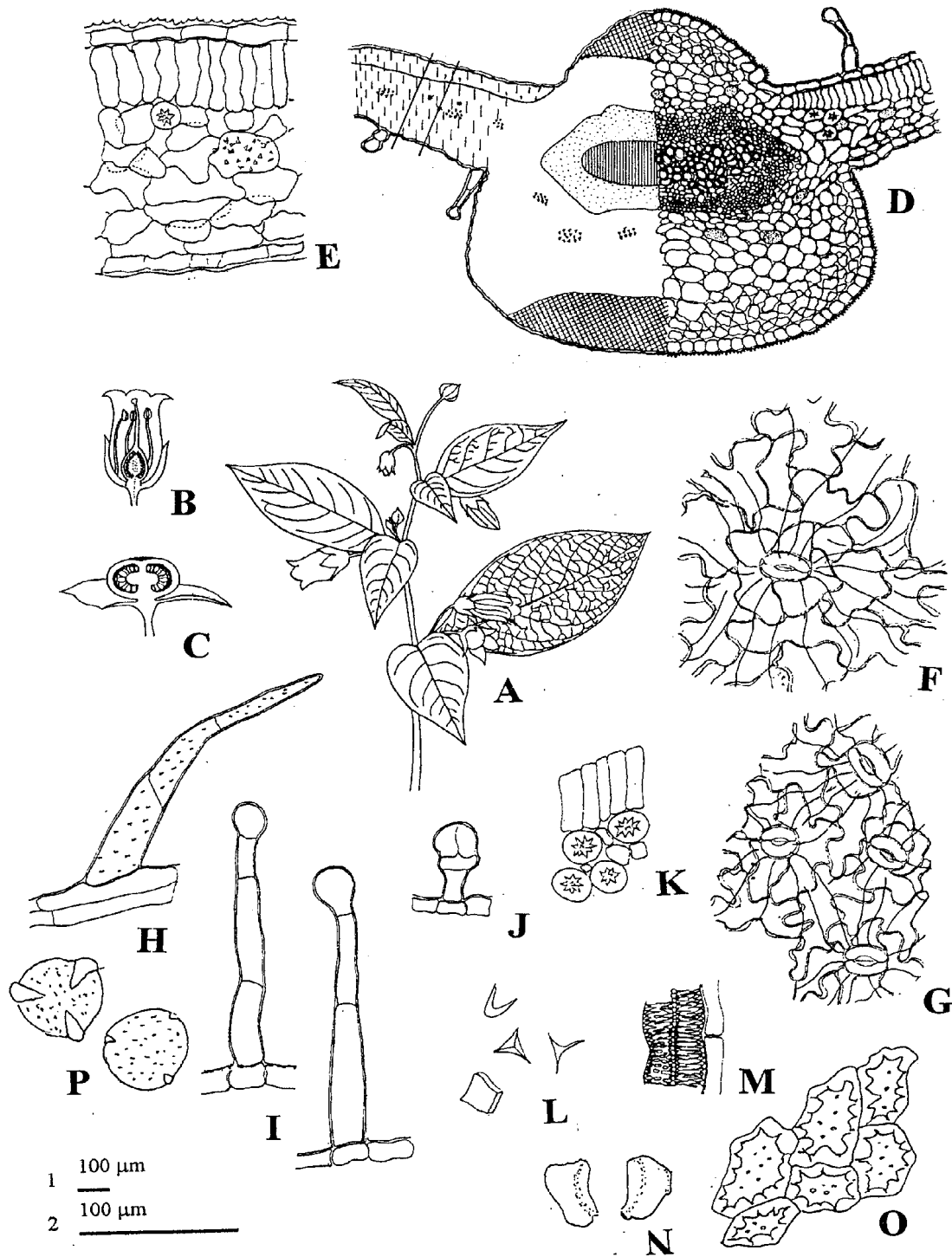
Debe cumplir con los requisitos.

VALORACION

Pesar exactamente alrededor de 10 g de Belladonna, previamente desecados entre 100 y 105 °C y reducida a polvo, transferir a un recipiente apropiado que contenga una mezcla de 5 ml de amoníaco concentrado, 10 ml de alcohol y 30 ml de éter libre de peróxidos y mezclar. Transferir a un percolador con ayuda de solución de extracción si fuera necesario y dejar macerar durante 4 horas. Lixiviar con una mezcla de cloroformo y éter (1:3), hasta extracción completa de los alcaloides [NOTA: evaporar hasta sequedad unos pocos mililitros del líquido eluido del percolador, disolver el residuo obtenido en ácido sulfúrico 0,25 M y comprobar la ausencia de alcaloides con una solución de tetraiodomercuriato de potasio (SR)]. Reducir el volumen del percolado a 50 ml e introducir la mezcla en una ampolla de decantación, enjuagando con éter libre de peróxidos. Al líquido obtenido, agregar al menos 2,1 veces su volumen de éter libre de peróxidos para obtener dos fases. Realizar al menor tres extracciones con 20 ml de ácido sulfúrico 0,25 M cada una. Separar las fases y reunir las fracciones ácidas en una ampolla de decantación. Alcalinizar con amoníaco concentrado y realizar tres extracciones con 30 ml de cloroformo cada una. Reunir las fases clorofórmicas, agregar 4 g de sulfato de sodio anhidro y dejar en contacto durante 30 minutos, agitando periódicamente. Decantar el cloroformo y lavar el sulfato de sodio con tres porciones de 10 ml de cloroformo cada una. Reunir las fases clorofórmicas, evaporar hasta sequedad y calentar el residuo en una estufa entre 100 y 105 °C durante 15 minutos. Disolver el residuo obtenido en unos pocos mililitros de cloroformo, agregar 20 ml de ácido sulfúrico 0,01 M y descartar la fase clorofórmica. Titular el exceso de ácido con hidróxido de sodio 0,02 N (SV) empleando rojo de metilo (SR) como indicador. Calcular la cantidad en porcentaje del contenido de alcaloides totales expresado como Hiosciamina en la porción de Belladonna en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$57,88(20 - n)/P(100 - d)$$

en la cual d es la pérdida por desecación en porcentaje, n es el número de ml de hidróxido de sodio 0,02 M consumidos, y P es peso de la muestra en gramos.



Atropa belladonna L. A-P, A-C: morfología; A, rama con flores; B-C: sección longitudinal: B, flor; C, fruto. D-E: sección transversal de la lámina de la hoja: D, nervio medio, esquema y detalle; E, detalle del semilímbo según lo indicado en D. F-P: droga en polvo: F-G: epidermis en vista superficial: F, superior; G, inferior; H-J: pelos: H, pelo simple pluricelular; I-J: pelos glandulares, I, de pie pluricelular y cabeza unicelular; J, de pie unicelular y cabeza pluricelular; K, porción de células en empalizada y parénquima esponjoso con drusas de oxalato de calcio; M, vasos espiralados y reticulados; N, semillas; O, fragmento de células del tegumento seminal; P, granos tricólpados. Las reglillas corresponden 1 a B; 2 a E y P.

BOLDO, Hoja

Definición - Boldo es la hoja desecada de *Peumus boldus* Mol. (*Boldea boldus* (Mol.) Looser) (Monimiaceae). Contiene no menos de 2,0 por ciento de aceite esencial y no menos de 0,20 por ciento de alcaloides totales, calculados como boldina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - *Características macroscópicas* - La hoja de Boldo es elíptica u oval elíptica, redondeada en la base, cortamente peciolada, de hasta 6 cm de largo y 4 cm de ancho; de borde entero y ligeramente plegado hacia abajo; gruesa, coriácea, áspera al tacto y quebradiza; cubierta en ambas caras de pelos cortos rígidos estrellados; de color verde grisáceo; con nervadura principal prominente. El haz presenta como característica más relevante numerosas elevaciones puntiformes. El Boldo tiene olor aromático fuerte, semejante al timol, que aumenta cuando se tritura entre los dedos, de sabor amargo y astringente.

B - *Características microscópicas* - La lámina en vista superficial presenta la epidermis adaxial con células poligonales de paredes rectas con cutícula gruesa, lisa sin estomas y con escasos pelos estrellados; la epidermis abaxial presenta células de paredes sinuosas; estomas anomocíticos y numerosos pelos estrellados. El mesófilo está constituido por una hipodermis de 1 a 3 hileras de células de paredes engrosadas; parénquima en empalizada de dos capas de células y parénquima esponjoso dispuesto en varias capas de células. En ambos parénquimas se observan abundantes células secretoras esféricas, más abundantes en el esponjoso.

C - *Droga en polvo* - Polvo verde claro con olor aromático y pungente. Se observan numerosos fragmentos de pelos estrellados; parénquima con abundantes células oleíferas; fragmentos de epidermis con estomas anomocíticos.

D - A 1 g de hoja pulverizada, agregar 10 ml de alcohol al 80 % v/v, calentar a ebullición 15 minutos, enfriar y filtrar. Evaporar en un baño de agua, hasta un volumen aproximado de 1 ml. Agregar una gota de amoníaco y agitar 2 minutos con 5 ml de éter etílico. Filtrar a través de sulfato de sodio anhidro la fase etérea. Evaporar en una cápsula de porcelana y agregar 2 ml de una solución de vaini-

lina al 1 % en ácido clorhídrico: se obtiene una coloración rosa alilada, estable por unos minutos.

E - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Tolueno, acetato de etilo y dietilamina (7:2:1).

Solución estándar - Disolver 0,1 g de Boldina en 100 ml de una mezcla de cloroformo y metanol (5:5).

Solución muestra - Agregar 10 ml de ácido sulfúrico 0,1 N a 100 g de Boldo en polvo. Agitar durante 2 minutos y filtrar. Ajustar el filtrado a pH 8 con amoníaco diluido. Realizar cinco extracciones sucesivas con 30 ml de cloroformo. Reunir los extractos clorofórmicos y filtrar a través de sulfato de sodio anhidro. Evaporar a sequedad en baño de agua y disolver el residuo en 0,25 ml de una mezcla de cloroformo y metanol (5:5).

Revelador - Reactivo de Dragendorff.

Procedimiento - Aplicar por separado en bandas, 10 μ l de la *Solución muestra* y 10 μ l de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Dejar secar al aire. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 366 nm. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar* debe presentar una zona de fluorescencia azul violeta, correspondiente a boldina a un *Rf* aproximado de 0,27. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar dos zonas azul violeta en el valor de *Rf* correspondiente a la boldina en la *Solución estándar*. Pulverizar con *Revelador*. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar dos zonas anaranjadas en el valor de *Rf* correspondiente a la boldina en la *Solución estándar* y, por debajo de las mismas, otras dos zonas de alcaloides minoritarios.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 13 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de metales pesados <590>

Debe cumplir con los requisitos.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 4 % de ramas y 2 % de otras materias extrañas.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe perder más de 10 %, determinado mediante destilación sobre 20 g de Boldo en polvo.

Residuos de Pesticidas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Aceites esenciales

Realizar la determinación de aceites esenciales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*). Pesar 10 g de Boldo en polvo y transferir a un balón de 1 litro. Destilar con 300 ml de agua y recolectar el destilado empleando 0,5 ml de xileno en un tubo graduado, a una velocidad de 2 a 3 ml por minuto durante 2 horas.

Alcaloides

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 304 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Solución A - Preparar una mezcla de 99,8 ml de agua y 0,2 ml de dietilamina. Ajustar a pH 3 con ácido fórmico.

Solución B - Preparar una mezcla de 99,8 ml de acetonitrilo y 0,2 ml de dietilamina.

Fase móvil - *Solución A* y *Solución B* (84:16). Filtrar y degasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Preparar una solución de boldina en *Fase móvil* con una concentración de 0,012 mg por ml.

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 1 g de Boldo en polvo, agregar 50 ml de ácido clorhídrico, agitar y calentar en un baño de

agua a 80 °C durante 30 minutos. Filtrar, tomar el residuo con 50 ml de ácido clorhídrico, agitar y calentar en un baño de agua a 80 °C durante 30 minutos. Filtrar, y repetir la operación sobre el residuo obtenido. Filtrar, reunir los líquidos filtrados fríos y agitar con 100 ml de una mezcla de acetato de etilo y hexano (5:5). Ajustar la fase acuosa a pH 9,5 con amoníaco diluido. Agitar sucesivamente con 100 ml, 50 ml y 50 ml de cloruro de metileno. Reunir las fases orgánicas y evaporarlas a presión reducida. Transferir el residuo a un matraz aforado de 10 ml y diluir a volumen con *Fase móvil*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos a la boldina deben ser: 0,9 para isoboldina, 1,8 para isocorydina *N*-óxido; 2,2 para laurotetanina; 2,8 para isocorudina y 3,2 para *N*-metillaurotetanina; (pueden aparecer picos adicionales); la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

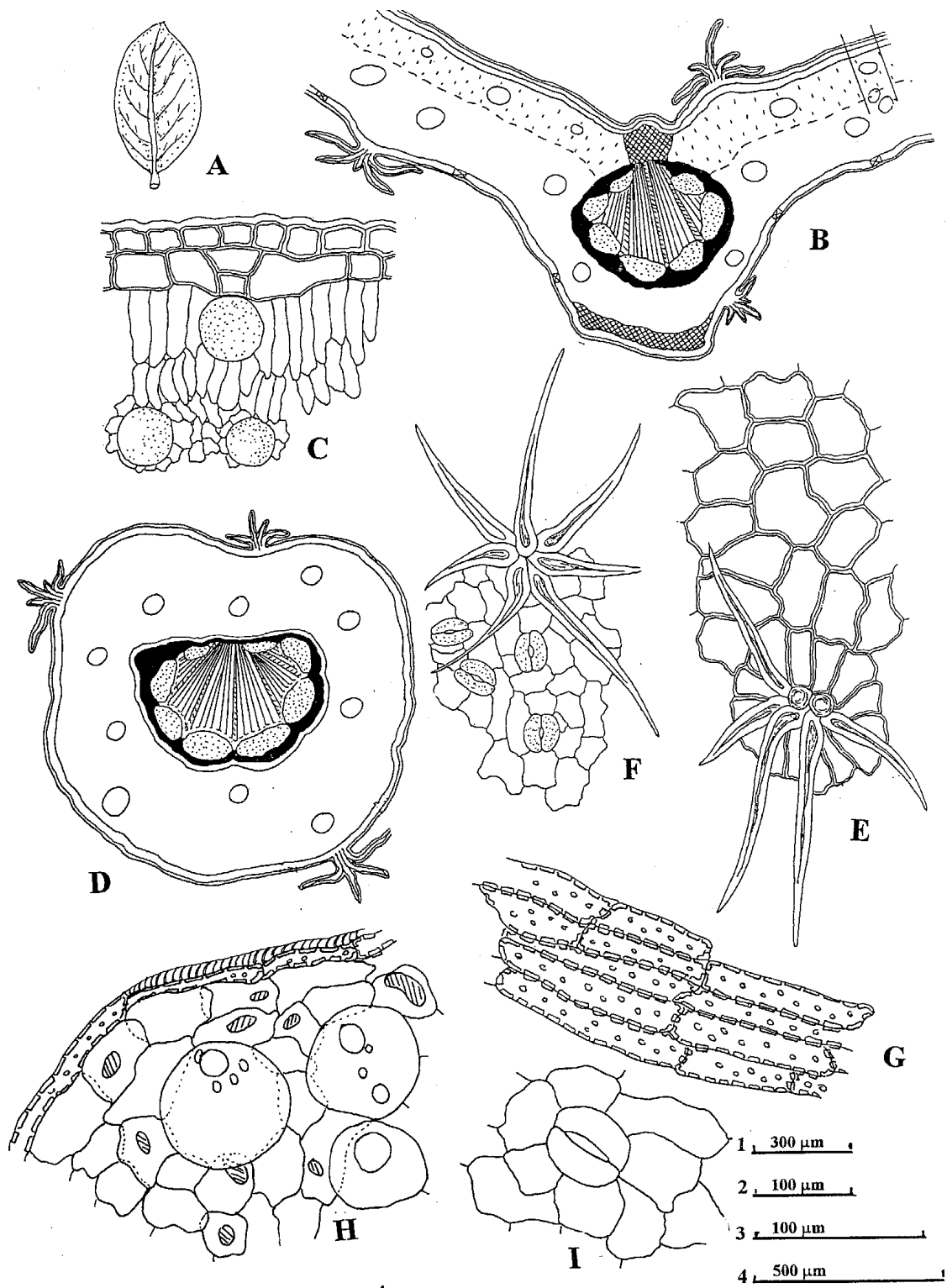
Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo aproximadamente 20 µl de la *Preparación muestra* y 20 µl de la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el contenido en porcentaje del total de alcaloides, expresado como boldina en la porción de Boldo en ensayo por la fórmula siguiente:

$$(\sum r_i / r_E)(P_E / P_M)$$

en la cual $\sum r_i$ es la suma de las respuestas de los picos correspondiente a los alcaloides identificados en el cromatograma obtenido con la *Preparación muestra*, r_E es la respuesta del pico correspondiente a la boldina en el cromatograma obtenido con la *Preparación estándar*, P_M es el peso de la muestra expresada en mg en la *Preparación muestra* y P_E es el peso de la boldina en mg en la *Preparación estándar*.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la denominación oficial, seguida del nombre científico en latín.



Peumus boldus Molina, A-I: A, hoja, exomorfología. B-D sección transversal. B, esquema representativo del limbo. C, detalle de lo indicado en B. D, esquema representativo del pecíolo. E-F vista superficial de la epidermis, mostrando pelos fasciculados. E, superior. F, inferior con estomas. G-I, polvo. G, parénquima axial del xilema de paredes engrosadas. H, porción del parénquima del mesófilo con células oleíferas y un vaso espiralado acompañado de parénquima engrosado. I, fragmento de epidermis con un estoma anomocítico. Las reglillas corresponden a: 1 a B, D; 2 a C, E, F; 3 a H, I; 4 a G.

CALENDULA, flor

Definición - Calendula consiste en las flores liguladas completamente abiertas, separadas del receptáculo, desecadas, enteras o fragmentadas, de los capítulos simples, semidobles de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Debe contener no menos de 0,4 por ciento de flavonoides totales, calculado como hiperósido sobre la droga desecada y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - *Características macroscópicas* - Flores liguladas femeninas de 20 a 30 mm de longitud por 5 a 7 mm de diámetro, de color amarillo o amarillo anaranjado a pardo anaranjado, son pilosas, con tres dientes en el ápice de la lígula; tubo corolino de color pardo amarillento o pardo anaranjado, estilo bifido, ovario de color pardo amarillento a pardo anaranjado, los frutos son aquenios curvados, naviculares, con el dorso cubierto de espinas cortas de color pardo verdoso y sin vilano. Flores tubulosas masculinas con corola de aproximadamente 5 mm de longitud, 5-lobulada, de color amarillo, rojo anaranjado o rojo violáceo, pilosa en la parte inferior.

B - *Características microscópicas* - En el material diafanizado se observan en vista superficial flores liguladas, fragmentos de la corola cuya epidermis interna está compuesta por células elongadas longitudinalmente, con paredes delgadas y cutícula estriada; en el parénquima en el parénquima subyacente se observa gran cantidad de glóbulos oleíferos de color amarillo-anaranjado y en la base de la corola las células epidérmicas muestran las paredes más engrosadas y con diminutos cristales o drusas de oxalato de calcio; la epidermis externa es similar a la interna excepto por presentar escasos estomas de tipo anomocítico. Se observan tricomas simples, presentes en la base de la corola, ellos son biseriados, largos, cónicos con ápice redondeado, con células de paredes ligeramente engrosadas. En la corola y en la pared del ovario se encuentran tricomas glandulares de dos tipos: uniseriados, con un pie de 3 a 5 células, ocasionalmente pueden ser biseriados con 3 a 4 células por serie; los tricomas glandulares del segundo tipo son sésiles y en todos los casos las cabezas son pluricelulares. Se encuentran fragmentos con papilas estigmáticas, cortas y bulbosas, con granos de polen, retenidos, esfé-

ricos de hasta 40 μm de diámetro, con tres poros germinativos y exina con espinas; fragmentos de la pared del ovario, con células poligonales, las que contienen abundantes pigmentos de color marrón; fruto aquenio, de forma navicular con el dorso espinoso, de color pardo oscuro; restos de corolas de las flores tubulosas, abundantes fragmentos de filamentos y anteras y fragmentos de endotecio de las anteras.

C - *Droga en polvo* - El polvo es de color pardo amarillento. Presenta fragmentos de las corolas conteniendo gotitas de aceite de color amarillo claro, algunos con abundantes estomas anomocíticos, grandes, otros conteniendo prismas y drusas de oxalato de calcio; pelos glandulares con un pie uniseriado o biseriado (pluricelular); granos de polen esféricos, de hasta 40 μm de diámetro, con una exina fuertemente espinulosa y tres poros germinativos. Ocasionalmente muestra fragmentos de los estigmas con papilas cortas y bulbosas.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Ácido fórmico, acetato de etilo y agua (80:10:10).

Solución estándar - Disolver 1,0 mg de ácido cafeico, 1,0 mg de ácido clorogénico y 2,5 mg de rutina en 10 ml de metanol.

Solución muestra - Calentar a reflujo durante 10 minutos 1,0 g de droga reducida a polvo con 10,0 ml de metanol. Enfriar y filtrar.

Revelador - Solución al 1 % de difenilborinato de 2-aminoetilo en metanol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 μl de la *Solución muestra* y 20 μl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y secar entre 100 y 105 °C. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*, dejar secar al aire y examinar la placa bajo luz ultravioleta a 365 nm. El cromatograma obtenido con la *Solución estándar* debe presentar tres bandas de fluorescencia pardo amarillenta en la parte inferior correspondiente a la rutina, otra celeste en la parte media correspondiente al ácido clorogénico y la tercera también celeste en la parte superior correspondiente al ácido cafeico. El cromatograma obtenido con la *Solución muestra* debe presentar entre otras, una banda de fluorescencia pardo amarillenta con el mismo valor de R_f que la correspondiente a la rutina obtenida a partir de la

Solución estándar. Además debe presentar, una banda de fluorescencia verde amarillenta por debajo de la banda correspondiente a la rutina y otra de fluorescencia celeste por encima de la banda correspondiente al ácido clorogénico obtenida en el cromatograma de la *Solución estándar*; una banda de fluorescencia verde amarillenta por encima y otra de fluorescencia celeste por debajo de la correspondiente al ácido cafeico obtenida en el cromatograma de la *Solución estándar*.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 10,0 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No más de 0,001 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 5 % de brácteas y no más de 2,0 % de otros elementos extraños.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Secar entre 100 y 105 °C durante 2 horas 1,0 g de droga reducida a polvo: no debe perder más de 12,0 % de su peso.

Residuos de pesticidas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Calentar a reflujo en un balón de 100 ml durante 30 minutos, 0,800 g de la droga reducida a polvo fino, 1,0 ml de la solución al 0,5 % de hexametilentetramina, 20 ml de acetona y

7 ml de ácido clorhídrico. Filtrar a través de algodón absorbente y transferir a un matraz de 100 ml. Agregar el algodón al residuo en el balón y extraer a reflujo con dos porciones de 20 ml de acetona a reflujo durante 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente, filtrar a través de algodón, reunir los extractos y filtrar a través de un papel de filtro y transferir el filtrado al matraz. Completar a volumen con acetona lavando el balón y el filtro. Transferir 20,0 ml de la solución anterior a una ampolla de decantación, agregar 20 ml de agua y extraer con 15, 10, 10 y 10 ml de acetato de etilo. Combinar los extractos en una ampolla de decantación, lavar con dos porciones de 50 ml de agua, filtrar sobre 10 g de sulfato de sodio anhidro y transferir a un matraz aforado de 50 ml. Completar a volumen con acetato de etilo y mezclar.

Solución de cloruro de aluminio - Disolver 2,0 g de cloruro de aluminio en 100 ml de una solución de ácido acético glacial en metanol al 5 % v/v.

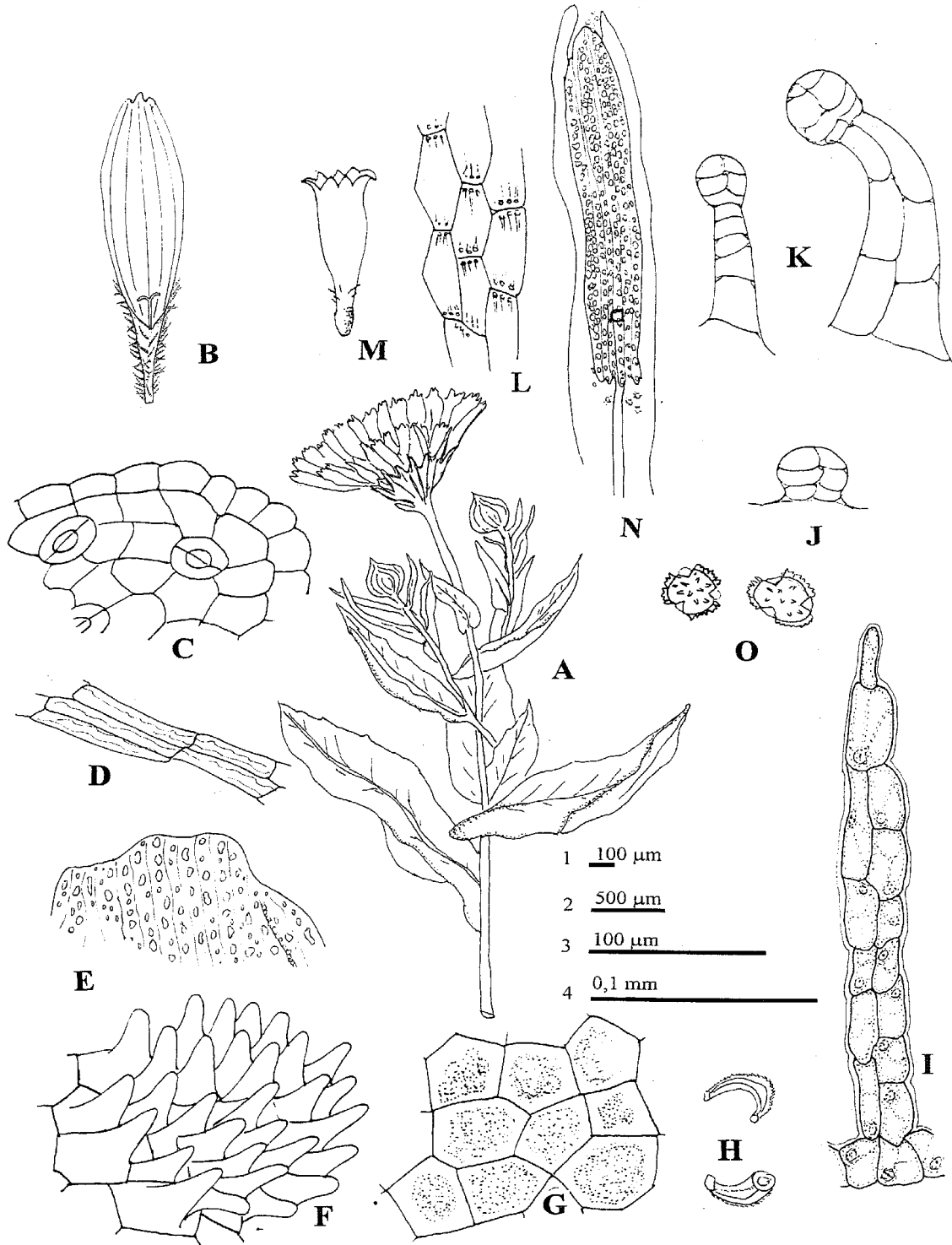
Solución problema - Transferir 10,0 ml de la *Preparación muestra* a un matraz aforado de 25 ml, agregar 1 ml de *Solución de cloruro de aluminio* y completar a volumen con una solución de ácido acético glacial en metanol al 5 % v/v.

Solución de compensación - Transferir 10,0 ml de la *Preparación muestra* a un matraz aforado de 25 ml y completar a volumen con una solución de ácido acético glacial en metanol al 5 % v/v.

Procedimiento - Determinar la absorbancia de la *Solución problema* luego de 30 minutos por comparación con la *Solución de compensación*, a 425 nm. Calcular el porcentaje total de flavonoides como hiperósido, empleando 500 como coeficiente de extinción específica $E (1 \%, 1 \text{ cm})$, por la fórmula siguiente:

$$1,25A/P$$

en la cual A es la absorbancia a 425 nm y P es el peso en g de la droga en polvo empleada para preparar la *Preparación muestra*.



Calendula officinalis L. A-O: A, rama con capítulo. B, flor ligulada; C, porción de epidermis externa de la corola de la flor ligulada, extremo, con estomas anomocíticos; D, epidermis interna de la flor ligulada con cutícula estriada; E, porción del parénquima subyacente con glóbulos oleíferos; F, papilas estigmáticas, G, epidermis de la pared del ovario, cuyas células tienen un pigmento de color pardo; H, frutos; I: tricomas simples, pluricelular biseriado del tubo de la corola; J-K: tricomas glandulares: J, glándula séstil K, con pie de 3-5 células y cabeza pluricelular, presentes en la corola y pared del ovario; L, porción de endotecio; M, flor tubulosa; N, fragmento de filamento y antera de un estambre; O, granos de polen. Las reglillas corresponden a 1 a B; 2 a N; 3 a B, E, H, I, J, K, O y 4 a C, F, G, L, M.

CANELA DE CEILAN, corteza

Definición - La Canela está constituida por la corteza desecada, libre de súber y del parénquima subyacente, de los tallos de *Cinnamomum verum* J.S. Presl. (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) (Lauraceae). Debe contener no menos de 1,2 por ciento de aceite esencial.

CONSERVACION

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio seco y fresco.

ENSAYOS

Identificación

A - *Características macroscópicas* - Las cortezas se presentan en trozos acanalados, enrollados en sus márgenes, dispuestos unos dentro de otros, de longitud variable y de 0,2 a 0,8 mm de espesor. La superficie externa es lisa, pardo amarillenta, con cicatrices redondeadas que corresponden al punto de inserción de las hojas y brotes axilares y con largas y sinuosas estrías longitudinales. La superficie interna es ligeramente oscura y longitudinalmente estriada. La fractura es corta y fibrosa. Tiene olor característico y aromático.

B - *Características microscópicas* - La sección transversal de la corteza presenta externamente algunas células de parénquima cortical en el que se observa una ancha y continua capa de periciclo esclerenquimático constituido por grupos de esclereidas redondeadas o tangencialmente elongadas, de paredes gruesas con puntuaciones muy ramificadas y ocasionalmente grupos de fibras. El floema está compuesto por tubos cribosos y parénquima. Se observan idioblastos con aceites esenciales y mucílagos. Las fibras del floema con paredes muy engrosadas, se disponen aisladas o en pequeños grupos. El parénquima del floema contiene granos de almidón simples o compuestos de 2 a 4 unidades de 2 a 4 μm de diámetro. Los radios parenquimáticos son de una o dos células de ancho presentando pequeños cristales aciculares de oxalato de calcio.

C - *Droga en polvo* - El polvo es de color pardo o pardo amarillento. Observado al microscopio presenta abundantes granos de almidón simples, céntricos y compuestos, numerosas fibras incoloras con gruesas paredes, braquiesclereidas con puntuaciones, moderadamente engrosadas y pequeños cristales aciculares de oxalato de calcio.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100.

Cromatografía) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloruro de metileno.

Solución estándar - Disolver 50 μl de aldehído cinámico y 10 μl de eugenol en tolueno y diluir a 10,0 ml con el mismo solvente.

Solución muestra - Extraer 100 mg de la droga reducida a polvo con 2 ml de cloruro de metileno durante 15 minutos, con agitación continua. Filtrar y secar el filtrado a presión reducida. Resuspender el residuo en 0,4 ml de tolueno.

Revelador - Floroglucinol (SR).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, en bandas, 10 μl de la *Solución estándar* y 10 μl de la *Solución muestra*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente de solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa y dejar secar al aire. Examinar a 254 nm: el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar una banda atenuada en la parte media (R_f 0,5) que se corresponde con el aldehído cinámico e inmediatamente arriba de ella, una banda de absorción más débil que se corresponde con el eugenol. Examinar la placa a 365 nm, la *Solución muestra* debe presentar una banda de fluorescencia celeste (eugenol) e inmediatamente por debajo otra banda correspondiente al aldehído cinámico. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*: el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar una banda pardo amarillenta y otra banda violeta, que se corresponden con las correspondientes al aldehído cinámico y al eugenol de la *Solución estándar*, respectivamente.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 6,0 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos según el destino.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No más de 0,001 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener materia extraña.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe perder más de 12 % de su peso; determinado sobre 2,0 g de droga reducida a polvo

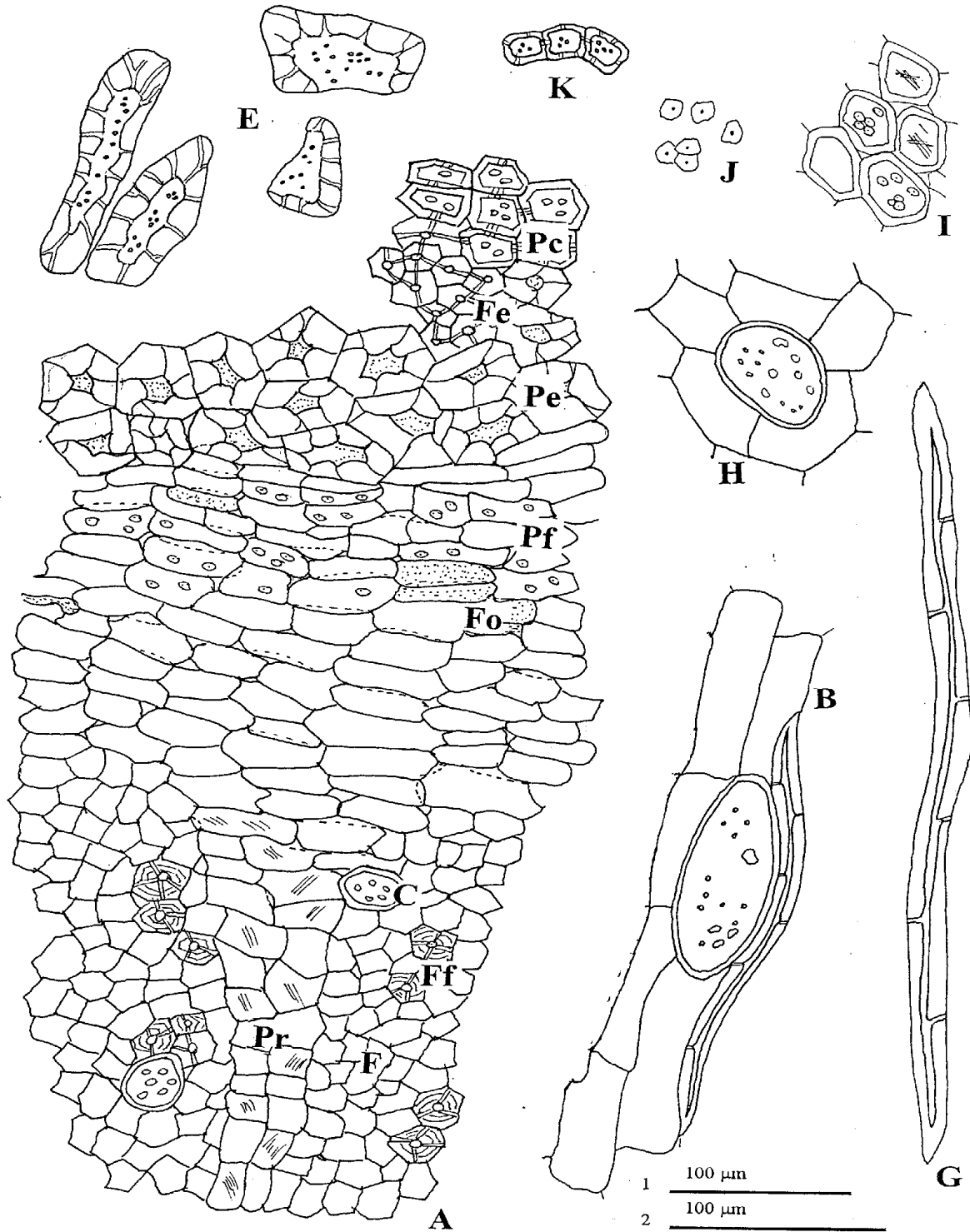
mediante desecación en estufa entre 100 y 105 °C, durante 2 horas.

Residuo de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACION

Efectuar la determinación de aceites esenciales en vegetales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*). Pesar 20,0 g de la droga reducida a polvo y transferir a un balón de 1 litro. Proceder inmediatamente con la determinación, empleando 200 ml de ácido clorhídrico 0,1 M como líquido de destilación y 0,5 ml de xileno en el tubo graduado. Efectuar la destilación con una velocidad de 2,5 - 3,5 ml por minuto durante 3 horas. Luego de 10 minutos de finalizada la destilación, leer el volumen de líquido colectado en el tubo graduado y restarle el volumen de xileno. Calcular el resultado en ml por cada 100 g de droga.



Cinnamomum verum J.S. Presl. A, detalle de la corteza en sección transversal; Pc, parénquima cortical; Fe; fibras esclerenquimáticas; Pe, periciclo; Pf, parénquima del floema con almidón; Fo, floema obliterado; C, célula oleífera; Ff, fibras del floema; F, floema funcional; Pr, parénquima con rafidios de oxalato de calcio. Droga en polvo: B, células parenquimáticas con célula oleífera; E, esclereidas pericíclicas; G, fibra del floema; H, células parenquimáticas con célula oleífera; I, células parenquimáticas con almidón y rafidios de oxalato de calcio; J, granos de almidón; K, células parenquimáticas. Las reglillas corresponden 1 a A, 2 a B, E, G, H, I, J, K.

CARDO MARIANO, fruto

Definición - Cardo Mariano consiste en el fruto maduro y seco, desprovisto del pappus, de *Silybum marianum* (L.) Gaertner (Asteraceae). Debe contener no menos de 2,0 % de silimarina, calculado como silibina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Silibina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Los frutos (aquenios) son ovoides y alargados, algo curvos y aplanados, de aproximadamente 6 a 7 mm de longitud, hasta 3 mm de diámetro y 1,5 mm de grosor. En el extremo superior se observa una protuberancia anular de color amarillo (resto estilar). El pericarpo es brillante de color negro pardusco o gris pardusco o con líneas de color gris claro. La cubierta seminal envuelve al embrión, que posee dos cotiledones gruesos y aplanados conteniendo gránulos de aleurona, aceite graso y drusas de oxalato de calcio.

B - Características microscópicas - La epidermis del pericarpo está compuesta por una capa de células en empalizada poco coloreadas de cerca de 75 μm de longitud y 8 μm de diámetro, las que poseen las paredes tangenciales externas y radiales fuertemente engrosadas en forma de U invertida. La capa subepidérmica está formada por células parenquimáticas de paredes delgadas, las que alternan con grupos de células pigmentadas. Luego se observa el mesocarpo constituido por 8 capas de células parenquimáticas, alargadas siguiendo el eje longitudinal del fruto. Las células de la capa más interna de la pared del fruto pueden desintegrarse. En la semilla la epidermis de la testa está formada por células grandes, elongadas de 150 μm de longitud, dispuestas en empalizada, de color amarillo limón, de paredes estriadas y con lumen estrecho, algo ampliado en el extremo. Las células subepidérmicas poseen paredes punteadas y lignificadas. Por debajo hay una sola capa de células de paredes gruesas, algo hinchadas y con contenido lipofílico (resto de endosperma). Los cotiledones del embrión presentan células de paredes delgadas que, además de drusas de oxalato de calcio, contienen glóbulos de grasa y aleuronas.

C - Droga en polvo - El polvo es de color pardo amarillento. Se observan fragmentos de pericarpo con células epidérmicas en empalizada, poco coloreadas acompañadas de células pigmentadas y células epidérmicas en vista superficial, células del mesocarpo con paredes engrosadas reticuladas. Fragmentos de color amarillo limón de la testa de la semilla, porciones de cotiledón con células de paredes delgadas, que contienen cristales prismáticos y drusas de oxalato de calcio, sustancias lipofílicas y aleuronas.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo, acetona, ácido fórmico anhidro (75:16,5:8,5).

Solución estándar - Preparar una solución de Silibina SR-FA en metanol de aproximadamente 1,0 mg por ml.

Solución muestra - Extraer 1 g de la droga pulverizada (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*) con 50 ml de éter de petróleo, calentando bajo reflujo, durante 30 minutos. Descartar el extracto etéreo y extraer la droga con 10 ml de metanol, calentando bajo reflujo durante 15 minutos. Filtrar y concentrar a 5 ml.

Revelador 1 - Solución de difenilborinato de 2-aminoetilo al 1 % en metanol.

Revelador 2 - Solución de polietilenglicol 4.000 al 5 % en alcohol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 30 μl de la *Solución muestra* y 10 μl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore durante 30 minutos en una corriente de aire frío. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1*. Dejar secar al aire, pulverizar sobre la placa con *Revelador 2*, dejar secar nuevamente al aire. Examinar el cromatograma bajo luz ultravioleta a 366 nm. El cromatograma de la *Solución estándar* debe presentar una banda de fluorescencia azul verdosa correspondiente a silibina con un valor de R_f de aproximadamente 0,6 y puede presentar una banda de fluorescencia similar correspondiente a silicristina con un valor de R_f de aproximadamente 0,35. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar dos bandas que se corresponden en posición y fluorescencia a las observadas en la *Solución estándar* y debe presentar

una banda anaranjada correspondiente a taxifolina con un valor de R_f de aproximadamente 0,4.

Cenizas insolubles en ácido (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 1 %.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 8 %, determinado sobre 1,0 g de droga finamente pulverizada.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No más de 0,001 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 2 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe perder más de 8,0 % de su peso.

Residuos de pesticidas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Solución reactivo - Disolver 1,0 g de 2,4-dinitrofenilhidracina, previamente secada durante 8 horas en un desecador al vacío, en 2 ml de ácido sulfúrico. Diluir con metanol a 100 ml. Preparar esta solución en el momento de su uso.

Preparación estándar - Preparar una solución de Silibina SR-FA en metanol de aproximadamente 2,0 mg por ml.

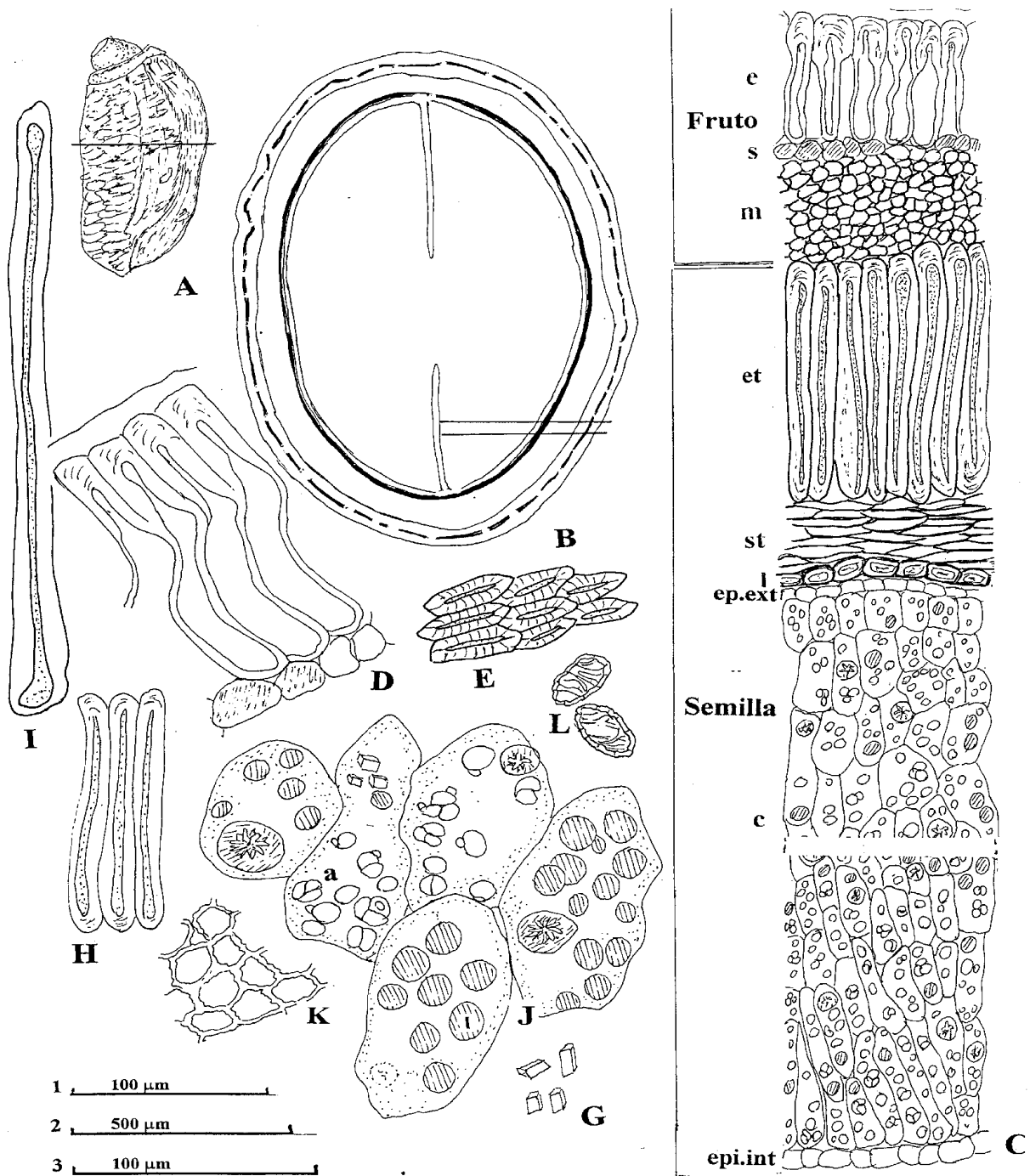
Preparación muestra - Transferir 5,0 g de Cardo Mariano pulverizado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*) a un cartucho de extracción y cubrir con una torunda de algodón. Colocar el cartucho en un aparato de extracción continua (Soxhlet) equipado con un balón de 250 ml que contenga 150 ml de éter de petróleo. Calentar el balón en un manto calefactor durante 2 horas. Descartar el extracto etéreo y secar el cartucho hasta completa remoción del disolvente. Colocar el cartucho en otro aparato de extracción equipado con un balón de 250 ml que contenga 100 ml de acetato de etilo. Calentar el balón en una camisa calefactora con reflujo lento. Después de 4 horas de extracción, evaporar la solución de acetato de etilo en el balón aproximadamente a 40 °C bajo presión reducida en un evaporador rotatorio. Disolver el residuo en 25 ml de metanol,

transferir a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con metanol y homogeneizar.

Procedimiento - Transferir 1,0 ml de la *Preparación estándar* y 1,0 ml de la *Preparación muestra* a sendos matraces aforados de 10 ml. Agregar 2,0 ml de *Solución reactivo* a cada matraz y homogeneizar. Tapar los matraces y mantener a una temperatura de 50 °C, con agitación suave, durante 50 minutos. Enfriar los matraces, completar a volumen con metanol y mezclar. Transferir 2,0 ml de cada una de las soluciones a dos matraces aforados de 100 ml y agregar 3,0 ml de solución de hidróxido de tetrametilamonio en metanol recientemente preparada. Completar a volumen con metanol, mezclar y dejar en reposo durante 30 minutos. Determinar las absorbancias de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* a 490 nm, empleando metanol como blanco (ver 470. *Espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible*). Calcular el contenido de silimarina como silibina en la porción de Cardo Mariano en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$5.000(C/P)(A_M/A_E)$$

en la cual C es la concentración en mg por ml de Silibina en la *Preparación estándar*, P es el peso en mg calculado sobre la sustancia seca de Cardo Mariano en la *Preparación muestra*, y A_M y A_E son las absorbancias de las soluciones obtenidas a partir de la *Preparación muestra* y *Preparación estándar*, respectivamente.



Silybum marianum (L.) Gaertner, A-L: A, fruto, morfología externa. B, sección transversal del fruto, según lo indicado en A, esquema. C, detalle de lo indicado en B. F, fruto. e, epidermis del fruto con células engrosadas en U invertida; s, subepidermis; m, mesocarpio. S, semilla. et, epidermis de la testa constituida por macroescleridas; st, subepidermis de la testa; l, estrato de células con restos lipofílicos (resto del endosperma). c, cotiledón. ep.ext, epidermis externa, epi.int, epidermis interna del cotiledón. D, fragmento de la pared del fruto con células engrosada en U invertida y grupo de células pigmentadas de la subepidermis. E, células de la epidermis del fruto, en vista superficial, con paredes fuertemente engrosadas. G, cristales prismáticos de oxalato de calcio. H, fragmento de la epidermis de la testa de la semilla. I, macroesclerida de la testa. J, fragmento del cotiledón constituido por células parenquimáticas conteniendo glóbulos de grasa, drusas de oxalato de calcio inmersas en una gota de aceite y granos de aleurona. K, células del mesocarpio, en sección transversal, con paredes engrosadas a modo de rosario. L, dos células del mesocarpio, vista en superficie, mostrando el engrosamiento reticulado de sus paredes. a, granos de aleurona; l, lípidos, las reglillas corresponden a: 1 a C; 2 a B; 3 a D-G.

CÁSCARA SAGRADA,

Corteza

Definición - Cáscara Sagrada es la corteza desecada de *Rhamnus purshiana* D.C. (Rhamnaceae), recogida por lo menos un año antes de ser empleada con fines medicinales. Debe contener no menos de 7,0 por ciento de derivados de hidroxiantraceno totales, calculados como cascarósido A, de los cuales no menos de 60 por ciento está constituido por cascarósidos, calculados como cascarósido A y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, almacenados en un sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Se presenta en piezas aplanadas o transversalmente curvas, ocasionalmente en rollos de longitud variable, con espesor de 1 a 5 mm. La superficie externa es de color pardo o pardo rojizo, con costillas alargadas longitudinales, con o sin placas de líquenes grisáceas o blancuzcas, en ocasiones con lenticelas transversalmente alargadas y eventualmente con musgo adherido. La superficie interna se presenta longitudinalmente estriada y de color pardo amarillento. La fractura es breve con proyecciones de haces de fibras floemáticas en la parte interna.

B - Características microscópicas - El corte transversal de la corteza muestra externamente tejido suberoso de color pardo amarillento a pardo rojizo de 10 o más hileras de células pequeñas; en la región media de la corteza se encuentran grupos de 20 a 50 células pétreas, tangencialmente alargadas, rodeados por una vaina parenquimática con prismas monoclinicos o drusas de oxalato de calcio; radios floemáticos de 1 a 4 células de ancho y 15 a 25 células de longitud, con frecuencia dispuestos en forma diagonal o curvada y convergen en la región del floema externo; fibras floemáticas en haces pequeños, rodeadas por una vaina parenquimática con prismas monoclinicos de oxalato de calcio, ubicados entre los radios del floema. El parénquima, con paredes de color pardo, contiene granos de almidón y cristales de oxalato de calcio.

C - Droga en polvo - Varía entre el color pardo amarillento claro a anaranjado amarillento oscuro. Muestra fibras floemáticas de 950 a 1.100 μm de largo por 16 a 24 μm de ancho que se presentan en haces fragmentados acompañados de vainas paren-

quimáticas, que contienen prismas monoclinicos de oxalato de calcio; células pétreas de paredes gruesas formando pequeños grupos; fragmentos de súber con coloración entre pardo rojizo y amarillo; masas de parénquima y células de radios del floema que se colorean de pardo rojizo a anaranjado al agregar una solución alcalina fuerte; granos de almidón esferoidales, de hasta 8 μm de diámetro; oxalato de calcio en prismas monoclinicos o drusas de 6 a 20 μm de diámetro, ocasionalmente hasta de 45 μm de diámetro.

D - Agregar a 100 mg de Cáscara Sagrada pulverizada 10 ml de agua destilada aproximadamente a 80 °C, agitar la mezcla ocasionalmente hasta que se enfríe. Filtrar. Diluir el filtrado con agua hasta 10 ml y agregar 10 ml de hidróxido de amonio 6 N. Se debe desarrollar color anaranjado o amarillo anaranjado.

E - Preparar una solución de ácido clorhídrico al 25 % empleando 70 g de ácido clorhídrico concentrado y llevando a 100 ml con agua. Calentar en un baño de agua durante 15 minutos 200 mg de Cáscara Sagrada pulverizada con 5 ml de agua. Dejar enfriar y filtrar. A 10 ml del filtrado, agregar 20 ml de ácido clorhídrico y calentar en un baño de agua durante 15 minutos. Dejar enfriar la solución y transferir a una ampolla de decantación; agitar con 3 porciones de 20 ml cada una de éter etílico. Conservar la fase acuosa (*Solución A*). Reunir las tres fases etéreas y agitar con 10 ml de amoníaco diluido. Se debe observar coloración rojo violeta en la fase acuosa. Agregar 5 g de cloruro férrico a la *Solución A* y calentar en un baño de agua durante 30 minutos. Dejar enfriar. Transferir la solución a una ampolla de decantación y agitar con 15 ml de éter etílico. Lavar la fase etérea con 5 ml de amoníaco diluido. Se debe observar color rojo en la fase acuosa.

F - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica:

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, metanol y agua (100:13,5:10).

Solución estándar - Disolver 5 mg de aloína en 5 ml de alcohol al 70 % v/v.

Solución muestra - Calentar a ebullición 500 mg de polvo de Cáscara Sagrada, con 5 ml de metanol, dejar enfriar y centrifugar. Emplear el sobrenadante dentro de los 30 minutos siguientes.

Revelador 1 - Solución al 1 % de difenilborinato de 2-aminoetilo en metanol.

Revelador 2 - Solución al 5 % de polietilenglicol 4.000 en etanol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, en bandas, 10 μl de la *Solución muestra* y 5 μl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplica-

ciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1*. Dejar secar al aire, pulverizar sobre la placa con *Revelador 2*, dejar secar nuevamente al aire. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 366 nm. El cromatograma de la *Solución estándar* presenta una zona fluorescente amarilla correspondiente a barbaloina con un valor de R_f de aproximadamente 0,50. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar dos pares de bandas fluorescentes amarillas, correspondientes a cascarósidos A y B con un valor de R_f entre 0,10 y 0,15 y a cascarósidos C y D con un valor de R_f entre 0,20 y 0,25; una mancha menos intensa y con fluorescencia amarilla similar a la del cromatograma de la *Solución estándar* correspondiente a barbaloina y una banda fluorescente roja a la altura del frente del solvente debida a agliconas. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar, además, muchas zonas fluorescentes azul grisáceas situadas por debajo y encima de la zona que corresponde a la barbaloina con un R_f entre 0,35 y 0,75.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 7,0 %, determinado sobre 1,0 g de droga finamente pulverizada.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 2 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Secar entre 100 y 105 °C durante 2 horas: no debe perder más de 10,0 % de su peso, determinado sobre 1,0 g de droga pulverizada

VALORACIÓN

[NOTA: llevar a cabo la *Valoración* protegido de la luz.]

Solución muestra - Transferir 1,0 g de Cáscara Sagrada a 100 ml de agua en ebullición y agitar. Mantener a ebullición durante 5 minutos con agitación constante. Dejar enfriar, transferir a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con agua, agitar y filtrar eliminando los primeros 20 ml de filtrado. Transferir 10 ml del filtrado a una ampolla de decan-

tación, agregar 0,1 ml de solución de ácido clorhídrico 1 N y extraer con dos porciones de 20 ml cada una de una mezcla de hexano y éter etílico (3:1). Reservar la fase acuosa. Reunir las fases orgánicas en otra ampolla de decantación y lavar con 5,0 ml de agua, desechar la fase orgánica y mezclar el agua de lavado con la fase acuosa reservada. Tratar esta solución con 4 porciones de 30 ml cada vez, de acetato de etilo recientemente saturado con agua (a 150 ml de acetato de etilo agregar 15 ml de agua; agitar durante 3 minutos y dejar reposar). Entre cada extracción, dejar reposar hasta que la fase orgánica se observe clara. Reunir las fracciones de acetato de etilo. Emplear la fase acuosa para la valoración de cascarósidos y la orgánica para valoración de heterósidos hidroxiantracénicos no cascarósidos.

Procedimiento -

A - Heterósidos hidroxiantracénicos no cascarósidos

Concentrar la fase orgánica, casi a sequedad, a una temperatura de aproximadamente 80 °C. Disolver el residuo en 0,5 ml de metanol. Transferir la solución a un matraz aforado de 50 ml y lavar el recipiente con 3 porciones de 10 ml de agua a 80 °C aproximadamente; agregar el agua de lavado a la solución metanólica. Dejar enfriar y completar a volumen con agua. Transferir 20 ml de esta solución a un balón de 100 ml, que contenga 2,0 g de cloruro férrico y 12 ml de ácido clorhídrico 1 N; ajustar un refrigerante al balón y someter a reflujo durante 4 horas, en un baño de agua. Dejar enfriar. Transferir la solución a una ampolla de decantación y lavar el balón sucesivamente con porciones de 4 ml de una solución de hidróxido de sodio 1 N y porciones de 4 ml de agua, transferir los líquidos de lavado a la ampolla. Extraer con tres porciones de 30 ml cada una de una mezcla de hexano y éter etílico (3:1). Reunir las fracciones orgánicas en otra ampolla de decantación y lavar con dos porciones de agua de 10 ml cada una y desechar los líquidos de lavado. Colocar la fase orgánica en un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con la mezcla de hexano y éter etílico (3:1). Evaporar cuidadosamente a sequedad 20 ml de la solución en baño de agua a una temperatura de aproximadamente 60 °C. Disolver el residuo en 10 ml de una solución de acetato de magnesio al 0,5 % p/v en metanol. Medir la absorbancia a 515 y a 440 nm; la diferencia entre la absorbancia determinada a 515 nm y la absorbancia a 440 nm, no debe ser menor a 2,4. Si es menor a 2,4 se debe repetir la valoración empleando metanol como blanco.

Calcular el contenido en porcentaje de heterósidos hidroxiantracénicos, expresados como Cascarósido A, en la porción de Cáscara Sagrada en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$\frac{6.950A}{180p}$$

en la cual A es la absorbancia obtenida a 515 nm, p es el peso de Cáscara Sagrada en mg y 180 es el coeficiente de extinción específica E (1 %, 1 cm) de heterósidos hidroxiantracénicos (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*).

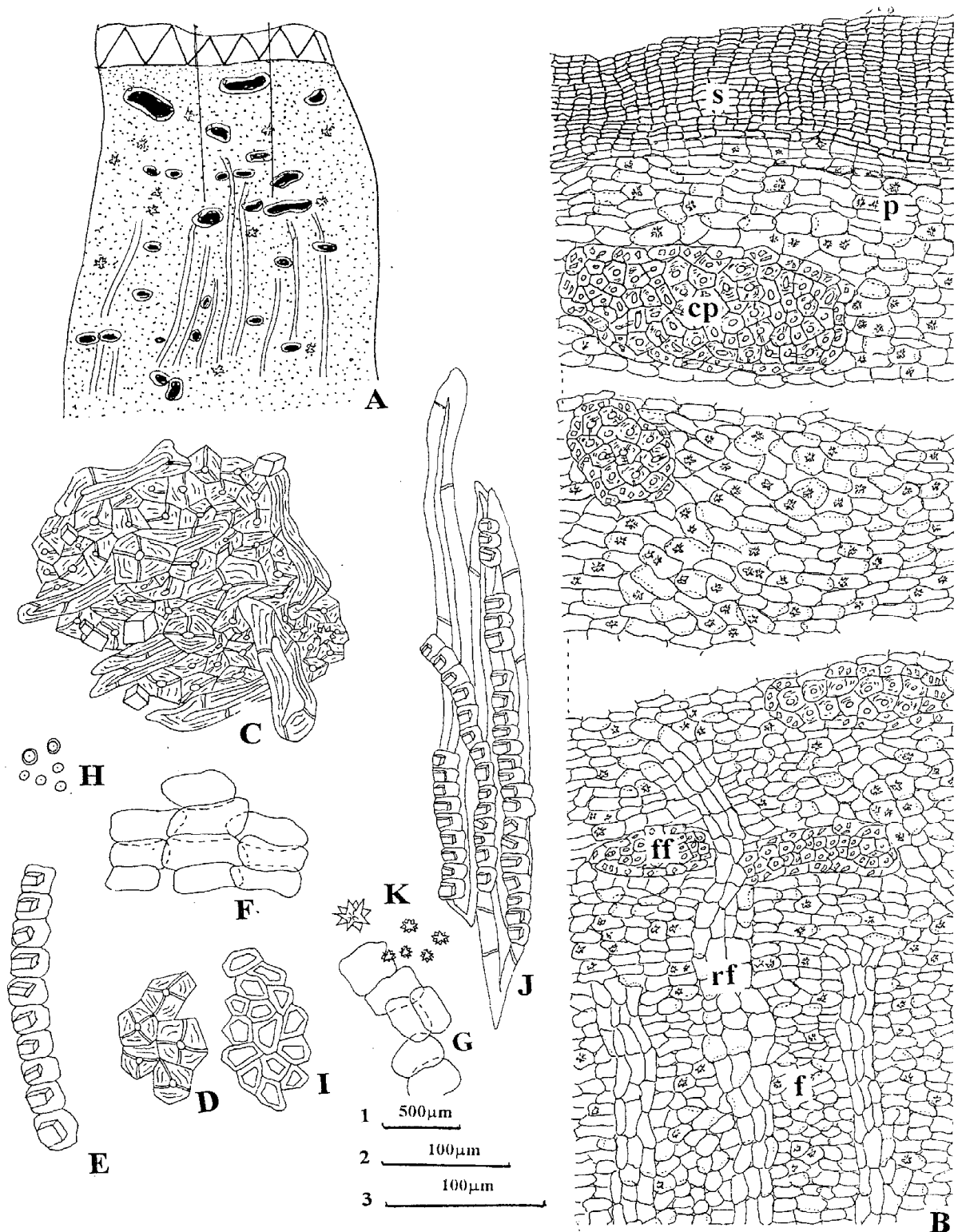
B - Cascarósidos

Transferir la fase acuosa a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con agua y proceder según se indica en *Valoración para Heterósidos hidroxiantracénicos no cascarósidos* comenzando donde dice "Transferir 20 ml de esta solución a un balón ...". Calcular el contenido en porcentaje de

heterósidos hidroxiantracénicos, expresados como cascarósido A, en la porción de Cáscara Sagrada en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$\frac{6.950A}{180p}$$

en la cual A es la absorbancia obtenida a 515 nm; p es el peso de Cáscara Sagrada en mg y 180 es el coeficiente de extinción específica E (1 %, 1 cm) de heterósidos hidroxiantracénicos (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*). Medir la absorbancia de la solución a 440 nm; la diferencia entre la absorbancia determinada a 515 nm y la absorbancia a 440 nm no debe ser menor a 2,7; si es menor la valoración debe repetirse.



Rhamnus prusiana DC, A-K: A, B, sección transversal de la corteza. A, esquema representativo. B, detalle de lo indicado en A. C, D, células pétreas. E, vaina parenquimática cristalífera. F, G, parénquima. H, almidón simple. I, súber. J, fibras floemáticas con vaina. K, oxalato de calcio. s, súber; p, parénquima; cp, células pétreas; ff, fibras floemáticas; f, floema; rf, radios del floema. Las reglillas corresponden a: 1 a A; 2 a B; 3, a C-K.

CASTAÑO DE INDIAS, semilla

Definición - Castaño de Indias está constituido por las semillas maduras y desecadas de *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastanaceae). Debe contener no menos de 3 por ciento de glicósidos tri-terpénicos calculados como escina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Semillas irregularmente ovoides o subesféricas, de 2 a 4 cm de diámetro. El tegumento de 2 mm de espesor es liso, de color pardo amarillento, generalmente lustroso con una gran mancha blanquecina correspondiente al hilo.

B - Características microscópicas - El tegumento está constituido por una epidermis de color pardo amarillento que en vista superficial presenta células poligonales con paredes engrosadas, que en sección transversal son columnares con paredes engrosadas y cutícula gruesa y lisa, compactas, orientadas radialmente constituyendo una empalizada. Por debajo de ellas se observan cuatro zonas distintas: la primera más externa constituida por varias capas de células de colénquima con paredes muy engrosadas de color pardo; la segunda zona presenta numerosas capas de células esclerenquimáticas, de paredes muy engrosadas, pigmentadas de color pardo amarillento, dispuestas tangencialmente, en esta capa se encuentran los haces vasculares; la tercera zona está constituida por 4 a 5 hileras de grandes células parenquimáticas, que poseen paredes delgadas y dejan amplios espacios intercelulares; la cuarta zona muestra varias hileras de células de paredes engrosadas de color pardo ubicadas tangencialmente. Los cotiledones presentan una epidermis uniestratificada que limita a un parénquima de grandes células que contienen granos de almidón y gotas lipídicas. Los granos de almidón son simples, esféricos, de 5 a 10 µm con hilo puntual o de 10 a 40 µm de diámetro irregulares, piriformes, ovoideos, con hilo estrellado y pocos granos compuestos de 2 a 4 unidades.

C - Droga en polvo - El polvo es de color castaño-amarillento con olor suave. Se observan fragmentos de epidermis con paredes fuertemente engrosadas, porciones de testa que en vista superficial muestran las paredes tangenciales uniformemente engrosadas y gran cantidad de parénquima pertene-

ciente a los cotiledones con granos de almidón característicos y gotas lipídicas.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Emplear la fase superior de una mezcla de *n*-butanol, agua y ácido acético glacial (50:40:10).

Solución estándar - Preparar una solución de aproximadamente 10 mg de escina por ml de metanol.

Solución muestra - Calentar 2 g del polvo obtenido en *Valoración* a reflujo durante 10 minutos con 10 ml de alcohol 70 %, filtrar y evaporar hasta obtener un volumen de aproximadamente 5 ml.

Revelador - Anisaldehído sulfúrico (SR).

Procedimiento - Aplicar por separado en bandas, 10 µl de la *Solución estándar* y entre 25 y 40 µl de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara y dejar secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar la placa entre 100 y 105 °C, durante 5 a 10 minutos. Examinar los cromatogramas bajo luz visible: el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar una banda azul violácea correspondiente a escina similar en valor de R_f y color a la banda principal obtenida con la *Solución estándar*. Por encima de esta banda en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se deben observar varias bandas angostas, de color marrón a marrón rojizas menos intensas que la banda correspondiente a escina.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No mayor a 4 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>.

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No más de 0,001 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 2 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe perder más de 10 % de su peso.

Residuo de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Determinación de glicósidos triterpénicos

Solución A - Metanol y agua (65: 35).

Solución B - Emplear la fase inferior de una mezcla de 30 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, 20 ml de *n*-propanol y 50 ml de cloroformo.

Reactivo - Disolver 75 mg de cloruro férrico en 50 ml de ácido acético glacial. Agregar 50 ml de ácido sulfúrico mediante agitación. Dejar enfriar. [NOTA: preparar inmediatamente antes de su uso].

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de escina en ácido acético glacial, agitando durante 1 minuto. Hacer las diluciones necesarias hasta obtener soluciones de aproximadamente 0,2; 0,4 y 0,6 mg de escina por ml.

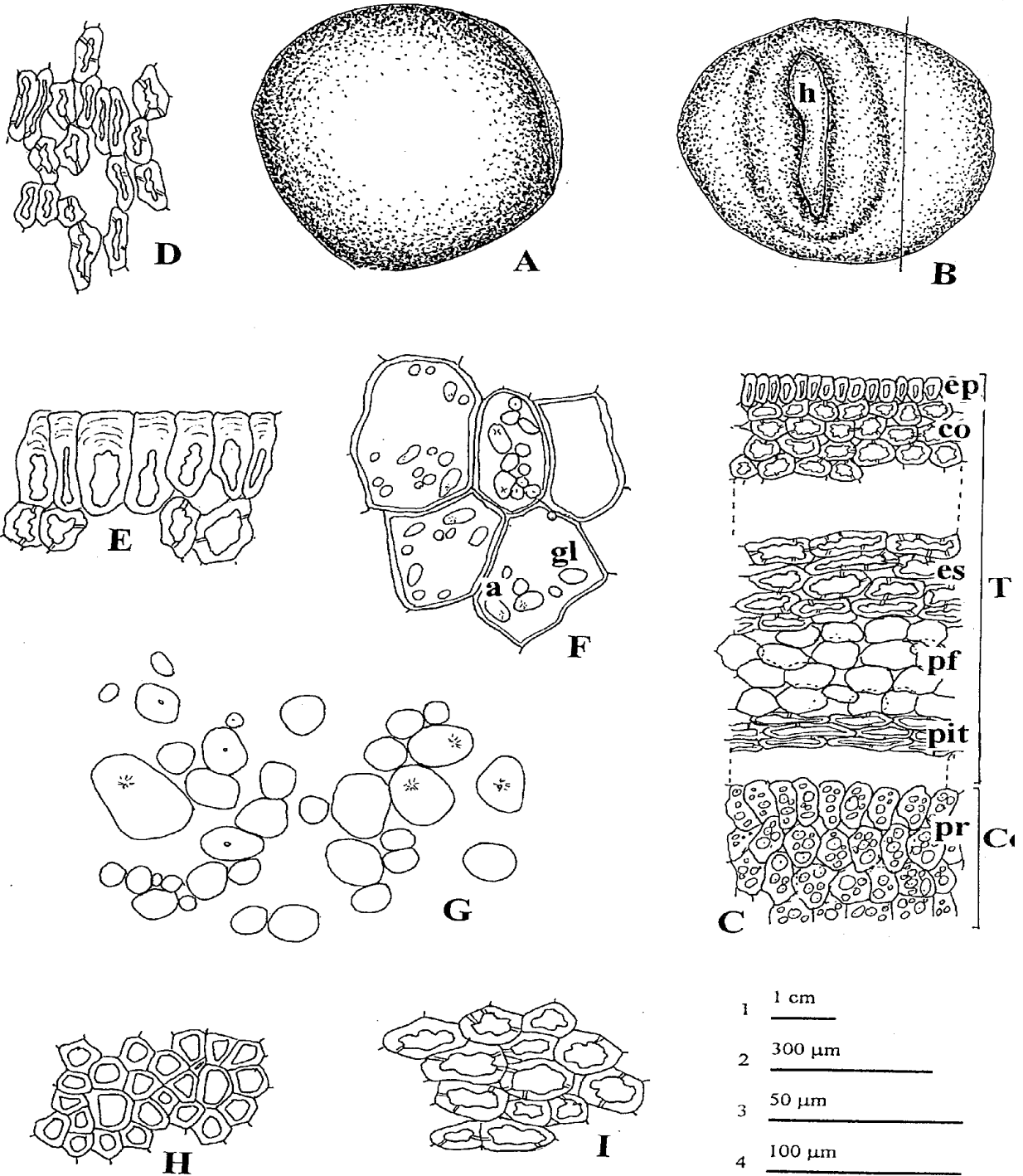
Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de Semillas de Castaño de Indias reducidas a polvo y colocar en un balón de 250 ml. Agregar 100 ml de *Solución A*, pesar y llevar a reflujo durante 30 minutos y dejar enfriar. Ajustar al peso inicial mediante el agregado de *Solución A*, si fuera necesario, mezclar y filtrar. Transferir 30,0 ml del filtrado a un balón y evaporar a sequedad a presión reducida. Disolver el residuo con 20 ml de ácido clorhídrico 0,1 N y transferir a una ampolla de decantación de 250 ml, lavando con dos porciones de 5 ml de ácido clorhídrico 0,1 N. Agregar 20 ml de *n*-propanol y 50 ml de cloroformo y agitar durante 2 minutos. Separar la fase clorofórmica. Agregar *Solución B* a la fase superior remanente en la ampolla. Agitar durante 2 minutos

y separar la fase clorofórmica. Combinar las fases clorofórmicas en un balón y evaporar a sequedad. Lavar el residuo con dos porciones de 10 ml de éter, filtrar, lavar el filtro con 10 ml de éter y descartar estos filtrados. Agregar al residuo una alícuota de 10 ml de ácido acético glacial y transferir a través de un filtro previamente usado y secado, a un matraz aforado de 50,0 ml. Repetir dos veces la adición de ácido acético glacial seguida por filtración y combinar los filtrados en el matraz. Lavar el balón con pequeñas cantidades de ácido acético glacial y transferir a través del filtro al matraz. Completar a volumen con ácido acético glacial.

Procedimiento - Transferir 1,0 ml de cada una de las diluciones de la *Preparación estándar*, *Preparación muestra* y ácido acético glacial a tubos de ensayo. Agregar 4,0 ml de *Reactivo* a cada tubo, tapar los tubos, colocar en un baño de agua a 60 °C durante 25 minutos y agitar ocasionalmente. Medir las absorbancias a 540 nm de la *Preparación muestra* y de las diluciones de la *Preparación estándar* empleando el ácido acético glacial como blanco. Graficar las absorbancias obtenidas de las diluciones de *Preparación estándar* versus las concentraciones en mg por ml de escina en la correspondiente dilución de la *Preparación estándar*. Del gráfico así obtenido determinar la concentración *C* en mg por ml de glicósidos triterpénicos como escina en la *Preparación muestra*. Calcular el porcentaje de glicósidos triterpénicos en la porción de Castaño de Indias en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$50/3(C/P)$$

en la cual *C* es la concentración en mg por ml de glicósidos triterpénicos en la *Preparación muestra* y *P* es el peso en g de Castaño de Indias en ensayo.



Aesculus hippocastanum L. – A-B, representación esquemática de la semilla. A, en vista abaxial; B, en vista adaxial mostrando el hilo, h; C, detalle de la sección transversal de la semilla según lo indicado en B, T, tegumento co, colénquima, es, esclerenquima, ep, epidermis, pf parénquima fundamental, pit, parénquima interno del tegumento; Co, cotiledán, pr, parénquima de reserva de los cotiledones. D-I droga en polvo. D, detalle de la epidermis del tegumento en vista superficial; E, detalle de la epidermis del tegumento; F, células parenquimáticas con granos de almidón, a y gotas lipídicas, gl; G, granos de almidón; H, células esclerenquimáticas; I, células colenquimatosas. Las reglillas corresponden 1 a A, B; 2 a C; 3 a G; 4 a D, E, F, H, I.

CEDRÓN, hoja

Definición - Cedrón está constituido por hojas enteras o fragmentadas de *Aloysia citriodora* Palau (Verbenaceae). La droga entera debe contener no menos de 0,20 por ciento de aceite esencial. La droga fragmentada debe contener no menos de 0,15 por ciento de aceite esencial. Cedrón debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados, en sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Hojas enteras, con borde ligeramente aserrado, lanceoladas, de ápice acuminado, de 4 a 12 cm de longitud y 1 a 2,5 cm de ancho, brevemente pecioladas, ásperas al tacto y quebradizas. Cara superior de color verde oliva y cara inferior más clara. Nervadura media prominente en la cara inferior y con numerosas nervaduras secundarias, notablemente paralelas entre sí. Posee aroma cítrico característico y sabor ligeramente dulzaino.

B - Características microscópicas - En vista superficial se observa una epidermis superior con células poliédricas, de paredes anticlinales mas bien rectas, cutícula lisa, y pelos unicelulares, verrucosos, silicificados, cistolíticos, adpresos, rodeados de una roseta de alrededor de 8 células poligonales, las que contienen cada una un cistolito de carbonato de calcio, y de pelos unicelulares de paredes gruesas, verrucosos, en forma de colmillo. Los pelos glandulares pueden ser con una célula basal, una de pie y una cabeza secretora unicelular y pelos glandulares sésiles con cabeza unicelular. La epidermis inferior presenta células de paredes anticlinales sinuosas, con tricomas similares a los descriptos, pero en mayor cantidad, con estomas elevados de tipo anomocítico y cutícula estriada sobre las nervaduras. El corte transversal pone de manifiesto a ambas epidermis uniestratificadas. El mesófilo es dorsiventral con 1 a 2 hileras de parénquima en empalizada y 3 a 4 hileras de parénquima esponjoso. En la región del nervio medio, se observa colénquima angular en relación con ambas epidermis. El haz vascular es colateral, con floema hacia ambas caras.

C - Droga en polvo - Polvo color verde claro. Muestra fragmentos de epidermis superior sin estomas y de epidermis inferior con estomas, pelos con los caracteres ya descriptos y fragmentos de nervaduras.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Tolueno y acetato de etilo (96:4).

Solución estándar - Transferir 0,1 ml de citral a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con etanol.

Solución muestra - Transferir 0,1 ml de la porción de aceite esencial obtenida en *Valoración* a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con etanol.

Revelador - Anisaldehído sulfúrico (SR).

Procedimiento- Aplicar por separado 5 µl de la *Solución estándar* y 5 µl de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara y dejar secar a temperatura ambiente. Examinar la placa bajo la luz ultravioleta a 254 nm. La banda mayoritaria en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe ser similar a la obtenida con la *Solución estándar*, correspondiente al citral. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar entre 5 a 10 minutos a una temperatura comprendida entre 100 y 105 °C. Examinar la placa bajo luz natural. La banda mayoritaria de color violeta grisáceo en el cromatograma obtenido con la *Solución muestra* debe ser similar en valor de R_f y color a la obtenida con la *Solución estándar*.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 10 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 2 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe perder más de 11 %.

Aceites esenciales y perfil cromatográfico

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama, un inyector de flujo dividido (1:100) y una columna capilar de 30 m × 0,25 mm de sílice fundida recubierta con fase estacionaria constituida por polietilenglicol de peso molecular aproximadamente 20.000 y de 0,25 µm de espesor. Mantener la temperatura de columna a 60 °C durante 10 minutos y programar un aumento de 2 °C

por minuto hasta alcanzar 180 °C y mantener a esta temperatura durante por lo menos 5 minutos. Mantener el inyector y el detector aproximadamente a 220 °C. Se debe emplear nitrógeno como gas transportador y la velocidad lineal debe ser aproximadamente 35 cm por segundo.

Solución estándar - Disolver 100 mg de limoneno, 100 mg de eucaliptol, 200 mg de citral y 100 mg de citronelal en 5 ml de ciclohexano.

Solución muestra - Emplear una porción de aceite esencial obtenida en ciclohexano en *Valoración*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos correspondientes a limoneno y eucaliptol no debe ser menor de 1,5 y el número de platos teóricos calculado a partir del pico de limoneno debe ser mayor de 30.000.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 µl) de la *Solución estándar* y de la *Solución muestra*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los todos los picos. Determinar los tiempos de retención relativos al pico de geranial y determinar el contenido en porcentaje de cada uno de los constituyentes por el método de normalización porcentual.

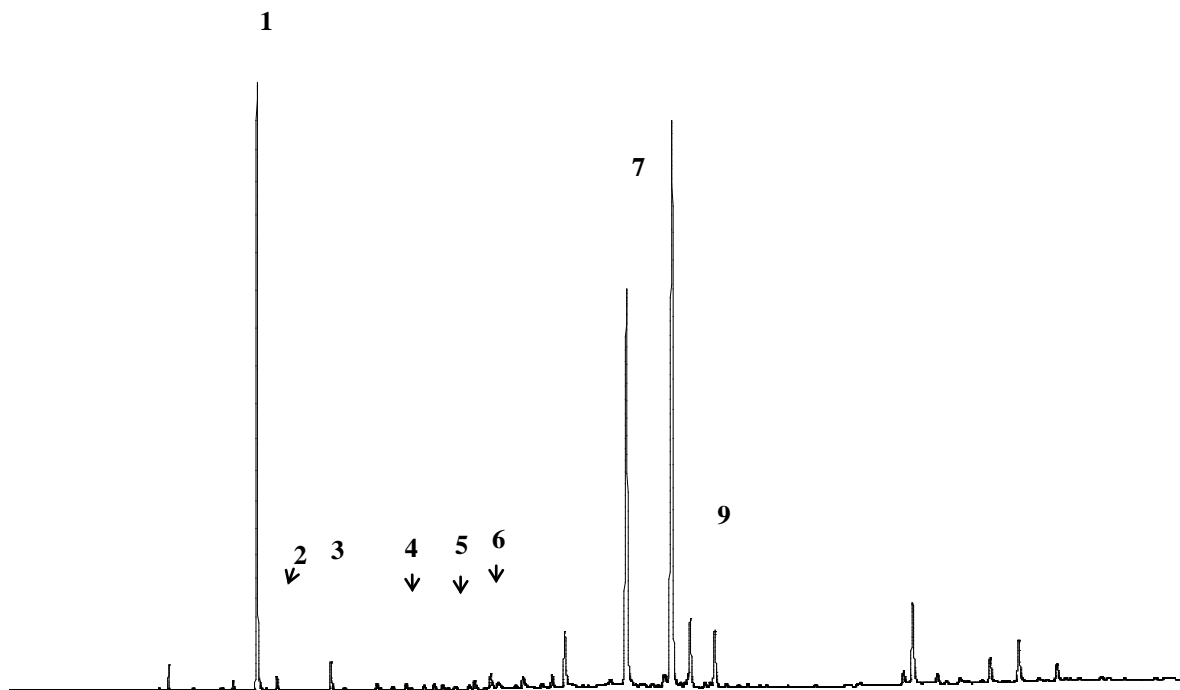
Los contenidos en porcentaje de aceites esenciales son los indicados en la siguiente tabla:

Aceites esenciales	Contenido (%)
Limoneno	Entre 10 y 30 %
Eucaliptol	Menor de 1,0 %
Metil heptenona	Menor de 3,5 %
<i>cis</i> -tuyona + <i>tans</i> -tuyona	Menor de 0,5 %
Citronelal	Menor de 0,5 %
Neral	Entre 14 y 27 %
Geranial	Entre 17 y 36 %
<i>ar</i> -Curcumeno	Mayor de 1,0%

VALORACIÓN

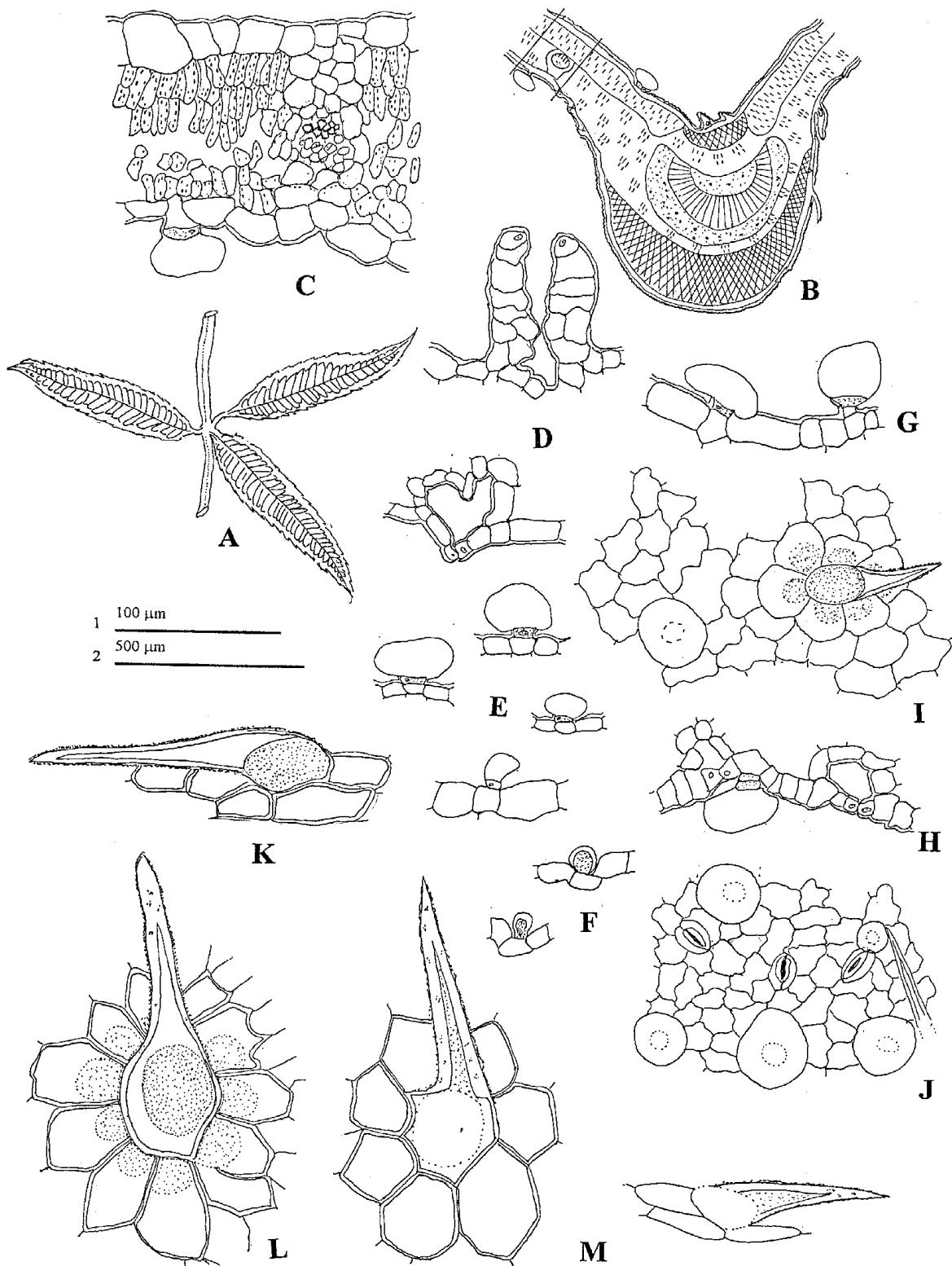
Pesar 25,0 g de Cedrón recientemente reducido a polvo y transferir a un balón de 1 litro. Destilar con 300 ml de agua y 0,5 ml de ciclohexano en el tubo graduado, a una velocidad de 2 a 3 ml por minuto durante 2 horas. (ver *Determinación de aceites esenciales* en 630. *Métodos de farmacognosia*)

8



- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 1. Limoneno (0,37) | 6. Citronelal (0,66) |
| 2. Eucaliptol (0,40) | 7. Neral (0,93) |
| 3. Metil heptenona (0,48) | 8. Geranial |
| 4. <i>cis</i> -tuyona (0,60) | 9. <i>ar</i> -Curcumeno (1,06) |
| 5. <i>trans</i> -tuyona (0,62) | |

Perfil cromatográfico tipo del aceite esencial de Cedrón.



Aloysia citriodora Palau, A-M: A, morfología externa del vástago. B-H: sección transversal: B-C: lámina de la hoja; B, nervio medio, esquema; C, detalle del semilimbo según lo indicado en B. D, estomas sobre elevados. E-F: pelos glandulares: E, con una células basal, una de pie y cabeza unicelular; F, sésiles con cabeza unicelular. G-H: epidermis: G, superior; H, inferior. I-M vista superficial: I-J: epidermis, I, superior; J, inferior. K-M: pelos no glandulares: K, cistolítico, simple, punzante, verrucoso, del borde de la lámina; L, cistolítico, simple, verrucoso con una roseta de células basales conteniendo, cada una, un cistolito, presentes en ambas epidermis. M, pelo en forma de colmillo, presente en ambas epidermis.

CENTELLA, hierba

Definición - Centella está constituida por las partes aéreas desecadas de *Centella asiatica* (L.) Urban (*Hydrocotyle asiatica* L.) (Apiaceae). Centella debe contener no menos de 2,0 por ciento de asiaticósido calculado sobre la droga seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio fresco.

ENSAYOS

Identificación

A - *Características macroscópicas.* Planta herbácea, estolonífera, polimorfa. Las hojas son simples, pecioladas, la lámina es ovada a orbicular-reniforme, de 1,5 a 7 cm de ancho y de 1 a 6 cm de largo, palmatinervia con 5 a 9 nervaduras principales que convergen en hidátodos. Ápice redondeado, obtuso a truncado y margen crenado. Pecíolos fistulosos de hasta 15 cm de longitud, ensanchados en la base, con estípulas de color castaño verdoso a castaño rojizo. En la cara superior y en la inferior de la lámina y en el pecíolo de hojas jóvenes presenta una lanosidad de color pardo a rojizo, que se restringe a las nervaduras. Flores pequeñas, de aproximadamente 2 mm, de color blanco a rosado pálido reunidas en umbelas simples, por lo general en número de 3 a 5 con pedúnculo generalmente corto, de color blanco a rosado pálido. Fruto orbicular, diaquenio, tan ancho como largo, comprimido lateralmente, con 7 nervaduras por mericarpo, pericarpo muy grueso, reticulado, de color pardo oscuro. Semillas comprimidas y pequeñas.

B - *Características microscópicas.* En vista superficial la epidermis superior presenta células poligonales de paredes rectas, estomas sobreelevados, de tipo paracítico y en menor proporción anisocítico, cutícula estriada; la epidermis inferior similar a la descripta pero con células de mayor tamaño. Ambas epidermis presentan pelos simples, uniseriados, retorcidos, generalmente con 2 a 3 células, escasos en la epidermis superior. En sección transversal ambas epidermis están constituidas por células rectangulares, tangencialmente aplanadas, alternando con células cuadrangulares papilosas. El mesófilo presenta estructura dorsiventral con 1 a 3 hileras de células en empalizada y 6 a 7 capas de parénquima esponjoso constituido por células alargadas tangencialmente que dejan amplios espacios intercelulares; en ambos parénquimas se observan drusas de oxalato de calcio. El colénquima se presenta en ambas caras reforzando el nervio medio, que está constituido por un haz cola-

teral. Rodeando la nervadura media se distingue un número variable de canales secretores. El pecíolo muestra contorno circular, algo aplanado, con dos aristas opuestas en la cara superior, separadas por una pequeña región levemente cóncava, que le confiere un aspecto canaliculado. La epidermis presenta células cuadrangulares, algo papilosas, con estomas y tricomas similares a los de la epidermis de la lámina, la cutícula es delgada y estriada; en posición subepidérmica se observan 2 a 3 hileras de colénquima y hasta 5 en las aristas, luego clorénquima con 7 haces vasculares colaterales dispuestos en círculo, separados por parénquima en el que se observan drusas de oxalato de calcio, también se observan canales secretores. Cada arista lleva un haz vascular pequeño, reforzado por fibras del lado del floema.

C - *Droga en polvo.* Polvo verde grisáceo, olor levemente aromático y sabor ligeramente amargo. Se observan fragmentos de epidermis con células poligonales, estomas paracíticos, pelos muy delgados, largos y retorcidos; porciones de parénquima con drusas de oxalato de calcio; grupos de fibras y fragmentos de nervadura con vasos leñosos estrechos anillados.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica:

Fase Estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Butanol, 2-propanol, agua, alcohol y amoníaco concentrado (30:30:20:5:1) [NOTA: preparar inmediatamente antes de su uso].

Solución estándar - Disolver 20 mg de asiaticósido en 10 ml de metanol.

Solución muestra - Reducir a polvo fino una porción de Centella, pesar exactamente alrededor de 5 g, transferir a un extractor tipo soxhlet, y extraer con metanol durante 4 horas. Filtrar, transferir el extracto a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con metanol.

Revelador - Anhídrido acético y ácido sulfúrico (9:1).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 5 μ l y 10 μ l de *Solución muestra* y de *Solución estándar*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar de la cámara, marcar el frente de solvente y secar bajo corriente de aire caliente. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*, calentar en estufa entre 100 y 110 °C durante 20 minutos y examinar a la luz natural. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar* debe presentar una mancha de color violeta con un R_f de aproximadamente 0,40. La *Solución muestra* debe pre-

senta dos manchas de color violeta con valor de R_f relativo de 1 y 0,90, de las cuales la de mayor R_f corresponde al asiaticósido.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No más de 12 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Materia Extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No más de 2 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe perder más de 11 %.

Residuos de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACION

Sistema cromatográfico - Emplear un cromatógrafo de líquidos equipado con detector ultravioleta ajustado a 210 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosa de 5 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,8 ml por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	75	25
75	52	48

Solución A - Agua y ácido fosfórico (99,5: 0,5).

Solución B - Acetonitrilo.

Fase móvil - Emplear mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

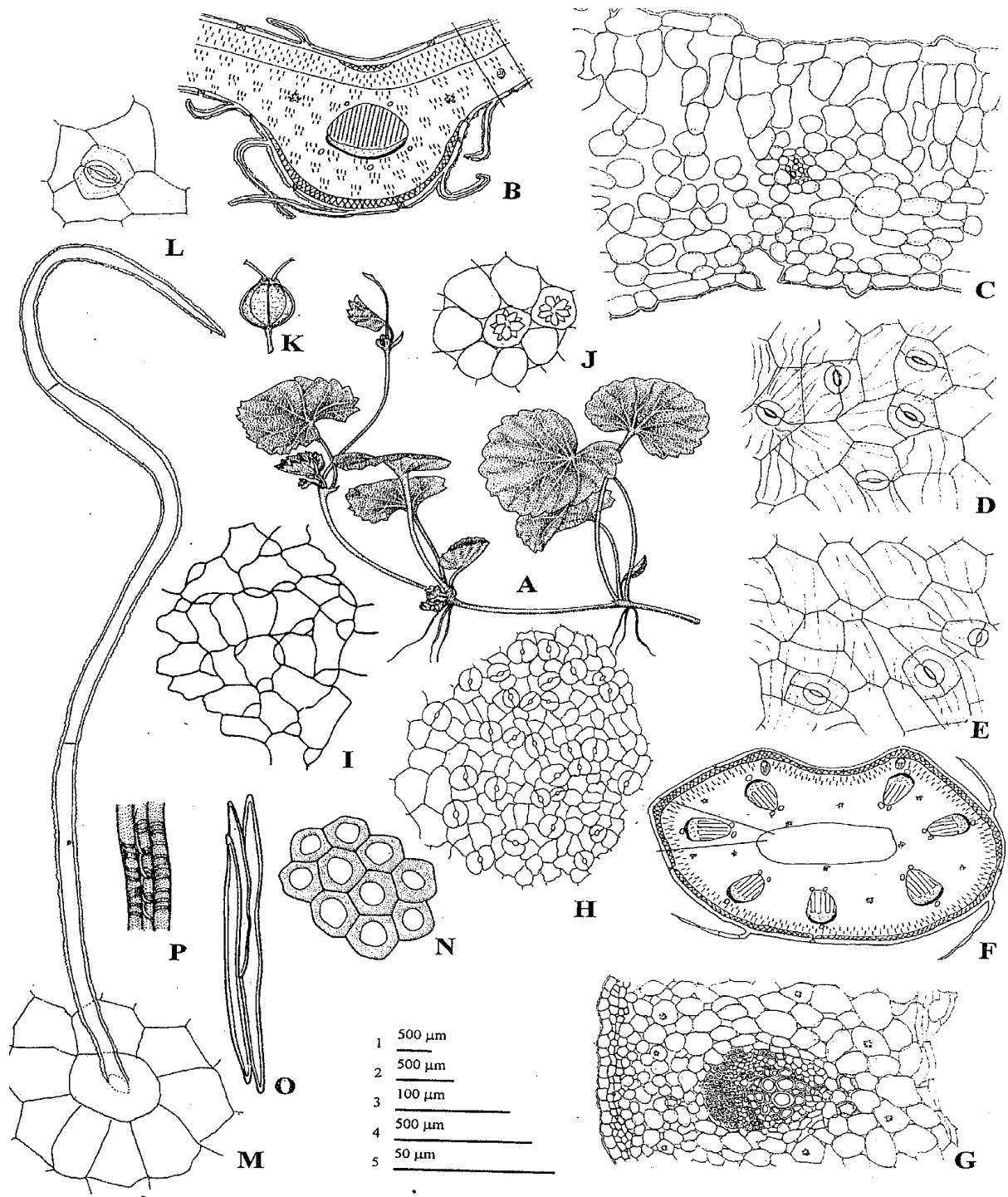
Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 10 mg de asiaticósido, transferir a un matraz aforado de 10 ml. Agregar 5 ml de metanol, agitar hasta disolver y completar a volumen con el mismo solvente.

Preparación muestra - Reducir aproximadamente 50 g de Centella a polvo fino, pesar exactamente alrededor de 5,0 g y realizar una extracción empleando un extractor tipo soxhlet con 100 ml de metanol durante 4 horas. Filtrar, transferir el extracto obtenido a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con el mismo solvente y filtrar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μl) de *Preparación estándar* y de la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir la respuesta de los picos correspondientes a asiaticósido. Calcular la cantidad en porcentaje de asiaticósido en la porción de Centella en ensayo con la fórmula siguiente:

$$1.000(P_E/P_M)(r_M/r_E)$$

en la cual r_M y r_E son las respuestas de los picos de asiaticósido en la *Preparación muestra* y en la *Preparación estándar*, respectivamente, y P_M y P_E son los pesos en g de la porción de Centella en ensayo y de asiaticósido en la *Preparación estándar*, respectivamente.



Centella asiatica (L.) Urban A-P: A, planta, exomorfología. Sección transversal: B-C: lámina foliar, B, esquema de la zona del nervio medio; C, detalle del semilimbo según lo indicado en B. F-G: pecíolo, F, esquema; G, detalle según lo indicado en F. Vista superficial: D-E, epidermis; D, superior; E, inferior. H-M, *Droga en polvo*, H, porción de hoja con hidatodo; I, fragmento de aerénquima; J, grupo de células parenquimáticas con drusas de oxalato de calcio; K, fruto ; L, porción de epidermis con estoma paralítico; M, pelo; *Tallo disociado*: N-O, fibras: N en sección transversal; O, longitudinal; P, vasos anillados. Las reglillas corresponden a 1 a G; 2 a F; 3 a C, D, E, I, J, L, M, N, O, P; 4 a B, H; 5 a L.

COLA, nuez de

Definición - Nuez de Cola es la semilla privada del tegumento, entera o en trozos, desecada, de *Cola nitida* (Vent.) Schott et Endl. (*C. vera* K. Schum.) y de sus variedades, así como de *Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott et Endl. (*Sterculia acuminata* P. Beauv.) (Sterculiaceae). Nuez de Cola debe contener no menos de 1,5 por ciento de cafeína, calculado sobre la droga seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados, en un sitio seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Semillas oblongas, más o menos obtusas, subtetrágonas, deformadas por presión recíproca en el fruto; de tamaño y peso variable, entre 5 y 15 g. La parte externa es dura, de superficie lisa, de color marrón muy oscuro; la parte interna es de color pardo rojizo. En *C. nitida* y sus variedades, las semillas se hallan divididas en dos partes plano-convexas correspondientes a los cotiledones (media cola). Los cotiledones miden de 3 a 4 cm de largo, de 2 a 2,5 cm de ancho y de 1 a 2 cm de espesor. En *C. acuminata* los cotiledones son de menor tamaño que en *C. nitida*, y se hallan divididos en cuatro a seis partes irregulares (cuartos de cola).

B - Droga en polvo - Polvo pardo claro o pardo amarillento, inodoro, de sabor ligeramente astringente. Presenta numerosos granos de almidón ovoides, esféricos, reniformes o irregulares de 5 a 25 µm (hasta 45 µm) de diámetro, con estrías concéntricas y con hilo en forma de estrella, ligeramente excéntrico; fragmentos del tejido de los cotiledones con células poligonales, de paredes gruesas, rojizas, con granos de almidón; fragmentos de la epidermis de los cotiledones y vasos espiralados y punteados del xilema.

C - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta de gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Agua, acetato de etilo y metanol (10:77:13).

Solución estándar A - Disolver 25 mg de cafeína en 10 ml de alcohol al 60 %.

Solución estándar B - Disolver 50 mg de teobromina en 10 ml de *Fase móvil*.

Solución muestra - Reducir a polvo fino 1,0 g de Nuez de Cola, realizar una extracción con 5,0 ml de alcohol al 60 % a 40 °C, con agitación continua, durante 30 minutos.

Revelador I - Alcohol y ácido clorhídrico concentrado (1:1).

Revelador II - Preparar inmediatamente antes de su uso una solución de 1,0 g de iodo y 1,0 g de ioduro de potasio en 100 ml de alcohol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, 20 µl de *Solución muestra*, 20 µl de *Solución estándar A* y *B*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente las tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa, marcar el frente de solvente y dejar secar durante 5 minutos en una corriente de aire. Examinar el cromatograma bajo luz ultravioleta a 254 nm. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar dos bandas principales que se corresponden en posición con las bandas observadas en el cromatograma obtenido con la *Solución estándar A* y la *Solución estándar B*. Pulverizar sobre la placa *Revelador I*, y a continuación *Revelador II*. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar una banda principal pardo rojiza, que se corresponde en posición y color con la banda observada en el cromatograma de la *Solución estándar A*.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No más de 9,0 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de metales pesados <590>

Método 1. No más de 0,001 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener materias extrañas.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Secar en estufa entre 100 a 105 °C, durante 2 horas, 2,0 g de Nuez de Cola previamente pulverizada. No debe perder más de 12 %.

Residuo de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 272 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm, con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agua y metanol (75:25). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 30 mg de *Cafeína* y 15 mg de teobromina, transferir a un matraz de 100 ml, agregar cantidad suficiente de *Fase móvil* y agitar hasta disolver. Completar a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con el mismo solvente.

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de Nuez de Cola previamente reducida a polvo fino, transferir a un recipiente adecuado y agregar 50 ml de metanol. Calentar a reflujo en baño de agua durante 30 minutos, enfriar a temperatura ambiente y filtrar. Lavar el filtro con 10 ml de metanol y retomar el residuo con 50 ml de metanol y repetir la operación anterior. Reunir los

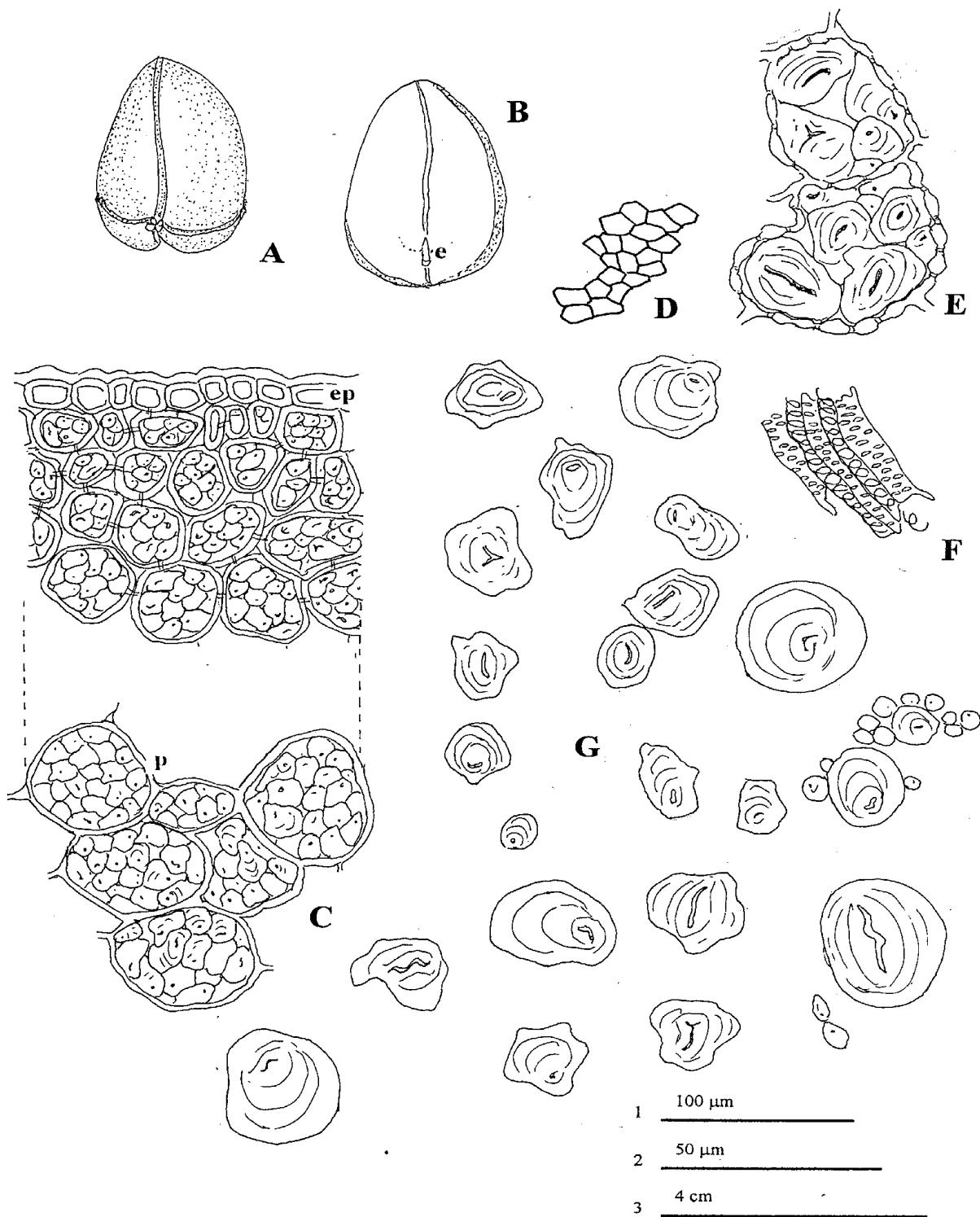
filtrados y las soluciones de lavado en un matraz aforado de 200 ml y completar a volumen con metanol. Transferir 20 ml de esta solución a un balón y evaporar hasta sequedad a presión reducida. Disolver el residuo con *Fase móvil*, transferir a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con *Fase móvil*.

Aptitud del sistema - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de cafeína y teobromina debe ser mayor de 2,5. Si fuera necesario, ajustar el volumen de agua en la proporción de *Fase móvil*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales de *Preparación estándar* y de *Preparación muestra*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos correspondientes a cafeína. Calcular el porcentaje de cafeína en la porción de Nuez de Cola, por la fórmula siguiente:

$$50(P_E/P_M)(r_M/r_E)$$

en la cual r_M y r_E son las respuestas de los picos correspondientes a cafeína en el cromatograma obtenido con la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente, P_M es el peso en g de Nuez de Cola en la *Preparación muestra* y P_E es el peso en g de *Cafeína* en la *Preparación estándar*.



Cola nitida (Vent.) Schott et Endl., A-G: A-B, morfología: A, semilla entera; B, la misma cortada longitudinalmente mostrando el embrión. C, sección transversal de una porción del cotiledón. D, vista superficial de la epidermis del cotiledón. E, dos células del parénquima amilífero. F, vasos espiralados y punteados del xilema. G, granos de almidón. e, embrión; ep, epidermis del cotiledón; p, parénquima amilífero. Las reglillas corresponden a: 1 a C, D y F; 2 a E y G; 3 a A y B.

EUCALIPTO, hoja

Definición - Eucalipto consiste en la hoja madura y desecada de *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae). La droga entera debe contener no menos de 20 ml/kg de aceite esencial y la droga trozada no menos de 15 ml/kg, en ambos casos calculado sobre a la droga seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio seco y fresco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas. Hojas simples, de aproximadamente 25 cm de largo por 4 cm de ancho, con pecíolo de 1 a 3 cm de longitud, de color marrón claro, ligeramente aplastado, acanalado, casi siempre retorcido. Lámina de color verde pálido a verde grisáceo, lanceolada, falca, coriácea, de borde entero resoluta, ápice acuminado y base desigualmente obtusa o redondeada; nervio medio bien marcado en la cara inferior con ramificaciones que se anastomosan y terminan formando una nervadura paralela a 1 ó 2 mm del borde del limbo; presenta gran cantidad de cavidades de aceites esenciales que se pueden reconocer como puntos traslúcidos.

B - Características microscópicas. La lámina en vista superficial presenta, en ambas epidermis, células poligonales de paredes rectas, moderadamente gruesas y estomas hundidos, de tipo anocítico, más abundantes en la inferior. La venación es densa. La sección transversal de la lámina es anfiestomática e isolateral. Ambas epidermis son uniestratificadas con cutícula lisa y gruesa. En relación con ambas epidermis se observan de 3 a 4 hileras de parénquima en empalizada de células cortas; parénquima esponjoso, ubicado entre ambas empalizadas, constituido por 3 a 4 hileras de células pequeñas. En el mesófilo aparecen grandes cavidades esquizolisígenas que contienen aceites esenciales. Nervio medio constituido por un gran haz vascular de forma plano-convexa rodeado por una vaina discontinua de fibras, acompañado en la parte superior, por dos haces vasculares menores. En relación con ambas epidermis aparece colénquima laminar. Los parénquimas presentan drusas de oxalato de calcio y escasos prismas.

C - Droga en polvo. Color verde grisáceo, olor aromático, pungente, característico, sabor astringente, amargo que con el tiempo da sensación de frescura. Al microscopio aparecen fragmentos de epi-

dermis con estomas, células de parénquima con drusas de oxalato de calcio y escasos prismas sueltos, porciones de epidermis superior e inferior y fragmentos de nervaduras.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo y tolueno (1:9).

Solución estándar - Diluir 50 µl de 1,8-cineol en 5,0 ml de tolueno.

Solución muestra - Reducir a polvo fino una porción de Eucalipto, pesar exactamente alrededor de 0,5 g de polvo, agregar 5,0 ml de tolueno y agitar entre 2 y 3 min. Filtrar sobre aproximadamente 2 g de sulfato de sodio anhidro.

Revelador - Anisaldehído sulfúrico (SR).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, en forma de banda, 10 µl de *Solución muestra* y 10 µl de *Solución estándar*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente de solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa, dejar secar y pulverizar sobre la placa con *Revelador*. Calentar la placa entre 100 y 105 °C durante 5 a 10 minutos y observar a la luz. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar en la zona media una banda correspondiente al 1,8-cineol que se corresponde en posición y color con la obtenida en la *Solución estándar*. También se debe observar una intensa banda violeta cercana al frente de solvente y pueden observarse otras bandas de coloración tenue.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No más de 6,0 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de Agua <120>

Destilación azeotrópica. No más de 10 %, determinado sobre 20 g de Eucalipto, previamente reducido a polvo fino.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No más de 10 ppm.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

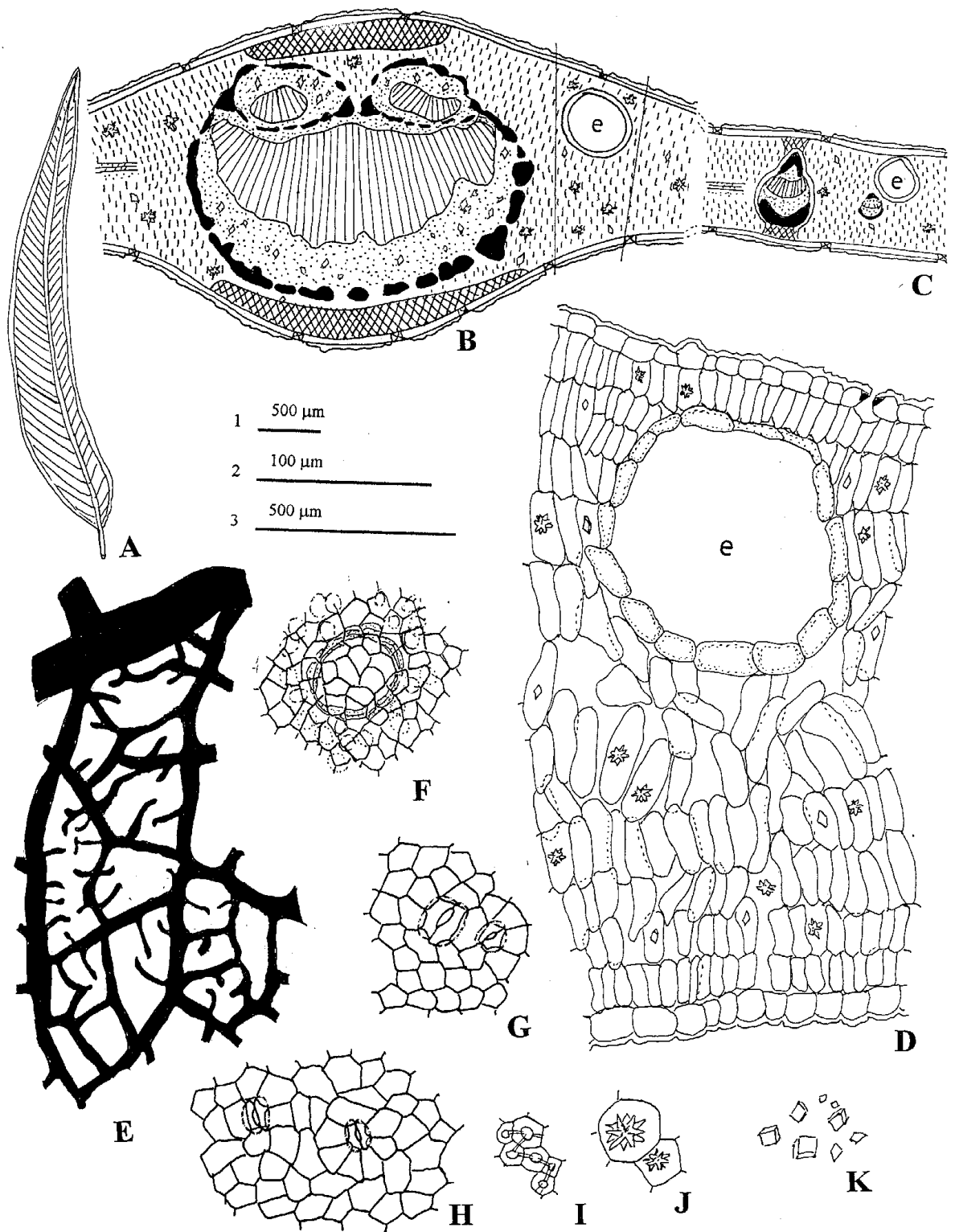
No más de 3 % de hojas oscuras y castañas, no más de 5 % de tallos y no más de 2 % de otra materia extraña. No debe presentar hojas sésiles, cordi-

formes u ovadas de ramas jóvenes, con numerosas glándulas de ambos lados, visibles como puntuaciones translúcidas. Determinar estos valores empleando 30 g de Eucalipto.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Determinación de aceites esenciales* (ver 630. *Métodos de Farmacog-*

nosia). Pesar exactamente alrededor de 10,0 g de Eucalipto, previamente trozado inmediatamente antes de su uso y transferir a un balón de 500 ml. Agregar 200 ml de agua y 100 ml de glicerina y destilar. Agregar 0,5 ml de xileno en el tubo graduado y destilar a una velocidad entre 2 y 3 ml por minuto durante 2 horas.



Eucalyptus globulus Labill. A-K, A, morfología; B-D: sección transversal de la lámina: B, nervio medio; C, semilímbo; D, detalle de lo indicado en B. E-H: vista superficial del limbo: E, arquitectura foliar; F, epidermis superior; G-H, epidermis: G, superior; H, inferior; I, fibras; J, drusas de oxalato de calcio; K, cristales poliédricos de oxalato de calcio. Las reglillas corresponden a 1 a E; 2 a D, F-J; 3 a B y C.

GINKGO, hoja

Definición - Ginkgo está constituido por la hoja seca de *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae). No debe contener menos de 0,5 por ciento de flavonoides calculado como heterósidos flavonoides sobre la droga seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Las hojas, simples, enteras, desecadas se presentan plegadas o fragmentadas, con o sin pecíolo adjunto; su color varía desde verde parduzco hasta pardo verdoso y a menudo son más pardas en el borde apical y más oscuras en la superficie adaxial. La lámina es ampliamente obcuneada (configurada en forma de abanico), de 2 a 12 cm de ancho y de 2 a 9,5 cm de largo desde el pecíolo hasta el margen apical; generalmente es 1,5 a 2 veces más ancha que larga. Los bordes en la base son cóncavos y enteros; los apicales son ondulados, generalmente truncados o con hendidura central y raramente con hendiduras múltiples. La superficie es glabra y de apariencia arrugada por la prominente nerviación. La misma se origina de doce nervios básales que se ramifican dicotómicamente de tres a cinco veces. El pecíolo es de color similar al de la hoja, es surcado en la superficie adaxial y tiene de 2 a 8 cm de longitud.

B - Características microscópicas - Lámina en vista superficial: la epidermis adaxial presenta células rectangulares de paredes onduladas, de $105 \times 30 \mu\text{m}$. La epidermis abaxial con células más pequeñas que miden $35 \times 17 \mu\text{m}$. Los estomas de tipo anomocíticos hundidos son elípticos y miden $53 \times 33 \mu\text{m}$, las células oclusivas de los estomas muestran la pared dorsal fuertemente engrosada; las células subsidiarias se encuentran en número de 4 a 7 y están localizadas por encima de las células oclusivas. En corte transversal presenta estructura dorsiventral e hipoestomática. Las epidermis adaxial y abaxial presentan células papilosas con cutícula conspicua, los estomas se hallan hundidos. Mesófilo con clorénquima en empalizada compuesto por una capa continua de células lobuladas. Clorénquima esponjoso con grandes espacios intercelulares, se halla surcado por haces vasculares colaterales abiertos, en el parénquima de los radios del floema se observan drusas de oxalato de calcio que miden de 14 a 18 μm , cada haz se halla limitado

por una endodermis. En el parénquima esponjoso también se encuentran cavidades esquizógenas de 180 μm de diámetro, que secretan mucílagos; idioblastos con drusas de oxalato de calcio, de 20 a 30 μm , e idioblastos de mucílagos. El parénquima de transfusión está representado por traqueidas reticuladas. Pecíolo en corte transversal: es plano convexo. Presenta epidermis uniestratificada papilosa con cutícula gruesa, estomas hundidos y una gran cámara subestomática; hipodermis discontinua constituida por una o dos capas de células de paredes engrosadas alternando con células de paredes delgadas; el clorénquima es de células isodiamétricas con escasos idioblastos de oxalato de calcio. Se observan cuatro cavidades esquizógenas de 85 μm de diámetro, dispuestas simétricamente, tres de las mismas se ubican en la cara superior plana y la restante en la inferior. Posee dos haces colaterales abiertos, limitados por una endodermis.

C - Droga en polvo - Es de color castaño dorado. Muestra una epidermis adaxial con paredes anticlinales onduladas y la abaxial de células más pequeñas, con numerosos estomas hundidos de tipo anomocítico. Fragmentos de tejido xilemático con traqueidas reticuladas. Parénquima con notables idioblastos de mucílagos. Las drusas de oxalato de calcio pueden medir de 14 a 18 μm y de 20 a 30 μm . Fragmentos de parénquima con cavidades esquizógenas.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, agua, ácido fórmico anhidro y ácido acético glacial (67,5:17,5:7,5:7,5).

Solución estándar - Emplear una solución de rutina y ácido clorogénico en metanol que contenga aproximadamente 0,6 y 0,2 mg por ml, respectivamente.

Solución muestra - Transferir 2 g de Ginkgo finamente pulverizado a un tubo de ensayo, agregar 10 ml de metanol y calentar en un baño de agua a 65 °C durante 10 minutos. Agitar la mezcla con frecuencia durante el calentamiento. Dejar enfriar a temperatura ambiente, filtrar, concentrar el filtrado a la mitad de su volumen en un baño de agua a una temperatura no superior a 65 °C.

Revelador 1 - Solución al 1 % de difenilborinato de 2-aminoetilo en metanol.

Revelador 2 - Solución al 5 % de polietilenglicol 400 en alcohol.

Procedimiento - Aplicar por separado, en bandas, 20 μl de la *Solución muestra* y 20 μl de la *Solución estándar*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente

tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Pulverizar la placa con *Revelador 1*. Calentar la placa en estufa a 105 °C durante 10 minutos y luego pulverizar con el *Revelador 2*. Dejar enfriar la placa durante 30 minutos y examinar bajo luz ultravioleta a 366 nm. La secuencia de las zonas para la *Solución estándar* y la *Solución muestra* son las indicadas en el cuadro. En el cromatograma de la *Solución muestra* pueden observarse otras zonas menos intensas.

<i>Frente del solvente</i>	
	Banda fluorescente castaño amarillenta
	Banda fluorescente verde
	Dos bandas fluorescentes castaño amarillentas
	Banda fluorescente azul, a veces encimada con un banda fluorescente castaño verdosa.
Ácido clorogénico: banda fluorescente celeste. R_f aproximadamente a 0,5.	
	Banda fluorescente verde
Rutina: banda fluorescente castaño amarillenta R_f aproximadamente a 0,5.	Dos bandas fluorescentes castaño amarillentas.
	Banda fluorescente castaño amarillenta
<i>Solución estándar</i>	<i>Solución muestra</i>

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 11 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 3,0 % de tallos y no más de 2,0 % de otra materia extraña.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe perder más de 11,0 %, determinado sobre 1,0 g de droga pulverizada secada en estufa entre 100 y 105 °C durante 2 horas.

Residuos de pesticidas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un cromató-

grafo de líquidos equipado con un detector ultravioleta ajustado a 370 nm y una columna de 12,5 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a sílice porosa de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser de aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Solvente de extracción - Solución de acetona en agua al 60 % v/v.

Solución de ácido clorhídrico - Transferir 10,0 ml de ácido clorhídrico a un matraz aforado de 50 ml, diluir con agua a volumen y mezclar.

Fase móvil - Solución de ácido cítrico al 0,6 %, acetonitrilo y alcohol isopropílico (100:47:5). Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación madre del estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de quercetina en metanol para obtener una solución de aproximadamente 0,8 mg por ml.

Preparaciones estándar A, B y C - Transferir 3,0; 5,0 y 10,0 ml de *Preparación madre del estándar* a tres matraces aforados de 100 ml, agregar 10 ml de agua y 30 ml de *Solución de ácido clorhídrico* a cada matraz. Diluir el contenido de cada matraz con metanol a volumen y mezclar para obtener las *Preparaciones estándar A, B y C* con concentraciones conocidas de 0,024; 0,04 y 0,08 mg por ml, respectivamente.

Preparación muestra - Transferir aproximadamente 2,5 g de Ginkgo, finamente pulverizado y pesado con exactitud, a un balón apropiado equipado con un refrigerante. Agregar 50 ml de *Solvente de extracción* y calentar en un baño de agua caliente, bajo reflujo, durante 30 minutos. Dejar enfriar, filtrar y recolectar el filtrado en un matraz aforado de 100 ml. Extraer el residuo del filtro una segunda vez de la misma manera, empleando 40 ml de *Solvente de extracción*, y recolectar el filtrado en el mismo matraz aforado de 100 ml. Diluir a volumen el contenido del matraz con *Solvente de extracción* y mezclar. Evaporar 50,0 ml de la solución hasta sequedad y transferir el residuo a un matraz aforado de 50 ml con la ayuda de 30 ml de metanol. Agregar 4,4 ml de *Solución de ácido clorhídrico*, diluir con agua a volumen, mezclar y centrifugar. Transferir 10,0 ml del líquido sobrenadante a un recipiente con tapa de vidrio ámbar y cerrar el mismo. Calentar en un baño de agua hirviendo durante 25 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar A* y registrar las respuestas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe mayor de 2,0 %.

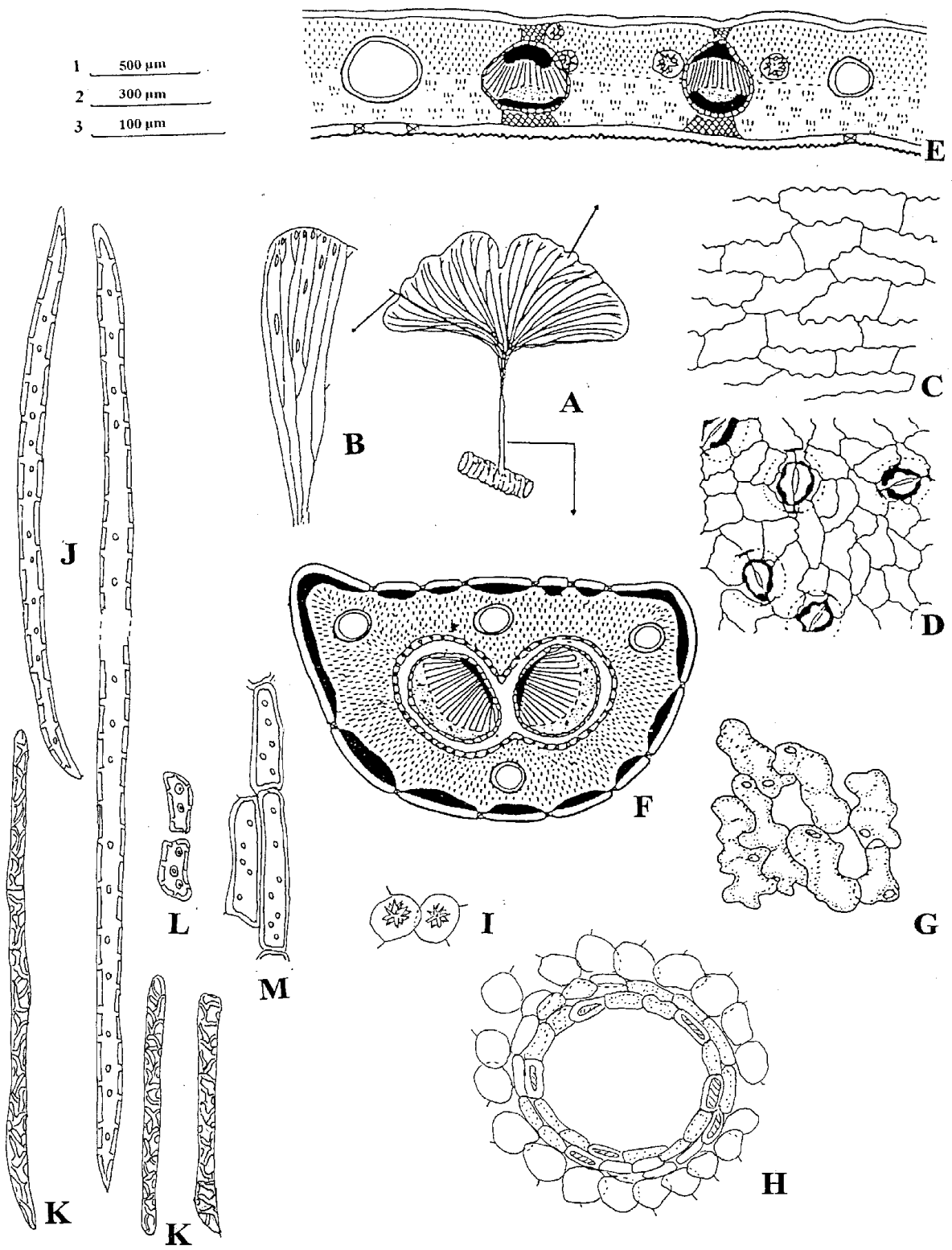
Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente

10 μ l) de cada una de las *Soluciones estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas, medir las respuestas de los picos principales y sumar las respuestas de todos los picos principales debidos a la quercetina, canferol e isoramnetina en el cromatograma de la *Preparación muestra*. Los tiempos de retención relativos de los glicósidos de flavonol de interés son aproximadamente 1,0 para quercetina, 1,6 para canferol y 1,7 para isoramnetina. [NOTA: a veces la isoramnetina coeluye con el canferol]. Graficar las respuestas del pico principal de cada una de las *Soluciones estándar* en función de las concentraciones en mg por ml, de quercetina y calcular la ecuación

de la recta que mejor ajuste. A partir de la ecuación obtenida, determinar la concentración en mg por ml, de los glicósidos de flavonol en la *Preparación muestra*. Multiplicar el valor obtenido por un factor promedio de peso molecular de 2,514 y calcular el porcentaje de los glicósidos de flavonol, como 3-O-8(2-O-[6-O-(*p*-hidroxi-*trans*-cinamoil)- β -D-glucosil]- α -L-ramnosil))quercetina, con un peso molecular medio de 756,7.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la denominación oficial seguida del nombre científico en latín.



Ginkgo biloba L., A-M. A, hoja, exomorfología. B-D vista superficial. B, arquitectura foliar. C-D epidermis. C, superior. D, inferior. E-I, sección transversal. E, limbo. F, pecíolo. G, parénquima esponjoso. H, cavidad esquizógena. I, idioblastos con oxalato de calcio. J-M macerado, tipos celulares. J, fibras. K, traqueadas. L, traqueadas de transfusión. M, parénquima del radio. Las reglillas corresponden a: 1 a E, y F; 2 a B; 3 a C, D, G-M.

GINSENG ORIENTAL, raíz

Definición - Ginseng Oriental está constituido por las raíces desecadas de *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae). Debe contener no menos de 0,30 por ciento de la combinación de los ginsenósidos Rg₁ y Rb₁, calculados sobre la droga seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio fresco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas. Raíces de tipo contráctil, antropomorfas, a veces ramificadas, de 5 a 12 hasta 20 cm de longitud y hasta 2,5 cm de diámetro en la corona, con una o varias cicatrices de tallos; superficie de color amarillo pálido o cremoso, lisa en la parte superior pero con surcos finos y longitudinales y cicatrices radicales en las partes inferiores. Fractura corta con superficie pardo amarillento claro, presentando un anillo de canales secretores en la corteza y un cambium diferenciado de color amarillo pardusco.

B - Características microscópicas. El corte transversal de la raíz presenta súber compuesto por células poligonales de paredes poco engrosadas; parénquima cortical con meatos aeríferos pequeños y poco visibles. Parénquima con canales de secreción que contienen masas anaranjado-parduscas abundantes junto a la peridermis. Zona cambial marcada; vasos xilemáticos en pequeños grupos aislados de la zona cambial; fibras del floema con paredes celulósicas gruesas. Parénquima con gran cantidad de granos de almidón, simples de 5 a 6 µm de diámetro o agrupados en número de 2 a 5. Células con drusas de oxalato de calcio de 27 µm de diámetro en el parénquima cortical y medular.

C - Droga en polvo. Color pardo amarillento pálido y olor algo aromático. Se observan fragmentos de súber con paredes delgadas, parénquima con granos de almidón simples o dos a cinco compuestos y células con drusas de oxalato de calcio; fragmentos de parénquima conteniendo canales secretores con masas de color anaranjado pardusco, vasos xilemáticos reticulados, anulares y escalariformes y fibras floemáticas con paredes celulósicas de extremos irregulares o espatulados.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Emplear la capa superior de una mezcla de alcohol butílico, agua y acetato de etilo (10:5:2,5).

Solución estándar - Preparar una solución de aproximadamente 5 mg de arbutina y 5 mg de escina por ml de metanol.

Solución muestra - Reducir a polvo fino una porción de Ginseng Oriental, pesar exactamente alrededor de 1 g y transferir a un balón de 25 ml. Agregar 10 ml de una mezcla de metanol y agua (7:3) y calentar a reflujo durante 15 minutos. Enfriar, filtrar y diluir el filtrado obtenido con metanol a 10 ml.

Revelador - Anisaldehído sulfúrico (SR).

Procedimiento - Aplicar en bandas por separado sobre la placa, 20 µl de *Solución muestra* y 20 µl de *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara y dejar secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar la placa entre 105 y 110 °C, durante aproximadamente 10 minutos. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar* se debe observar, en el tercio superior, una banda parda que corresponde a arbutina y, en el tercio inferior, una banda gris que corresponde a escina. Entre estas dos bandas, en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, se debe observar bandas grises violáceas que corresponden a ginsenósido Rg₁ en la parte superior y a ginsenósido Re en el medio. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, se debe observar una banda gris violácea correspondiente a ginsenósido Rb₁ al mismo valor de R_f de la banda gris correspondiente a escina en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*. Se pueden observar otras bandas, menos intensas, entre las bandas correspondientes a los ginsenósidos Rb₁ y Re y la banda más cercana al origen correspondientes a ginsenósido Rc. Se pueden observar otras bandas en el tercio inferior del cromatograma.

Cenizas insolubles en ácido (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 1,0 %.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener mas de 8,0 %, determinado sobre 1,0 g de Ginseng Oriental, previamente reducido a polvo fino.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 2,0 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Secar 1,0 g de Ginseng Oriental, previamente reducido a polvo, a 105 °C durante 2 horas: no debe perder más de 12,0 % de su peso.

Residuos de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos equipado con detector ultravioleta ajustado a 203 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosa de 3 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto. El cromatografo se debe programar del siguiente modo:

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0 – 12	76	24	Isocrática
12 – 28	76 → 65	24 → 35	Gradiente lineal
28 – 52	65 → 57	35 → 43	Gradiente lineal
52 – 53	57 → 0	43 → 100	Gradiente lineal
53 – 65	0 → 76	100 → 24	Gradiente lineal
65 – 77	76	24	Isocrática

Solución A - Agua.

Solución B - Acetonitrilo y agua (8:2). Desgasificar.

[NOTA: este sistema separa los ginsenósidos Rb₁, Re, Rf, Rg₂, Rb₁, Rc, Rb₂ y Rd en orden de elución].

Fase móvil - Emplear mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico* (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - Agua y alcohol (60:40).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 1,5 mg de ginsenósido Rb₁ y 1,5 mg de ginsenósido Rg₁, transferir a un matraz aforado de 10 ml, disolver en *Diluyente*, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar.

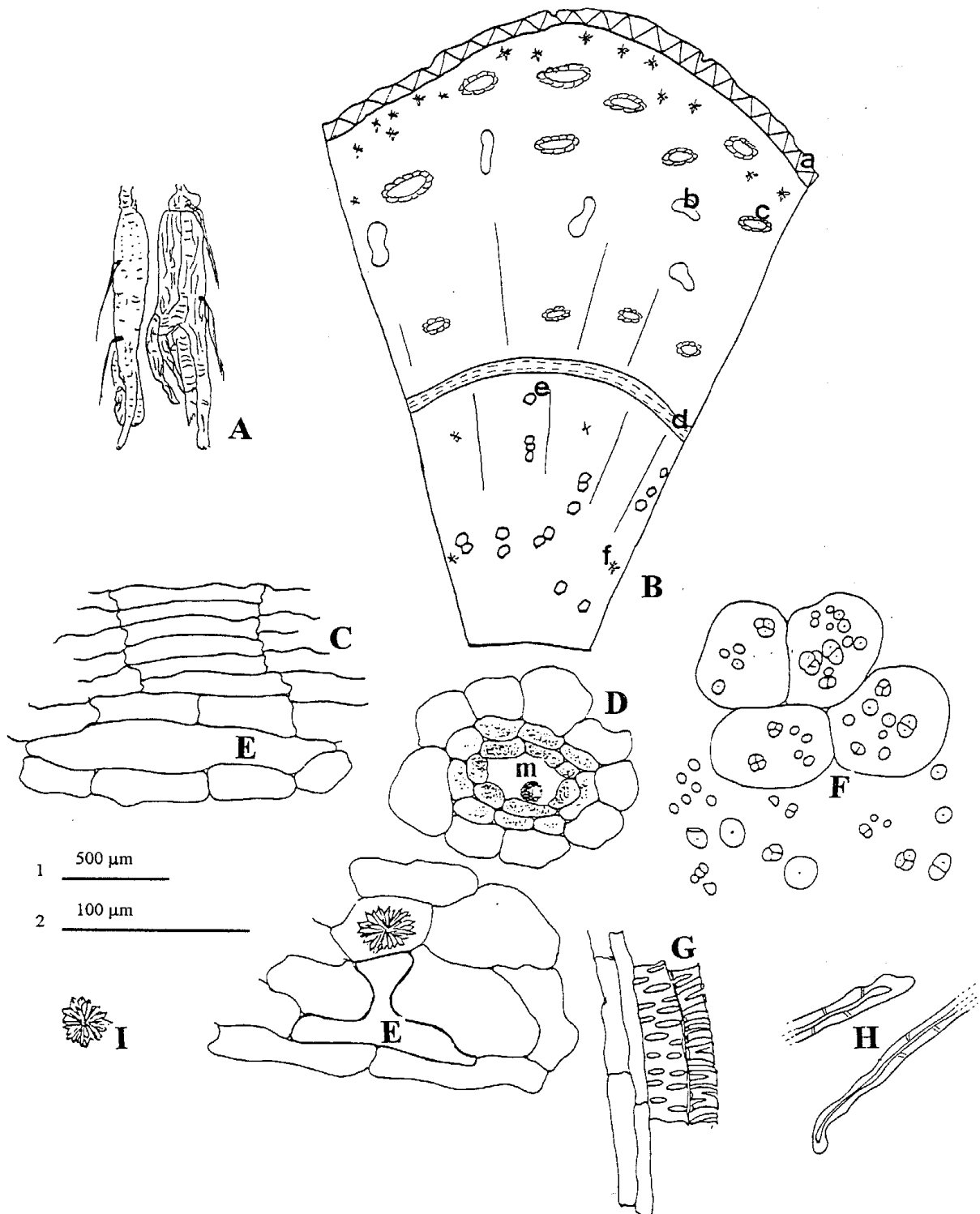
Preparación muestra - Reducir a polvo fino aproximadamente 50 g de Ginseng Oriental, pesar exactamente alrededor de 1,0 g de Ginseng Oriental en polvo y transferir a un balón de 250 ml. Agregar 70 ml de *Diluyente*, agregar unos trozos de material poroso y calentar a ebullición en un baño de agua a reflujo durante 1 hora. Enfriar, filtrar y recolectar el extracto. Lavar el residuo con 20 ml de *Diluyente* y filtrar a través del mismo filtro. Reunir los extractos y evaporar a sequedad a presión reducida a una temperatura menor de 50° C. Transferir el residuo obtenido a un matraz aforado de 10 ml, disolver con 5 ml *Diluyente*, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. .

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos correspondientes a los ginsenósidos Rb₁ y Rg₁. Calcular la cantidad en porcentaje de ginsenósidos Rb₁ y Rg₁ en la porción de Ginseng Oriental en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$100/P[P_{Rb1}(r_{M1}/r_{E1}) + P_{Rg1}(r_{M2}/r_{E2})]$$

en la cual *P* es el peso en g de la porción de Ginseng Oriental en ensayo, *P_{Rb1}* y *P_{Rg1}* son los pesos en g de ginsenósido Rb₁ y ginsenósido Rg₁ en la *Preparación estándar*; *r_{M1}* y *r_{E1}* son las respuestas de los picos correspondientes a ginsenósido Rb₁ obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente; y, *r_{M2}* y *r_{E2}* son las respuestas de los picos correspondientes a ginsenósido Rg₁ obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente.



Panax ginseng C.A. Meyer, A-I: A, morfología externa de la parte usada. B, representación esquemática de la sección transversal de la raíz. C-I: *Droga en polvo*: C, súber. D, canal secretor. E, meato aerífero, F, parénquima amilífero. G, vasos xilemáticos. H, fibras liberianas. I, drusas de oxalato de calcio. a, súber; b, meatos aeríferos; c, canales secretores; d, cambium; e, vasos xilemáticos; f, drusas de oxalato de calcio; m, masas secretoras. Las reglillas corresponden a 1 a B, 2 a C-I.

HAMAMELIS, hoja

Definición - Hamamelis consiste en la hoja desecada de *Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidaceae). Debe contener no menos de 3,0 por ciento de taninos, expresados como pirogalol, calculados respecto al material vegetal desecado y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - La hoja es verde o pardo verdosa, a menudo fragmentada, arrugada y comprimida en masas más o menos compactas. El limbo es generalmente ovado u obovado, de 5 a 12 cm de largo por 3 a 8 cm de ancho; la base es oblicua y asimétrica y el ápice agudo o, raramente, obtuso. Los márgenes del limbo son gruesamente crenados o dentados. La nervadura es pinnada y prominente en la cara abaxial.

B - Características microscópicas - En vista superficial la epidermis superior está compuesta por células ligeramente elongadas con paredes rectas o ligeramente sinuosas y con escasos pelos estrellados sobre las nervaduras. La epidermis inferior presenta células poligonales con paredes más delgadas y más uniformes que la epidermis superior, estomas paracíticos numerosos y tricomas estrellados característicos compuestos por 4 a 12 ramas unicelulares rectas o curvadas de gruesas paredes unidas por sus porciones basales. En la sección transversal se observa la epidermis superior constituida por una única capa de células, parénquima en empalizada uniestratificado, parénquima esponjoso de 3 a 6 capas de células, con esclereidas ramificadas irregulares dispersas; en la nervadura media se observa colénquima angular en relación con ambas epidermis; el nervio medio está constituido por xilema y floema dispuestos en forma circular, acompañado superiormente por un arco de tejido vascular y ambos rodeados por una vaina fibrosa; exteriormente a ésta se disponen células parenquimáticas que contienen prismas y drusas de oxalato de calcio; la epidermis inferior, también uniestratificada, presenta numerosos pelos estrellados.

C - Droga en polvo - El polvo es verde pardusco. Presenta fragmentos de la epidermis superior con células de paredes anticlinales

onduladas; epidermis inferior con estomas principalmente paracíticos; pelos tectores estrellados, enteros o fragmentados, compuestos por 4 a 12 brazos unicelulares; fibras lignificadas, de paredes gruesas, aisladas o en grupos, acompañadas por una vaina de células con cristales prismáticos de oxalato de calcio; células del parénquima en empalizada pequeñas; células irregulares del parénquima esponjoso; esclereidas ramificadas irregulares de 150 a 180 µm de largo, enteras o fragmentadas; fragmentos de vasos espiralados o anillados; prismas aislados y drusas de oxalato de calcio.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta de gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Emplear una mezcla recientemente preparada de formiato de etilo, ácido fórmico anhidro y agua (80:10:10).

Solución estándar A - Disolver 30 mg de ácido tánico en 5,0 ml de alcohol al 60 % v/v.

Solución estándar B - Disolver 5 mg de ácido gálico en 5,0 ml de alcohol al 60 % v/v.

Solución muestra - Reducir a polvo fino una porción de Hamamelis, pesar exactamente alrededor de 1,0 g y transferir a un erlenmeyer. Extraer con 10 ml de alcohol al 60 % v/v, agitar durante 15 minutos y filtrar.

Revelador - Cloruro férrico (SR).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, en bandas, 10 µl de las *Soluciones estándar A* y *B* y 10 µl de la *Solución muestra*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa, secar a una temperatura entre 100 y 105 °C durante 1 minuto y dejar enfriar. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* hasta que aparezcan bandas azul grisáceas (compuestos fenólicos). El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar, en su tercio inferior, una banda principal similar en posición a la obtenida con la *Solución estándar A* y en su parte superior, una delgada banda similar en posición a la obtenida con la *Solución estándar B*. El cromatograma obtenido con la *Solución muestra* debe presentar, en la parte central, numerosas bandas ligeramente coloreadas.

Cenizas insolubles en ácido (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 2,0 %.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 7,0 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos según el destino.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No más de 0,001 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 7 % de tallos ni más de 2 % de materias extrañas; determinado sobre 50 g de Hamamelis.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Secar 2,0 g de sustancia reducida a polvo entre 100 y 105 °C durante 4 horas: no debe perder más de 10,0 % de su peso.

Residuo de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Determinación de Taninos

[NOTA: efectuar la valoración protegiendo de la luz intensa. Emplear agua libre de dióxido de carbono para todas las operaciones.]

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 0,75 g de Hammelis reducida a polvo (malla 18), transferir a un erlenmeyer y agregar 150 ml de agua libre de dióxido de carbono. Calentar hasta ebullición y mantener en un baño de agua durante 30 minutos. Enfriar bajo corriente de agua. Transferir la mezcla a un matraz aforado de 250 ml y completar a volumen con agua libre de dióxido de carbono. Decantar y filtrar el líquido a través de un papel de filtro. Descartar los primeros 50 ml del filtrado.

Determinación de polifenoles totales

Transferir 5,0 ml de la *Preparación muestra* obtenida en *Determinación de taninos* a un matraz

aforado de 25,0 ml y completar a volumen con agua libre de dióxido de carbono en un matraz aforado. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y mezclar con 2,0 ml de ácido fosfotúngstico (SR) y completar a volumen con carbonato de sodio (SR). Después de 3 minutos del agregado del último reactivo, medir la absorbancia a 715 nm (A_1), empleando agua como blanco.

Determinación de polifenoles no absorbibles por polvo de cuero

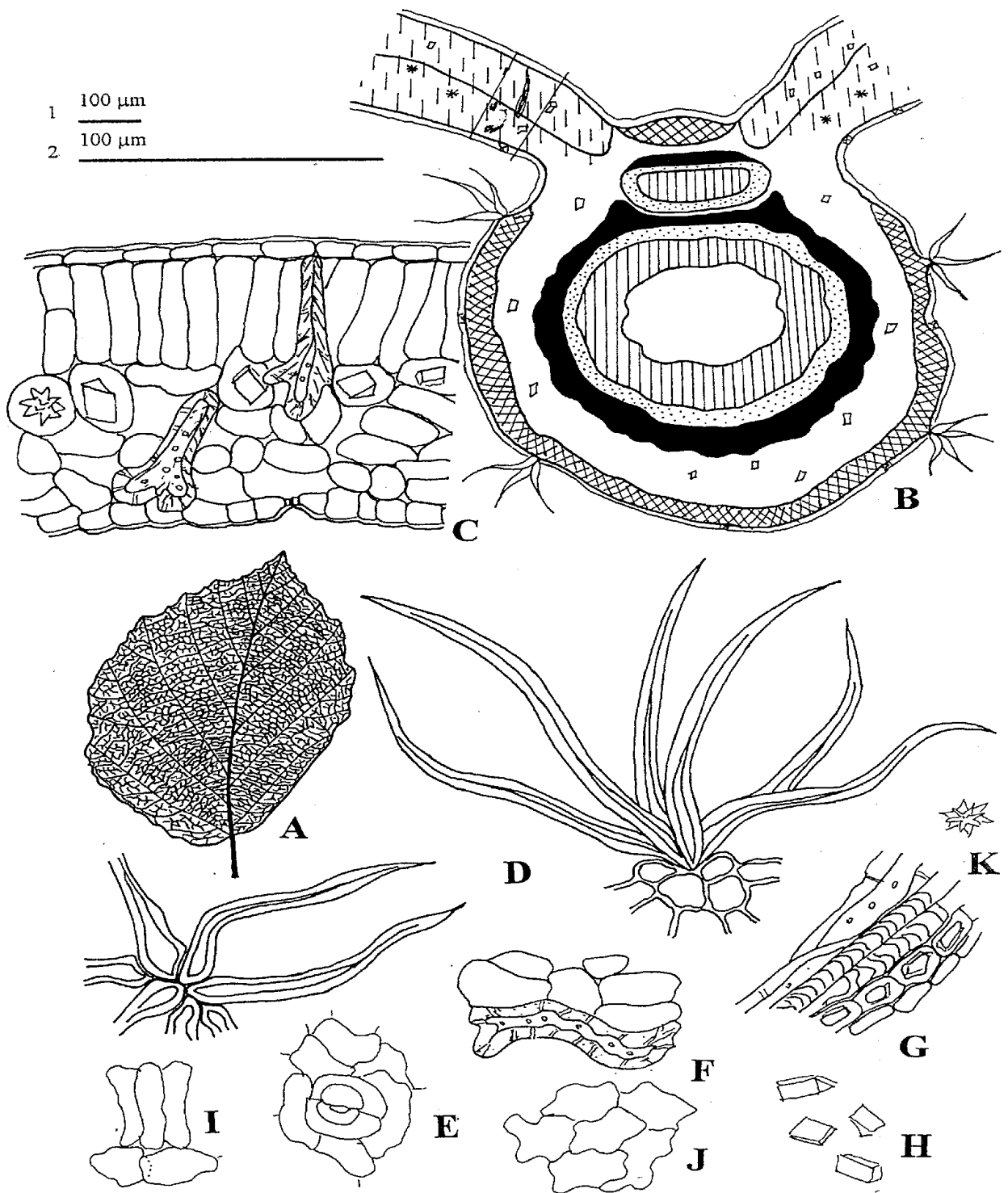
A 20,0 ml de la *Preparación muestra* obtenida en *Determinación de taninos* agregar 200 mg de polvo de cuero, agitar vigorosamente durante 60 minutos y filtrar. Transferir 5,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 25,0 ml y completar a volumen con agua libre de dióxido de carbono. Mezclar 5,0 ml de esta solución con 2,0 ml de ácido fosfotúngstico (SR) y diluir hasta 50,0 ml con carbonato de sodio (SR). Después de 3 minutos del agregado del último reactivo, medir la absorbancia a 715 nm (A_2), empleando agua como blanco.

Preparación estándar - Disolver 50,0 mg de pirogalol en agua libre de dióxido de carbono, transferir a un matraz de 100 ml y completar a volumen con agua libre de dióxido de carbono. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con agua libre de dióxido de carbono. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml, mezclar con 2,0 ml de ácido fosfotúngstico (SR) y completar a volumen con carbonato de sodio (SR). Después de 3 minutos del agregado del último reactivo, medir la absorbancia a 715 nm (A_3), empleando agua como blanco.

Calcular la cantidad en porcentaje de taninos, por la fórmula siguiente:

$$\frac{13,12(A_2 - A_1)}{A_3 m}$$

en la cual m es la masa del material vegetal en ensayo, en gramos, y A_1 , A_2 y A_3 son los términos definidos anteriormente.



Hamamelis virginiana L. A-K, A, morfología; B-C: sección transversal de la lámina: B, nervio medio, esquema; C, detalle del semilimbo según lo indicado en B. D-J: droga en polvo: D, pelos estrellado, enteros y fragmentados; E, epidermis superior con estoma paralítico; F, esclereida con extremos algo ensanchados, G, vasos helicados acompañados por fibras de paredes gruesas y parénquima cristalífero; H, cristales prismáticos de oxalato de calcio; I, porción de células en empalizada; J, epidermis superior con paredes anticlinales onduladas; K, drusa de oxalato de calcio. Las reglillas corresponden 1 a B; 2 a C-K.

HIPÉRICO, hierba

Definición - Hipérico está constituido por las partes aéreas superiores incluyendo hojas, botones florales y flor, desecadas, recogidas durante la floración de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae). Debe contener no menos de 0,06 por ciento de hipericinas totales, calculado como hipericina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Hojas opuestas, sésiles, oblongo-ovadas, de hasta 3,5 cm de longitud; láminas de bordes lisos, con pelos glandulares oscuros en el margen y puntos translúcidos en toda su superficie. Las flores son pentámeras, numerosas, de color amarillo y pedúnculos cortos que forman cimbras compuestas (pleiocasios). Sépalos 5, lanceolados, con puntos negros en el margen. Pétalos 5, de color amarillo oscuro, ovales, oblicuos y con glándulas de color rojo oscuro en el borde. Estambres numerosos, agrupados de 3 a 6 haces (generalmente 3) con glándula conectiva apical. Gineceo gamocarpelar con tres estilos. Fruto cápsula tricarpelar de 8-10 × 4-6 mm, ovoide o elipsoide-trigona, dehiscente en el ápice, rodeada por los restantes verticilos marcescentes. La semilla es de 1 a 1,2 mm, cilindroide, foveolada, de color castaño a negro. La droga seca consiste mayormente de flores, incluyendo hojas y yemas sin abrir. Las hojas son de color verde o verde pálido. Se observan los pétalos de las flores de color amarillo a pardo amarillento, también hay alto contenido de fragmentos de inflorescencias. Tanto las hojas como los pétalos se caracterizan por la presencia de numerosas glándulas redondeadas de aproximadamente 0,5 a 1 mm de diámetro, en las hojas se las observan como puntos translúcidos cuando se las ilumina a contraluz y las de los pétalos son de color rojo oscuro y se presentan solamente en los bordes. Los fragmentos de tallos son de color verde pálido, cilíndricos, huecos y con dos costillas longitudinales opuestas.

B - Características microscópicas - El tallo en sección transversal muestra células epidérmicas rectangulares con cutícula conspicua y lisa; la corteza consta de varias capas de colénquima. El floema y el xilema se disponen en un anillo continuo, atravesado por numerosos radios uniseriados; las fibras del xilema son muy engrosadas y se disponen en series radiales. La médula es parenquimática se lisa y ahueca.

Los canales secretores están presentes en la corteza, floema y médula. La hoja en vista superficial presenta la epidermis superior con células poligonales de paredes anticlinales rectas; en la epidermis inferior son más pequeñas, con paredes anticlinales marcadamente sinuosas con estomas frecuentemente paracíticos o a veces anomocíticos; la cutícula es lisa, más gruesa en la epidermis superior. En sección transversal la lámina presenta estructura dorsiventral, con 1 ó 2 hileras de células en empalizada; glándulas oleosas conspicuas en el mesófilo esponjoso. La nervadura central está constituida por un solo haz colateral. La flor tiene los sépalos con características semejantes a las de la hoja, con numerosas glándulas de color rojo en los bordes. Los pétalos presentan la epidermis superior con células de paredes rectas y la epidermis inferior con paredes sinuosas, las glándulas de aceite son visibles, a menudo alargadas con un contenido rojizo o amarillo. Los granos de polen son prolados, de aproximadamente 20 µm de diámetro con 3 colpiros y exina lisa o verrucosa.

C - Droga en polvo - El polvo es de color amarillo claro a pardo verdoso con un olor aromático y balsámico. Los fragmentos de hojas vistos en superficie muestran las células epidérmicas alargadas, poligonales con paredes anticlinales gruesas, en forma de rosario, con estomas paracíticos (ocasionalmente anomocíticos); abundantes fragmentos de hoja, la mayoría conteniendo glándulas, algunas con un contenido rojo cerca del margen, los pétalos muestran las células de la epidermis superior, estrechas, alargadas, con paredes anticlinales delgadas, rectas y sinuosas en la epidermis inferior; se observan glándulas de aceites alargadas con un contenido rojo o amarillo; numerosos granos de polen que tienen entre 20 y 25 µm de diámetro, prolados, tricolporados. Se observan fragmentos de tallos y frutos enteros acompañados por estilos.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, agua, ácido fórmico y ácido acético glacial (100:26:11:11).

Solución estándar - Preparar una solución de hiperósido y ácido clorogénico al 0,05% para cada uno en metanol.

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino aproximadamente 5 g de Hipérico y transferir 500 mg de la droga pulverizada a un matraz de 25 ml. Agregar 10 ml de metanol y mezclar. Calentar en un baño de agua a 60°C durante 15 minutos agitando con frecuencia. Filtrar.

Revelador 1 - Solución al 1% de difenilborinato de 2-aminoetilo en metanol.

Revelador 2 - Solución al 5% de polietilenglicol 4.000 en etanol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa cromatográfica, en bandas, 10 µl de la *Solución muestra* y 10 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1*. Dejar secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 2*, dejar secar nuevamente al aire. Examinar el cromatograma bajo luz ultravioleta a 366 nm. En el cromatograma se deben observar dos bandas de fluorescencia rojovioláceas debido a la presencia de hipericina con un valor de R_f aproximadamente de 0,85 y pseudohipericina con un valor de R_f aproximadamente de 0,80; varias zonas con una fluorescencia amarillo anaranjada, una de las cuales coincide en valor de R_f y color con la banda de hiperósido con un valor de R_f 0,50 presente en la *Solución estándar*. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar una zona de fluorescencia azul que coincide en posición y color con la banda del ácido clorogénico con un valor de R_f aproximadamente de 0,40 presente en la *Solución estándar*.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 3,0% de tallos con un diámetro superior a 5 mm y no más de 2% de otras materias extrañas.

Pérdida por secado <680>

No debe perder más de 10,0%, determinado sobre 1,0 g de Hipérico pulverizado y secado en estufa entre 100 y 105 °C durante 2 horas.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Pesar y reducir a polvo fino 5,0 g de Hipérico y transferir 800 mg del polvo, exactamente pesado, a un balón de 100 ml. Agregar 60 ml de una mezcla de tetrahidrofurano y agua (80:20) y agitar. Calentar la mezcla a ebullición en baño de agua a 70 °C a reflujo durante 30 minutos. Centrifugar durante 2 minutos a 2.000 rpm y transferir el sobrenadante en un matraz de 250 ml. Suspender el residuo con 60 ml de una mezcla de tetrahidrofurano y agua (80:20). Transferir al balón y repetir la operación por 30 minutos más. Centrifugar durante 2 minutos a 2.000 rpm y reunir los sobrenadantes. Evaporar hasta sequedad. Disolver el residuo con 15 ml de metanol ayudándose con ultrasonido y llevar a un matraz aforado de 25 ml. Lavar el matraz de 250 ml con metanol y completar a volumen de 25 ml con el mismo solvente. Filtrar y descartar los primeros 2 ml del filtrado. Transferir 5 ml del filtrado a un matraz aforado de 25 ml y completar a volumen con metanol.

Procedimiento - Medir la absorbancia de la *Preparación muestra* a 590 nm por comparación empleando como blanco metanol. Calcular el contenido en porcentaje de hipericina en la porción de Hipérico en ensayo por la fórmula siguiente:

$$(125/870)(A/P)$$

en la cual A es la absorbancia de la *Solución muestra* a 590 nm; P es el peso de Hipérico en mg y 870 es el coeficiente de extinción específica E (1%, 1 cm) de hipericina (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*).

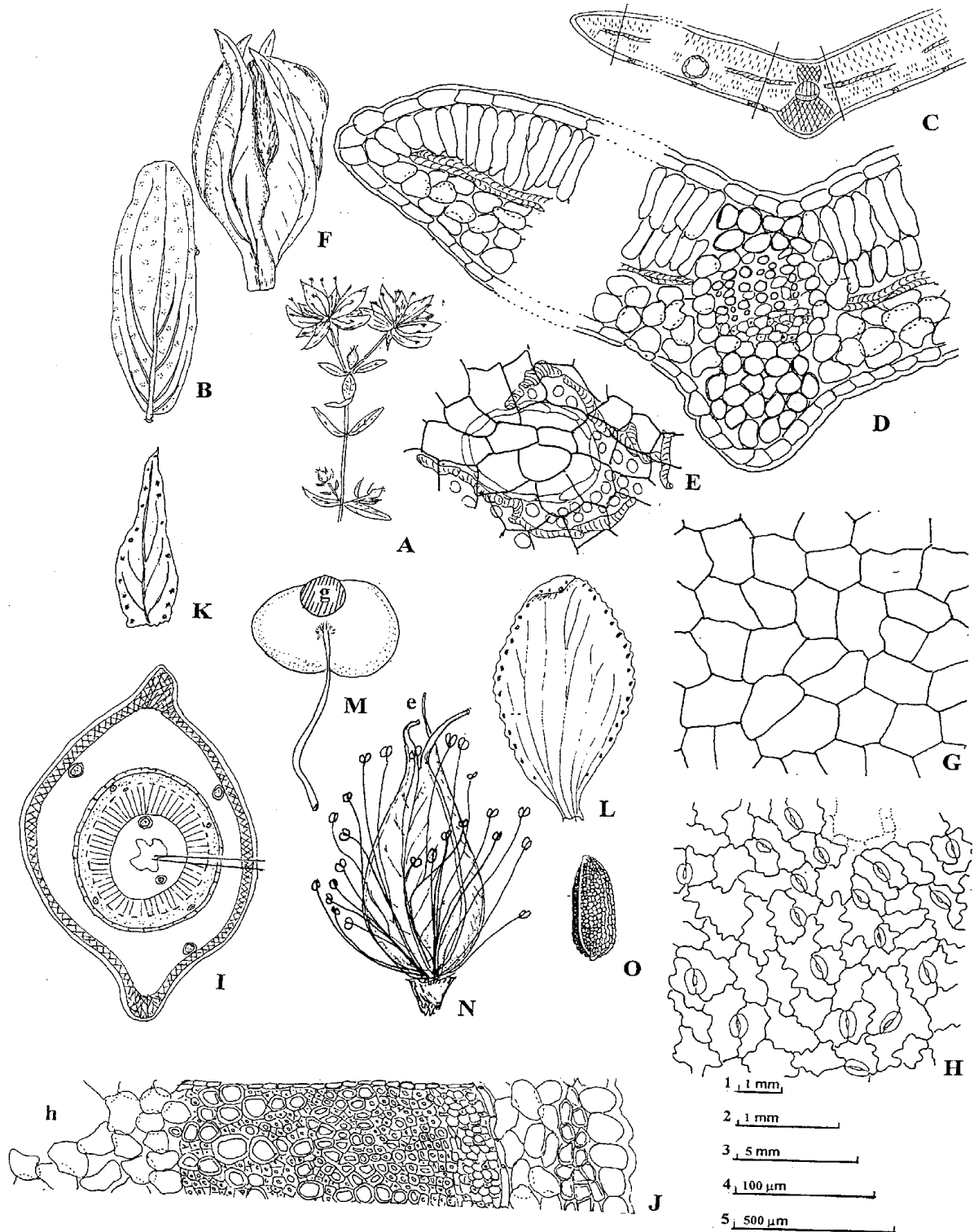


Fig. 1: *Hypericum perforatum* L., A-O: A, planta florida. B-H, hoja. B, morfología externa. C-D, sección transversal. C, limbo, esquema. D, detalle de lo indicado en C. E, G-H en vista superficial. E, detalle de una glándula. G-H, epidermis. G, superior. H, inferior. I-J, tallo en sección transversal. I, tallo hueco con dos costillas, esquema. J, detalle de lo indicado en I. F, K-M, flor, morfología externa. F, botón floral. K, sépalo con glándulas oscuras. L, pétalo con glándula de color negruzco a rojizo. M, estambre con glándula conectival apical, esférica. N, fruto, cápsula septicida con restos florales. O, semilla cilindroide, foveolada. e, estilos; g, glándula conectival del estambre; h, hueco. Las reglillas corresponden a: 1 a K, L; 2 a O; 3 a F, M, N; 4 a D, E, G, H, J; 5 a B, C, I.

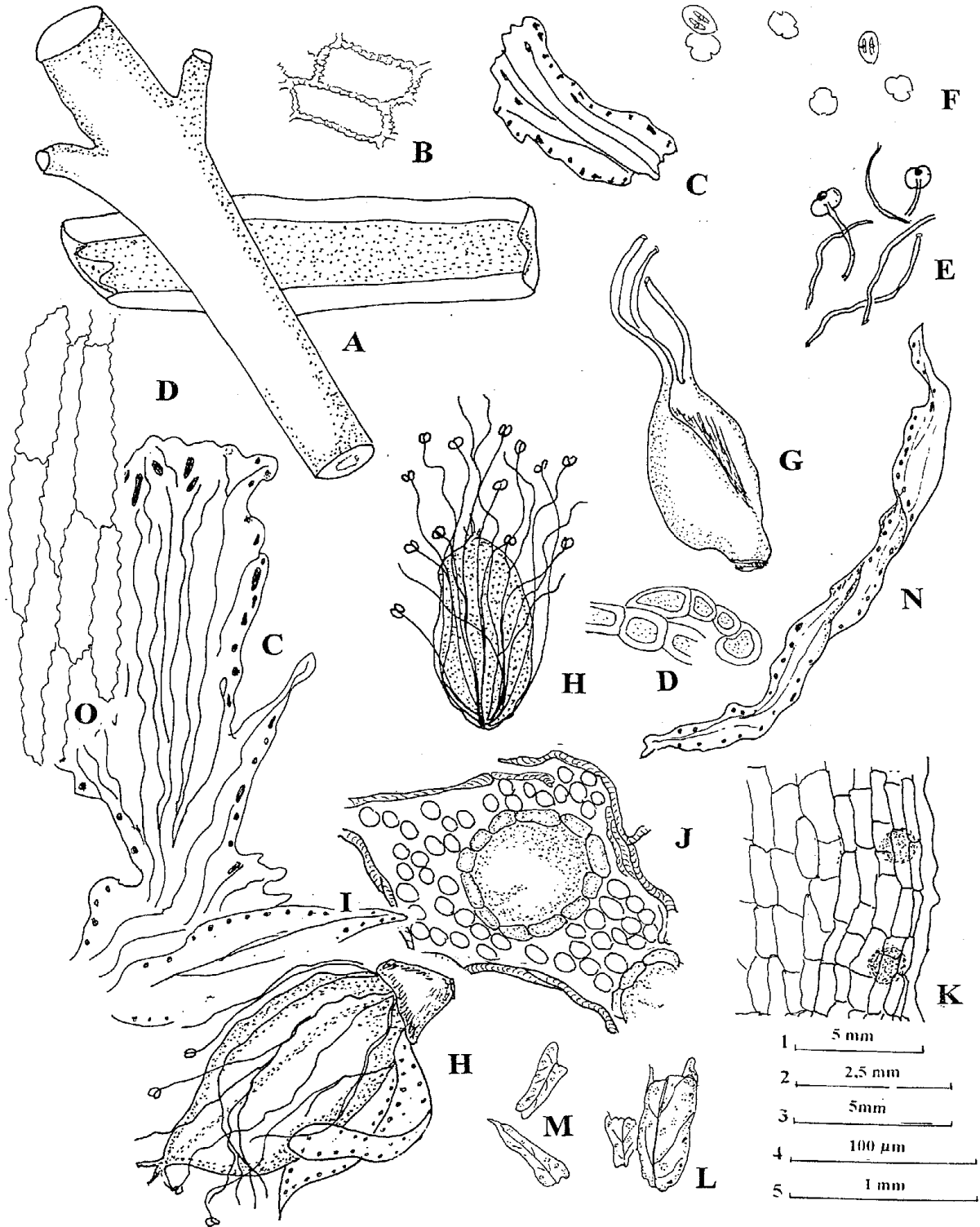


Fig. 2: Polvo *Hypericum perforatum* L., A-O; A, fragmentos de tallos enteros y cortados longitudinalmente huecos. B, fragmento de epidermis superior con paredes engrosadas a modo de rosario. C, porción de pétalos. D, pelo glandular del borde de la hoja. E, estambres. F, granos de polen, prolados, tricolporados. G, fruto con restos de tres estilos. H, gineceo acompañado por restos de piezas florales (sépalos y estambres). I, sépalo. J, porción de hoja mostrando la glándula. K, porción de un pétalo en vista superficial de la cara superior mostrando la epidermis de paredes delgadas y rectas y glándulas de color negruzco a rojizo en el margen. L, fragmentos de hoja. M, fragmentos de sépalos. N, pétalos deshidratados, retorcidos. O, epidermis inferior del pétalo de paredes delgadas y sinuosas. Las reglillas corresponden a: 1 a M, L; 2 a A, C, G, H; 3 a C, I; 4 a B, D, F, J, K, O; 5 a E, N.

IPECACUANA, raíz y rizoma

Definición - Ipecacuana está constituida por el rizoma y las raíces desecadas de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (*Cephaelis ipecacuanha* (Brotero) A. Richard) y *Psychotria acuminata* Karsten (Rubiaceae). Debe contener no menos de 2,0 por ciento de alcaloides totales calculados como emetina. El contenido de emetina sumado al contenido de cefelina no debe ser menor a 90,0 por ciento de los alcaloides totales solubles en éter. El contenido de cefelina puede variar de una cantidad igual hasta una cantidad no mayor de 2,5 veces el contenido de emetina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Clorhidrato de Emetina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Las raíces contráctiles se presentan en segmentos subcilíndricos, éstos son mayormente encorvados y flexuosos, ocasionalmente ramificados, alcanzan hasta 15 cm de largo, generalmente con diámetros entre 3 a 6,5 mm aunque pueden llegar hasta los 9 mm; de color grisáceo, castaño grisáceo o castaño rojizo. Los rizomas también contráctiles aparecen como segmentos cilíndricos de aproximadamente 2 mm de diámetro, muestran algunas cicatrices elípticas dejadas por las raíces al desprenderse. Presenta olor peculiar, el polvo es estornutatorio.

B - Características microscópicas - La sección transversal de la raíz presenta súber de pocas células de espesor. El ancho feloderma consta de células de parénquima redondeadas con gránulos de almidón e idioblastos con rafidios de oxalato de calcio de 30 a 80 μm de largo. Los gránulos de almidón rara vez se encuentran aislados, por lo general se agrupan entre 2 a 4 y pueden llegar a formar grupos de 8. Los gránulos individuales miden hasta 22 μm de diámetro. En el cilindro central el floema constituye una banda estrecha. La médula está ocupada por xilema secundario constituido por vasos y traqueidas presentando radios medulares. El rizoma difiere de la raíz principalmente porque presenta una médula parenquimática desarrollada.

C - Droga en polvo - Polvo de color gris verde

oliva pálido, castaño o amarillo pálido. Presenta células de súber pequeñas de paredes delgadas; gránulos de almidón simples de hasta 22 μm de diámetro o compuestos por 2 a 8 unidades; ráfides de oxalato de calcio de 30 a 80 μm de longitud; miembros de vaso punteados y reticulados, fibrotraqueidas y fibras septadas; parénquima de células ovaladas de paredes delgadas. Las células del parénquima del rizoma son de mayor tamaño que las del parénquima de la raíz.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Tolueno, acetato de etilo, metanol y amoníaco concentrado (65:18:15:2).

Solución estándar - Disolver 2,5 mg de Clorhidrato de Emetina SR-FA y 3,0 mg de clorhidrato de cefelina en metanol y diluir hasta 20 ml con el mismo solvente.

Solución muestra - A 100 mg de Ipecacuana pulverizada agregar 0,05 ml de amoníaco concentrado y 5 ml de éter. Agitar enérgicamente. Dejar reposar 30 minutos y filtrar.

Revelador - Solución de yodo al 0,5% en alcohol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μl de la *Solución estándar* y 10 μl de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Dejar secar la placa al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar a 60 °C aproximadamente 10 minutos. Examinar la placa bajo luz visible. Los cromatogramas obtenidos a partir de la *Solución estándar* y a partir de la *Solución muestra* deben presentar una banda de color amarilla en la zona inferior correspondiente a emetina con un valor de R_f de 0,3 y debajo de la misma una banda de color pardo correspondiente a cefelina. Examinar los cromatogramas bajo luz ultravioleta a 366 nm. Las bandas correspondientes a emetina deben presentar una fluorescencia amarilla y las correspondientes a cefelina una fluorescencia azul claro. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar además otras bandas fluorescentes débiles.

Con *Psychotria acuminata* las bandas principales en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, deben ser similares en posición, fluorescencia y tamaño a las bandas correspondientes en el cromatograma obtenido con la *Solución estándar*.

Con *P. ipecacuanha* la única diferencia debe ser que la zona que corresponde a la cefelina en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe ser mucho más pequeña que la misma zona corres-

pondiente del cromatograma obtenido con la *Solución estándar*.

Cenizas insolubles en ácido (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 3%.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 5%.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 2,0 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe perder más de 10,0%, determinado sobre 1,0 g de Ipecacuana pulverizada secada en estufa a 105 °C durante 2 horas.

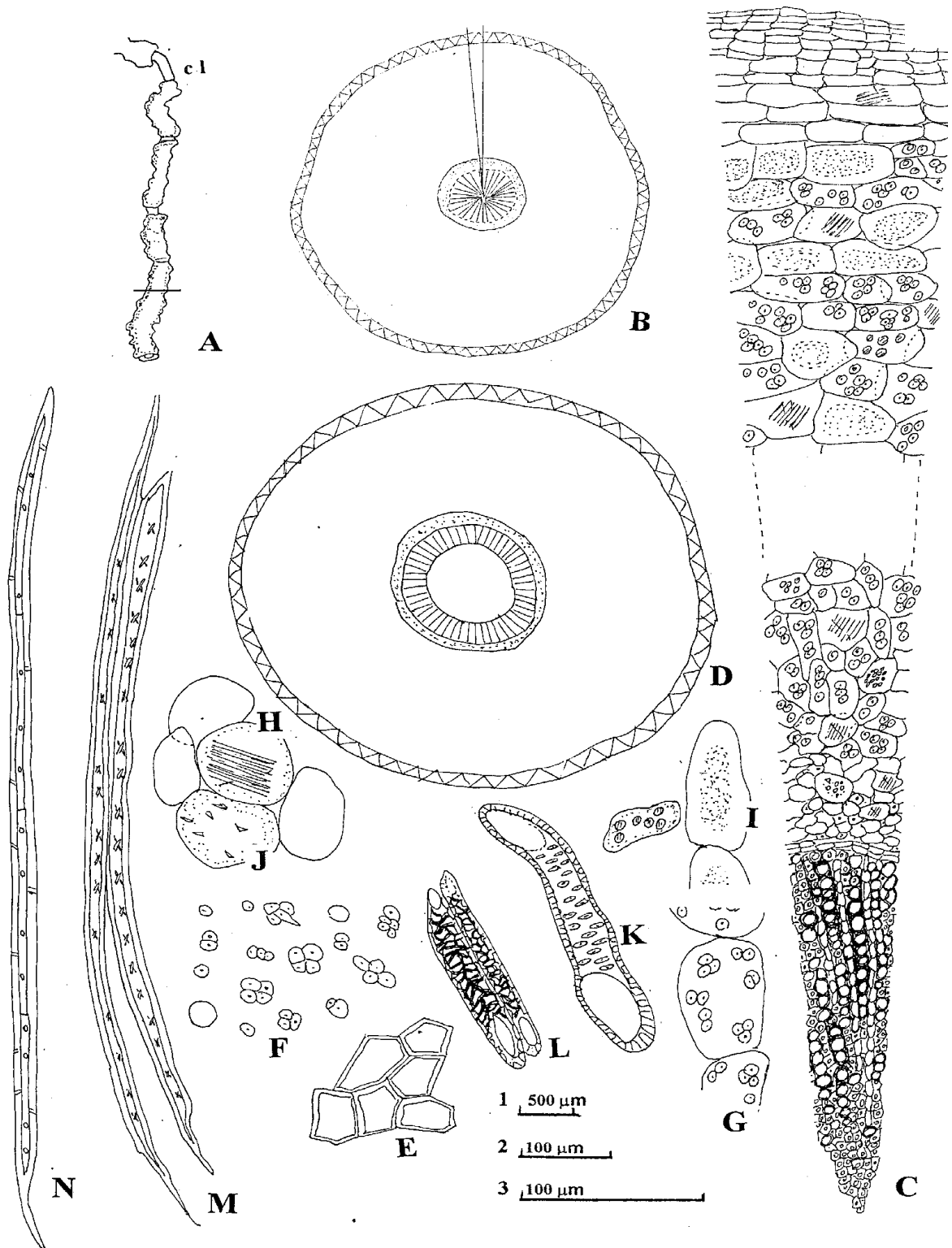
Tallos externos (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

nosia)

No debe contener más de 5 %.

VALORACIÓN

En un matraz aforado, transferir 7,5 g de Ipecacuana pulverizada, agregar 100 ml de éter y agitar durante cinco minutos. Agregar 5 ml de amoníaco diluido y agitar durante una hora. Agregar 5 ml de agua y agitar enérgicamente. Transferir la capa etérea a un matraz aforado empleando algodón como filtro. Lavar el residuo 2 veces con 25 ml de éter y filtrar. Combinar las fases etéreas y evaporar el éter por destilación. Disolver el residuo en 2 ml de alcohol al 90 % v/v. Evaporar hasta sequedad y calentar a 100 °C durante 5 minutos. Disolver el residuo en 5 ml de etanol al 90 % v/v, calentando en un baño de agua, agregar 15,0 ml de ácido clorhídrico 0,1 M. Titular el exceso de ácido con hidróxido de sodio 0,1 M, empleando 0,5 ml de una mezcla de 100 mg de rojo de metilo (SR) y 50 mg de azul de metileno (SR) en 100 ml de alcohol como indicador. Cada ml de ácido clorhídrico 0,1 M equivale a 24,03 mg de alcaloides totales, calculados como emetina.



Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes, A-N: A, porción de raíz, morfología externa. B-D, sección transversal. B, representación esquemática de raíz. C, detalle de lo indicado en B. D, representación esquemática del rizoma. E, súber en vista superficial. F, almidón. G-J, células parenquimáticas. G, con almidón. H, con rafidos de oxalato de calcio. I, con fino granuloso. J, con microcristales de oxalato de calcio. K-L vasos. K, punteados. L, reticulados. M, fibrotraqueidas. N, fibra septada. cl, cilindro leñoso. Las regrillas corresponden a: 1 a B y D; 2 a C; 3 a E-N.

MANZANILLA, flores

Definición - Manzanilla está constituida por la inflorescencia desecada de *Matricaria recutita* L. (*Matricaria chamomilla* L., *Chamomilla recutita* (L. Rauschert) (Asteraceae). Debe contener no menos de 0,4 por ciento de aceite esencial y no menos de 0,3 por ciento de 7-glucósido de apigenina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Bisabolol SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, almacenados en un sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A- Características macroscópicas - Los capítulos son hemisféricos o cónicos, de aproximadamente 6 mm de diámetro. Constan de unas pocas flores externas liguladas y numerosas flores internas tubulosas sin páleas, dispuestas sobre un receptáculo hueco de 3 a 10 mm de diámetro. Involucro verde, formado por dos o tres series de brácteas oblongo-lanceoladas, glabras, imbricadas, con ápices obtusos y margen hialino. Las flores liguladas son blancas y pistiladas, de 7 a 10 mm de longitud y 2 a 3 mm de ancho; la lígula es tridentada y se encuentra recorrida por cuatro nervios principales ocasionalmente acompañados por uno o dos nervios paralelos más cortos. Las flores tubulosas son amarillas, perfectas, de alrededor de 2 mm de longitud; la corola tubulosa es pentadentada. Los estambres en número de 5 son singenésicos y epipétalos. El ovario es ínfero. El fruto es un aquenio ovoideo entre 3 y 5 estrías longitudinales.

B- Características microscópicas - En el material diafanizado se observan en vista superficial fragmentos de las brácteas del involucro cuya zona marginal está compuesta por células elongadas longitudinalmente con paredes delgadas y cutícula débilmente estriada; los estomas son anomocíticos. La corola de las flores liguladas y tubulosas muestra en superficie células isodiamétricas o alargadas con paredes ligeramente engrosadas y escasos pelos glandulares. La epidermis externa de las flores liguladas presentan células papilosas con cutícula estriada. La base del ovario de las flores liguladas y tubulosas muestra la presencia de un anillo de pequeñas esclereidas rectangulares con paredes moderadamente engrosadas y punteadas y asimismo se observan tricomas glandulares con una cabeza biseñada con 2 a 4 células que se disponen en hileras longitudinales, alternando con células alargadas

conteniendo mucílagos. Las células de la epidermis en el ápice de los estigmas están extendidas en forma de papilas redondeadas. Los fragmentos de filamentos y anteras de los estambres son muy abundantes. Los granos de polen son muy abundantes, poseen un diámetro de aproximadamente 30 μm , son redondeados, con tres poros germinales y una exina espinosa.

C - Aplicar las siguientes técnicas cromatográficas:

Ensayo 1

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, agua, ácido acético glacial y ácido fórmico (100:26:11:11).

Solución estándar - Pesar exactamente alrededor de 5 mg de 7-O-glucósido apigenina y disolver en 10 ml de metanol.

Solución muestra - Pesar y reducir a polvo fino aproximadamente 5 g de manzanilla y transferir 1 g de la droga pulverizada a un matraz de 25 ml. Agregar 10 ml de metanol y mezclar. Calentar en un baño de agua a 60 °C durante 5 minutos agitando con frecuencia y filtrar.

Revelador 1 - Solución de difenilborinato de 2-aminoetilo al 1 % en metanol.

Revelador 2 - Solución de polietilenglicol 400 al 5 % en alcohol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, en bandas, 20 μl de la *Solución muestra* y 10 μl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1*. Dejar secar la placa al aire y luego pulverizar sobre la placa con *Revelador 2*. Examinar la placa, luego de 30 minutos aproximadamente, bajo luz ultravioleta a 366 nm. El cromatograma obtenido con la *Solución muestra* debe presentar tres bandas de fluorescencia amarillo-anaranjadas con un valor de entre 0,55 a 0,75, una de ellas con valor de e intensidad similar a la banda de 7-O-glucósido de apigenina en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*. La *Solución muestra* presenta de cuatro a seis bandas de color celeste brillante con un valor de entre 0,45 y 0,95 correspondiente a la presencia de cumarinas.

Ensayo 2

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo y tolueno (93:7).

Solución estándar - Preparar una solución de Bisabolol SR-FA en tolueno (1:30).

Solución muestra - Diluir 1 ml del aceite esencial de Manzanilla con 9 ml de tolueno

Revelador - Reactivo vainillina-sulfúrico.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, en bandas, 3 µl aproximadamente, 100 µg, de la *Solución estándar*, y 5 µl de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*. Calentar la placa a 110 °C durante 5 a 10 minutos. Examinar la placa a la luz visible. El cromatograma obtenido con la *Solución muestra* presenta una banda de color amarillo-verdosa correspondiente al óxido de bisabolol con un valor de R_f de aproximadamente 0,2; dos bandas violetas correspondientes a espatulenol y bisabolol con un valor de R_f de aproximadamente 0,25 y 0,35 que coincide en posición y color con la banda obtenida a partir de la *Solución estándar*. Se observan también dos bandas de color castaño oscuro con un valor de R_f de 0,5 y 0,6; y una banda rojo-violeta con un valor de R_f de 0,95 correspondiente al azuleno y otra de color azul-violeta con un R_f de 0,99 correspondiente al farneseno.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 13,0 %.

Determinación de aceites esenciales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Reducir a polvo grueso la Manzanilla, pesar 60,0 g y transferir a un balón de 500 ml. Agregar 0,5 ml de xileno en el tubo graduado y destilar con 300 ml de agua, a una velocidad entre 3 y 4 mm por minuto durante 2 horas.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 10,0 %.

Residuos de pesticidas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Sustancia orgánica extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 2,0 %.

VALORACIÓN

Contenido de 7-glucósido de apigenina

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 335 nm y una columna de 12,5 cm × 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. Programar la fase móvil para obtener una composición variable de *Solución A* y *Solución B* según se indica: en el momento de la inyección la proporción de *Solución B* corresponde al 26 %; mantener ese nivel durante 3 minutos; luego aumentar linealmente durante los siguientes 19 minutos hasta 85 % de *Solución B*; luego disminuir linealmente durante los siguientes 5 minutos a 26 % de *Solución B* y mantener esa composición durante los siguientes 3 minutos antes de la próxima inyección. El caudal debe ser aproximadamente 1 ml por minuto

Ácido fosfórico diluido - Transferir 5,0 ml de ácido fosfórico a un matraz aforado de 100 ml, agregar 50 ml de agua, diluir con agua a volumen y mezclar.

Solución A - Preparar una solución de fosfato monobásico de potasio 0,5 M. Ajustar con *Ácido fosfórico diluido* a un pH de $2,55 \pm 0,05$.

Solución B - Preparar una mezcla de acetónitrilo y metanol (65:35).

Preparación estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de 7-O-glucósido de apigenina y 7-metoxicumarina en metanol y diluir cuantitativamente y en etapas si fuera necesario, con metanol hasta obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 25,0 µg de 7-O-glucósido de apigenina y 10,0 µg de 7-metoxicumarina por ml.

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de Manzanilla, transferir a un erlenmeyer equipado con un refrigerante y un agitador, agregar 80,0 ml de metanol, y calentar a reflujo la mezcla con agitación durante 1 hora. Enfriar el erlenmeyer a temperatura ambiente, filtrar la solución metanólica a través de un papel de filtro plegado y recoger el filtrado en un matraz aforado de 100 ml. Lavar el matraz con 3 ml de metanol, verter los lavados a través del papel de filtro y agregar el filtrado al matraz aforado. Diluir con metanol a volumen, mezclar y filtrar. Transferir 25,0 ml de la

solución filtrada a un balón equipado con un refrigerante y un agitador, agregar 5,0 ml de solución de hidróxido de sodio, preparada mediante disolución de 0,4 g de hidróxido de sodio en 5,0 ml de agua y calentar a reflujo la mezcla durante 25 minutos. Enfriar el balón y ajustar la solución con ácido clorhídrico a un pH entre 5,0 y 6,2. Transferir cuantitativamente la solución a un matraz aforado de 50 ml, diluir con metanol a volumen, mezclar y filtrar, descartando los primeros 10 ml del filtrado.

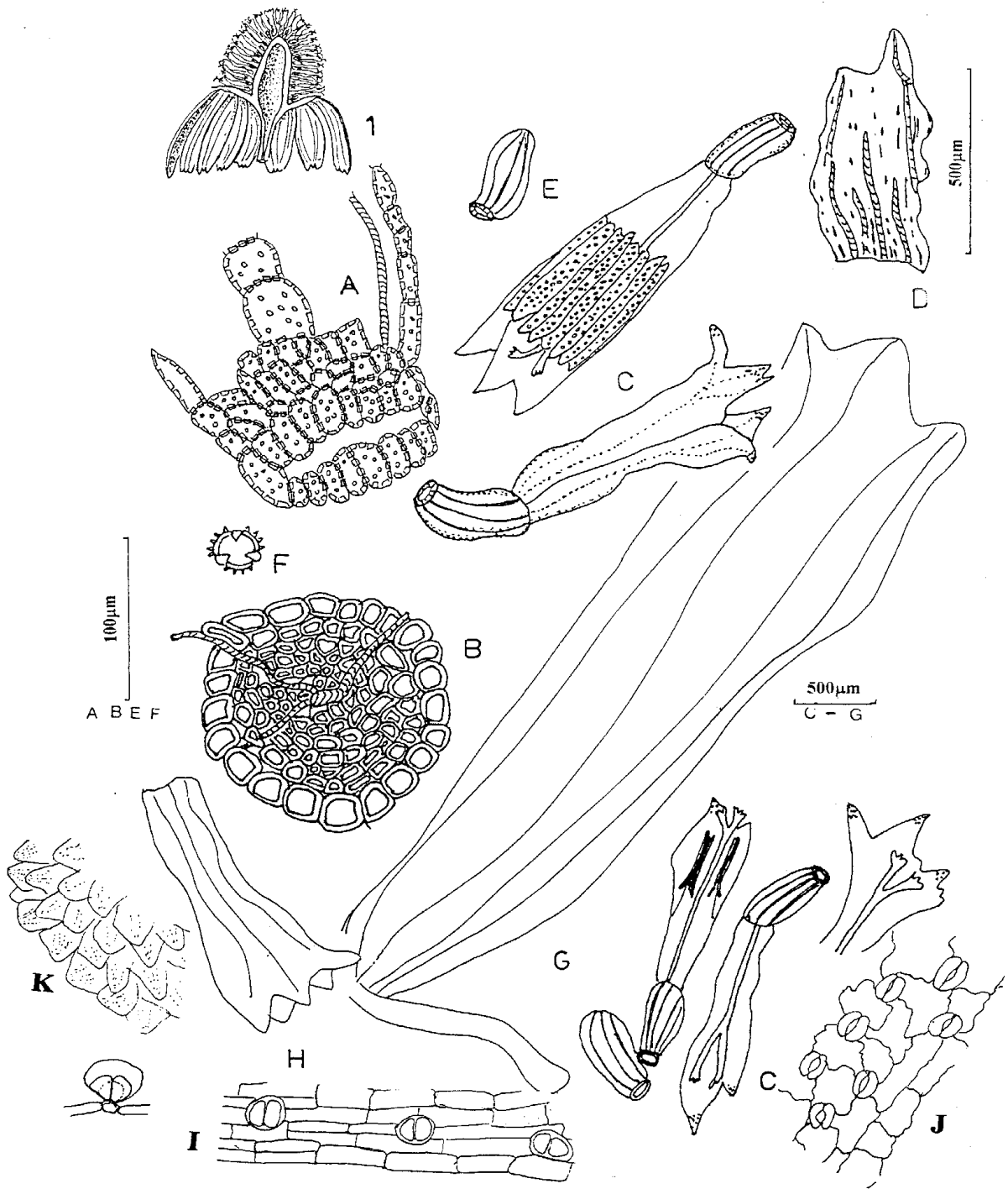
Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar aproximadamente 15 µl de la *Preparación estándar*. Hacer los ajustes necesarios para obtener tiempos de retención relativos de aproximadamente 0,63 y 1,0 para 7-*O*-glucósido de apigenina y 7-metoxicumarina, respectivamente; registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre 7-*O*-glucósido de apigenina y 7-metoxicumarina no debe ser menor de 3,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 15 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*. Dejar eluir la *Preparación muestra* por lo

menos seis veces el tiempo de retención de 7-*O*-glucósido de apigenina. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos observados en el cromatograma de la *Preparación muestra*. Los tiempos de retención relativos deben ser aproximadamente 0,30; 0,47; 0,66; 0,89 y 1,0 para 7-*O*-glucósido de apigenina, 7-metoxicumarina, apigenina, *trans*-espiroéter y *cis*-espiroéter, respectivamente. Calcular el porcentaje de 7-glucósido de apigenina en la porción de Manzanilla en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$12(C/P)(/)$$

en la cual *C* es la concentración en mg por ml de 7-*O*-glucósido de apigenina en la *Preparación estándar*; *P* es el peso en g de Manzanilla en ensayo para la *Preparación muestra*, y *y* son las respuestas de los picos de 7-*O*-glucósido de apigenina obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente.



Matricaria recutita L.

A-B: anillo de células engrosadas de la base del ovario; A, en vista lateral, B, vista superficial; C, flores del disco; D, bráctea del involucreo con elementos de conducción y muchas fibras; E, aquenio; F, grano de polen; G, corola de una flor ligulada, tridentata; H, corola de una flor del disco o tubulosa; I, tricomas glandulares; J, estomas anomocíticos de la bráctea del involucreo; K, papilas de las flores liguladas

MENTA, hoja

Definición - Menta está constituida por las hojas desecadas de *Menta x piperita* L. (Lamiaceae). La droga entera y la droga cortada deben contener no menos de 1,2 por ciento y 0,9 por ciento de aceite esencial, respectivamente, sobre la sustancia seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados almacenados en sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - La hoja es de forma ovado - oblonga a oblongo - lanceolada, de 1,5 a 9 cm de longitud, de ápice agudo, base angosta o redondeada y bordes aserrados; de color verde claro a verde oscuro; el haz es prácticamente liso y el envés es pubescente. El pecíolo es de 4 a 15 mm de longitud, pubescente.

La Menta tiene olor aromático característico, sabor penetrante y produce una sensación refrescante en la boca.

B - Características microscópicas - En vista superficial tanto la epidermis superior como la inferior constan de células de paredes onduladas con estomas diacíticos. Presenta pelos glandulares y no glandulares. Los pelos no glandulares son uniseriados, de cutícula papilosa, de hasta ocho células. Los pelos glandulares son de dos tipos: los más grandes se presentan hundidos en depresiones de la epidermis y constan de un pie de una a dos células y una cabeza secretora formada por unas ocho células dispuestas en forma de corona. Los más pequeños constan de un pie de una a dos células con una cabeza secretora de una sola célula.

En sección transversal ambas epidermis constan de una sola capa de células. El mesófilo presenta una sola capa de parénquima en empalizada y 3 a 4 capas de células de parénquima esponjoso. La nervadura central consiste en un haz vascular colateral.

C - Droga en polvo - Es de color verde claro a verde oliva. Presenta fragmentos de la epidermis con las características y elementos mencionados en *Características microscópicas*; fragmentos del mesófilo y fragmentos de las nervaduras.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Tolueno y acetato de etilo (95:5).

Solución estándar - Disolver 50 mg de mentol, 20 µl de 1,8-cineol, 10 mg de timol y 10 µl de acetato de mentilo en tolueno y diluir hasta 10 ml con el mismo solvente.

Solución muestra - A 200 mg de Menta recientemente pulverizada agregar 2 ml de diclorometano, agitar durante algunos minutos y filtrar. Evaporar el filtrado aproximadamente a 40°C hasta sequedad, disolver el residuo en 0,1 ml de tolueno.

Revelador - Anisaldehído sulfúrico.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de la *Solución estándar* y 20 µl de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar una banda de fluorescencia débil inmediatamente debajo de la banda correspondiente al timol en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*, correspondiente a pulegona. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar 5 a 10 minutos entre 100 y 105 °C.

Examinar la placa bajo luz visible. El cromatograma obtenido con la *Solución estándar* debe presentar una banda de color azul oscuro a violeta correspondiente al mentol con un valor de R_f aproximadamente de 0,30, una banda de color azul violáceo a pardo correspondiente al 1,8-cineol con un valor de R_f aproximadamente de 0,40, una banda rosa correspondiente al timol con un valor de R_f aproximadamente de 0,48 y una banda violeta azulada correspondiente al acetato de mentilo con un valor de R_f aproximadamente de 0,75. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar una banda intensa correspondiente al mentol y una banda débil correspondiente al 1,8-cineol. Entre las bandas de 1,8-cineol y de mentol puede presentar una banda anaranjada correspondiente a piperitona y por encima de la banda de 1,8-cineol, bandas verde azulada o verde grisáceas correspondientes a pulegona e isomentona y una banda violeta rojiza intensa correspondiente a hidrocarburos cerca del frente del solvente.

Cenizas insolubles en ácido (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 1,5 %.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 15 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de agua <120>

No debe contener más de 11 %, determinado sobre 20 g de Menta por destilación.

Impurezas orgánicas volátiles <520>

Debe cumplir con los requisitos.

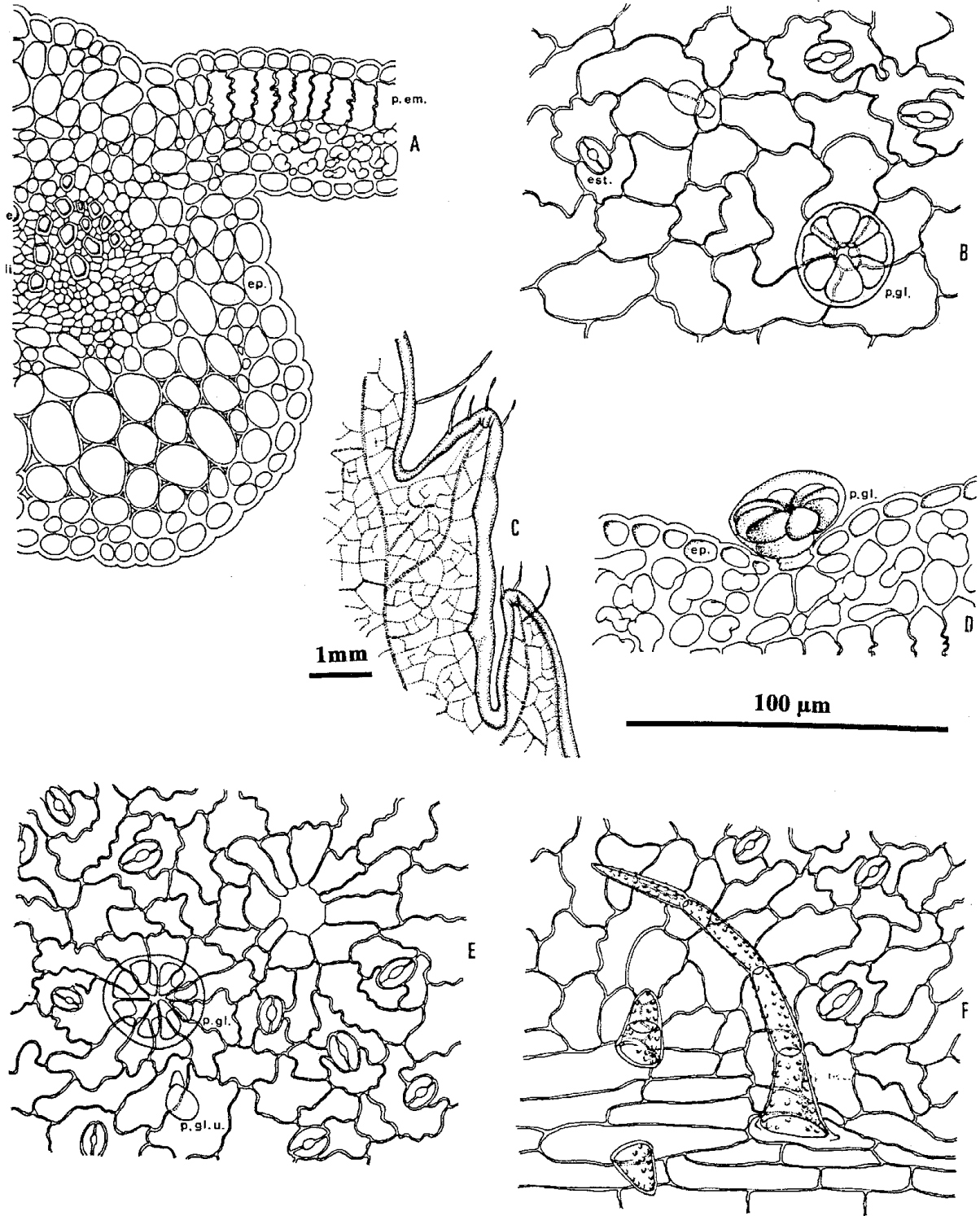
Tallos de menta u otras materias extrañas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

La cantidad de tallos de Menta no debe ser mayor de 5 %; el diámetro de los tallos no debe ser mayor de 1,5 mm; no debe contener más de 2 % de otras materias extrañas y la cantidad de hojas que presenten bandas pardas de *Puccinia menthae* no debe ser mayor de 8 %.

VALORACIÓN

Realizar la determinación de aceites esenciales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*). Pesar 20,0 g de Menta triturada y transferir a un matraz de 500 ml.

Destilar con 200 ml de agua y 0,5 ml de xileno en el tubo graduado, a una velocidad de 3 a 4 ml por minuto durante 2 horas.



Mentha x piperita L.

Hoja A: sección transversal, B: vista superficial de la epidermis superior, C: detalle de inervación y margen foliar, D: pelo glandular, E vista superficial de la epidermis inferior, F: pelo no glandular

PODÓFILO, RESINA DE

Sinonimia - Podofilina.

Definición - Resina de Podófilo es una mezcla pulverizada de resinas extraídas de *Podophyllum peltatum* Linneo (Berberidaceae), mediante percolación del material vegetal con alcohol y precipitación posterior del percolado concentrado por el agregado de agua acidificada. Debe contener no menos de 40,0 por ciento y no más de 50,0 por ciento de materia insoluble en hexano y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Podofilotoxina SR-FA.

Precaución - La Resina de Podófilo es altamente irritante a los ojos y a las mucosas.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos de cierre perfecto.

ENSAYOS

Identificación

A - La Resina de Podófilo debe ser soluble en hidróxido de potasio 1 N o en hidróxido de sodio 1 N, produciendo un líquido amarillo, que se torna gradualmente más oscuro en reposo y que produce un precipitado por agregado de ácido clorhídrico.

B - Una solución acuosa caliente de Resina de Podófilo debe dejar depositar por enfriamiento la mayor parte de sus solutos. Si se filtra el líquido enfriado, el filtrado se torna pardo al agregar gotas de cloruro férrico (SR).

C - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo y metanol (25:1).

Solución estándar - Disolver 50 mg de Podofilotoxina SR-FA en 10 ml de etanol.

Solución muestra - Transferir 1 g de Resina de Podófilo a un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 30 ml de etanol y completar a volumen con el mismo solvente.

Revelador - Metanol y ácido sulfúrico al 50 %.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa, en bandas, 10 µl de la *Solución muestra* y

10 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar que el solvente se evapore. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y secar en estufa a 130 °C durante 10 minutos. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar una banda correspondiente en valor de R_f y color a la banda principal obtenida con la *Solución estándar* y no debe presentar bandas grisáceas en el tercio medio del cromatograma pero si pueden estar presentes otras bandas coloreadas.

Determinación del residuo de ignición <270>

No más de 1,5 %.

Diferencia con la Resina de Podófilo de la India (*Podophyllum hexandrum* Royle)

A - Agregar 400 mg de Resina de Podófilo a 3 ml de alcohol al 60 %, agregar 0,5 ml de hidróxido de potasio 1 N, agitar la mezcla suavemente y dejar en reposo durante 2 horas: no debe gelatinizar.

B - A 5 ml de una solución de Resina de Podófilo al 0,5 % en alcohol, agregar 0,5 ml de una solución de acetato de cobre al 0,5 %: se debe producir color verde brillante, sin precipitado [NOTA: con el Podófilo de la India se produce un precipitado pardo].

VALORACIÓN

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 500 mg de Resina de Podófilo, transferir a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con alcohol. Transferir 10 ml de esta solución a una ampolla de decantación y agregar 90 ml de agua. Extraer la mezcla con seis porciones de diclorometano, combinar las fases orgánicas y extraer con 10 ml de hidróxido de sodio 0,2 N y luego con cinco porciones de 10 ml de agua. Lavar por separado las seis porciones de 20 ml de diclorometano, combinar las fases orgánicas y filtrar.

Procedimiento - Evaporar hasta sequedad el filtrado y disolver el residuo en 100 ml de alcohol. Diluir 10 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente y medir la absorbancia (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*) a 292 nm. Calcular el contenido de ariltetralin lignanos expresados como podofilotoxina, empleando como coeficiente de extinción específica $E(1\%, 1\text{ cm})$ 105,4.

REGALIZ, raíz

Definición - Regaliz está constituido por las raíces y los rizomas desecados de *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae). Debe contener no menos de 2,5 por ciento de ácido glicirrónico calculado sobre la droga seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Las raíces y rizomas se presentan en piezas cilíndricas de una longitud de 14 a 20 cm o más y un diámetro de 5 a 20 mm; externamente la corteza presenta color pardo amarillento o pardo oscuro, es longitudinalmente rugosa o estriada. Los rizomas más delgados presentan yemas de posición alterna y cicatrices de raíces pequeñas; éstas se originan sobre el rizoma en proximidad de las yemas. La fractura de la raíz y del rizoma es fibrosa. La corteza es delgada; la región del floema secundario es gruesa y ligeramente amarilla con estrías radiales. El xilema, amarillo, cilíndrico, es compacto con estructura radial. El rizoma posee una médula central pequeña, la que está ausente en la raíz.

B - Características microscópicas - El corte transversal del rizoma muestra una peridermis angosta, el súber constituido por varias hileras de células suberosas poligonales de paredes delgadas con contenido de color pardo rojizo. Le continúa el cilindro cortical con células colenquimatosas, algunas de ellas con cristales simples de oxalato de calcio. Le sigue un parénquima cortical, algunas de cuyas células contienen granos de almidón ovalados y prismas de oxalato de calcio. El floema de color amarillo se dispone en anchas regiones en forma radial y separadas entre sí por radios parenquimáticos de 1 a 8 células de ancho. Cada región del floema está constituida por haces de fibras amarillas de gruesas paredes rodeadas de una vaina parenquimática, donde en cada célula se observa un cristal simple de oxalato de calcio. Los elementos de conducción del floema, acompañados por fibras floemáticas muy largas, de gruesas paredes con lumen angosto, se hallan próximas al cambium pluriestratificado. El xilema amarillo se dispone en forma radiada, las zonas del xilema se hallan separadas unas de otras por radios parenquimáticos que se conectan con los radios del floema. El xilema está constituido por anchas tráqueas rodeadas por

traqueidas amarillas, grupos compactos de gruesas fibras que están parcialmente rodeadas de vainas parenquimáticas cristalíferas, cada célula contiene prismas simples de oxalato de calcio y parénquima leñoso, el que contiene almidón y cristales. La médula del rizoma es parenquimatosa, contiene almidón y prismas simples de oxalato de calcio.

C - Droga en polvo - El polvo es de color ligeramente amarillo parduzco a débilmente grisáceo, muestra fragmentos de fibras con gruesas paredes amarillas de 700 a 1.200 μm de largo y 10 a 20 μm de ancho, con un lumen puntiforme, a menudo acompañado por una vaina cristalina conteniendo cristales de oxalato de calcio de 10 a 35 μm de largo y 2 a 5 μm de ancho. Los vasos de color amarillo miden de 100 a 160 μm de longitud y 30 a 70 μm de diámetro, tienen numerosas puntuaciones rebordeadas ovales con forma de hendidura; las traqueidas miden entre 100 a 140 μm de longitud y 10 a 14 μm de diámetro. Los fragmentos de corteza consisten en células de paredes delgadas y se observan prismas de oxalato de calcio aislados, así como fragmentos de tejido parenquimatoso. El polvo muestra gránulos de almidón simples, redondos u ovales con hilo semilunar o lineal de 3 a 12 μm pudiendo llegar hasta 20 μm de diámetro.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Butanol, agua y ácido acético glicólico (70:20:10).

Solución estándar - Disolver 5 mg de ácido glicirrónico en 1 ml de una mezcla de alcohol y agua (70:30).

Solución muestra - Pesar exactamente alrededor de 2,0 g de Regaliz, previamente reducido a polvo fino y transferir a un recipiente apropiado. Agregar 10 ml de una mezcla de alcohol y agua (70:30), calentar en un baño de agua durante 5 minutos con agitación, enfriar y filtrar.

Procedimiento - Aplicar por separado 2 μl de la *Solución muestra* y 2 μl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la placa. Retirar de la cámara, dejar secar y examinar bajo luz ultravioleta a 254 nm. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, entre otras, debe presentar una mancha púrpura oscura, correspondiente al ácido glicirrónico, similar en valor de (aproximadamente 0,4) a la mancha principal obtenida con la *Solución estándar*.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No mayor de 7,0 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No más de 0,003 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 2 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Secar a 105 °C durante 6 horas. No debe perder más de 12 % de su peso, determinado sobre 1 ó 2 g de Regaliz reducido a polvo fino.

Residuo de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACION

Sistema cromatográfico - un equipo para cromatografía de líquidos equipado con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm y una columna de 15 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 0,6 ml por minuto.

Solución A - Ácido acético y agua (1:15).

Fase móvil - *Solución A* y acetonitrilo (3:2).

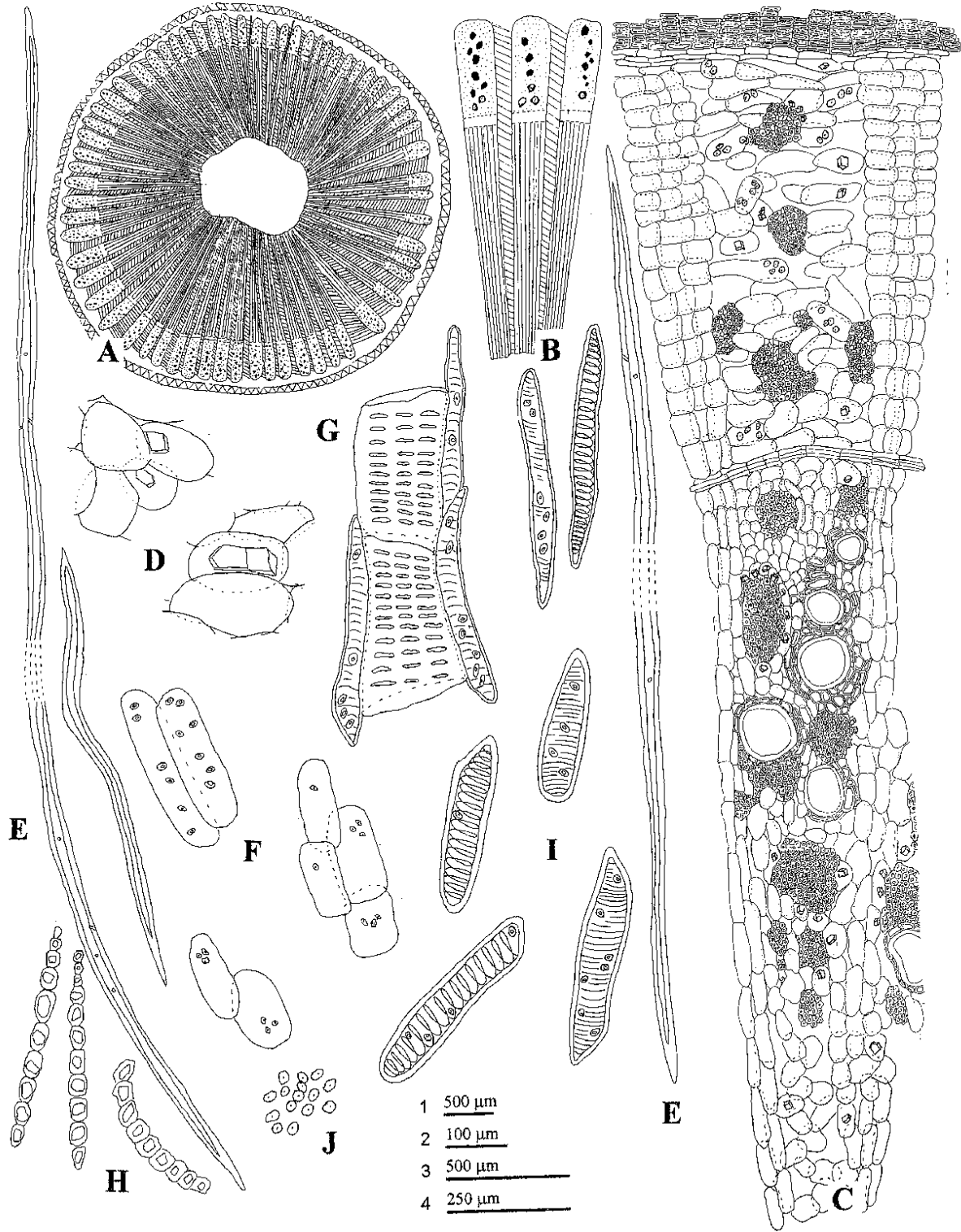
Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 25,0 mg de ácido glicirrónico, transferir a un matraz aforado de 100 ml, agregar 30 ml de una mezcla de agua y alcohol (50:50) y agitar hasta disolución total. Completar a volumen con el mismo solvente.

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 500 mg de Regaliz reducido a polvo fino y transferir a un erlenmeyer de 125 ml. Agregar 70 ml de una mezcla de agua y alcohol (50:50), agitar durante 15 minutos, centrifugar y transferir el sobrenadante a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 25 ml del mismo solvente al residuo obtenido, agitar durante 15 minutos y centrifugar. Transferir el sobrenadante obtenido al matraz anteriormente empleado y completar a volumen con la mezcla de agua y alcohol (50:50).

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes al ácido glicirrónico. Calcular el contenido en porcentaje de ácido glicirrónico en la porción de Regaliz en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$100(I)(/)$$

en la cual es el peso en gramos del ácido glicirrónico en la *Preparación estándar*, es el peso en gramos de la porción de la muestra en ensayo, y y son las respuestas de los picos del ácido glicirrónico en la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente.



Glycyrrhiza glabra L. A, B, representación esquemática de la sección transversal del rizoma; C detalle de lo indicado en B; D, células parenquimáticas conteniendo cristales monoclinos de oxalato de calcio; F, fibras del floema; F, células parenquimáticas conteniendo granos de almidón simples; G, vasos o tráqueas acompañados por traqueidas anilladas; H, vaina de células parenquimáticas cristalíferas; I, traqueidas, anilladas y helicadas; J, granos de almidón simples. Las reglillas corresponden 1 a A, 2 a C, 3 a B, 4 a D-J.

SEN, hoja

Definición - El Sen está constituido por los folíolos desecados de *Senna alexandrina* P. Miller (Caesalpinaceae ex Fabaceae) (*Cassia acutifolia* Del. *C. angustifolia* Vahl). Debe contener no menos de 2,5 por ciento de glicósidos hidroxiantracénicos calculados como sennósido B sobre la sustancia seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Extracto de Sen SR-FA.

CONSERVACION

Conservar protegido de la luz y de la humedad.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Se presenta como folíolos desigualmente lanceolados u oval-lanceolados, frecuentemente rotos, de 1,5 cm a 5 cm de largo por 5 mm a 15 mm de ancho, desiguales en la base, con pecíolos gruesos muy cortos. Los folíolos tienen ápice agudo y son enteros, quebradizos y subcoriáceos, con pelos cortos y algo aplastados, escasos en la cara superior, más numerosos en la cara inferior, donde aparecen en la nervadura media. Su color varía de amarillo pálido a verde grisáceo claro y verde oliva pálido. Presenta olor característico.

B - Características microscópicas - Presenta en vista superficial células epidérmicas poligonales con paredes rectas y contenido mucilaginoso; estomas numerosos mayoritariamente parasíticos, de 20 a 35 μm de longitud. Los pelos son unicelulares, cónicos, a menudo curvos, con paredes gruesas, papilosas, de 100 a 350 μm de longitud. En sección transversal muestra un mesófilo isobilateral con una sola capa de células en empalizada. La nervadura central está constituida por un haz colateral rodeado por una vaina de células parenquimáticas que contienen cristales prismáticos de oxalato de calcio, reforzado por casquetes de fibras tanto hacia el lado adaxial como hacia el abaxial. El oxalato de calcio aparece en agregados en forma de roseta en el parénquima esponjoso y en prismas de seis a ocho lados en las vainas con cristales, que se encuentran en la superficie exterior de cada grupo de fibras.

C - Droga en polvo - Color amarillo verdoso a verde oliva pardo a la luz, presenta fragmentos de nervaduras con vasos, traqueidas, fibras y vainas parenquimáticas con cristales prismáticos de oxalato de calcio, pelos unicelulares, fragmentos de mesófilo que contienen drusas de oxalato de calcio y de epidermis con estomas.

Previa hidrólisis alcalina - Mezclar 500 mg de Sen con 10 ml de una solución 1 en 10 de hidróxido de potasio en alcohol, calentar hasta ebullición durante aproximadamente 2 minutos, diluir con 10 ml de agua y filtrar. Acidificar el filtrado con ácido clorhídrico, agitar con éter, retirar la capa etérea y agitarla con 5 ml de hidróxido de amonio 6 N. Esta se debe tornar de color rojo anaranjado.

Previa hidrólisis ácida - Transferir a un erlenmeyer 25 mg de droga pulverizada (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*) y agregar 50 ml de agua y 2 ml de ácido clorhídrico. Calentar en un baño de agua durante 15 minutos, enfriar y agitar con 40 ml de éter. Separar la capa etérea y desecar sobre sulfato de sodio anhidro, evaporar 5 ml a sequedad y al residuo frío agregar 5 ml de amoníaco diluido. Debe aparecer una coloración amarilla o anaranjada. Calentar en un baño de agua durante 2 minutos. Se debe desarrollar una coloración rojo-violeta.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta de gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, propanol, agua, ácido acético glacial (40:40:30:1).

Solución estándar - Disolver 10 mg de Extracto de Sen SR-FA en 1 ml de una mezcla de volúmenes iguales de alcohol y agua.

Solución muestra - Agregar a 0,5 g de la droga pulverizada (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*), 5 ml de una mezcla de volúmenes iguales de alcohol y agua. Calentar hasta ebullición. Centrifugar y emplear el líquido sobrenadante.

Revelador 1 - Solución de ácido nítrico al 20 por ciento v/v.

Revelador 2 - Solución al 5 % de hidróxido de potasio en alcohol al 50 por ciento.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 μl de cada solución en bandas de 20 mm por 2 mm. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Dejar secar al aire, pulverizar sobre la placa con **Revelador 1** y calentar a 102 °C durante 10 minutos. Dejar enfriar y pulverizar con **Revelador 2** hasta que las bandas aparezcan. Las bandas principales del cromatograma obtenido con la **Solución muestra** son similares en posición (sennósidos B, A, D y C por orden creciente de *R_f*), coloración y tamaño a las bandas principales del cromatograma obtenido con la **Solución estándar**. Entre las bandas correspondientes a los sennósidos D y C puede aparecer una banda roja correspondiente a la reina - 8 - glucósido.

Cenizas insolubles en ácido (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 3,0 %.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 12,0 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 3 % de órganos extraños y no más de 1 % de elementos extraños.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 12,0 %, determinado sobre 1,000 g de droga pulverizada secada en estufa a 100 - 105 °C durante 2 horas.

Raíces de sen, vainas u otras materias extrañas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

La cantidad de raíces de Sen no debe exceder de 8,0 % y la cantidad de vainas de Sen u otra materia extraña no debe exceder de 2,0 %.

VALORACIÓN

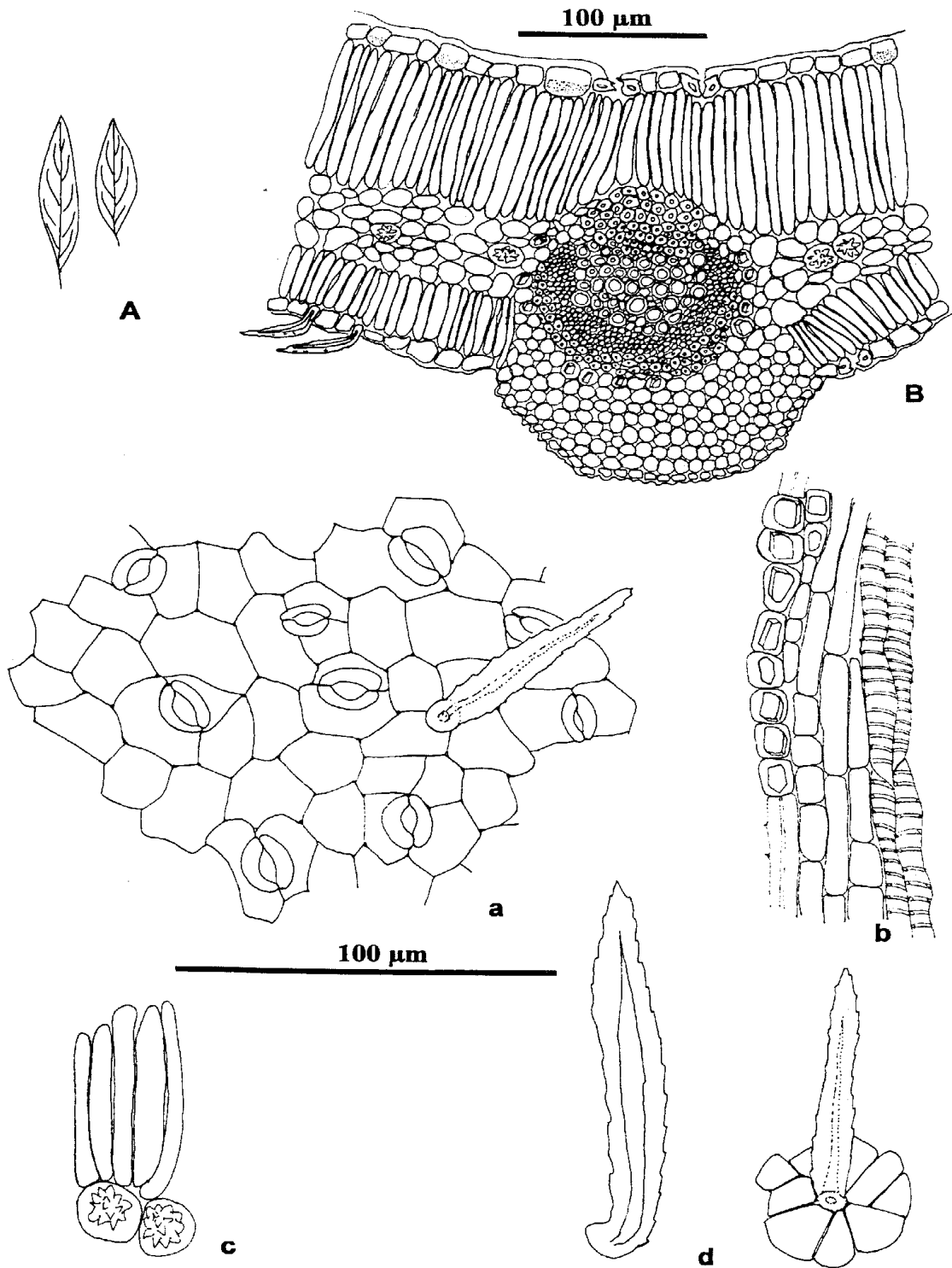
[NOTA: Llevar a cabo la valoración protegida de la luz intensa].

En un matraz aforado de 100 ml transferir 150 mg de la droga pulverizada (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*) y agregar 30,0 ml de agua. Mezclar, pesar y colocar en un baño de agua. Calentar a reflujo durante 15 minutos. Dejar enfriar, pesar y restablecer el peso original con agua. Centrifugar y colocar 20,0 ml del líquido sobrenadante en una ampolla de decanta-

ción de 150 ml. Agregar 0,1 ml de ácido clorhídrico diluido al 10 % y agitar tres veces con 15 ml de clorofórmico cada vez. Dejar separar y eliminar la capa clorofórmica. Agregar 100 mg de bicarbonato de sodio y agitar durante 3 minutos. Centrifugar y colocar 10,0 ml del líquido sobrenadante en un matraz aforado de 100 ml con tapón esmerilado. Agregar 20 ml de solución de cloruro férrico y mezclar. Calentar a reflujo durante 20 minutos en un baño de agua, de manera que el nivel de agua quede más alto que el del líquido del matraz. Agregar 1 ml de ácido clorhídrico y calentar durante 20 minutos más, agitando frecuentemente hasta disolver el precipitado. Enfriar, colocar la mezcla en una ampolla de decantación y agitar tres veces con 25 ml cada vez del éter empleado previamente para lavar el matraz. Reunir las tres capas etéreas y lavar dos veces con 15 ml de agua cada vez. Transferir las capas etéreas a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con éter. Evaporar 10,0 ml cuidadosamente a sequedad y disolver el residuo en 10,0 ml de una solución de acetato de magnesio de 5 g por litro en metanol. Medir la absorbancia de la solución a 515 nm, empleando metanol como blanco. Calcular el contenido en porcentaje de sennósido B en la porción de Sen en ensayo por la fórmula siguiente:

$$1,25A/m$$

en la cual *A* es la absorbancia a 515 nm y *m* es la masa de la sustancia a examinar en gramos. Emplear como coeficiente de extinción específica $E(1\%, 1\text{ cm})$ de sennósido B un valor de 240.



Senna alexandrina P. Millar (Fabaceae)

Foliolos A, Sección transversal B.

Droga en polvo:

a: Vista superficial de la epidermis con estomas y pelos no glandulares; b: fragmentos de nervadura; c: drusas; d: pelos no glandulares

UVA URSI, hoja

Definición - Uva Ursi consiste en la hoja entera y desecada de *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng (Ericaceae). Debe contener no menos de 7,0 por ciento de arbutina, calculado sobre el material desecado.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio seco y fresco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - La hoja es brillante y verde oscura en la cara superior y más clara, verde amarillenta, en la cara inferior, de 7 a 30 mm de largo y 5 a 12 mm de ancho. Lámina obovada, espatulada, ápice obtuso, base aguda y angosta, margen entero y ligeramente revoluto. En las hojas jóvenes ambas caras son glabras y finamente reticuladas. La textura es coriácea, la fractura breve, el olor ligeramente aromático y sabor astringente y amargo. El pecíolo es aproximadamente de 3 mm de largo, ligeramente pubescente.

B - Características microscópicas - La vista superficial de la epidermis presenta la epidermis superior con células poligonales de paredes rectas, sin estomas. La epidermis inferior está constituida por células isodiamétricas de paredes rectas; presenta estomas anomocíticos, con apertura circular. La sección transversal de la lámina presenta una epidermis uniestratificada, la cutícula de ambas epidermis es muy gruesa. Las hojas jóvenes presentan pelos unicelulares cónicos. El mesófilo es dorsiventral con 3 a 4 hileras de células en empalizada y 8 a 9 capas de parénquima esponjoso que contiene una materia pigmentada de color pardo amarillento. Las células parenquimáticas, que rodean a las angostas fibras asociadas al haz vascular, contienen cristales de oxalato de calcio. En la región del nervio medio, que está constituido por un solo haz vascular colateral de forma plano-convexa, se observa colénquima de tipo laminar en relación con ambas epidermis. El pecíolo en sección transversal es plano convexo. La epidermis es similar a la descrita para la lámina; en posición subepidérmica se observa colénquima laminar dispuesto de manera continua y un haz vascular cóncavo convexo.

C - Droga en polvo - Polvo verde amarillento. Se observan fragmentos de células epidérmicas poligonales con estomas anomocíticos; fragmentos de fibras lignificadas asociadas con parénquima que

contiene prismas de oxalato de calcio y numerosas células de parénquima conteniendo resina amarilla. Ocasionalmente se observan tricomas cónicos, unicelulares.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica:

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta de gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, agua y ácido fórmico anhidro (88:6:6).

Solución estándar - Disolver 25 mg de arbutina, 25 mg de ácido gálico y 25 mg de hidroquinona en 10 ml de metanol.

Solución muestra - Calentar a reflujo durante 10 minutos, 500 mg de Uva Ursi reducido a polvo con 5,0 ml de una mezcla de metanol y agua (1:1). Filtrar en caliente, lavar el recipiente y el filtro con el mismo solvente. Transferir a un matraz de 5,0 ml y llevar a volumen con el solvente de extracción.

Revelador 1 - Solución de dicloroquinonclorimida en metanol al 1,0 %.

Revelador 2 - Solución de carbonato de sodio anhidro al 2,0 %.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de la *Solución estándar* y 20 µl de la *Solución muestra*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa, secar a una temperatura entre 105 y 110 °C y pulverizar sobre la placa con *Revelador 1* y luego con *Revelador 2*. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar* presenta dos bandas en la zona superior, la de mayor R_f de color azul, corresponde a hidroquinona e inmediatamente por debajo de ella, la otra banda de color pardo, correspondiente al ácido gálico. La zona inferior presenta una banda celeste correspondiente a arbutina. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, además de las bandas mencionadas para la *Solución estándar*, puede presentar otras bandas de color azul o gris-pardo.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 5,0 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos según el destino.

Límite de metales pesados <590>

No más de 0,001 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 5 % de tallos ni más de 3 % de otras materias extrañas.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe perder más de 10 % de su peso.

Residuo de pesticidas (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema Cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm de diámetro, con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosa de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser de aproximadamente 1,2 ml por minuto.

Fase móvil - Agua y metanol (90:10). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*)

Preparación estándar - Transferir 10,0 mg de arbutina, exactamente pesados, a un matraz aforado de 10,0 ml y agregar 5,0 ml de *Fase móvil*. Sonicar

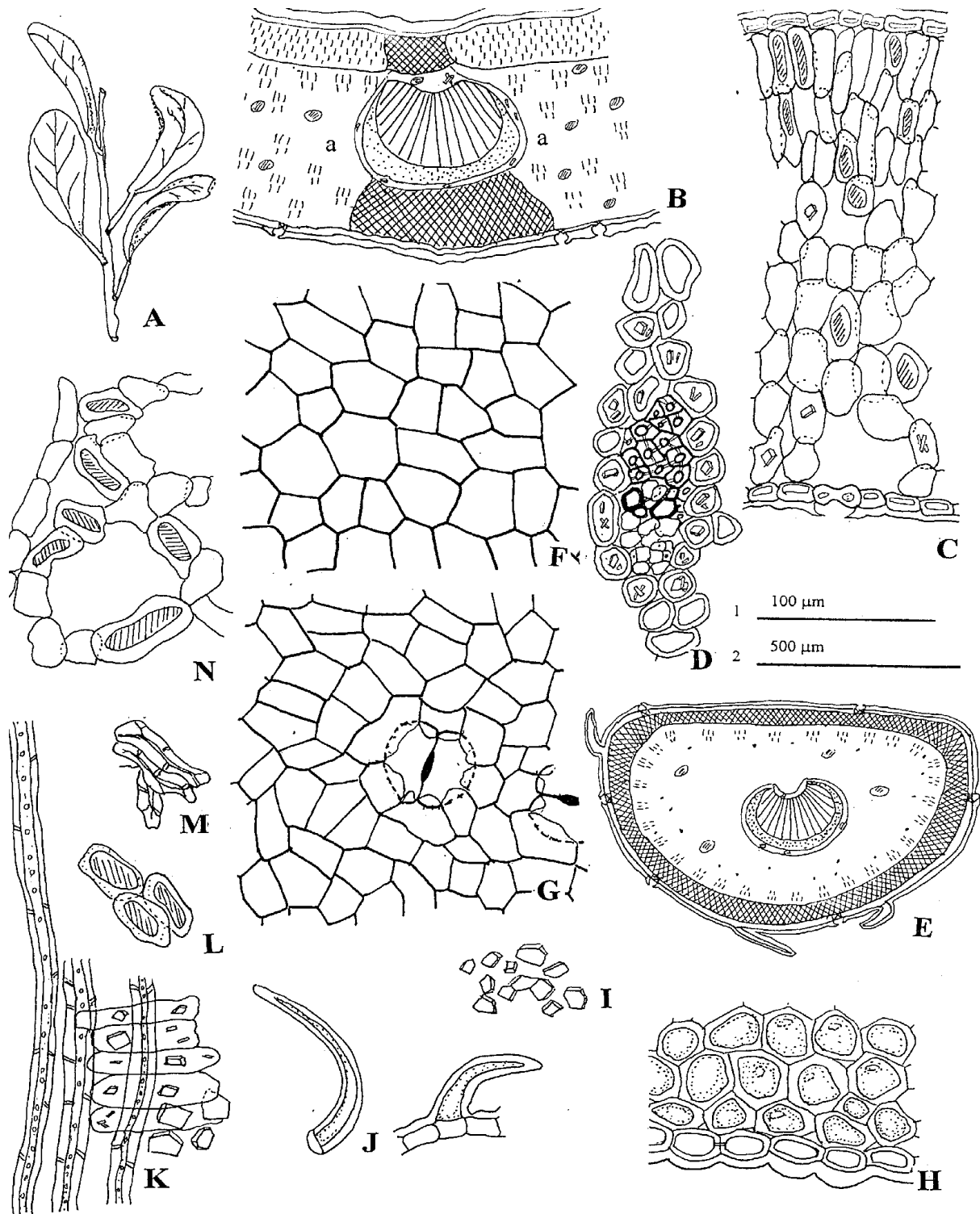
hasta disolución total y completar a volumen con *Fase móvil*.

Preparación muestra - Reducir a polvo una porción de Uva Ursi, pesar exactamente alrededor de 0,80 g y extraer con 20 ml de agua, calentando a reflujo en un baño de agua durante 30 minutos. Dejar enfriar y filtrar el líquido a través de un torunda de algodón absorbente. Agregar el algodón absorbente al residuo del recipiente utilizado y extraer con 20 ml de agua a reflujo en un baño de agua durante 30 minutos. Dejar enfriar y filtrar a través de papel de filtro. Combinar los filtrados y transferir a un matraz aforado de 50 ml con agua. Filtrar a través de papel de filtro. Descartar los primeros 10 ml del filtrado.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales de la *Preparación estándar* y de la *Preparación muestra*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Calcular el porcentaje de arbutina en la porción de Uva Ursi en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$100(P_E/P_M)(r_M/r_E)$$

en la cual P_M es el peso en gramos de Uva Ursi en ensayo, P_E es el peso en gramos de arbutina en la *Preparación estándar*, y r_M y r_E son las respuestas de los picos correspondientes a arbutina en la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente.



Arctostaphylos uva-ursi (L.) Spreng. A-N: A, vástago; B-E sección transversal ; B-D, lámina foliar; B, zona del nervio medio, esquema; C, detalle del semilimbo según lo indicado en B; C, detalle de un nervio secundario. E, pecíolo, esquema. F-G, vista superficial, epidermis: F, superior, G, inferior. H-N: *Droga en polvo*: H, porción de colénquima laminar; I, cristales de oxalato de calcio; J, pelos simples del pecíolo; K, fragmento de un grupo de fibras con células parenquimáticas asociadas que contiene cristales de oxalato de calcio; L, grupo de células parenquimáticas con contenido de color amarillo. Las reglillas corresponden 1 a C, D, F-N; 2 a B y E.

VALERIANA, raíz y rizoma

Definición - Valeriana está constituida por las raíces y rizomas de *Valeriana officinalis* L. (Valerianaceae) desecados cuidadosamente a menos de 40 °C. Debe contener no menos de 0,17 por ciento de ácido valerénico calculado sobre la droga seca y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en sitio fresco.

ENSAYOS

Identificación

A - *Características macroscópicas*. Rizomas color gris-amarillento a gris pardusco, verticales, de 2 a 4 cm de longitud y 1 a 2,5 cm de ancho, pueden aparecer enteros o partidos. En el corte longitudinal, la médula presenta una cavidad central con tabiques transversales. Las raíces, blanquecinas o amarillentas en su interior, de hasta 10 cm de longitud y 2 mm de diámetro, cilíndricas, más o menos enredadas y rotas, a veces envuelven casi completamente al rizoma o están casi completamente separadas de él. Fractura corta y córnea. Olor característico y sabor canforáceo y ligeramente amargo.

B - *Características microscópicas*. El corte transversal del rizoma presenta una peridermis delgada, una amplia zona cortical parenquimatosas rica en almidón y una endodermis que contiene glóbulos de aceite esencial. Rodeada por un anillo de haces vasculares colaterales, existe una amplia médula que contiene grupos dispersos de esclereidas rectangulares. El corte transversal de la raíz permite observar una epidermis con células papilosas y pelos radicales, una exodermis de una u ocasionalmente dos hileras de células grandes y paredes suberizadas que contienen glóbulos de aceite esencial. La corteza externa de 2 a 4 hileras de células con paredes finas o colenquimatosas, algunas veces suberizadas conteniendo resinas. La corteza interna y el parénquima de la médula, ésta última bien desarrollada en las raíces viejas, contienen almidón, en granos simples o compuestos de 2 a 4 unidades que miden de 3 a 20 μm de diámetro. En ambos parénquimas se observan microcristales de oxalato de calcio e idioblastos con resinas.

C - *Droga en polvo*. Color pardo amarillento. Presenta fragmentos de súber, esclereidas rectangulares aisladas y células parenquimáticas que contienen granos de almidón simples o compuestos como los descriptos. Se observan células que contienen glóbulos de aceite esencial, también miembros de vasos espiralados, escaleriformes y punteados,

células con resinas de color pardo claro, rizodermis con papilas y pelos

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Hexano, acetato de etilo y ácido acético glacial (65:35:0,5).

Solución estándar - Disolver 5,0 mg de *Fluoresceína* y 5,0 mg de Sudán III en 20 ml de metanol.

Solución muestra - Reducir a polvo fino una porción de Valeriana, pesar exactamente alrededor de 1,0 g de polvo, transferir a un recipiente apropiado y agregar 6 ml de metanol. Agitar durante 15 minutos y filtrar. Lavar el filtro con metanol para obtener 5 ml de filtrado. Evaporar el filtrado hasta obtener 2 ml y agregar 3 ml de una solución de hidróxido de potasio al 10 % p/v. Transferir a una ampolla de decantación y extraer con dos porciones de 5 ml cada una de cloruro de metileno. Descartar la fase inferior y calentar la fase acuosa en un baño de agua a 40 °C durante 10 minutos. Enfriar y agregar ácido clorhídrico diluido hasta obtener reacción ácida. Agitar con dos porciones de 5 ml de cloruro de metileno. Filtrar a través de sulfato de sodio anhidro y evaporar hasta sequedad. Disolver el residuo obtenido en 1 ml de cloruro de metileno.

Revelador - Anisaldehído-sulfúrico (SR).

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 μl de la *Solución estándar* y 20 μl de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente de solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara y dejar secar al aire. Examinar bajo luz natural. El cromatograma obtenido con la *Solución estándar* debe presentar una banda roja correspondiente a Sudán III con un valor de R_f de aproximadamente 0,45 y una banda amarillenta correspondiente a fluoresceína con un valor de R_f de aproximadamente 0,18. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar entre 100 y 105 °C durante 5 a 10 minutos. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar una banda azul-violeta, correspondiente al ácido hidroxivalerénico, con el mismo valor de R_f que la fluoresceína y una banda violeta, correspondiente al ácido valerénico, con el mismo valor de R_f que el Sudán III en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar además otras bandas azul violeta en la parte superior del cromatograma.

Cenizas insolubles en ácido (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 5 %.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 12 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe contener más de 2 %.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No debe perder más de 12 % de su peso.

VALORACION

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 220 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,5 ml por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0 - 5	55	45	Isocrática
5 - 18	55 → 20	45 → 80	Gradiente lineal
18 - 20	20	80	Isocrática
20 - 22	20 → 55	80 → 45	Gradiente lineal

Solución A - Ácido fosfórico al 0,5 % p/v y acetonitrilo (80:20).

Solución B - Acetonitrilo y Ácido fosfórico al 0,5 % p/v (80:20).

Fase móvil - Emplear mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*)

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 30 mg de dantrón, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en metanol y completar a volumen con el mismo solvente. Transferir 5 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con metanol. [NOTA: preparar la solución inmediatamente antes de su uso, en envase inactivo].

Preparación muestra - Reducir a polvo fino una porción de Valeriana, pesar exactamente alrededor de 1,5 g de polvo y transferir a un recipiente apropiado. Agregar 20 ml de metanol, mezclar y calentar a reflujo durante 30 minutos. Dejar enfriar y filtrar. Conservar el filtrado y repetir esta operación con el residuo retenido en el filtro calentando a reflujo durante 15 minutos. Dejar enfriar y filtrar. Reunir los filtrados en un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con metanol, lavando el balón y el filtro.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos al pico de dantrón deben ser aproximadamente 0,7 para el ácido acetoxivalerénico y 1,2 para el ácido valerénico.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de ácido acetoxivalerénico en la *Preparación muestra*, por la fórmula siguiente:

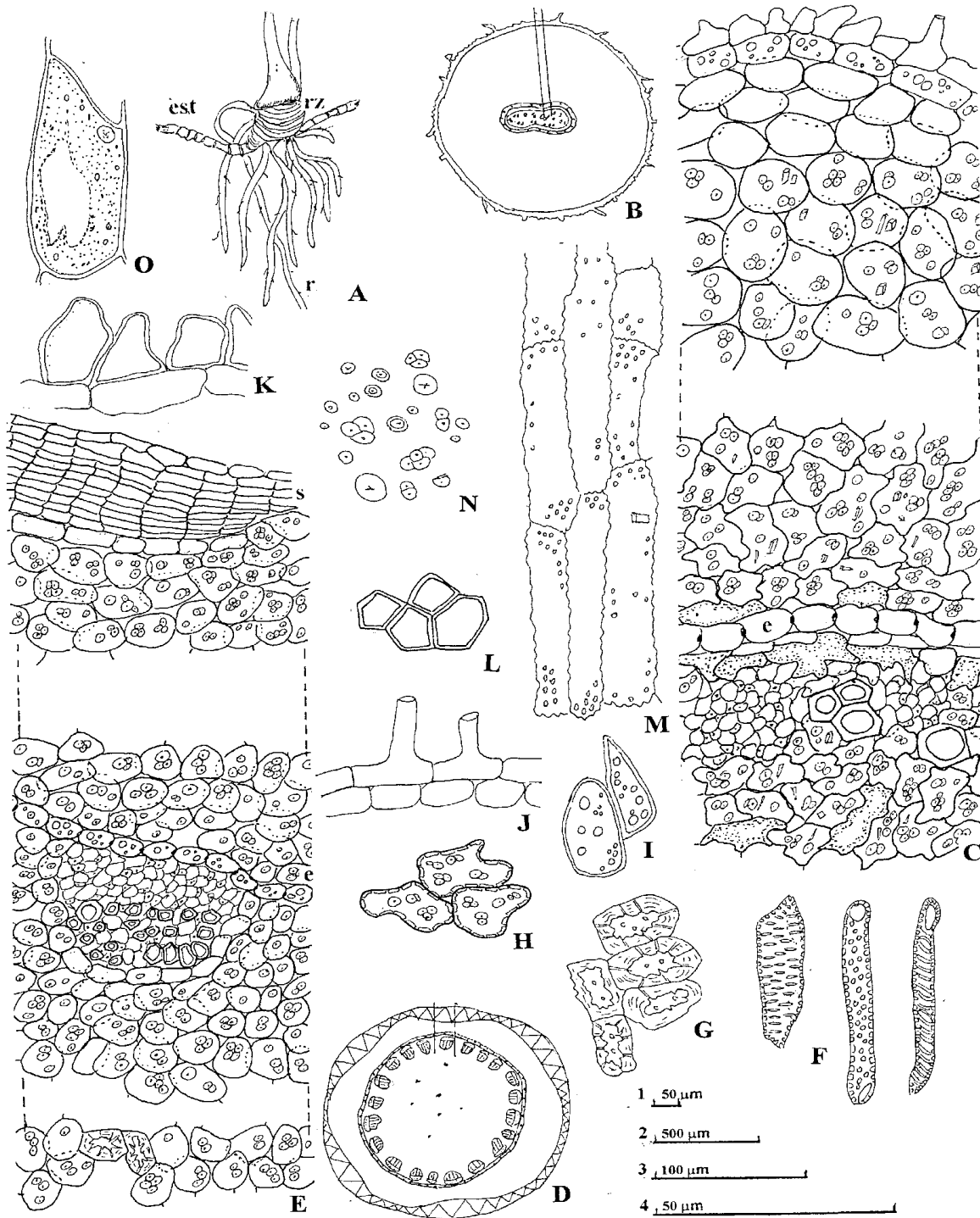
$$11,51(r_V/r_E)(P_E/P_M)$$

en la cual r_V es la respuesta del pico correspondiente a ácido acetoxivalerénico en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra*; r_E es la respuesta del pico correspondiente a dantrón en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación estándar*; P_E es la masa de dantrón en gramos empleada para preparar la *Preparación estándar*; y P_M es la masa de la droga analizada en gramos empleada para preparar la *Preparación muestra*.

Calcular el porcentaje de ácido valerénico en la *Preparación muestra*, por la fórmula siguiente:

$$8,09(r_A/r_E)(P_E/P_M)$$

en la cual r_A es la respuesta del pico correspondiente a ácido valerénico en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* y los demás términos son los anteriormente descriptos.



Valeriana officinalis L., A-O: A, morfología externa de la parte usada. B, representación esquemática de la sección transversal de la raíz. C, detalle de lo indicado en B. D, representación esquemática de la sección transversal del rizoma, E, detalle de lo indicado en D. F, vasos escalariformes, espiralados y punteados. G, macroesclereidas de la médula del rizoma adulto. H-I, células parenquimáticas. H, con almidón. I, con aceites. J-K, rizodermis. J, con pelos radicales rotos. K, risodermis de células papilosas. L, fragmento del súber del rizoma en vista superficial. M, endodermis del rizoma en vista longitudinal tangencial. N, grano de almidón. O, idioblasto. e, endodermis; est, estolón; h, hipodermis; i, idioblasto; r, raíz; rz, rizoma. Las reglillas corresponden a: 1 a B; 2 a D; 3 a F-I; 4 a J-O.

YERBA MATE, hoja y tallo

Definición - Yerba Mate está constituida por hojas y tallos jóvenes procesados, desecados y fragmentados de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. var. *paraguariensis* (Aquifoliaceae). Debe contener no menos de 0,8 por ciento de cafeína, calculado sobre la sustancia seca, y no más del 10,0 por ciento de tallos. Yerba Mate debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados, en un sitio seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - La hoja de Yerba Mate es cortamente peciolada, oval cuneiforme, atenuada hacia el pecíolo, con borde aserrado, de 10 cm de largo y 4 cm de ancho. Nervadura media prominente en la cara inferior y con 5 ó 6 nervaduras secundarias en cada semilimbo. Tallos con corteza lisa de color grisáceo.

B - Características microscópicas - La lámina en vista superficial presenta la epidermis superior con células de contornos rectos con cutícula gruesa, ornamentada, sin estomas; la epidermis inferior con células de paredes levemente onduladas; estomas ciclocíticos y abundantes hidatodes. En ambas epidermis se observan escasos pelos tectores unicelulares, simples. En corte transversal el mesófilo está constituido por parénquima en empalizada, con células dispuestas en 3 capas, y por parénquima esponjoso bractiforme. En ambos parénquimas se observan células con drusas de oxalato de calcio.

El sistema vascular de la nervadura principal presenta un haz anfibasal rodeado por una vaina completa de fibras esclerenquimáticas.

Índice de estomas: 6.89 (10.13) 15.50

Índice de empalizada: 2.50 (3.00) 4.50

Los tallos en corte transversal presentan un parénquima cortical, con drusas de oxalato de calcio, una vaina de fibras esclerenquimáticas que rodea al floema y al xilema, y un parénquima medular en el que se observan células con cristales simples y drusas de oxalato de calcio.

C - Droga en polvo - Polvo verde claro a oscuro. Se observan numerosos fragmentos de epidermis superior, sin estomas, e inferior, con numerosos estomas e hidatodes, y células del parénquima en empalizada y esponjoso bractiforme, con drusas de oxalato de calcio. Fibras

esclerenquimáticas, células pétreas, vasos anillados y punteados, cristales simples y drusas de oxalato de calcio y fragmentos de súber provenientes del tallo.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. Cromatografía) recubierta de gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Acetato de etilo, agua, ácido acético y ácido fórmico (100:26:11:11) [NOTA: preparar inmediatamente antes de su uso].

Solución estándar - Disolver 2 mg de ácido clorogénico y 2 mg de rutina en 10 ml de metanol.

Solución muestra - A 1 g de Yerba Mate reducida a polvo fino, agregar 10 ml de metanol, calentar en baño de agua a 60° C durante 5 minutos y filtrar.

Revelador - Reactivo de Productos naturales-polietilenglicol.

Procedimiento - Aplicar por separado, en bandas, 5 µl de la *Solución estándar* y 20 y 40 µl de la *Solución muestra*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente de solvente haya recorrido aproximadamente las tres cuartas partes de la placa. Retirar la placa de la cámara y dejar secar. Pulverizar con *Revelador* y dejar secar. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 365 nm. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar* debe presentar una banda de fluorescencia anaranjada correspondiente a rutina con un valor de R_f de 0,40 y otra banda de fluorescencia celeste correspondiente al ácido clorogénico con un valor de R_f de 0,47. El cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* debe presentar dos bandas que se correspondan en posición y fluorescencia a las obtenidas con la *Solución estándar*. El cromatograma de la *Solución muestra* puede presentar una banda anaranjada con un valor de R_f de 0,62 y bandas de fluorescencia celeste verdosa con valores de R_f de 0,52 y 0,80.

Cenizas totales (Ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

No más de 9 %.

Control higiénico (Ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Materia extraña (Ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe contener no más de 1% de materias extrañas.

Pérdida por secado (Ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe perder no más de 9,5 % determinado sobre 2,0 g de droga por desecación en estufa a una temperatura comprendida entre 100 y 105 °C durante 2 horas.

Residuo de pesticidas (Ver 630. *Métodos de farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Límites de metales pesados <590>

Método I. No más de 0,001 %.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un cromatógrafo de líquidos equipado con un detector ultravioleta ajustado a 273 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosa de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0-10	83 → 80	17 → 20
10-15	80	20
15-25	80 → 77	20 → 23
25-30	77 → 0	23 → 100

Solución A - Agua y ácido acético (98:2).

Solución B - Metanol y ácido acético (98:2).

Preparación estándar - Pesar exactamente alrededor de 10 mg de *Cafeína*, transferir a un

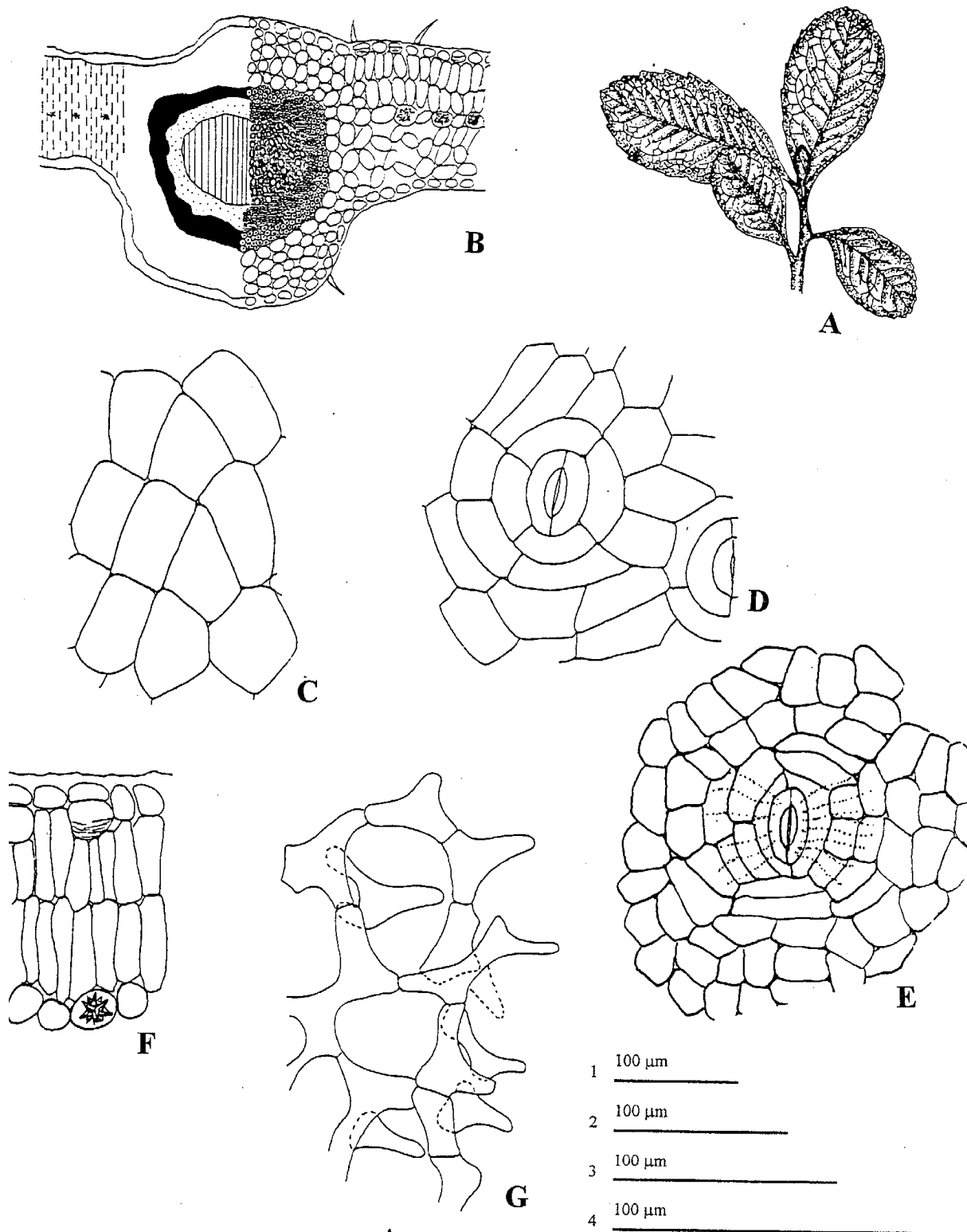
matraz aforado de 50 ml, agregar 30 ml de una mezcla metanol y agua (7:3) y agitar hasta disolver. Completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 50 ml y completar a volumen con el mismo solvente.

Preparación muestra - Reducir a polvo fino aproximadamente 50 g de Yerba Mate y pesar exactamente alrededor de 5,0 g de polvo. Transferir a un balón de 100 ml, agregar 70 ml de agua y unos trozos de material poroso y calentar a ebullición en un baño de agua a reflujo durante 20 minutos. Enfriar a una temperatura comprendida entre 40 y 45 °C, filtrar y transferir a un matraz aforado de 100 ml. Completar a volumen con agua. Transferir 5,0 ml del extracto obtenido a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con una mezcla de metanol y agua (7:3).

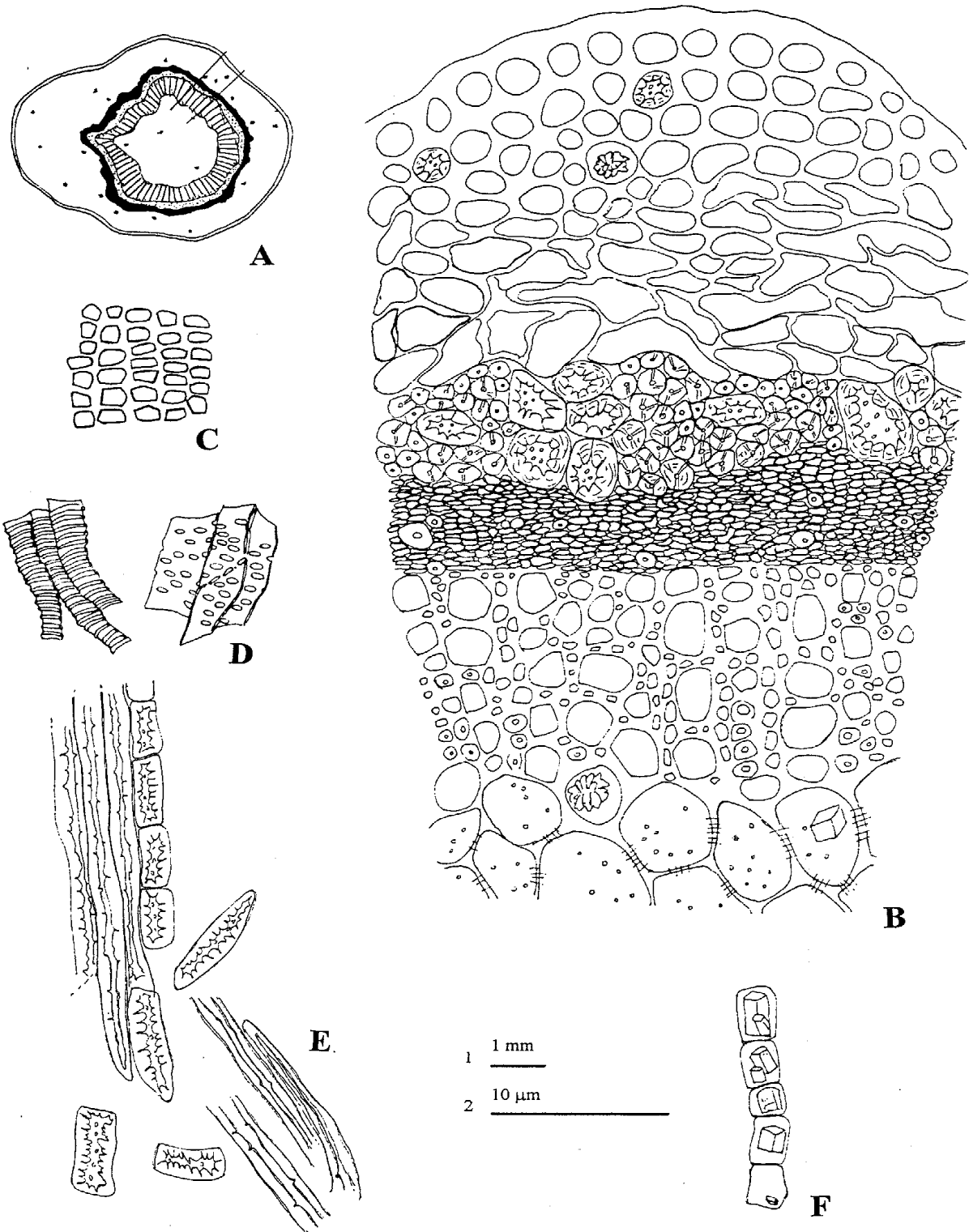
Procedimiento - Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos correspondientes a cafeína. Calcular la cantidad en porcentaje de cafeína contenido en la porción de Yerba Mate en ensayo a partir de la fórmula siguiente:

$$100(P_E/P_M)(r_M/r_E)$$

en la cual P_E es el peso en gramos de cafeína en la *Preparación estándar*, P_M es el peso en gramos de la porción de la muestra en ensayo, y r_M y r_E son las respuestas de los picos de cafeína en la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* respectivamente.



Ilex paraguariensis St. Hil. var. *paraguariensis*. A-G, Hoja. A, morfología. B, sección transversal de la lámina. C-G: droga en polvo, C-E: vista superficial de la epidermis, C, superior; D, inferior; E, hidatode. F-G: parénquimas: F, en empalizada; G, esponjoso. Las reglillas corresponden a 1 a B; 2 a C, D y G; 3 a E; 4 a F.



Ilex paraguariensis St. Hil. var. *paraguariensis*. A-F, Tallo. A-B, sección transversal, A, esquema; B, detalle de lo indicado en A. C-F: droga en polvo, C, súber; D, porción de vasos anillados y escalariformes del xilema; E, fibras y esclereidas; F, porción de fibras cristalíferas. Las reglillas corresponden a 1 a A; 2 a B-F.

HEMODERIVADOS

APARTADO DE HEMODERIVADOS

ÍNDICE

Métodos Generales de Análisis

<385> - Ensayos en Hemoderivados

Monografías

Albúmina Humana, Solución

Antitrombina III Humana, Concentrado

Complejo Protrombínico Humano

Factor VII de Coagulación Humano, Liofilizado

Factor VIII de Coagulación Humano

Factor IX de Coagulación Humano

Inmunoglobulina Humana anti Hepatitis B

Inmunoglobulina Humana anti Hepatitis B, para Administración Intravenosa

Inmunoglobulina Humana Normal

Inmunoglobulina Humana Normal, para Administración Intravenosa

Inmunoglobulina Humana Antitetánica

Plasma Humano para Fraccionamiento

385. ENSAYOS EN HEMODERIVADOS

VALORACIÓN DE ANTITROMBINA III HUMANA

Estimar la potencia del Concentrado de Antitrombina III Humana por comparación de su habilidad para inactivar trombina en presencia de un exceso de heparina con la misma habilidad de una sustancia de referencia de antitrombina III humana calibrada en UI. Mezclar cantidades variables de antitrombina III con una cantidad dada de trombina y determinar el remanente de trombina mediante un sustrato cromogénico apropiado.

La Unidad Internacional es la actividad de antitrombina III de una cantidad establecida de Patrón Internacional de antitrombina III. La equivalencia en Unidades Internacionales del Patrón Internacional la establece la Organización Mundial de la Salud.

Aplicar la siguiente técnica.

Soluciones reguladoras - Emplear Tris-EDTA pH 8,4 y Tris-EDTA BSA pH 8,4 (ver *Soluciones reguladoras en Reactivos y Soluciones*).

Solución reguladora para dilución - Preparar una solución de Tris-EDTA BSA pH 8,4 que contenga 15 UI de heparina por ml.

Solución de trombina bovina - Preparar una solución que contenga 2 UI de trombina bovina por ml de solución reguladora Tris-EDTA BSA pH 8,4.

Sustrato cromogénico - *D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida* reconstituido en agua para obtener una solución 4 mmol por litro.

Preparación estándar - Diluir la sustancia de referencia de antitrombina III humana calibrada en UI con *Solución reguladora para dilución* para obtener una solución que contenga una 1 UI de antitrombina III por ml. Realizar por duplicado y en forma independiente por lo menos tres diluciones en el rango de 1/75 a 1/200 en progresión geométrica o aritmética utilizando la misma *Solución reguladora*.

Preparación muestra - Diluir El Concentrado de Antitrombina III Humana con *Solución reguladora* para obtener una solución que contenga 1 UI de antitrombina III por ml. Realizar por duplicado y en forma independiente por lo menos tres diluciones en el rango de 1/75 a 1/200 en progresión geométrica o aritmética utilizando la misma *Solución reguladora*.

Procedimiento - Según el ensayo se realice en tubos o en microplacas, ajustar los volúmenes de manera que se mantengan las proporciones de la mezcla. Realizar dos reacciones de cada dilución.

Precalear 200 μ l de cada dilución de la *Preparación muestra* y de la *Preparación estándar* a 37 °C durante 1 a 2 minutos. Agregar a cada dilución 200 μ l de *Solución de trombina bovina*, mezclar y mantener a 37 °C durante 1 minuto. Agregar 500 μ l de *Sustrato cromogénico* diluido hasta una concentración apropiada para el ensayo usando solución reguladora Tris-EDTA BSA pH 8,4 (sin albúmina). Medir inmediatamente el cambio de las absorbancias a 405 nm durante al menos 30 segundos. Calcular el valor de $\Delta A/\text{min}$. Alternativamente puede llevarse a cabo un ensayo de punto final deteniendo la reacción con ácido acético y midiendo la absorbancia a 405 nm o también es posible detener la reacción de hidrólisis tras un intervalo apropiado bajando el pH mediante el agregado de un reactivo apropiado, como ácido acético al 50 %v/v o una solución de citrato 1 M a pH 3. El valor de cambio de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$) o A es inversamente proporcional a la actividad de antitrombina III. Calcular la potencia de la muestra a examinar y comprobar la validez del ensayo empleando los métodos estadísticos habituales (ver 10. *Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*).

VALORACIÓN DE HEPARINA EN FACTORES DE COAGULACIÓN

El método para determinar la actividad de heparina en factores de coagulación es un ensayo cromogénico en el cual se estima su actividad por su efecto inhibitorio sobre el factor Xa (actividad anti-Xa). La potencia de heparina se estima comparando su actividad inhibitoria con un Patrón Internacional o Patrón Nacional calibrado en Unidades Internacionales.

La Unidad Internacional es la actividad de heparina en una cantidad establecida de patrón Internacional. La equivalencia en Unidades Internacionales del Patrón Internacional la establece la Organización Mundial de la Salud.

El método cromogénico de valoración consiste en los siguientes pasos: la formación del complejo heparina-antitrombina III, en el cual se debe asegurar un exceso de antitrombina III en el medio en el que se produce la reacción, la formación del complejo heparina antitrombina III-factor Xa, en el cual el factor Xa debe estar en exceso, y el clivaje enzimático de un sustrato cromogénico específico para factor Xa (residual) para dar un cromóforo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. Bajo condiciones adecuadas, existe una relación

inversamente proporcional entre la actividad de heparina y el clivaje del sustrato cromogénico.

Reactivos

Solución reguladora para diluciones - Solución de 6,05 g por litro de Tris(hidroximetil)aminometano, si es necesario, ajustar el pH a 8,4 con ácido clorhídrico.

Sustrato cromogénico del factor Xa - Un sustrato cromogénico específico para factor Xa tal como cloruro de *N*-benzoil-*L*-isoleucil-*L*-glutamil-glicil-*L*-arginina-4-nitroanilida. Reconstituir según se indica en el rótulo.

Solución de antitrombina III

Solución de factor Xa bovino

Plasma humano normal

Preparación estándar - Diluir con *Solución reguladora para diluciones* para obtener una solución de 0,1 UI por ml de heparina.

Preparación muestra - Diluir la preparación en ensayo con *Solución reguladora para diluciones* para obtener una solución de 0,1 UI de heparina por ml.

Procedimiento - Las siguientes condiciones de trabajo se aplican a placas de 96 pocillos. Si el ensayo es llevado a cabo en tubos, los volúmenes deben ser ajustados manteniendo la proporción en la mezcla. Inmediatamente antes de iniciar el ensayo, calentar todas las soluciones en un baño de agua a 37 °C. Distribuir en una serie de tubos o pocillos de la placa, preferentemente por duplicado, 20 µl de *Plasma humano normal* y 20 µl de *Solución de antitrombina III*. Agregar a los tubos o pocillos volúmenes crecientes en progresión aritmética (por ejemplo 20 µl, 60 µl, 100 µl y 140 µl) de la *Preparación muestra* o la *Preparación estándar* y completar a un volumen final de 200 µl empleando *Solución reguladora para diluciones* (0,02 a 0,08 UI por ml de heparina en la mezcla final de reacción). Las concentraciones se pueden modificar si con ellas se obtienen una mejor linealidad en la relación dosis-respuesta. Transferir 40 µl de cada tubo o pocillo a una segunda serie de los pocillos, agregar 20 µl de *Solución de factor Xa bovino* e incubar a 37 °C durante 30 segundos.

Método de punto final - Agregar 40 µl de una solución 1 mmol por litro de *Sustrato cromogénico del factor Xa* e incubar a 37 °C durante 3 minutos. Finalizar la reacción disminuyendo el pH por agregado de un reactivo adecuado tal como una solución al 20 % v/v de ácido acético glacial y medir la absorbancia (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*) a 405 nm. En general, los tiempos de reacción están comprendidos entre 3 y 15 minutos, pero se admiten variaciones si así se obtiene una

mejora en la linealidad de la relación dosis-respuesta.

Método cinético - Agregar 40 µl de una solución 2 mmol por litro de *Sustrato cromogénico del factor Xa*, incubar a 37 °C y cuantificar la velocidad de liberación del sustrato, que debe ser inversamente proporcional a la concentración de heparina, midiendo en un espectrofotómetro el cambio de absorbancia a una longitud de onda apropiada por monitoreo continuo de la absorbancia. Determinar la velocidad de cambio de absorbancia a 405 nm continuamente por un período de tiempo y obtener la velocidad media del cambio de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$).

Comprobar la validez del ensayo y calcular la actividad de heparina en la preparación a examinar por los métodos estadísticos habituales para un ensayo de relación de pendientes (ver 10. *Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*).

FACTORES DE COAGULACIÓN ACTIVADOS

[NOTA: cuando corresponda, determinar la cantidad de heparina presente y neutralizarla por agregado de sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutralizan 1 UI de heparina).]

Preparar diluciones 1 en 10 y 1 en 100 de la preparación en ensayo empleando una solución reguladora tris(hidroximetil)aminometano pH 7,5 (ver *Soluciones reguladoras* en *Reactivos* y *Soluciones*). Colocar en un baño de agua a 37 °C una serie de tubos de poliestireno y agregar a cada tubo 0,1 ml de plasma pobre en plaquetas y 0,1 ml de una dilución apropiada de cefalina o sustituto de plaquetas. Dejar en reposo durante 60 segundos. Agregar a cada tubo 0,1 ml de una de las diluciones o 0,1 ml de solución reguladora (tubo control). Inmediatamente agregar a cada tubo 0,1 ml de una solución de cloruro de calcio 3,7 g por litro (precalentada a 37 °C) y medir el tiempo que transcurre entre el agregado del cloruro de calcio y la formación de un coágulo. El ensayo debe realizarse en un tiempo no mayor a 30 minutos luego de haber realizado la dilución original. El ensayo solo es válido si el tiempo de coagulación medido para el tubo control esté entre 200 y 350 segundos.

VALORACIÓN DEL FACTOR II DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA

El método para determinar la actividad de factor II de coagulación es un ensayo cromogénico en el cual se determina la actividad de factor II a través de su activación específica y formación de factor IIa. La potencia de la preparación de factor II se estima comparando su actividad con un Patrón

Internacional o una sustancia de referencia calibrada en Unidades Internacionales.

La Unidad Internacional es la actividad de factor II de una cantidad establecida de Patrón Internacional que consiste en un concentrado liofilizado de factor II humano. La equivalencia en Unidades Internacionales del Patrón Internacional la establece la Organización Mundial de la Salud.

El método cromogénico de valoración consiste en dos pasos: la activación del factor II a factor IIa dependiente de veneno de serpiente y el clivaje enzimático de un sustrato cromogénico específico para factor IIa, para dar un cromóforo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. Bajo condiciones adecuadas, existe una relación lineal entre la actividad del factor IIa y el clivaje del sustrato cromogénico.

Reactivos

Solución reguladora para dilución - Solución que contiene 6,06 g por litro de Tris(hidroximetil)aminometano, 17,53 por litro de cloruro de sodio, 2,79 g por litro de ácido (etilendinitrilo)tetracético y 1 g por litro de albúmina bovina o albúmina humana. Ajustar a pH 8,4 si fuera necesario, con ácido clorhídrico.

Veneno de víbora específico para activar factor II (Ecarina) - Se trata de una proteína derivada del veneno de víbora (*Echis carinatus*) que activa específicamente el factor II. Reconstituir y almacenar según se indica en el rótulo.

Sustrato cromogénico para Factor IIa - Sustratos cromogénicos específicos para factor IIa tales como: *H-D*-fenilalanil-*L*-pipecolil-*L*-arginina-4-nitroanilida clorhidrato, 4-toluensulfonil-glicilprolil-*L*-arginina-4-nitroanilida, *H-D*-ciclohexilglicil- α -aminobutiril-*L*-arginina-4-nitroanilida, diacetato de *D*-ciclohexilglicil-*L*-alanil-*L*-arginina-4-nitroanilida. Reconstituir según se indica en el rótulo.

Preparación estándar - Diluir con *Solución reguladora para dilución* para obtener una solución entre 0,015 y 0,16 UI por ml de factor II. Preparar, preferentemente por duplicado y en forma independiente, al menos tres diluciones en progresión geométrica o aritmética empleando el mismo solvente.

Preparación muestra - Diluir con *Solución reguladora para dilución* para obtener una solución entre 0,015 y 0,16 UI por ml de factor II. Preparar, preferentemente por duplicado y en forma independiente, al menos tres diluciones en progresión geométrica o aritmética empleando el mismo solvente.

Procedimiento - Precalentar todas las soluciones en un baño de agua a 37 °C inmediatamente antes de realizar el ensayo. Las siguientes condiciones de ensayo se utilizan para placas de

96 pocillos, si el ensayo se lleva a cabo en tubos, se deben ajustar los volúmenes de manera que se mantengan las proporciones de la mezcla; se deben realizar dos reacciones de cada dilución. En una placa de 96 pocillos mantenida a 37 °C, agregar por duplicado 25 μ l de cada dilución de la *Preparación muestra* o la *Preparación estándar* a cada uno de los pocillos. Agregar 125 μ l de solución reguladora a cada pocillo, luego 25 μ l de *Veneno de víbora específico para activar factor II* e incubar durante exactamente 2 minutos. A cada pocillo agregar 25 μ l de *Sustrato cromogénico para Factor IIa*. Se admiten modificaciones de volúmenes de los reactivos si con ellas se obtiene una mejor linealidad en la relación dosis-respuesta. Determinar la velocidad de cambio de absorbancia (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*) a 405 nm de forma continua durante 3 minutos y obtener el promedio de velocidad de cambio de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$). Si no se puede medir en forma continua, leer la absorbancia a 405 nm a intervalos consecutivos adecuados, durante 40 segundos, graficar la absorbancia en función del tiempo y calcular $\Delta A/\text{min}$ como la pendiente de la recta. El método se puede adaptar a una reacción de punto final deteniendo la reacción de hidrólisis tras un intervalo apropiado bajando el pH por adición de un reactivo apropiado como ácido acético (50 % v/v) o una solución de citrato 1M a pH 3. Ajustar el tiempo de hidrólisis para conseguir un incremento lineal del cromóforo a lo largo del tiempo. Con los valores de $\Delta A/\text{min}$ o de A de cada dilución tanto de muestra como de estándar, calcular la potencia de la muestra a examinar y comprobar la validez del ensayo empleando los métodos estadísticos habituales (ver 10. *Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*).

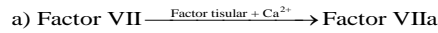
VALORACIÓN DEL FACTOR VII DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA

El método para determinar la actividad de factor VII de coagulación es un ensayo cromogénico en el cual se determina su actividad biológica como complejo factor VIIa-factor tisular en la activación del factor X en presencia de iones calcio y fosfolípidos. La potencia de la preparación de factor VII se estima comparando la cantidad necesaria para alcanzar una cierta velocidad de formación del factor Xa en una mezcla que contiene las sustancias que intervienen en la activación del factor X y la cantidad de Patrón Internacional o de una preparación de referencia, calibrada en Unidades Internacionales, requerida para producir la misma velocidad de formación de factor Xa. La Unidad Internacional se define como la actividad del factor VII de una cantidad establecida de Patrón Internacional, que consiste en un concentrado de factor VII huma-

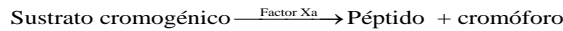
no liofilizado. La equivalencia en Unidades Internacionales del Patrón Internacional la establece la Organización Mundial de la Salud.

El método cromogénico consta de dos pasos consecutivos: la activación del factor VII a factor VIIa, por medio del factor tisular y calcio, la activación de factor X a factor Xa por la presencia de factor VIIa, calcio fosfolípidos y factor tisular y el

Etapa 1:



Etapa 2:



En ambas etapas se utilizan reactivos que pueden ser obtenidos comercialmente. La composición de cada reactivo puede estar sujeta a alguna variación, sus características esenciales se describen en las siguientes especificaciones: los reactivos contienen proteínas purificadas de origen humano o bovino. Éstas incluyen factor X, factor tisular y fosfolípidos como activador del factor VII. Estas proteínas están parcialmente purificadas y no deben contener impurezas que interfieran en la activación del factor VII o del factor X. El factor X está presente en cantidades cuya concentración final durante el primer paso del ensayo esta comprendida entre 10 y 350 nmol por litro (preferentemente de 14 a 70 nmol por litro). Tromboplastina de origen natural (cerebro bovino o de conejo) o de origen sintético, se puede usar como fuente de factor tisular y fosfolípidos. La Tromboplastina adecuada para uso en la determinación del tiempo de protrombina se diluye entre 1 en 5 y 1 en 50 en una solución reguladora tal que la concentración final de Ca^{2+} este comprendida entre 15 y 25 nmol por litro. La formación final de factor Xa es realizada en una solución que contiene albúmina humana o bovina con una concentración tal que no se produzca pérdida por adsorción y que está apropiadamente regulada a pH entre 7,3 y 8,0. En la mezcla de incubación final, el factor VII debe ser el único componente limitante de la velocidad y cada componente del reactivo no debe tener capacidad de generar el factor Xa por sí mismo.

La segunda etapa comprende la cuantificación del factor Xa por medio de un sustrato cromogénico específico para el factor Xa. Este sustrato generalmente consiste de un péptido corto que tiene entre 3 y 5 aminoácidos, unido a un grupo cromóforo. Cuando se cliva este grupo del péptido sustrato, se produce un cambio de absorbancia a una longitud de onda apropiada que permite su cuantificación

segundo paso es el clivaje enzimático de un sustrato cromogénico específico para el factor Xa, para dar un cromóforo que se puede cuantificar espectrofotométricamente. En las condiciones adecuadas, existe una relación lineal entre la velocidad de formación del factor Xa y la concentración del factor VII. El ensayo se resume en el siguiente esquema:

espectrofotométrica. El sustrato se disuelve normalmente en agua y se utiliza a una concentración final entre 0,2 y 2 mmol por litro. El sustrato puede contener también inhibidores para detener la formación adicional de factor Xa (adición de edetato).

Preparación estándar - Reconstituir el contenido completo de una ampolla de la preparación con el agregado de una cantidad apropiada de agua; emplear las preparaciones reconstituidas dentro de la hora de su preparación. Realizar una dilución con suficiente prediluyente para obtener una solución que contenga entre 0,5 UI y 2,0 UI de factor VII por mililitro. Preparar las diluciones posteriores empleando una solución reguladora isotónica y no quelante que contenga 1 % de albúmina humana o bovina, regulada entre pH 7,3 y 8,0. Preparar preferentemente por duplicado y en forma independiente por lo menos tres diluciones en progresión geométrica o aritmética. Las diluciones deben prepararse de forma tal que la concentración final de factor VII esté por debajo de 0,005 UI por ml.

Preparación muestra - Reconstituir el contenido completo de la ampolla según se indica en el rótulo. Emplear las preparaciones reconstituidas dentro de la hora de su preparación. Hacer una dilución con suficiente prediluyente para obtener una solución que contenga entre 0,5 UI y 2,0 UI de factor VII por mililitro. Preparar las diluciones posteriores empleando una solución reguladora isotónica y no quelante que contenga 1 % de albúmina humana o bovina, regulada entre pH 7,3 y 8,0. Preparar preferentemente por duplicado y en forma independiente por lo menos tres diluciones en progresión geométrica o aritmética. Las diluciones deben prepararse de forma tal que la concentración final de factor VII esté por debajo de 0,005 UI/ml.

Procedimiento - Preparar una solución control que incluya todos los componentes exceptuando el factor VII (blanco).

[NOTA: preparar todas las diluciones en tubos de plástico y usarlas dentro de la hora de su preparación; se deben realizar al menos dos reacciones de cada dilución.]

Etapas 1. Mezclar las diluciones de la preparación de referencia del factor VIII y de la preparación a examinar con un volumen apropiado del reactivo de factor de coagulación precalentado o con una combinación de sus constituyentes separados, e incubar la mezcla en tubos de plástico o en pocillos de microplaca a 37 °C. Las concentraciones de los diversos componentes durante la formación del factor Xa deben ser las especificadas en la descripción de los reactivos. Dejar que la activación del factor X proceda durante un tiempo apropiado, terminando la reacción antes de que la concentración del factor Xa alcance su nivel máximo, con el fin de obtener una relación lineal satisfactoria entre dosis y respuesta. Los tiempos adecuados de activación están normalmente entre 2 y 5 minutos, pero se admiten desviaciones si con ellas se obtiene mejor linealidad de la relación dosis-respuesta.

Etapas 2. Determinar el factor Xa por adición de un reactivo precalentado que contenga el sustrato cromogénico. Cuantificar la velocidad de liberación del sustrato, que debe ser proporcional a la concentración del factor Xa formado, midiendo en un espectrofotómetro el cambio de absorbancia a una longitud de onda apropiada por monitoreo continuo de la absorbancia. Determinar la velocidad de cambio de absorbancia a 405 nm continuamente por un período de tiempo y obtener la velocidad media del cambio de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$) o detener la reacción de hidrólisis por disminución del pH a 3, con un reactivo tal como ácido acético (500 g por litro) o solución de citrato 1 M tras un intervalo de tiempo apropiado (A). Ajustar el tiempo de hidrólisis de modo tal de alcanzar un desarrollo lineal del cromóforo con el tiempo. En general los tiempos de hidrólisis suelen estar entre 3 y 15 minutos, pero

se admiten variaciones si así se obtiene una mejora en la linealidad de la relación dosis-respuesta.

Comprobar la validez del ensayo y calcular la potencia de la preparación a examinar empleando los métodos estadísticos habituales (ver 10. *Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*).

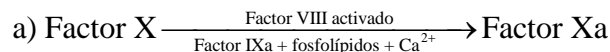
VALORACIÓN DEL FACTOR VIII DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA

El método para determinar la actividad de factor VIII es un ensayo cromogénico en el cual se determina su actividad biológica como cofactor en la activación del factor X por el factor IX activado (factor IXa) en presencia de iones calcio y fosfolípidos. La potencia de la preparación del factor VIII se estima comparando la cantidad necesaria para alcanzar una cierta velocidad de formación del factor Xa en una mezcla de reacción que contiene las sustancias que intervienen en la activación del factor X y la cantidad de un Patrón Internacional o de una preparación de referencia calibrada en Unidades Internacionales, requerida para producir el mismo efecto.

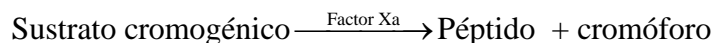
La Unidad Internacional es la actividad del factor VIII de una cantidad establecida de Patrón Internacional, que consiste en concentrado de factor VIII humano liofilizado. La equivalencia en Unidades Internacionales del Patrón Internacional la establece la Organización Mundial de la Salud.

El método cromogénico consta de dos pasos consecutivos: la activación del factor X a factor Xa que depende del factor VIII y el clivaje enzimático de un sustrato cromogénico específico para el factor Xa, produciendo un cromóforo que se puede cuantificar espectrofotométricamente. En las condiciones adecuadas, existe una relación lineal entre la velocidad de formación del factor Xa y la concentración del factor VIII. El resumen del ensayo se indica en el siguiente esquema:

Etapas 1:



Etapas 2:



En ambas etapas se utilizan reactivos que pueden ser obtenidos comercialmente. La composición de cada reactivo puede estar sujeta a alguna variación, sus características esenciales se describen en la siguiente especificación: pueden permitirse cier-

tas desviaciones de esta descripción únicamente si se ha comprobado, usando el Patrón Internacional de factor VIII, que los resultados obtenidos no difieren significativamente.

[NOTA: es importante demostrar por la validación, la adecuabilidad del kit usado, chequeando el tiempo de generación de factor X para determinar el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de la generación máxima de factor X.]

Reactivo factor de coagulación - Contiene proteínas purificadas de origen humano o bovino. Estas incluyen el factor X, factor IXa, y un activador del factor VIII usualmente trombina. Estas proteínas parcialmente purificadas, al menos hasta el 50 %, no contienen impurezas que interfieren con la activación del factor VIII o del factor X. La trombina puede estar presente en su forma precursora protrombina, siempre que su activación en el reactivo sea suficientemente rápida para provocar la activación completa y prácticamente instantánea del factor VIII durante el ensayo. Los fosfolípidos se pueden obtener de un sustrato natural o pueden prepararse por síntesis, pero deben contener una proporción importante, de fosfatidilserina. Los componentes del reactivo completo suelen encontrarse separados en al menos dos reactivos distintos, carentes de la capacidad de formar el factor Xa por sí solos. Uno de los reactivos contiene iones calcio. Después de la reconstitución, éstos se pueden combinar, siempre que se pruebe que no se generan cantidades significativas de factor Xa en ausencia del factor VIII. En la mezcla de incubación final, el factor VIII debe ser el único componente limitante de la velocidad.

El segundo paso comprende la cuantificación del factor Xa formado, empleando un sustrato cromogénico específico para el factor Xa. Generalmente consiste en un péptido corto derivatizado, de entre 3 y 5 aminoácidos, unido a un grupo cromóforo. Cuando se cliva este grupo a partir del péptido sustrato, se produce un cambio de absorbancia a una longitud de onda apropiada que permite su cuantificación espectrofotométrica. El sustrato debe contener también inhibidores apropiados para detener la formación adicional del factor Xa (por ejemplo agentes quelantes) y suprimir la actividad de la trombina.

Prediluyente - Consiste de plasma de un paciente con hemofilia A grave, o de un reactivo preparado artificialmente que contenga suficiente factor von Willebrand y que de resultados que no difieren significativamente de los obtenidos empleando plasma hemofílico en las preparaciones patrón y problema. Los materiales prediluidos deben ser estables durante un tiempo superior al requerido para el ensayo.

Preparación estándar - Reconstituir el contenido de la ampolla mediante el agregado de una cantidad apropiada de agua; usar inmediatamente.

Realizar una dilución con suficiente cantidad de *Prediluyente* para obtener una solución que contenga entre 0,5 y 2,0 Unidades Internacionales por mililitro. Preparar las siguientes diluciones de la preparación estándar empleando una solución isotónica regulada, no quelante que contenga 1 % de albúmina humana o bovina, por ejemplo, tris(hidroximetil)aminometano o imidazol. Preparar preferentemente por duplicado y en forma independiente por lo menos tres diluciones en progresión geométrica o aritmética. La concentración final del factor VIII deberá ser inferior a 0,01 UI por ml durante el paso de formación del factor Xa.

Preparación muestra - Reconstituir el contenido de la ampolla según se indica en el rótulo y emplear inmediatamente. Realizar una dilución con suficiente cantidad de *Prediluyente* para obtener una solución que contenga entre 0,5 y 2,0 UI por mililitro. Preparar las siguientes diluciones empleando una solución isotónica regulada, no quelante que contenga 1 % de albúmina humana o bovina, por ejemplo, tris(hidroximetil)aminometano o imidazol. Preparar preferentemente por duplicado y en forma independiente por lo menos tres diluciones en progresión geométrica o aritmética. La concentración final del factor VIII en la mezcla reacción deberá ser inferior a 0,01 UI por ml durante el paso de formación del factor Xa.

Procedimiento - Preparar una solución blanco que incluya todos los componentes excepto el factor VIII. [NOTA: preparar todas las diluciones en tubos de plástico y emplearlas inmediatamente. Se debe realizar al menos dos replicas de cada dilución.]

Etapas 1. Mezclar las diluciones precalentadas de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra* con un volumen apropiado de *Reactivo factor de coagulación*, también precalentado, o con la combinación de sus constituyentes separados. Incubar en tubos de plástico o en pocillos de microplaca a 37 °C. Las concentraciones de los distintos componentes durante la formación del factor Xa deben ser las especificadas anteriormente en la descripción de los reactivos. Permitir que la activación del factor X proceda durante un tiempo apropiado, terminando la reacción (Etapa 2) cuando la concentración del factor Xa alcance aproximadamente el 50 % del nivel máximo. Los tiempos de activación están normalmente entre 2 y 5 min.

Etapas 2. Determinar el factor Xa por agregado del sustrato cromogénico precalentado. Cuantificar la proporción de sustrato escindido, que debe ser lineal con respecto a la concentración del factor Xa formado, midiendo en un espectrofotómetro el cambio de absorbancia a una longitud de onda apropiada. Puede registrarse la absorbancia de

modo continuo, por medio de la lectura de la velocidad de cambio de absorbancia a 405 nm continuamente por un período de tiempo y obtener la velocidad media del cambio de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$) o también es posible detener la reacción de hidrólisis tras un intervalo apropiado bajando el pH por adición de un reactivo apropiado, como ácido acético al 50 % v/v o una solución de citrato (1 mol por litro), a pH 3. Ajustar el tiempo de hidrólisis para conseguir un incremento lineal del cromóforo a lo largo del tiempo. Los tiempos adecuados de hidrólisis suelen estar entre 3 y 15 min, pero se admiten variaciones si con ellas se obtiene una mejor linealidad en la reacción dosis-respuesta.

Comprobar la validez del ensayo y calcular la potencia de la preparación a examinar empleando los métodos estadísticos usuales (ver 10. *Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*).

VALORACIÓN DEL FACTOR IX DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA

El método para determinar la actividad de factor IX es un ensayo de coagulación basado en la capacidad del factor IX de reducir el tiempo de coagulación de un plasma carente de factor IX. La reacción es acelerada por el agregado de un reactivo que contenga fosfolípidos y un activador de contacto como por ejemplo caolín, sílica o ácido ellágico. La potencia es determinada por comparación de la curva dosis-respuesta de la preparación muestra, con la de una preparación de referencia calibrada en Unidades Internacionales.

La Unidad Internacional es la actividad de una cantidad establecida de Patrón Internacional, que consiste en un concentrado liofilizado de factor IX de coagulación. La equivalencia en Unidades Internacionales del Patrón Internacional la establece la Organización Mundial de la Salud.

Reactivos

Plasma carente de factor IX

Reactivo que contenga fosfolípidos (Cefalina) y un Activador de contacto (Caolín liviano (Sílica o Ácido ellágico)).

Cloruro de calcio

Solución Reguladora Imidazol pH 7,3

Albúmina bovina o humana

Preparación estándar - Reconstituir la preparación según las indicaciones de la preparación estándar. Cuando corresponda, determinar la actividad de heparina presente y neutralizarla mediante la adición de por ejemplo sulfato de protamina (10 μg de sulfato de protamina neutralizan 1 UI de heparina). Diluir la preparación estándar con plasma carente de factor IX para obtener una solución que contenga entre 0,5 y 2,0 UI por mililitro. A partir

de esta dilución preparar, preferentemente por duplicado y en forma independiente, al menos tres diluciones, en progresión geométrica utilizando solución reguladora adecuada (por ejemplo solución reguladora de imidazol a pH 7,3 conteniendo 10 g por litro de albúmina bovina o humana). Preparar estas diluciones con precisión y utilizarlas inmediatamente.

Preparación muestra - Reconstituir la preparación en ensayo según se indica en el rótulo y utilizar inmediatamente. Cuando corresponda, determinar la actividad de heparina presente y neutralizarla mediante la adición de por ejemplo sulfato de protamina (10 μg de sulfato de protamina neutralizan 1 UI de heparina). Diluir la preparación en ensayo con plasma carente de factor IX para obtener una solución que contenga entre 0,5 y 2,0 UI por mililitro. Preparar diluciones en progresión geométrica de igual manera que la preparación estándar.

Procedimiento - Usar un aparato apropiado para medir tiempos de coagulación o realizar el ensayo colocando los tubos en baño de agua a 37 °C. Realizar la reacción por duplicado en el siguiente orden E1, E2, E3, M1, M2, M3 y con el otro juego de diluciones continuar en el siguiente orden M1, M2, M3, E1, E2 y E3. Colocar en cada tubo 0,1 ml plasma carente de factor IX y 0,1 ml de una de las diluciones de la *Preparación estándar* o de la *Preparación muestra*. Añadir a cada tubo 0,1 ml de un reactivo que contenga fosfolípidos y un activador de contacto apropiado para Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA) e incubar el tiempo recomendado a 37 °C. A cada tubo añadir 0,1 ml de una solución 3,7 g por litro de cloruro de calcio previamente calentado a 37 °C. Utilizando un cronómetro, medir el tiempo de coagulación, es decir, el intervalo entre el momento de agregado del cloruro de calcio y la primera indicación de formación de fibrina. [NOTA: se recomienda utilizar material plástico; los volúmenes se pueden modificar al igual que los tiempos de incubación; se pueden emplear reactivos comerciales siempre que se compruebe que los resultados son iguales.] Calcular la potencia empleando los métodos estadísticos habituales (ver 10. *Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*).

VALORACIÓN DEL FACTOR X DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA

El método para determinar la actividad de factor X de coagulación es un ensayo cromogénico en el cual se determina su actividad por su activación específica para formar factor Xa. La potencia de la preparación de factor X se estima comparando su actividad con un Patrón Internacional o una sustan-

cia de referencia calibrada en Unidades Internacionales por un método cromogénico.

La Unidad Internacional es la actividad de factor X de una cantidad establecida de patrón Internacional que consiste en un concentrado liofilizado de factor X humano. La equivalencia en Unidades Internacionales del Patrón Internacional la establece la Organización Mundial de la Salud. El método cromogénico de valoración consiste en dos pasos: la activación del factor X a factor Xa que depende de veneno de serpiente y el clivaje enzimático de un sustrato cromogénico específico para factor Xa, para dar un cromóforo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. En las condiciones apropiadas, existe una relación lineal entre la actividad del factor Xa y el clivaje del sustrato cromogénico.

Reactivos

Solución reguladora para diluciones - Solución de 3,7 g por litro de tris(hidroximetil)aminometano, 18,0 g por litro de cloruro de sodio, 2,1 g por litro de imidazol, 0,02 g por litro de bromuro de hexadimetrina y 1 g por litro de albúmina bovina o albúmina humana. Ajustar a pH 8,4, si fuera necesario, con ácido clorhídrico.

Veneno de víbora Russell específico para activar factor X - Se trata de una proteína derivada del veneno de víbora Russell's (*Vipera russelli*) que activa específicamente el factor X. Reconstituir y almacenar según se indica en el rótulo.

Sustrato cromogénico para factor Xa - Sustratos cromogénicos específicos para factor Xa tales como: *N*- α -benziloxycarbonil-*D*-arginil-*L*-glicil-*L*-arginina-4-nitroanilida diclorhidrato, *N*-benzoil-*L*-isoleucil-*L*-glutamil-glicil-*L*-arginin-4-nitroanilida clorhidrato, metanosulfonil-*D*-leucil-glicil-*L*-arginin-4-nitroanilida, metoxicarbonil-*D*-ciclohexilalanil-glicil-*L*-arginin-4-nitroanilida acetato. Reconstituir según se indica en el rótulo.

Preparación estándar - Diluir con *Solución reguladora para diluciones* para obtener una solución de 0,18 UI de factor X por mililitro. Preparar, preferentemente por duplicado y en forma independiente, al menos tres diluciones en progresión geométrica o aritmética empleando el mismo solvente.

Preparación muestra - Diluir con *Solución reguladora para diluciones* para obtener una solución de 0,18 UI de factor X por mililitro. Preparar, preferentemente por duplicado y en forma independiente, al menos tres diluciones en progresión geométrica o aritmética empleando el mismo solvente.

Procedimiento - Precalear todas las soluciones en un baño de agua a 37 °C inmediatamente antes de realizar el ensayo. Las siguientes condiciones de ensayo se utilizan para placas de

96 pocillos. Si el ensayo se lleva a cabo en tubos, se deben ajustar los volúmenes de manera que se mantengan las proporciones de la mezcla. Se deben realizar dos reacciones de cada dilución. En una placa de 96 pocillos mantenida a 37 °C, agregar por duplicado 12,5 μ l de cada dilución de la *Preparación muestra* o la *Preparación estándar* a cada uno de los pocillos. Mezclar volúmenes iguales de *Veneno de víbora Russell específico para activar factor X* y cloruro de calcio 0,1M, transferir 25 μ l a cada pocillo e incubar durante exactamente 90 segundos. A cada pocillo agregar 150 μ l de *Sustrato cromogénico para factor Xa* diluido 1 en 6 con *Solución reguladora para diluciones*. [NOTA: se admiten modificaciones de volúmenes de la reacción si con ellas se obtiene una mejor linealidad]. Determinar la velocidad de cambio de absorbancia (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*) a 405 nm de forma continua durante 3 minutos y obtener el promedio de velocidad de cambio de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$). Si no se puede medir en forma continua, leer la absorbancia a 405 nm a intervalos consecutivos adecuados, durante 40 segundos, o también es posible detener la reacción de hidrólisis tras un intervalo apropiado bajando el pH por adición de un reactivo conveniente, como ácido acético al 50 % v/v o una solución de citrato 1 M. Ajustar el tiempo de hidrólisis para conseguir un incremento lineal del cromóforo a lo largo del tiempo. Con los valores $\Delta A/\text{min}$ o *A* de cada dilución tanto de muestra como el estándar. Comprobar la validez del ensayo y calcular la potencia de la preparación a examinar empleando los métodos estadísticos habituales (ver 10. *Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*).

VALORACIÓN DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND

La potencia del factor de von Willebrand humano se determina comparando su actividad en la unión a colágeno o como cofactor ristocetina con la misma actividad de una preparación de referencia calibrada en Unidades Internacionales contra el estándar internacional.

La Unidad Internacional se define como la actividad de una cantidad establecida de Patrón Internacional para factor de von Willebrand en concentrado de factor VIII de coagulación humana. La equivalencia en Unidades Internacionales del Patrón Internacional la establece la Organización Mundial de la Salud.

Ensayo de unión a colágeno

La unión a colágeno se determina por un Enzoinmunoensayo sobre placas cubiertas con colágeno. El método se basa en la unión específica del

factor de von Willebrand a las fibras de colágeno y la posterior unión a un anticuerpo policlonal anti-factor de von Willebrand conjugado a una enzima, la cual, al agregar un sustrato cromogénico, genera un producto que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. Bajo condiciones apropiadas existe una relación lineal entre el factor de von Willebrand unido a colágeno y la absorbancia.

Reactivos

Colágeno - Emplear fibras de colágeno humano o equino nativas tipo I o III. Pueden emplearse soluciones de colágeno.

Diluyente de Colágeno - Disolver 50 g de glucosa en agua, ajustar a pH entre 2,7 y 2,9 con ácido clorhídrico 1 M y diluir a 1 litro con agua.

Solución reguladora salina fosfatada (PBS) - Disolver 8 g de cloruro de sodio, 1,05 g de fosfato dibásico de sodio, 0,2 g de fosfato monobásico de sodio y 0,2 g de cloruro de potasio en agua. Ajustar a pH 7,2 con hidróxido de sodio 1 M o ácido clorhídrico 1 M y diluir a 1 litro con agua.

Solución reguladora de lavado - *Solución reguladora salina fosfatada* conteniendo 1 g por litro de polisorbato 20.

Reactivo bloqueante - *Solución reguladora salina fosfatada* conteniendo 1 g por litro de polisorbato 20 y 10 g por litro de albúmina sérica bovina.

Solución reguladora de dilución - *Solución reguladora salina fosfatada* conteniendo 1 g por litro de polisorbato 20 y 50 g por litro de albúmina sérica bovina.

Conjugado - Suero de conejo anti-factor de von Willebrand humano conjugado con peroxidasa. Emplear de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Solución sustrato - Inmediatamente antes de emplear disolver una tableta de dicloruro de o-fenilendiamina y una tableta de peróxido de hidrógeno en 20 ml de agua o un volumen adecuado de peróxido de hidrógeno. [NOTA: proteger de la luz.]

Placas de microtitulación - Placas de poliestireno de fondo plano con superficies optimizadas para enzimo-inmunoensayo y alta capacidad de unión a proteínas.

Preparación estándar - Reconstituir la preparación de referencia según se indica en el rótulo. Diluir con *Solución reguladora de dilución* para obtener una solución de aproximadamente 1 UI de factor de von Willebrand. Preparar dos series independientes de no menos de tres diluciones cada una con *Solución reguladora de dilución*.

Preparación muestra - Reconstituir la preparación en ensayo según se indica en el rótulo. Diluir con *Solución reguladora de dilución* para obtener

una solución de aproximadamente 1 UI de factor de von Willebrand. Preparar dos series independientes de no menos de tres diluciones cada una con *Solución reguladora de dilución*.

Procedimiento - Llevar la solución de *Colágeno* a temperatura ambiente. Diluir con *Diluyente de colágeno* para obtener una solución entre 30 y 75 µg por ml de colágeno, mezclar para obtener una suspensión uniforme de fibras de colágeno. Colocar 100 µl en cada orificio de la placa de titulación. Cubrir la placa con un film plástico e incubar a 37 °C durante toda la noche. Vaciar los orificios de la placa cubierta con colágeno invirtiéndola y dejar secar sobre papel absorbente. Agregar 250 µl de *Solución de lavado*. Vaciar los orificios de la placa invirtiéndola y dejar secar sobre papel absorbente. Repetir la operación tres veces. Agregar 250 µl de *Reactivo bloqueante* a cada orificio, cubrir la placa con un film plástico e incubar a 37 °C por una hora. Vaciar los orificios de la placa invirtiéndola y dejar secar sobre papel absorbente. Agregar 250 µl de *Solución de lavado*. Vaciar los orificios de la placa invirtiéndola y dejar secar sobre papel absorbente. Repetir la operación tres veces. Agregar 100 µl de *Preparación muestra* o de *Preparación estándar* en los orificios. Agregar 100 µl de *Solución reguladora de dilución* a una serie de orificios que actúan como control negativo. Cubrir la placa con un film plástico e incubar a 37 °C por dos horas. Vaciar los orificios de la placa invirtiéndola y dejando secar sobre papel absorbente. Agregar 250 µl de *Solución de lavado*. Vaciar los orificios de la placa invirtiéndola y dejar secar sobre papel absorbente. Repetir la operación tres veces. Preparar una dilución apropiada del conjugado con *Solución reguladora salina fosfatada* conteniendo albúmina sérica bovina 5 g por litro y agregar 100 µl a cada orificio. Cubrir la placa con un film plástico e incubar a 37 °C durante dos horas. Vaciar los orificios de la placa invirtiéndola y dejar secar sobre papel absorbente. Agregar 250 µl de *Solución de lavado*. Vaciar los orificios de la placa invirtiéndola y dejar secar sobre papel absorbente. Repetir la operación tres veces. Agregar 100 µl de *Solución sustrato* a cada orificio e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. Agregar 100 µl de ácido clorhídrico a cada orificio. Medir las absorbancias a 492 nm. Emplear los valores de absorbancia para estimar la potencia de la preparación con los métodos estadísticos habituales. El ensayo solo es válido si los valores de absorbancia para los controles negativos son mayores que 0,05.

Actividad de cofactor ristocetina

Preparar diluciones apropiadas de la preparación en ensayo y de la preparación de referencia emple-

ando como diluyente una solución de 9 g por litro de cloruro de sodio y albúmina humana 10 a 50 g por litro. Añadir a cada dilución cantidades adecuadas de un reactivo von Willebrand conteniendo plaquetas humanas estabilizadas y ristocetina A. Mezclar sobre una placa de vidrio con movimientos circulares durante 1 minuto. Dejar reposar durante 1 minuto y observar sobre fondo oscuro con iluminación lateral. La última dilución que presenta aglutinación claramente visible indica el título de cofactor de ristocetina en la muestra. Emplear el diluyente como control negativo.

ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA

Llevar a cabo la determinación de la actividad anticomplemento (AAC) de la inmunoglobulina por incubación de una determinada cantidad de sustancia a examinar (10 mg de inmunoglobulina) con una determinada cantidad de complemento de cobayo (20 CH₅₀), seguida de la titulación del complemento residual. Expresar la actividad anticomplemento como el porcentaje de complemento consumido respecto al complemento control considerado como 100 %. La unidad hemolítica de actividad del complemento (CH₅₀) es la cantidad de complemento que, en las condiciones de la reacción, provoca la lisis de $2,5 \times 10^8$ eritrocitos sobre un total de 5×10^8 eritrocitos sensibilizados de forma óptima.

Reactivos

Solución concentrada de magnesio y calcio - Disolver 1,103 g de cloruro de calcio y 5,083 g de cloruro de magnesio en agua y diluir hasta 25 ml con el mismo solvente.

Solución reguladora concentrada de barbital - Disolver 207,5 g de cloruro de sodio y 25,48 g de barbital sódico en 4 litros de agua y ajustar a pH 7,3 con ácido clorhídrico 1 M. Agregar 12,5 ml de *Solución concentrada de magnesio y calcio* y diluir hasta 5 litros con agua. Filtrar a través de una membrana filtrante de 0,22 µm y conservar a 4 °C en envases de vidrio.

Solución de gelatina - Disolver 12,5 g de gelatina en aproximadamente 800 ml de agua y calentar a ebullición en un baño de agua. Enfriar a 20 °C y completar hasta 10 litros con agua. Filtrar a través de una membrana filtrante de 0,22 µm y conservar a 4 °C. [NOTA: emplear únicamente soluciones lípidas.]

Solución citratada - Disolver 8,0 g de citrato de sodio, 4,2 g de cloruro de sodio y 20,5 g de glucosa en 750 ml de agua. Ajustar a pH 6,1 con una solución de ácido cítrico 100 g por litro y diluir hasta 1 litro con agua.

Solución reguladora gelatina-barbital - Agregar 4 volúmenes de *Solución de gelatina* a 1 volumen de *Solución reguladora concentrada de barbital* y mezclar. Ajustar a pH 7,3, si fuera necesario, con ácido clorhídrico 1 M o hidróxido de sodio 1 M y mantener a 4 °C. [NOTA: preparar en el día de su uso.]

Sangre de carnero estabilizada - Recolectar 1 volumen de sangre de carnero sobre 1 volumen de *Solución citratada* y mezclar. Conservar la sangre estabilizada a 4 °C durante un mínimo de 7 días y un máximo de 28 días. [NOTA: la sangre de carnero o los eritrocitos de carnero estabilizados se pueden obtener comercialmente.]

Hemolisina - Antisuero frente a los eritrocitos de carnero, preparado en conejo [NOTA: dichos antisueros se pueden obtener comercialmente.]

Complemento de cobayo - Mezclar los sueros obtenidos a partir de la sangre de al menos diez cobayos. Separar el suero de la sangre coagulada por centrifugación a 4 °C aproximadamente. Conservar el suero en pequeñas cantidades a una temperatura inferior a -70 °C.

Método

Preparación de la suspensión patrón de eritrocitos de carnero al 5 %

Separar los eritrocitos de carnero por centrifugación de un volumen adecuado de sangre de carnero estabilizada. Lavar las células tres veces como mínimo con *Solución reguladora gelatina-barbital* y preparar una suspensión al 5 % v/v en *Solución reguladora gelatina-barbital*. Determinar la concentración celular según se indica a continuación. Agregar 0,2 ml de la suspensión a 2,8 ml de agua y centrifugar el lisado durante 5 minutos a 1.000 g. La concentración celular es adecuada si la absorbancia del líquido sobrenadante, determinada a 541 nm, es de $0,62 \pm 0,01$. Corregir la concentración celular por adición de un volumen de *Solución reguladora gelatina-barbital* hasta un V_f calculado por la fórmula siguiente:

$$AV_o/0,62$$

en la cual V_o es el volumen inicial de la suspensión original y A es la absorbancia de la suspensión original a 541 nm. La suspensión ajustada contiene aproximadamente 10^9 células por ml.

Titulación de la hemolisina

Preparar las diluciones de hemolisina según el siguiente esquema:

<i>na requerida</i>	<i>Solución reguladora barbital - gelatina</i>		<i>Hemolisina</i>
	Volumen (ml)	Dilución (1:....)	Volumen (ml)
7,5	0,65	no diluido	0,1
10	0,90	no diluido	0,1
75	1,80	7,5	0,2
100	1,80	10	0,2
150	1,00	75	1,0
200	1,00	100	1,0
300	1,00	150	1,0
400	1,00	200	1,0
600	1,00	300	1,0
800	1,00	400	1,0
1.200	1,00	600	1,0
1.600	1,00	800	1,0
2.400	1,00	1.200	1,0
3.200*	1,00	1.600	1,0
4.800*	1,00	2.400	1,0

* Descartar 1,0 ml de la mezcla.

Agregar 1,0 ml de *Suspensión patrón de eritrocitos de carnero al 5 %* a cada tubo de la serie de *Diluciones de hemolisina*, comenzando con la dilución 1:75 y mezclar. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.

Transferir 0,2 ml de cada mezcla de *Dilución de hemolisina* a tubos nuevos y agregar 1,10 ml de *Solución reguladora gelatina-barbital* y 0,2 ml de una dilución de *Complemento de cobayo* (por ejemplo 1:150). Realizar estas operaciones por duplicado.

Como control de células sin hemólisis preparar tres tubos con 1,4 ml de *Solución reguladora gelatina-barbital* y 0,1 ml de *Suspensión de eritrocitos de carnero al 5 %*.

Como control de células hemolisadas preparar tres tubos con 1,4 ml de agua y 0,1 ml de *Suspensión de eritrocitos de carnero al 5 %*.

Incubar todos estos tubos a 37 °C durante 60 minutos y centrifugar a 1.000 g durante 5 minutos. Medir la absorbancia de cada líquido sobrenadante a 541 nm y calcular el grado de hemólisis de cada tubo por la fórmula siguiente:

$$(A_a - A_l) / (A_b - A_l)$$

en la cual A_a es la absorbancia de los tubos que contienen las *Diluciones de hemolisina*, A_b es la absorbancia media de los tres tubos con hemólisis total y A_l es la absorbancia media de los tres tubos sin hemólisis.

Graficar el grado de hemólisis obtenido, en porcentaje, en función de la inversa de la *Dilución de*

hemolisina. Determinar la dilución óptima de hemolisina a partir del gráfico. Elegir una dilución en la que un aumento de la cantidad de hemolisina ya no produzca una variación sensible del grado de hemólisis. Esta dilución se considera que contiene 1 unidad mínima de hemólisis (1 UMH) en 1,0 ml. La dilución óptima hemolítica de hemolisina para la preparación de eritrocitos de carnero sensibilizados contiene 2 UMH por ml.

La titulación de hemolisina no es válida si la hemólisis máxima no esta comprendida entre el 50 y el 70 %. Si el máximo grado de hemólisis no está en este intervalo, repetir la titulación utilizando una disolución de complemento más o menos diluida según corresponda.

Preparación de eritrocitos de carnero sensibilizados (sistema hemolítico)

Preparar una cantidad adecuada de hemolisina diluida conteniendo 2 UHM por ml y un volumen igual de *Suspensión patrón de eritrocitos de carnero al 5 %*. Añadir la dilución de hemolisina a la suspensión patrón de células y mezclar. Incubar a 37 °C durante 15 minutos; conservar entre 2 y 8 °C y emplear dentro de las 6 horas de preparada.

Titulación del complemento

Preparar una dilución apropiada de complemento (por ejemplo 1:250) con *Solución reguladora gelatina-barbital* y realizar la titulación por duplicado según se indica en la siguiente tabla:

<i>Tubo</i>	<i>Volumen de complemento diluido (ml)</i>	<i>Volumen de Solución reguladora de gelatina-barbital (ml)</i>
<i>N°</i>	<i>(por ej. 1:250)</i>	
1	0,1	1,2

2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1
Tres tubos Control de células con 0 % de hemólisis	-	1,3
Tres tubos al 100 % de hemólisis	-	1,3 ml de agua

Agregar 0,2 ml de *Eritrocitos de carnero sensibilizados* a cada tubo, mezclar e incubar a 37 °C durante 60 minutos. Enfriar los tubos en un baño de hielo y centrifugar a 1.000 g durante 5 minutos. Medir la absorbancia del sobrenadante a 541 nm y calcular el grado de hemólisis (Y) por la fórmula siguiente:

$$(A_c - A_f) / (A_b - A_f)$$

en la cual A_c es la absorbancia de los *Tubos 1 a 12*, A_b es la absorbancia media de los tres tubos con hemólisis al 100 % y A_f es la absorbancia media de los tres tubos sin hemólisis.

Representar una curva sobre papel doble logarítmico con los valores de $Y/(1-Y)$ en función al volumen de complemento diluido en mililitros. Hallar la ecuación de la recta que mejor ajuste al conjunto de puntos y determinar el valor en ordenadas que corresponda al 50 % de dosis hemolítica del complemento donde $Y/(1-Y) = 1,0$. Calcular la acti-

vidad en unidades hemolíticas (CH_{50}/ml) de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$C_d/5C_a$$

en la cual C_d es el valor inverso de la dilución del complemento, C_a es el volumen en mililitros del complemento diluido que produce un 50 % de hemólisis y 5 el factor de escala para tener en cuenta el número de eritrocitos.

El ensayo no será válido a menos que el gráfico sea lineal entre el 15 % y el 85 % de hemólisis y que el valor de la pendiente esté comprendido entre 0,15 y 0,40 (preferentemente entre 0,18 y 0,30).

Ensayo de la actividad anticomplemento

Preparar una dilución del *Complemento de cobayo* ya titulado con *Solución reguladora gelatina-barbital* para obtener 100 CH_{50}/ml . Agregar la inmunoglobulina a examinar, ajustada a pH 7 si fuera necesario. Preparar las mezclas siguientes de incubación para una inmunoglobulina que contenga 50 mg por ml:

	<i>Inmunoglobulina a ser examinada (ml)</i>	<i>Control de complemento (por duplicado) (ml)</i>
Inmunoglobulina (50 mg por ml)	0,2	—
Solución reguladora gelatina barbital	0,6	0,8
Complemento	0,2	0,2

Realizar en paralelo los ensayos sobre la inmunoglobulina a examinar y sobre controles negativos y positivos de AAC, preparados con inmunoglobulina humana según las indicaciones del prospecto que acompaña a la preparación de referencia. Si la sustancia a examinar contiene más o menos de 50 mg por ml de inmunoglobulina, ajustar adecuadamente los volúmenes de la preparación y de la *Solución reguladora gelatina-barbital*, por ejemplo, utilizar 0,33 ml de una

preparación que contenga 30 mg por ml de inmunoglobulina y 0,47 ml de *Solución reguladora gelatina-barbital* para conseguir un volumen total de 0,8 ml. Tapar los tubos e incubar a 37 °C durante 60 minutos. Agregar 0,2 ml de cada mezcla de incubación a 9,8 ml de *Solución reguladora gelatina-barbital* para diluir el complemento. Para determinar la actividad del complemento residual, realizar la *Titulación del complemento* en cada tubo según se ha descrito anteriormente.

Calcular la actividad anticomplementaria (AAC) de la sustancia a examinar empleando como referencia el complemento control considerado como 100 %, a partir de la fórmula siguiente:

$$100(a-b)/a$$

en la cual a es la media de la actividad del complemento (CH_{50}/ml) del complemento control y b es la actividad del complemento (CH_{50}/ml) de la sustancia a examinar.

El ensayo no es válido a menos que; las actividades anticomplementarias encontradas para los controles AAC negativos y los controles AAC positivos se sitúen en los límites indicados en el prospecto que acompaña la preparación de referencia; la actividad del complemento control (a) esté comprendida entre 80 y 120 CH_{50} por mililitro.

ACTIVADOR DE PRECALICREÍNA

El activador de precalicreína (PCA) transforma la precalicreína en calicreína y ésta puede valorarse por su capacidad de escindir un cromóforo a partir de un sustrato peptídico sintético. El grado de clivaje se puede medir por espectrofotometría y la concentración de PCA se calcula por comparación con una preparación patrón calibrada en Unidades Internacionales. La Unidad Internacional corresponde a la actividad de una determinada cantidad del Patrón Internacional, que está constituido por activador de la precalicreína liofilizado. La equivalencia en Unidades Internacionales de la muestra patrón internacional la establece la Organización Mundial de la Salud.

Reactivos

Solución reguladora A - Disolver 6,055 g de tris(hidroximetil)aminometano, 1,17 g de cloruro de sodio, 50 mg de bromuro de hexadimetrina y 100 mg de azida de sodio en agua. Ajustar a pH 8,0 con ácido clorhídrico 2 M y diluir hasta 1 litro con agua.

Solución reguladora B - Disolver 6,055 g de tris(hidroximetil)aminometano y 8,77 g de cloruro de sodio en agua. Ajustar a pH 8,0 con ácido clorhídrico 2 M y diluir hasta 1 litro con agua.

Preparación del sustrato de la precalicreína - [NOTA: para evitar que se active la coagulación, la sangre o el plasma utilizados para la preparación de la precalicreína deben ponerse en contacto sólo con material plástico o de vidrio tratado con silicona.] Añadir 9 volúmenes de sangre humana sobre un volumen de una solución de anticoagulante (ACD, CPD o una solución de citrato de sodio 38 g por litro) a la que se le ha agregado 1 mg por mililitro de bromuro de hexadimetrina.

Centrifugar la mezcla a 3.600 g durante 5 minutos. Separar el plasma y centrifugar de nuevo a 6.000 g durante 20 minutos para que sedimenten las plaquetas. Separar el plasma pobre en plaquetas y dializar frente a 10 volúmenes de *Solución reguladora A* durante 20 horas. Después de la diálisis, aplicar el plasma sobre una columna de cromatografía que contiene agarosa-DEAE para cromatografía de intercambio iónico, que haya sido equilibrada con *Solución reguladora A* y cuyo volumen sea igual a dos veces el volumen del plasma. Eluir con *Solución reguladora A* a un flujo de 20 ml/cm²/h. Recolectar el eluido en fracciones y medir la absorbancia a 280 nm. Reunir las fracciones que contengan el primer pico de proteínas para obtener aproximadamente un volumen de 1,2 veces el volumen del plasma pobre en plaquetas.

Para verificar que el sustrato está exento de actividad de calicreína, mezclar 1 volumen del mismo con 20 volúmenes de solución del sustrato cromogénico que será utilizado durante el ensayo precalentada e incubar a 37 °C durante 2 minutos. El sustrato es adecuado si la absorbancia no aumenta más de 0,001 por minuto. Agregar a la solución de sustrato 7 g por litro de cloruro de sodio y filtrar utilizando un filtro de membrana de 0,45 µm. Congelar el filtrado en alícuotas y conservar a -25 °C; el sustrato también puede liofilizarse para su conservación. [NOTA: efectuar todas las operaciones, desde el inicio de la cromatografía hasta la congelación en partes alícuotas, durante una misma jornada de trabajo.]

Valoración

Es preferible realizar la valoración utilizando un analizador enzimático automatizado a 37 °C, con volúmenes, concentraciones de sustrato y tiempos de incubación ajustados para que la velocidad de reacción sea lineal al menos hasta 35 UI/ml. Los patrones, las muestras y el sustrato de la precalicreína pueden diluirse, si fuese necesario, con *Solución reguladora B*.

Incubar los patrones o las muestras diluidos durante 10 minutos con sustrato de precalicreína, de forma que el volumen del patrón o de la muestra sin diluir no sobrepase 1/10 del volumen total de la mezcla de incubación, para evitar errores producidos por la variación de la fuerza iónica y el pH. Incubar la mezcla o una parte de ella con un volumen igual de una solución de un sustrato cromogénico sintético que sea específico para la calicreína (por ejemplo, acetato de *N*-benzoyl-*L*-prolil-*L*-fenilalanil-*L*-arginina 4-nitroanilida o dihidrocloruro de *D*-prolil-*L*-fenilalanil-*L*-arginina 4-nitroanilida), disuelto en *Solución reguladora B*.

Medir la variación de la absorbancia por minuto $\Delta A/\text{min}$ desde el minuto 2 al minuto 10, a la longitud de onda específica para el sustrato utilizado. Preparar un blanco para cada mezcla de muestra o de patrón utilizando la *Solución reguladora B* en lugar del sustrato de precalicreína. Corregir $\Delta A/\text{min}$ sustrayendo el valor obtenido para el blanco correspondiente. Realizar una curva de calibración utilizando los valores obtenidos con los patrones y sus respectivas concentraciones; utilizar la curva para determinar la actividad de PCA de la sustancia a examinar.

ALBÚMINA HUMANA

SOLUCIÓN

Definición - La Solución de Albúmina Humana es una solución acuosa de proteínas obtenidas a partir de plasma que debe cumplir los requisitos de *Plasma Humano para Fraccionamiento*.

Caracteres generales - Líquido límpido, ligeramente viscoso, prácticamente incoloro, amarillo, ámbar o ligeramente verdoso.

Sustancias de referencia - Albúmina Humana para Electroforesis SR-FA. Albúmina Humana para Validación del Ensayo de Aluminio SR-FA.

PRODUCCIÓN

La separación de la albúmina se lleva a cabo en condiciones estrictamente controladas, en particular en lo concerniente a pH, fuerza iónica y temperatura, de manera tal que en el producto final no menos del 95 por ciento de las proteínas totales sea albúmina. La Solución de Albúmina Humana puede prepararse como solución concentrada conteniendo de 150 g por litro a 250 g por litro de proteínas totales, o como solución isotónica conteniendo de 35 g por litro a 50 g por litro de proteínas totales. Se puede agregar un estabilizante que proteja a la solución de los efectos del calor, como por ejemplo caprilato de sodio (octanoato de sodio) o *N*-acetilriptofano o una combinación de ambos a una concentración apropiada. No se deben agregar conservantes antimicrobianos en ninguna fase de la preparación. La solución se filtra a través de una membrana capaz de retener bacterias, se distribuye asépticamente en envases estériles que posteriormente se cierran para prevenir cualquier contaminación. La solución en su envase final se calienta a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ y se mantiene a esta temperatura durante por lo menos 10 horas. Seguidamente, los envases se incuban entre 30 y 35°C durante no menos de 14 días, o entre 20 y 25°C durante no menos de 4 semanas y se realiza un examen visual de los envases para examinar evidencias de contaminación microbiana.

CONSERVACIÓN

Mantener protegido de la luz.

ENSAYOS

Identificación

Examinar la preparación mediante una técnica apropiada de inmunoelectroforesis (ver 635.

Métodos inmunoquímicos). Comparar el suero humano normal con la preparación en ensayo, ambos diluidos hasta una concentración de 10 g por litro de proteína, utilizando un antisuero contra suero humano normal. El componente principal de la preparación en ensayo debe tener la misma movilidad del componente principal del suero humano normal. La preparación puede contener también pequeñas cantidades de otras proteínas plasmáticas.

Determinación del pH <250>

Entre 6,7 y 7,3. Diluir la preparación en ensayo con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración de 10 g por litro de proteínas.

Proteínas totales

Diluir la preparación a examinar, si fuera necesario, con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro para obtener una solución de aproximadamente 15 mg de proteína en 2 ml. Transferir 2,0 ml a un tubo de centrifuga de fondo redondo y agregar 2,0 ml de una solución de molibdato de sodio 75 g por litro y 2,0 ml de una mezcla de agua y ácido sulfúrico libre de nitrógeno (30:1). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar el sobrenadante líquido y dejar escurrir el tubo invertido sobre un papel de filtro. Determinar el contenido de nitrógeno en el residuo (ver 200. *Determinación de nitrógeno*) y calcular el contenido de proteínas multiplicando el resultado por 6,25. [NOTA: si el producto contiene un estabilizante cuya molécula contiene nitrógeno, puede utilizarse otro método alternativo validado para determinación de proteínas.] El contenido de proteínas no debe ser menor a 95 % ni mayor a 105 % de la cantidad declarada en el rótulo.

Composición en proteínas

Examinar por electroforesis de zona (ver 300. *Electroforesis*), empleando como soporte tiras de gel de acetato de celulosa y como solución de electrolitos una solución reguladora barbital pH 8,6 (ver *Soluciones reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*).

Solución muestra - Diluir la preparación en ensayo con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración de proteínas de 20 g por litro.

Solución estándar - Diluir Albúmina Humana para Electroforesis SR-FA en una solución de cloruro de sodio 9 g por litro, hasta una concentración de proteínas de 20 g por litro.

Procedimiento - Aplicar sobre una tira 2,5 μl de la *Solución muestra* en una banda de 10 mm, o bien aplicar 0,25 μl por milímetro si se emplea una tira

más estrecha. En otra tira, aplicar en las mismas condiciones, un volumen igual de *Solución estándar*. Aplicar un campo eléctrico tal que el compuesto que se desplace más rápidamente migre no menos de 30 mm. Tratar las tiras con solución de negro amido 10B durante 5 minutos y luego decolorar con una mezcla de metanol y ácido acético glacial (90:10), hasta que el fondo de las tiras esté libre de color. Tratar las tiras con una mezcla de metanol y ácido acético glacial (81:19). Medir la absorbancia de las bandas a 600 nm mediante un instrumento capaz de dar a esta longitud de onda una respuesta lineal para el intervalo de medida. Calcular el resultado como un promedio de tres medidas de cada tira. El ensayo sólo es válido si en el electroforetograma obtenido con la *Solución estándar*, la proporción de proteínas contenidas en la banda principal está dentro de los límites que se especifican para la sustancia de referencia. En el electroforetograma obtenido con la *Solución muestra*, no más de 5 % de las proteínas tienen una movilidad distinta de la de la banda principal.

Distribución del tamaño molecular

Sistema cromatográfico – Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 60 cm × 7,5 mm o 30 cm × 7,8 mm con fase estacionaria constituida por gel de sílice hidrofílico para cromatografía para fraccionamiento de proteínas globulares con masa molecular relativa en el rango de 10.000 a 500.000. El caudal debe ser aproximadamente 0,5 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 4,873 g de fosfato dibásico de sodio, 1,741 g de fosfato monobásico de sodio, 11,688 g de cloruro de sodio y 50 mg de azida sódica en un litro de agua.

Solución muestra - Diluir la preparación en ensayo con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración apropiada al sistema cromatográfico que se vaya a utilizar.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo un volumen exactamente medido (generalmente el volumen de inyección debe contener entre 50 y 600 µg de proteínas) de *Solución muestra*. Registrar el cromatograma y localizar el pico correspondiente a polímeros y agregados en la región del cromatograma que representa el volumen muerto. Ignorar el pico debido al estabilizante. El área del pico debido a polímeros y agregados no debe ser mayor al 10 % del área total del cromatograma (corresponde aproximadamente a 5 % de polímeros y agregados).

Grupo Hemo

Diluir la preparación a examinar con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración de proteínas de 10 g por litro. Medir la absorbancia (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*) a 403 nm, empleando agua como blanco. La absorbancia de la preparación en ensayo no debe ser mayor a 0,15.

Activador de precalicreína

Proceder según se indica en *Activador de precalicreína* en 385. *Ensayos en hemoderivados*. No debe contener más de 35 UI por ml de activador de precalicreína.

Aluminio

Determinar el contenido de aluminio según se indica en *Método I* en 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*. Emplear un horno como generador atómico y envases de plástico para la preparación de las soluciones. Lavar todo el material con ácido nítrico al 20,0 % antes del uso.

Solución de validación - Albúmina Humana para Validación del Ensayo de Aluminio SR-FA.

Solución muestra - Emplear la preparación en ensayo.

Soluciones estándar - Preparar un rango adecuado de soluciones de referencia agregando volúmenes adecuados de solución de aluminio (10 ppm) (SL) (ver *Soluciones límite* en *Reactivos y Soluciones*) a volúmenes conocidos de agua. Diluir las soluciones si fuera necesario con ácido nítrico 10 g por litro que contenga 1,7 g por litro de nitrato de magnesio y 0,05 % v/v de octoxinol 10.

Procedimiento - Medir la absorbancia de todas las soluciones a 309,3 nm. El ensayo sólo es válido si el contenido de aluminio determinado para la Albúmina Humana para Validación del Ensayo de Aluminio SR-FA no difiere en más del 20 % del valor indicado para la sustancia de referencia. No debe contener más de 200 µg de aluminio por litro.

Potasio

Determinar el contenido de potasio según se indica en *Método I* en 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*. Medir la intensidad emitida a 766,5 nm. No debe contener más de 0,05 mmol de K por gramo de proteínas.

Sodio

Determinar el contenido de sodio según se indica en *Método I* en 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*. Medir la intensidad emitida a 589 nm. No debe contener menos del 95 ni más del 105 % de la cantidad declarada en el rótulo y como máximo 160 mmol de Na por litro.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de pirogénos <340>

Debe cumplir con los requisitos. En el caso de la solución de 35 g por litro a 50 g por litro de proteína, inyectar a cada conejo 10 ml de la preparación en ensayo por kilogramo de peso corporal. Cuando la solución contenga de 150 g por litro a 250 g por litro de proteínas, inyectar a cada conejo 5 ml de la solución a examinar por kilogramo de peso corporal.

ROTULADO

Indicar en el rótulo: el nombre de la preparación; el volumen; el contenido de proteínas, expresado en gramos por litro; el contenido de sodio, expresado en milimoles por litro; el nombre y la concentración de cualquier sustancia agregada (por ejemplo, los estabilizantes) y que el producto no debe usarse si se observa un precipitado o presenta turbidez.

ANTITROMBINA III HUMANA, CONCENTRADO DE

Definición- El Concentrado de Antitrombina III Humana es una preparación de una fracción glicoproteica obtenida a partir de plasma humano, capaz de inactivar trombina en presencia de un exceso de heparina. Se obtiene a partir de plasma que debe cumplir los requisitos en *Plasma Humano para Fraccionamiento*. La potencia de la preparación, reconstituida según se indica en el rótulo, no debe ser menor de 25 UI de antitrombina III por mililitro.

Caracteres generales - Polvo o masa sólida friable, blanco. Higroscópica.

PRODUCCIÓN

El método de producción debe incluir uno o varios pasos que hayan demostrado eliminar o inactivar agentes infecciosos conocidos. Si se utilizan sustancias para inactivación de virus durante la producción deberá validarse el procedimiento posterior de purificación para demostrar que la concentración de estas sustancias se reduce a niveles apropiados y que cualquier residuo presente no compromete la inocuidad de la preparación para los pacientes.

La actividad específica no debe ser menor de 3 UI de antitrombina III por mililitro de proteínas totales, excluyendo la albúmina.

La antitrombina III se debe purificar y concentrar, pudiendo agregarse un estabilizador apropiado. No se deben agregar conservantes antimicrobianos. El concentrado de antitrombina III se debe filtrar a través de una membrana capaz de retener bacterias, se debe distribuir asépticamente en los envases estériles finales y se debe congelar inmediatamente. Posteriormente se debe liofilizar y los envases se cierran al vacío o en atmósfera de gas inerte.

Ensayo de validación

Debe demostrarse que el proceso de fabricación produce un producto que cumple consistentemente con el siguiente ensayo:

Reacción que une a Heparina - Examinar por electroforesis en gel de agarosa (ver 300. *Electroforesis*). Preparar una solución de agarosa para electroforesis de 10 g por litro, que contenga aproximadamente 15 UI de heparina por ml, en solución reguladora barbital pH 8,4. Transferir 5 ml de esta solución sobre una placa de vidrio de 5 cm² y enfriar a 4° C durante 30 minutos. Cortar dos orificios de 2 mm de diámetro, situados a 1 cm y 4 cm, res-

pectivamente del borde de la placa y a 1 cm del cátodo. Sembrar en uno de los pocillos 5 µl de la preparación en ensayo, diluida de forma que contenga aproximadamente 1 UI de antitrombina III por ml. En el otro pocillo sembrar 5 µl de una solución de un colorante marcador tal como azul de bromofenol. Realizar la corrida electroforética a 4 °C aplicando un campo eléctrico constante de 7 V por cm, hasta que el colorante alcance el ánodo. Cortar el gel de agarosa a 1,5 cm del lado desde el borde de la placa en el que se ha depositado la preparación en ensayo y retirar la mayor parte del gel, dejando una banda de 1,5 cm de ancho que contiene la preparación en ensayo. Sustituir la parte de gel que se ha retirado por una capa uniforme formada por 3,5 ml de una solución de agarosa para electroforesis de 10 g por litro en una solución reguladora barbital pH 8,4 (ver *Soluciones reguladoras en Reactivos y Soluciones*) que contenga un anticuerpo de conejo anti-antitrombina III humana a la concentración apropiada, determinada previamente, de modo que se obtengan picos de una altura apropiada, no menor de 1,5 cm. Colocar la placa con el gel original en el cátodo de forma que pueda efectuarse una segunda migración electroforética en sentido perpendicular a la primera. Realizar esta segunda corrida electroforética aplicando un campo eléctrico constante de 2 V por cm durante 16 horas. Cubrir las placas con papel de filtro y varias capas de guata o papel absorbente empapado con una solución de 9 mg de cloruro de sodio por ml y comprimir bajo presión durante 2 horas, cambiando la solución de cloruro de sodio varias veces. Enjuagar con agua, secar las placas y teñir con solución de azul ácido 92 o Negro Amido 10B. Calcular la fracción de antitrombina III unida a heparina, que corresponde al pico más próximo al ánodo, con respecto a la cantidad total de antitrombina III, midiendo el área definida por los dos picos de precipitación. La proporción de antitrombina III que puede unirse a heparina no debe ser menor de 60 %.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos protegido de la luz.

ENSAYOS

Identificación

Debe cumplir con los requisitos en *Valoración*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,0 y 7,5. Reconstituir la preparación en ensayo según se indica en el rótulo.

Solubilidad

Reconstituir el Concentrado de Antitrombina III Humana según se indica en el rótulo. Se debe disolver completamente en no más de 10 minutos con

agitación suave formando una solución incolora, límpida o ligeramente turbia.

Osmolalidad <640>

No menos de 240 mosmol/kg.

Proteínas totales

Diluir la preparación a examinar, si fuera necesario, con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro para obtener una solución de aproximadamente 15 mg de proteína en 2 ml. Transferir 2,0 ml a un tubo de centrifuga de fondo redondo y agregar 2,0 ml de una solución de molibdato de sodio 75 g por litro y 2,0 ml de una mezcla de agua y ácido sulfúrico libre de nitrógeno (30:1). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar el sobrenadante líquido y dejar escurrir el tubo invertido sobre un papel de filtro. Determinar el contenido de nitrógeno en el residuo (ver 200. *Determinación de nitrógeno*) y calcular el contenido de proteínas multiplicando el resultado por 6,25. [NOTA: si el Concentrado de Antitrombina III Humana no contiene albúmina como estabilizante, se puede utilizar otro método debidamente validado].

Agua

Determinar el contenido de agua por *Titulación volumétrica directa* (ver 120. *Determinación de agua*) o según se indica en 680. *Pérdida por secado*. Debe cumplir con los requisitos establecidos por la autoridad sanitaria competente.

Determinación de heparina

Proceder según se indica en *Valoración de heparina en factores de coagulación* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). No debe contener más de 0,1 UI de actividad de heparina por UI de antitrombina III. [NOTA: se debe validar el ensayo de heparina para cada preparación específica para tener en cuenta la interferencia originada por la antitrombina III.]

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de piretógenos <340>

Debe cumplir con los requisitos. Inyectar a cada conejo un volumen de la preparación reconstituida equivalente a no menos de 50 UI de antitrombina III por kg de peso corporal.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración de Antitrombina III Humana* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe ser menor de 80 por ciento ni mayor de 120 por ciento de la potencia declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser

menor de 90 % ni mayor de 110 % de la potencia estimada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo: el contenido de antitrombina III en UI por envase; la cantidad de proteína contenida en el envase; el nombre y volumen del líquido a ser usado para la reconstitución; cuando corresponda, la cantidad de albúmina presente como estabilizador.

COMPLEJO PROTROMBÍNICO HUMANO

Definición - El Complejo Protrombínico Humano es una fracción de proteínas plasmáticas que contiene factor IX de coagulación sanguínea junto con cantidades variables de los factores II, VII y X de coagulación; la presencia y proporción de estos factores adicionales depende del método de fraccionamiento. Se obtiene a partir de plasma que debe cumplir los requisitos de *Plasma Humano para Fraccionamiento*. La potencia de la preparación, reconstituida según se indica en el rótulo, no debe ser menor de 20 UI de factor IX por mililitro.

Caracteres generales - Polvo o sólido friable, blanco o ligeramente coloreado. Muy higroscópico.

PRODUCCIÓN

El método de producción debe estar diseñado de forma de minimizar la activación de cualquier factor de coagulación (para minimizar la trombogenicidad potencial) y debe incluir uno o varios pasos que hayan demostrado eliminar o inactivar agentes infecciosos conocidos. Si se utilizan sustancias para inactivación de virus durante la producción deberá validarse el procedimiento posterior de purificación para demostrar que la concentración de estas sustancias se reduce a niveles apropiados y que cualquier residuo presente no compromete la inocuidad de la preparación para los pacientes.

La actividad específica antes del agregado de cualquier proteína estabilizante debe ser no menor de 0,6 UI del factor IX por miligramo de proteína total.

La fracción Complejo Protrombínico Humano se disuelve en un líquido apropiado. Puede agregarse heparina, antitrombina y otras sustancias auxiliares tales como estabilizadores. No se deben agregar conservantes antimicrobianos. La solución se filtra a través de una membrana capaz de retener bacterias, se distribuye asépticamente en el envase final y se congela inmediatamente. Posteriormente se liofiliza y los envases se cierran con vacío o bajo atmósfera de gas inerte.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos protegido de la luz.

[NOTA: reconstituir la preparación según se indica en el rótulo inmediatamente antes de realizar los *Ensayos*, excepto *Solubilidad* y *Agua*, y la *Valoración*.]

ENSAYOS

Identificación

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Para factor IX* y cuando corresponda *Para factor II*, *Para factor VII* y *Para factor X*, en *Valoración*.

Solubilidad

Al contenido de un envase, agregar el volumen de solvente indicado en el rótulo a la temperatura recomendada. La preparación debe disolverse completamente en no más de 10 minutos con agitación suave formando una solución límpida que puede estar coloreada.

Determinación del pH <250>

Entre 6,5 y 7,5.

Osmolalidad <640>

No debe ser menor de 240 mosmol/kg.

Proteínas totales

Diluir la preparación a examinar, si fuera necesario, con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro para obtener una solución de aproximadamente 15 mg de proteína en 2 ml. Transferir 2,0 ml a un tubo de centrifuga de fondo redondo y agregar 2,0 ml de una solución de molibdato de sodio de 75 g por litro y 2,0 ml de una mezcla de agua y ácido sulfúrico libre de nitrógeno (30:1). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar el líquido sobrenadante y dejar escurrir el tubo invertido sobre papel de filtro. Determinar el contenido de nitrógeno en el residuo (ver 200. *Determinación de nitrógeno*) y calcular el contenido de proteínas multiplicando el resultado por 6,25.

Agua

Determinar el contenido de agua por *Titulación volumétrica directa* (ver 120. *Determinación de agua*) o según se indica en 680. *Pérdida por secado*. Debe cumplir con los requisitos establecidos por la autoridad sanitaria competente.

Factores de coagulación activados

Proceder según se indica en *Factores de coagulación activados* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). Diluir la preparación en ensayo, si fuera necesario, para obtener una concentración de 20 UI de factor IX por mililitro. El tiempo de coagulación para cada dilución no debe ser menor a 150 segundos.

Determinación de heparina

En caso de que se haya agregado heparina durante la elaboración, se debe determinar la cantidad presente de heparina procediendo según se indica en *Valoración de heparina en factores de*

coagulación (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La preparación en ensayo no debe contener más de la cantidad de heparina indicada en el rótulo y en ningún caso más de 0,5 UI de heparina por UI de factor IX.

Trombina

Si la preparación en ensayo contiene heparina, determinar la cantidad presente según se indica en *Determinación de heparina* y neutralizar la cantidad presente por adición, por ejemplo de sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutraliza 1 UI de heparina). En cada uno de dos tubos de ensayo, mezclar volúmenes iguales de la preparación reconstituida y de una solución 3 g por litro de fibrinógeno. Mantener uno de los tubos a 37 °C durante 6 horas y el otro a temperatura ambiente durante 24 horas. En un tercer tubo, mezclar un volumen de solución de fibrinógeno con un volumen igual de una solución de trombina humana (1 UI por ml) y colocarlo en un baño de agua a 37 °C. No se debe producir coagulación en los tubos que contienen la preparación en ensayo. El tubo que contiene trombina debe coagular antes de 30 segundos.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de piretógenos <340>

Debe cumplir con los requisitos. Inyectar a cada conejo un volumen de la preparación reconstituida según se indica en el rótulo, equivalente a no menos de 30 UI de factor IX por kilogramo de peso corporal.

VALORACIÓN

PARA FACTOR II

Proceder según se indica en *Valoración del Factor II de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor de 125 % de la potencia declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 90 % ni mayor de 111 % de la potencia estimada.

PARA FACTOR VII

Si el rótulo indica que la preparación contiene Factor VII, proceder según se indica en *Valoración del Factor VII de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor de 125 % en base a la cantidad declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor que 125 % de la potencia estimada.

PARA FACTOR X

Proceder según se indica en *Valoración del Factor X de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor de 125 % de la potencia declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 90 % ni mayor de 111 % de la potencia estimada.

PARA FACTOR IX

Proceder según se indica en *Valoración del Factor IX de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor de 125 % en base a la cantidad declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor que 125 % de la potencia estimada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo: el número de UI de factor IX, factor II y factor X por envase; cuando corresponda, el número de UI de factor VII; si la preparación contiene proteína C y/o proteína S, la cantidad de proteína; nombre y cantidad de cualquier sustancia agregada incluyendo heparina cuando corresponda; nombre y volumen del líquido a ser usado para la reconstitución. En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: “*La transmisión de agentes infecciosos no puede ser totalmente excluida cuando se administran productos preparados a partir de sangre o plasma humanos*”.

FACTOR VII DE COAGULACIÓN HUMANO LIOFILIZADO

Definición - El Factor VII de Coagulación Humano es una fracción de proteínas plasmáticas que contiene factor VII (glicoproteína de cadena simple) y puede contener pequeñas cantidades de la forma activada: factor VIIa derivada de doble cadena. Pueden también estar presentes otros factores de coagulación: II, IX y X, proteína C y proteína S. Se obtiene a partir de plasma que debe cumplir los requisitos en *Plasma Humano para Fraccionamiento*. La potencia de la preparación, reconstituida según se indica en el rótulo, no debe ser menor de 15 UI de factor VII por mililitro

Caracteres generales - Polvo o masa sólida friable, blanco, amarillo pálido, verde o azul.

PRODUCCIÓN

El método de producción debe estar diseñado de forma de minimizar la activación de cualquier factor de coagulación (para minimizar la trombogenicidad potencial) y debe incluir uno o varios pasos que hayan demostrado eliminar o inactivar agentes infecciosos conocidos. Si se utilizan sustancias para inactivación de virus durante la producción deberá validarse el procedimiento posterior de purificación para demostrar que la concentración de estas sustancias se reduce a niveles apropiados y que cualquier residuo presente no compromete la inocuidad de la preparación para los pacientes.

La actividad específica antes del agregado de cualquier proteína estabilizante, no debe ser menor de 2 UI de factor VII por miligramo de proteína total.

La fracción factor VII se disuelve en un líquido apropiado. Puede agregarse heparina, antitrombina u otras sustancias auxiliares tales como estabilizadores. No se deben agregar conservantes antimicrobianos. La solución se filtra a través de una membrana capaz de retener bacterias, se distribuye asépticamente en el envase final y se congela inmediatamente. Posteriormente se liofiliza y los envases se cierran al vacío o bajo atmósfera de gas inerte.

Consistencia del método de producción

Debe demostrarse la consistencia del método de producción con respecto a las actividades de los factores II, IX y X de la preparación, expresadas en UI relativas a la actividad del factor VII.

También debe demostrarse la consistencia del método de producción con respecto a la actividad del factor VIIa. La actividad del factor VIIa puede ser determinada, por ejemplo, utilizando un factor tisular soluble recombinante que no active el factor VII pero que posea una función de cofactor específico para el factor VIIa. Después de la incubación de una mezcla del factor tisular soluble recombinante con reactivo de fosfolípidos y la dilución de la preparación en ensayo en un plasma deficiente en factor VII, agregar cloruro de calcio y determinar el tiempo de coagulación: el tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la actividad del factor VIIa.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos protegido de la luz.

[NOTA: reconstituir la preparación según se indica en el rótulo inmediatamente antes de realizar los *Ensayos*, excepto *Solubilidad* y *Agua*, y la *Valoración*.]

ENSAYOS

Identificación

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Valoración*.

Solubilidad

Al contenido de un envase, agregar el volumen de solvente indicado en el rótulo a la temperatura recomendada. La preparación debe disolverse completamente en no más de 10 minutos con agitación suave formando una solución incolora, límpida o ligeramente opalescente.

Determinación del pH <250>

Entre 6,5 y 7,5.

Osmolalidad <640>

No debe ser menor de 240 mosmol/kg.

Proteínas totales

Diluir la preparación a examinar, si fuera necesario, con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro para obtener una solución de aproximadamente 15 mg de proteína en 2 ml. Transferir 2,0 ml a un tubo de centrifuga de fondo redondo y agregar 2,0 ml de una solución de molibdato de sodio 75 g por litro y 2,0 ml de una mezcla de agua y ácido sulfúrico libre de nitrógeno (30:1). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar el sobrenadante líquido y dejar escurrir el tubo invertido sobre un papel de filtro. Determinar el contenido de nitrógeno en el residuo (ver 200. *Determinación de nitrógeno*) y calcular el contenido de proteínas multiplicando el resultado por 6,25.

Agua

Determinar el contenido de agua por *Titulación volumétrica directa* (ver 120. *Determinación de agua*) o según se indica en 680. *Pérdida por secado*. Debe cumplir con los requisitos establecidos por la autoridad sanitaria competente.

Factores de coagulación activados.

Proceder según se indica en *Factores de coagulación activados* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). Para cada una de las diluciones, el tiempo de coagulación no debe ser menor a 150 segundos.

Determinación de heparina

En caso de que se haya agregado heparina durante la elaboración, se debe determinar la cantidad presente procediendo según se indica en *Valoración de heparina en factores de coagulación* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La preparación en ensayo no debe contener más de la cantidad de heparina indicada en el rótulo y en ningún caso más de 0,5 UI de heparina por UI de factor VII.

Trombina

Si la preparación en ensayo contiene heparina, determinar la cantidad presente según se indica en *Determinación de heparina* y neutralizar la cantidad presente por adición, por ejemplo de sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutraliza 1 UI de heparina). En cada uno de dos tubos de ensayo, mezclar volúmenes iguales de la preparación reconstituida y de una solución 3 g por litro de fibrinógeno. Mantener uno de los tubos a 37 °C durante 6 horas y el otro a temperatura ambiente durante 24 horas. En un tercer tubo, mezclar un volumen de solución de fibrinógeno con un volumen igual de una solución de trombina humana (1 UI por ml) y colocarlo en un baño de agua a 37 °C. No se debe producir coagulación en los tubos que contienen la preparación en ensayo. El tubo que contiene trombina debe coagular antes de 30 segundos.

Factor II

Proceder según se indica en *Valoración del Factor II de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe ser mayor de 125 % de la potencia declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 90 % ni mayor de 111 % de la potencia estimada.

Factor IX

Proceder según se indica en *Valoración del Factor IX de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe ser mayor de 125 % en base a la cantidad declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor que 125 % de la potencia estimada.

Factor X

Proceder según se indica en *Valoración del Factor IX de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada es no mayor a 125 % en base a la cantidad declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor que 90% ni mayor que 111% de la potencia estimada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de piretógenos <340>

Debe cumplir con los requisitos. Inyectar a cada conejo un volumen de la preparación reconstituida equivalente a no menos de 30 UI de factor VII por kilogramo de peso corporal.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración del Factor VII de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor de 125 % de la potencia declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor de 125 % de la potencia estimada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo: el número de UI de factor VII por envase; el contenido máximo de UI de factor II, factor IX y factor X por envase; la cantidad de proteína contenida en el envase; nombre y cantidad de cualquier sustancia agregada incluyendo heparina cuando corresponda; nombre y volumen del líquido a ser usado para la reconstitución. En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: “*La transmisión de agentes infecciosos no puede ser totalmente excluida cuando se administran productos preparados a partir de sangre o plasma humanos*”.

FACTOR VIII DE COAGULACION HUMANO

Definición - El Factor VIII de Coagulación Humano es una fracción de proteínas plasmáticas que contiene factor VIII (glicoproteína de la coagulación), junto con cantidades variables de factor de von Willebrand, dependiendo del método de preparación. Se obtiene a partir de plasma que debe cumplir los requisitos en *Plasma Humano para Fraccionamiento*. La potencia de la preparación, reconstituida según se indica en el rótulo, debe no ser menor a 20 UI de factor VIII:C por mililitro.

Caracteres generales - Polvo higroscópico o masa sólida friable, blanca o amarillo pálido.

PRODUCCIÓN

El método de preparación debe incluir uno o varios pasos que hayan demostrado eliminar o inactivar agentes infecciosos conocidos. Si se utilizan sustancias para inactivación de virus durante la producción, deberá validarse el procedimiento posterior de purificación para demostrar que la concentración de estas sustancias se reduce a niveles apropiados y que cualquier residuo presente no compromete la inocuidad de la preparación para los pacientes.

La actividad específica antes del agregado de cualquier proteína estabilizante, no debe ser menor a 1 UI de factor VIII:C por miligramo de proteína total.

La fracción de factor VIII se disuelve en un líquido apropiado. Pueden agregarse sustancias auxiliares tales como estabilizadores. No se deben agregar conservantes antimicrobianos. La solución se filtra a través de una membrana capaz de retener bacterias, se distribuye asépticamente en el envase final y se congela inmediatamente. Posteriormente se liofiliza y los envases se cierran con vacío o bajo atmósfera de gas inerte.

Ensayo de validación aplicable a productos que contienen actividad de factor von Willebrand

Para productos indicados para el tratamiento de enfermedad de von Willebrand deberá demostrarse que el proceso de fabricación produce un producto con una composición consistente con respecto al factor de von Willebrand. Esta composición puede ser caracterizada de varias formas. Por ejemplo, puede determinarse el número y la cantidad relativa de los diferentes multímeros por electroforesis en gel de agarosa (1 % de agarosa) con dodecil sulfato

de sodio (SDS) con o sin análisis por Western blot sobre nitrocelulosa, utilizando una mezcla de plasma humano normal como referencia; la visualización del patrón multimérico puede realizarse por una técnica inmunoenzimática y la evaluación cuantitativa puede realizarse por análisis densitométrico u otro método adecuado.

Ensayo de validación aplicable a productos que presentan partículas en suspensión al ser reconstituidos

Si después de la reconstitución del liofilizado, aparecen partículas, se debe demostrar que la potencia no se ve significativamente afectada después del pasaje de la preparación a través de los filtros que se encuentran en el material para la administración provisto junto con el producto.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos protegido de la luz.

[NOTA: reconstituir la preparación según se indica en el rótulo inmediatamente antes de realizar los *Ensayos*, excepto *Solubilidad* y *Agua*, y la *Valoración*.]

ENSAYOS

Identificación

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Valoración de factor VIII* y, cuando corresponda en *Valoración de factor de von Willebrand*.

Solubilidad

Al contenido de un envase, agregar el volumen de solvente indicado en el rótulo a la temperatura recomendada. La preparación debe disolverse completamente en no más de 10 minutos con agitación suave formando una solución límpida o ligeramente opalescente, incolora o ligeramente amarillenta. Si en el rótulo se indica que pueden aparecer partículas en suspensión luego de la reconstitución, la solución debe filtrarse con el material provisto y la solución filtrada deberá ser clara, límpida o ligeramente opalescente

Determinación del pH <250>

Entre 6,5 y 7,5.

Osmolalidad <640>

No debe ser menor de 240 mosmol/kg.

Proteínas totales

Diluir la preparación a examinar, si fuera necesario, con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro para obtener una solución de aproximadamente 15 mg de proteína en 2 ml. Transferir 2,0 ml a un tubo de centrifuga de fondo redondo y agregar 2,0 ml de una solución de molibdato de sodio 75 g por litro y 2,0 ml de una

mezcla de agua y ácido sulfúrico libre de nitrógeno (30:1). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar el sobrenadante líquido y dejar escurrir el tubo invertido sobre un papel de filtro. Determinar el contenido de nitrógeno en el residuo (ver 200. *Determinación de nitrógeno*) y calcular el contenido de proteínas multiplicando el resultado por 6,25.

Hemaglutininas anti-A y anti-B

Diluir la preparación en ensayo con una solución 9 g por litro de cloruro de sodio hasta una concentración de 3 UI de factor VIII:C por mililitro. Preparar por duplicado diluciones en serie de la preparación en ensayo en una solución de cloruro de sodio 9 g por litro. Agregar a cada dilución de una serie un volumen igual de una suspensión al 5 % v/v de eritrocitos del grupo A₁, previamente lavados tres veces con la solución de cloruro de sodio. Agregar a cada dilución de la otra serie un volumen igual de una suspensión al 5 % v/v de eritrocitos del grupo B, previamente lavados tres veces con la solución de cloruro de sodio. Incubar las suspensiones a 37 °C durante 30 minutos y luego lavar las células tres veces con la solución de cloruro de sodio. Dejar las células en contacto con un reactivo de globulina polivalente antihumana durante 30 minutos. Examinar al microscopio cada suspensión sin centrifugar, para detectar aglutinación. La dilución 1:64 no debe presentar aglutinación.

Antígeno de superficie de Virus de Hepatitis B

Examinar la preparación reconstituida mediante un método de sensibilidad apropiada, tal como un ensayo inmunoensayo (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). No debe detectarse antígeno de superficie de hepatitis B.

Agua

Determinar el contenido de agua por *Titulación volumétrica directa* (ver 120. *Determinación de agua*) o según se indica en 680. *Pérdida por secado*. Debe cumplir con los requisitos establecidos por la autoridad sanitaria competente.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de pirogenos <340>

Debe cumplir con los requisitos. Inyectar a cada conejo un volumen de la preparación reconstituida equivalente a no menos de 50 UI de factor VIII:C por kilogramo de peso corporal.

VALORACIÓN DE FACTOR VIII

Proceder según se indica en *Valoración del Factor VIII de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe del 80 % ni mayor del 120 % de la potencia declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor que 120 % de la potencia estimada.

VALORACIÓN DE FACTOR DE VON WILLEBRAND

Proceder según se indica en *Valoración del Factor de von Willebrand* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*), para productos indicados para el tratamiento de enfermedad de von Willebrand. La potencia estimada no debe del 60 % ni mayor del 140 % de la potencia declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo: el número de UI de factor VIII:C y, cuando corresponda, de factor de von Willebrand en el envase; la cantidad de proteína contenida en el envase; nombre y cantidad de cualquier sustancia agregada; nombre y volumen del líquido a ser usado para la reconstitución; cuando corresponda, que la preparación puede presentar pequeñas partículas después de la reconstitución. En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: “*La transmisión de agentes infecciosos no puede ser totalmente excluida cuando se administran productos preparados a partir de sangre o plasma humanos*”.

FACTOR IX DE COAGULACION HUMANO

Definición - El Factor IX de Coagulación Humano es una fracción de proteínas plasmáticas que contiene factor IX de coagulación preparado por un método que separe efectivamente el factor IX de los factores de coagulación del *Complejo Protrombínico Humano* (factor II, factor VII, y factor X). Se obtiene a partir de plasma que debe cumplir los requisitos en *Plasma Humano para Fraccionamiento*. La potencia de la preparación, reconstituida según se indica en el rótulo, no debe ser menor de 20 UI de factor IX por mililitro.

Caracteres generales - Polvo higroscópico o masa sólida friable, blanco o amarillo pálido.

PRODUCCIÓN

El método de producción debe estar diseñado para mantener la integridad funcional del factor IX, minimizar la activación de cualquier factor de coagulación (para minimizar la trombogenicidad potencial) y debe incluir uno o varios pasos que hayan demostrado eliminar o inactivar agentes infecciosos conocidos. Si se utilizan sustancias para inactivación de virus durante la producción, deberá validarse el procedimiento posterior de purificación para demostrar que la concentración de estas sustancias se reduce a niveles apropiados y que cualquier residuo presente no compromete la seguridad de la preparación para los pacientes.

La actividad específica antes del agregado de cualquier proteína estabilizante, debe ser no menor de 50 UI de factor IX por miligramo de proteína total.

La fracción de factor IX se disuelve en un líquido apropiado. Puede agregarse heparina, antitrombina y otras sustancias auxiliares tales como estabilizadores. No se deben agregar conservantes antimicrobianos. La solución se filtra a través de una membrana capaz de retener bacterias, se distribuye asépticamente en el envase final y se congela inmediatamente. Posteriormente se liofiliza y los envases se cierran con vacío o bajo atmósfera de gas inerte.

Consistencia del método de producción

La consistencia del método de producción se evalúa por procedimientos analíticos apropiados que son determinados durante el desarrollo del producto y que normalmente incluyen:

- Valoración del factor IX
- Determinación de factores de la coagulación activados

- Determinación de la actividad de factores II, VII y X las cuales no deberán ser mayores al 5 % de la actividad del factor IX.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos protegido de la luz.

[NOTA: reconstituir la preparación según se indica en el rótulo inmediatamente antes de realizar los *Ensayos*, excepto *Solubilidad* y *Agua*, y la *Valoración*.]

ENSAYOS

Identificación

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Valoración*.

Solubilidad

Al contenido de un envase, agregar el volumen de solvente indicado en el rótulo a la temperatura recomendada. La preparación debe disolverse completamente en no más de 10 minutos con agitación suave formando una solución incolora, límpida o ligeramente opalescente.

Determinación del pH <250>

Entre 6,5 y 7,5.

Osmolalidad <640>

No debe ser menor de 240 mosmol/kg.

Proteínas totales

Diluir la preparación a examinar, si fuera necesario, con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro para obtener una solución de aproximadamente 15 mg de proteína en 2 ml. Transferir 2,0 ml a un tubo de centrifuga de fondo redondo y agregar 2,0 ml de una solución de molibdato de sodio 75 g por litro y 2,0 ml de una mezcla de agua y ácido sulfúrico libre de nitrógeno (30:1). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar el sobrenadante líquido y dejar escurrir el tubo invertido sobre un papel de filtro. Determinar el contenido de nitrógeno en el residuo (ver 200. *Determinación de nitrógeno*) y calcular el contenido de proteínas multiplicando el resultado por 6,25. [NOTA: para algunos productos, especialmente aquellos a los que no se les ha agregado una proteína estabilizante como la albúmina, este método puede no ser aplicable y deberá llevarse a cabo otro método validado para la determinación de proteínas.]

Agua

Determinar el contenido de agua por *Titulación volumétrica directa* (ver 120. *Determinación de agua*) o según se indica en 680. *Pérdida por*

secado. Debe cumplir con los requisitos establecidos por la autoridad sanitaria competente.

Factores de coagulación activados

Proceder según se indica en *Factores de coagulación activados* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). Si fuera necesario, diluir la preparación a ser examinada hasta una concentración de 20 UI de factor IX por mililitro. El tiempo de coagulación para cada dilución no debe ser menor a 150 segundos.

Determinación de heparina

En caso de que se haya agregado heparina durante la elaboración, se debe determinar la cantidad presente procediendo según se indica en *Valoración de heparina en factores de coagulación* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La preparación en ensayo no debe contener más de la cantidad de heparina indicada en el rótulo y en ningún caso más de 0,5 UI de heparina por UI de factor IX.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de pirogénos <340>

Debe cumplir con los requisitos. Inyectar a cada conejo un volumen de la preparación reconstituida equivalente a no menos de 50 UI de factor IX por kilogramo de peso corporal.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración del Factor IX de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). La potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor de 125 % en base a la cantidad declarada. Los límites de confianza del error ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 80 % ni mayor que 125 % de la potencia estimada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo: el número de UI de Factor IX por envase; la cantidad de proteína contenida en el envase; nombre y cantidad de cualquier sustancia agregada incluyendo cuando corresponda, heparina; nombre y volumen del líquido a ser usado para la reconstitución. En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: “*La transmisión de agentes infecciosos no puede ser totalmente excluida cuando se administran productos preparados a partir de sangre o plasma humanos*”.

INMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-HEPATITIS B

Definición - La Inmunoglobulina Humana Anti-hepatitis B es una preparación líquida o liofilizada, que contiene inmunoglobulinas, principalmente inmunoglobulina G (IgG). La preparación está destinada a la administración por vía intramuscular. Se obtiene a partir del plasma procedente de donantes seleccionados que poseen anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Puede agregarse *Inmunoglobulina Humana Normal*.

PRODUCCIÓN

Debe cumplir los requisitos según se indica en *Inmunoglobulina humana normal*, excepto en lo indicado al número mínimo de donantes.

CONSERVACIÓN

Para preparaciones líquidas, en envases de vidrio incoloro protegido de la luz.

Para preparaciones liofilizadas, en envases herméticos, de vidrio incoloro protegido de la luz.

ENSAYOS

Debe cumplir los requisitos según se indica en *Inmunoglobulina humana normal*, excepto en lo indicado para el contenido mínimo de *Proteínas totales*

VALORACIÓN

Determinar la potencia por comparación del título de anticuerpos de la inmunoglobulina en ensayo contra una Preparación Patrón Internacional, calibrada en UI, mediante un inmunoensayo de sensibilidad y especificidad adecuadas (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). La Unidad Internacional es la actividad contenida en una determinada cantidad de la Preparación de Referencia Internacional de inmunoglobulina anti-hepatitis B. La equivalencia en UI de la Preparación Patrón Internacional es establecida por la Organización Mundial de la Salud. La potencia declarada no debe ser menor de 100 UI por ml. La potencia estimada no debe ser menor que la potencia declarada. Los límites de confianza de la potencia estimada ($P = 0,95$) no deben ser menor de 80 % ni mayor de 125 %.

ROTULADO

Indicar en el rótulo:

- Para preparaciones líquidas, el volumen de la preparación contenido en el envase y el contenido en proteína expresado en gramos por litro;

- Para preparaciones liofilizadas, la cantidad de proteína contenida en el envase, el nombre o composición y el volumen de líquido reconstituyente.

Indicar en el rótulo, la vía de administración y el número de Unidades Internacionales contenidas en el envase.

INMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-HEPATITIS B PARA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA

Definición - La Inmunoglobulina Humana Anti-hepatitis B para Administración Intravenosa es una preparación líquida o liofilizada. Debe contener inmunoglobulinas, principalmente inmunoglobulina G (IgG). Se obtiene a partir del plasma procedente de donantes seleccionados que poseen anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Puede agregarse *Inmunoglobulina Humana Normal para Administración Intravenosa*.

PRODUCCIÓN

Debe cumplir los requisitos según se indica en *Inmunoglobulina Humana Normal para Administración Intravenosa*, excepto en lo indicado al número mínimo de donantes.

CONSERVACIÓN

Para preparaciones líquidas, en envases de vidrio incoloro protegido de la luz a la temperatura indicada en el rótulo.

Para preparaciones liofilizadas, en envases de vidrio incoloro protegido de la luz a una temperatura que no exceda los 25 °C.

ENSAYOS

Debe cumplir los requisitos según se indica en *Inmunoglobulina Humana Normal para Administración Intravenosa*, excepto en lo indicado para el contenido mínimo de *Proteínas totales* y *Osmolalidad*.

POTENCIA

Determinar la potencia por comparación del título de anticuerpos de la inmunoglobulina en ensayo contra una Preparación Patrón Internacional, calibrada en UI, mediante un inmunoensayo de sensibilidad y especificidad adecuadas (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). La Unidad Internacional es la actividad contenida en una determinada cantidad de la Preparación de Referencia Internacional de inmunoglobulina anti-hepatitis B. La equivalencia en UI de la Preparación Patrón Internacional es establecida por la Organización Mundial de la Salud. La potencia declarada no debe ser menor de 50 UI por ml. La potencia estimada no debe ser menor que la

potencia declarada. Los límites de confianza de la potencia estimada ($P = 0,95$) no debe ser menor de 80,0 % ni mayor de 125,0 %.

ROTULADO

Indicar en el rótulo:

- Para preparaciones líquidas, el volumen de la preparación contenido en el envase y el contenido en proteína expresado en gramos por litro;

- Para preparaciones liofilizadas, la cantidad de proteína contenida en el envase, el nombre o composición y el volumen de líquido reconstituyente.

Indicar en el rótulo, la cantidad de inmunoglobulina, el número de Unidades Internacionales contenida en el envase y la vía de administración. Cuando corresponda, indicar la cantidad de albúmina agregada como estabilizante.

INMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL

Definición - La Inmunoglobulina Humana Normal es una preparación líquida o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente inmunoglobulina G (IgG); pueden estar presentes otras proteínas. La Inmunoglobulina Humana Normal contiene anticuerpos IgG de personas sanas. Está destinada a la administración por vía intramuscular. Se obtiene a partir de plasma que debe cumplir los requisitos en *Plasma Humano para Fraccionamiento*. No se deben agregar antibióticos al plasma utilizado.

Caracteres generales - La preparación líquida es límpida y de color amarillo pálido a pardo claro; durante su conservación puede aparecer una ligera turbidez o una pequeña cantidad de partículas. La preparación liofilizada es un polvo o una masa sólida friable, higroscópico, blanco o ligeramente amarillento.

Sustancias de referencia - Inmunoglobulina Humana para Electroforesis SA-FA. Inmunoglobulina Humana SR-FA.

PRODUCCIÓN

El método de producción debe incluir uno o varios métodos validados de eliminación o inactivación de agentes infecciosos conocidos. Si se utilizan sustancias para la inactivación de virus, debe haberse demostrado que ningún residuo de las mismas presente en el producto final causa efectos adversos en los pacientes tratados con la inmunoglobulina.

Se debe haber demostrado mediante ensayos apropiados en animales y evaluación durante los ensayos clínicos, que el producto es bien tolerado cuando se administra por vía intramuscular.

La Inmunoglobulina Humana Normal se prepara a partir de una mezcla del material recolectado como mínimo de 1.000 donantes, por un método que haya demostrado obtener un producto que:

- no transmite infecciones;
- a una concentración proteica de 160 g por litro contiene al menos dos anticuerpos (uno antiviral y uno antibacteriano) para los cuales existe un Patrón Internacional o una Preparación de Referencia, siendo la concentración de dichos anticuerpos al menos diez veces superior a la concentración de los mismos en la mezcla inicial.

La Inmunoglobulina Humana Normal se prepara como una solución estabilizada, por ejemplo en una

solución de cloruro de sodio 9 g por litro, en una solución de glicina 22,5 g por litro, o, si la preparación va a ser liofilizada, en solución de glicina 60 g por litro.

Las preparaciones multidosis contienen un conservante antimicrobiano. Se debe haber demostrado para cualquier conservante antimicrobiano o estabilizante empleado que, a la concentración empleada, no produce efectos indeseables en el producto final. La solución se debe filtrar a través de una membrana capaz de retener bacterias. La preparación puede ser posteriormente liofilizada y los envases cerrados bajo vacío o atmósfera de gas inerte.

La estabilidad de la preparación deberá haber sido demostrada mediante pruebas llevadas a cabo durante el desarrollo del producto.

CONSERVACIÓN

Para preparaciones líquidas, en envases de vidrio incoloro protegido de la luz.

Para preparaciones liofilizadas, en envases herméticos, de vidrio incoloro protegido de la luz.

[NOTA: reconstituir las preparaciones liofilizadas según se indica en el rótulo inmediatamente antes de realizar los *Ensayos*, excepto *Solubilidad* y *Agua*.]

ENSAYOS

Identificación

Examinar la preparación mediante una técnica apropiada de inmunolectroforesis (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Comparar el suero humano normal con la preparación en ensayo, ambos diluidos hasta una concentración de 10 g por litro de proteína, utilizando un antisuero contra suero humano normal. El componente principal de la preparación en ensayo debe tener la misma movilidad que el componente IgG del suero humano normal. La preparación puede contener pequeñas cantidades de otras proteínas plasmáticas.

Solubilidad

Para las preparaciones liofilizadas agregar el volumen del líquido indicado en el rótulo. La preparación debe disolverse por completo en un máximo de 20 minutos a una temperatura entre 20 y 25° C.

Determinación del pH <250>

Entre 5,0 y 7,2. Diluir la preparación en ensayo con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración de 10 g por litro de proteínas.

Proteínas totales

Diluir la preparación a examinar, si fuera necesario, con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro para obtener una solución de aproximadamente 15 mg de proteína en 2 ml. Transferir 2,0 ml a un tubo de centrifuga de fondo redondo y agregar 2,0 ml de una solución de molibdato de sodio 75 g por litro y 2,0 ml de una mezcla de agua y ácido sulfúrico libre de nitrógeno (30:1). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar el sobrenadante líquido y dejar escurrir el tubo invertido sobre un papel de filtro. Determinar el contenido de nitrógeno en el residuo (ver 200. *Determinación de nitrógeno*) y calcular el contenido de proteínas multiplicando el resultado por 6,25. [NOTA: si el producto contiene un estabilizante cuya molécula contiene nitrógeno, puede utilizarse otro método alternativo validado para determinación de proteínas.] La preparación debe contener no menos de 100 g por litro y no más de 180 g por litro de proteínas y no menos del 90 % ni más del 110 % por ciento de la cantidad declarada en el rótulo.

Agua

Determinar el contenido de agua por *Titulación volumétrica directa* (ver 120. *Determinación de agua*) o según se indica 680. *Pérdida por secado*. Debe cumplir con los requisitos establecidos por la autoridad sanitaria competente.

Composición en proteínas

Examinar por electroforesis de zona (ver 300. *Electroforesis*), utilizando como soporte tiras de gel de acetato de celulosa y como solución de electrolitos una solución reguladora barbital pH 8,6 (ver *Soluciones reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*).

Solución muestra - Diluir la preparación en ensayo con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración de proteínas de 50 g por litro.

Solución estándar - Reconstituir Inmunoglobulina Humana para Electroforesis SA-FA y diluir con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración de proteínas de 50 g por litro.

Procedimiento - Aplicar sobre una tira 2,5 µl de la *Solución muestra* en una banda de 10 mm, o bien aplicar 0,25 µl por milímetro si se emplea una tira más estrecha. En otra tira, aplicar en las mismas condiciones, un volumen igual de *Solución estándar*. Aplicar un campo eléctrico tal que el compuesto que se desplace más rápidamente migre al menos 30 mm. Tratar las tiras con solución de negro amido 10B durante 5 minutos y luego

decolorar con una mezcla de metanol y ácido acético glacial (90:10), hasta que el fondo de las tiras esté libre de color. Tratar las tiras con una mezcla de metanol y ácido acético glacial (81:19). Medir la absorbancia de las bandas a 600 nm mediante un instrumento capaz de dar a esta longitud de onda una respuesta lineal para el intervalo de medida. Calcular el resultado como un promedio de tres medidas de cada tira. El ensayo sólo es válido si en el electroforetograma obtenido con la *Solución estándar*, la proporción de proteínas contenidas en la banda principal está dentro de los límites que se especifican para la sustancia de referencia. En el electroforetograma obtenido con la *Solución muestra*, no más de 10 % de las proteínas tienen una movilidad distinta de la de la banda principal.

Distribución del tamaño molecular

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 60 cm × 7,5 mm o 30 cm × 7,8 mm con fase estacionaria constituida por gel de sílice hidrofílico para cromatografía para fraccionamiento de proteínas globulares con masa molecular relativa en el rango de 10.000 a 500.000. El caudal debe ser aproximadamente 0,5 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver 4,873 g de fosfato dibásico de sodio, 1,741 g de fosfato monobásico de sodio, 11,688 g de cloruro de sodio y 50 mg de azida sódica en un litro de agua.

Solución muestra - Diluir la preparación en ensayo con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración apropiada al sistema cromatográfico que se vaya a utilizar.

Solución estándar - Diluir Inmunoglobulina Humana SR-FA con solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta la misma concentración proteica que la *Solución muestra*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (generalmente el volumen de inyección debe contener entre 50 a 600 µg de proteínas) de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. En el cromatograma obtenido con la *Solución estándar*, el pico principal corresponde al monómero de IgG observándose otro pico correspondiente al dímero, cuyo tiempo de retención relativo es aproximadamente 0,85 a 0,90 veces el del monómero. Los picos observados en el cromatograma obtenido con la *Solución muestra* se identifican por comparación con los obtenidos en la *Solución estándar*. Cualquier pico con tiempo de

retención inferior al del dímero corresponde a polímeros y agregados. La preparación en ensayo cumple el ensayo si en el cromatograma de la *Solución muestra* los tiempos de retención del monómero y dímero con respecto a los de los picos correspondientes de la *Solución estándar* son de $1 \pm 0,02$; la suma de las áreas de los picos de monómero y dímero deben ser no menor al 85 % del área total del cromatograma y la suma de las áreas de los picos correspondientes a polímeros y agregados debe ser no mayor al 10 % del área total del cromatograma.

Anticuerpos contra Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

Examinar la preparación en ensayo mediante un método de sensibilidad y especificidad apropiada, tal como un ensayo inmunoenzimático (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Debe contener no menos de 0,5 UI por g de inmunoglobulina.

Anticuerpos frente al virus de la hepatitis A

[NOTA: realizar el siguiente ensayo sólo si el producto está indicado para la profilaxis de Hepatitis A.] Determinar mediante un ensayo de sensibilidad y especificidad adecuadas (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*), el contenido de anticuerpos contra el virus de la Hepatitis A por comparación con una preparación de referencia calibrada en Unidades Internacionales. La potencia declarada debe ser no menor a 100 UI por ml. La potencia estimada debe ser no menor que la potencia declarada. Los límites de confianza de la potencia estimada ($P = 0,95$) deben no ser menores del 80 % ni mayores del 125 %.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de pirogéneos <340>

Debe cumplir con los requisitos. Inyectar a cada conejo 1 ml de la preparación en ensayo por kilogramo de peso corporal.

ROTULADO

Indicar en el rótulo:

- Para preparaciones líquidas, el volumen de la preparación contenido en el envase y el contenido en proteína expresado en gramos por litro;
- Para preparaciones liofilizadas, la cantidad de proteína contenida en el envase, el nombre o composición y el volumen de líquido reconstituyente.

Indicar en el rótulo, la vía de administración.

Cuando corresponda, que la preparación es adecuada para su uso en la profilaxis de la infección

por virus de la hepatitis A; la actividad de los anticuerpos anti-hepatitis A en UI por mililitro y el nombre y la cantidad de conservante antimicrobiano presente en la preparación.

INMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL PARA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA

Definición - La Inmunoglobulina Humana Normal para Administración Intravenosa es una preparación líquida o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente Inmunoglobulina G (IgG). Pueden estar presentes otras proteínas. La Inmunoglobulina Humana Normal para Administración Intravenosa contiene anticuerpos IgG de personas sanas.

La Inmunoglobulina Humana Normal para Administración Intravenosa se obtiene a partir de plasma que debe cumplir con los requisitos en *Plasma Humano para Fraccionamiento*. No se deben agregar antibióticos al plasma utilizado.

[NOTA: esta monografía no es aplicable a productos preparados con la intención de obtener fragmentos de inmunoglobulina o inmunoglobulina químicamente modificada.]

Caracteres generales - La preparación líquida es límpida o ligeramente opalescente, incolora o amarilla pálida. La preparación liofilizada es un polvo higroscópico blanco o masa sólida friable blanco o ligeramente amarillento.

Sustancias de referencia - Inmunoglobulina Humana para Electroforesis SA-FA. Inmunoglobulina Humana SR-FA.

PRODUCCIÓN

El método de producción debe incluir uno o varios métodos validados de eliminación o inactivación de agentes infecciosos conocidos. Si se emplean sustancias para la inactivación de virus, debe haberse demostrado que ningún residuo de las mismas presente en el producto final causa efectos adversos en los pacientes tratados con la inmunoglobulina.

Se debe haber demostrado mediante ensayos apropiados en animales y evaluación durante los ensayos clínicos que el producto es bien tolerado cuando se administra por vía intravenosa.

La Inmunoglobulina Humana Normal se prepara a partir de una mezcla del material recolectado como mínimo de 1.000 donantes, por un método que haya demostrado obtener un producto que:

- no transmite infecciones ;
- a una concentración proteica de 50 g por litro, contiene al menos dos anticuerpos (uno antiviral y uno antibacteriano) para los cuales existe

un Patrón Internacional o una Preparación de Referencia, siendo la concentración de dichos anticuerpos al menos tres veces superior a la concentración de los mismos en la mezcla inicial

- tiene una distribución definida de subclases de Inmunoglobulina G,
- cumple el ensayo de Función Fc de inmunoglobulina

La Inmunoglobulina Humana Normal para Administración Intravenosa se prepara como una solución estabilizada o como preparación liofilizada. Se puede agregar un estabilizante. En ambos casos la solución se debe filtrar a través de una membrana capaz de retener bacterias. No deben agregarse conservantes antimicrobianos durante el fraccionamiento ni en la etapa de preparación de la solución final a granel. La preparación puede ser liofilizada y los envases cerrados bajo vacío o atmósfera de gas inerte.

La estabilidad de la preparación debe haber sido demostrada mediante pruebas llevadas a cabo durante el desarrollo del producto.

CONSERVACIÓN

Para preparaciones líquidas, en envases de vidrio incoloro protegido de la luz a la temperatura indicada en el rótulo.

Para preparaciones liofilizadas, en envases herméticos, de vidrio incoloro protegido de la luz a una temperatura que no exceda los 25 °C.

[NOTA: reconstituir las preparaciones liofilizadas según se indica en el rótulo inmediatamente antes de realizar los *Ensayos*, excepto *Solubilidad y Agua*.]

ENSAYOS

Identificación

Examinar la preparación mediante una técnica apropiada de inmunoelectroforesis (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Comparar el suero humano normal con la preparación en ensayo, ambos diluidos hasta una concentración de 10 g por litro de proteína, utilizando un antisuero contra suero humano normal. El componente principal de la preparación a ser examinada debe tener la misma movilidad que el componente IgG del suero humano normal. La preparación puede contener pequeñas cantidades de otras proteínas plasmáticas. Si se ha agregado albúmina humana como estabilizador, ésta puede verse como el componente principal.

Solubilidad.

Para las preparaciones liofilizadas agregar el volumen del líquido indicado en el rótulo. La prepara-

ción debe disolverse por completo en un máximo de 30 minutos a una temperatura entre 20 y 25° C.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 7,4. Diluir la preparación en ensayo con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración de 10 g por litro de proteínas.

Osmolalidad <640>

No debe ser menor de 240 mosmol/kg.

Proteínas totales

Diluir la preparación a examinar, si fuera necesario, con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro para obtener una solución de aproximadamente 15 mg de proteína en 2 ml. Transferir 2,0 ml a un tubo de centrifuga de fondo redondo y agregar 2,0 ml de una solución de molibdato de sodio 75 g por litro y 2,0 ml de una mezcla de agua y ácido sulfúrico libre de nitrógeno (30:1). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar el sobrenadante líquido y dejar escurrir el tubo invertido sobre un papel de filtro. Determinar el contenido de nitrógeno en el residuo (ver 200. *Determinación de nitrógeno*) y calcular el contenido de proteínas multiplicando el resultado por 6,25. [NOTA: si el producto contiene un estabilizante cuya molécula contiene nitrógeno, puede utilizarse otro método alternativo validado para determinación de proteínas.] La preparación debe contener no menos de 30 g por litro de proteína y no menos del 90 % ni más del 110 % de la cantidad declarada en el rótulo.

Agua

Determinar el contenido de agua por *Titulación volumétrica directa* (ver 120. *Determinación de agua*) o según se indica en 680. *Pérdida por secado*. Debe cumplir con los requisitos establecidos por la autoridad sanitaria competente.

Composición en proteínas

Examinar por electroforesis de zona (ver 300. *Electroforesis*), utilizando como soporte tiras de gel de acetato de celulosa y como solución de electrolitos una solución reguladora barbital pH 8,6 (ver *Soluciones reguladoras en Reactivos y Soluciones*).

Solución muestra - Diluir la preparación en ensayo con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración de proteínas de 30 g por litro.

Solución estándar - Reconstituir Inmunoglobulina Humana para Electroforesis SA-FA y diluir con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración de proteínas de 30 g por litro.

Procedimiento - Aplicar sobre una tira 4,0 µl de *Solución muestra* en una banda de 10 mm, o bien aplicar 0,4 µl por milímetro si se emplea una tira más estrecha. En otra tira, aplicar en las mismas

condiciones, un volumen igual de *Solución estándar*. Aplicar un campo eléctrico tal que el compuesto que se desplace más rápidamente migre al menos 30 mm. Tratar las tiras con solución de negro amido 10B durante 5 minutos y luego decolorar con una mezcla de metanol y ácido acético glacial (90:10), hasta que el fondo de las tiras esté libre de color. Tratar las tiras con una mezcla de metanol y ácido acético glacial (81:19). Medir la absorbancia de las bandas a 600 nm mediante un instrumento capaz de dar a esta longitud de onda una respuesta lineal para el intervalo de medida. Calcular el resultado como un promedio de tres medidas de cada tira. El ensayo sólo es válido si en el electroforetograma obtenido con la *Solución estándar*, la proporción de proteínas contenidas en la banda principal está dentro de los límites que se especifican para la sustancia de referencia. En el electroforetograma obtenido con la *Solución muestra*, no más de 5 % de las proteínas tienen una movilidad distinta de la de la banda principal. [NOTA: este límite no es aplicable si se ha agregado albúmina a la preparación como estabilizante; para estas preparaciones, se debe realizar el ensayo para *Composición de proteínas* durante la fabricación, antes de agregar el estabilizante.]

Distribución del tamaño molecular

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 60 cm x 7,5 mm o 30 cm x 7,8 mm con fase estacionaria constituida por gel de sílice hidrofílico para cromatografía para fraccionamiento de proteínas globulares con masa molecular relativa en el rango de 10.000 a 500.000. El caudal debe ser aproximadamente 0,5 ml por minuto.

Fase móvil - Disolver: 4,873 g de fosfato dibásico de sodio, 1,741 g de fosfato monobásico de sodio, 11,688 g de cloruro de sodio y 50 mg de azida sódica en un litro de agua.

Solución muestra - Diluir la preparación en ensayo con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta una concentración apropiada al sistema cromatográfico que se vaya a utilizar.

Solución estándar - Diluir Inmunoglobulina Humana SR-FA con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro hasta la misma concentración que la *Solución muestra*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (generalmente el volumen de inyección debe contener entre 50 a 600 µg de proteínas) de la *Solución muestra* y la *Solución de referencia*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. En el cromatograma obtenido con la *Solución estándar*, el

pico principal corresponde al monómero de IgG observándose otro pico correspondiente al dímero, cuyo tiempo de retención relativo al pico principal es aproximadamente 0,85. Los picos observados en el cromatograma obtenido con la *Solución muestra* se identifican por comparación con los obtenidos en la *Solución estándar*. Cualquier pico con tiempo de retención inferior al del dímero corresponde a polímeros y agregados. La preparación a examinar cumple con el ensayo si en el cromatograma de la *Solución muestra* los tiempos de retención del monómero y dímero con respecto a los de los picos correspondientes en la *Solución estándar* son de $1 \pm 0,02$; la suma de las áreas de los picos de monómero y dímero debe ser no menor al 90 % del área total del cromatograma y la suma de las áreas de los picos de polímeros y agregados debe ser no mayor al 3 % del área total del cromatograma. [NOTA: este requisito no es aplicable a productos a los que se les ha agregado albúmina como estabilizante; para productos estabilizados con albúmina se debe realizar el ensayo para *Distribución del tamaño molecular* durante la fabricación, antes de agregar el estabilizante.]

Actividad anticomplementaria

Proceder según se indica en *Actividad anticomplementaria* en 385. *Ensayos en hemoderivados*. El consumo de complemento de la preparación en ensayo debe ser no mayor al 50 % ($1 CH_{50}$ por miligramo de inmunoglobulina).

Activador de precalicreína

Proceder según se indica en *Activador de precalicreína* en 385. *Ensayos en hemoderivados*. No debe contener más de 35 UI por ml, determinado sobre una solución que contiene 30 g por litro de inmunoglobulina.

Hemaglutininas anti-A y anti-B

[NOTA: si la preparación examinar contiene más de 30 g por litro de inmunoglobulina, diluir hasta esa concentración antes de preparar las diluciones que serán utilizadas en el ensayo.]

Preparar por duplicado diluciones en serie de la preparación en ensayo en una solución de cloruro de sodio 9 g por litro. Agregar a cada dilución de una serie un volumen igual de una suspensión al 5 % v/v de eritrocitos del grupo A₁, previamente lavados tres veces con la solución de cloruro de sodio. Agregar a cada dilución de la otra serie un volumen igual de una suspensión al 5 % v/v de eritrocitos del grupo B, previamente lavados tres veces con la solución de cloruro de sodio. Incubar las suspensiones a 37 °C durante 30 minutos y luego lavar las células tres veces con la solución de cloruro de sodio. Dejar las células en contacto con

un reactivo de globulina polivalente antihumana durante 30 minutos. Examinar al microscopio cada suspensión sin centrifugar, para detectar aglutinación. La dilución 1:64 no debe presentar aglutinación.

Anticuerpos contra Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

Examinar la preparación en ensayo mediante un método de sensibilidad y especificidad apropiada, tal como un ensayo inmunoenzimático (ver 635. *Métodos inmunológicos*). Debe contener no menos de 0,5 UI por g de inmunoglobulina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de pirogenos <340>

Debe cumplir con los requisitos. Inyectar a cada conejo un volumen equivalente a 0,5 g de inmunoglobulina por kilogramo de peso corporal pero no más de 10 ml por kilogramo de peso corporal.

ROTULADO

Indicar en el rótulo:

- Para preparaciones líquidas, el volumen de la preparación contenido en el envase y el contenido en proteína expresado en gramos por litro;
- Para preparaciones liofilizadas, la cantidad de proteína contenida en el envase, el nombre o composición y el volumen de líquido reconstituyente.

Indicar en el rótulo, la cantidad de inmunoglobulina contenida en el envase, la vía de administración, la distribución de subclases de inmunoglobulina G presentes en la preparación, el contenido máximo de inmunoglobulina A. Cuando corresponda, indicar la cantidad de albúmina agregada como estabilizante.

INMUNOGLOBULINA HUMANA ANTITETÁNICA

Definición - La Inmunoglobulina Humana Antitetánica es una preparación, líquida o liofilizada, que contiene inmunoglobulinas, principalmente inmunoglobulina G (IgG). La preparación está destinada a la administración por vía intramuscular. Se obtiene a partir de plasma que contiene anticuerpos específicos contra la toxina del *Clostridium tetani*. Se le puede agregar *Inmunoglobulina Humana Normal*.

PRODUCCIÓN

Durante el desarrollo, debe establecerse una relación satisfactoria entre la potencia determinada por inmunoensayo tal como se describe en *Valoración* y la determinada mediante el ensayo de *Capacidad neutralizante de toxina en ratones*, según se describe a continuación.

Capacidad neutralizante de toxina en ratones

La potencia se determina comparando la cantidad necesaria para proteger ratones de los efectos paralizantes de una cantidad determinada de toxina tetánica, con la cantidad de una preparación de referencia de *Inmunoglobulina Humana Antitetánica*, calibrada en Unidades Internacionales, necesaria para conferir la misma protección.

La Unidad Internacional de antitoxina es la actividad neutralizante específica para la toxina tetánica contenida en una determinada cantidad de la Preparación Patrón Internacional, constituida por inmunoglobulina humana liofilizada. La Organización Mundial de la Salud establece la equivalencia en Unidades Internacionales de la Preparación Patrón Internacional.

Selección de animales - Emplear ratones con un peso comprendido entre 16 y 20 g.

Preparación de la toxina de prueba - Preparar la toxina de prueba mediante un método apropiado, a partir del filtrado estéril de un cultivo en medio líquido de *C. tetani*. Los dos métodos descritos a continuación se citan como ejemplos. Puede emplearse cualquier otro método apropiado.

(1) Añadir 1 ó 2 volúmenes de glicerina al filtrado de un cultivo de aproximadamente 9 días y conservar la mezcla en estado líquido, ligeramente por debajo de 0 °C.

(2) Precipitar la toxina agregando al filtrado sulfato de amonio, secar el precipitado al vacío sobre pentóxido de fósforo, reducir a polvo y almacenar en seco, ya sea en ampollas selladas o al vacío sobre pentóxido de fósforo.

Determinación de la dosis de prueba de la toxina (Lp/10 dosis) - Preparar una solución de la preparación patrón en un líquido apropiado, de tal manera que contenga 0,5 UI de antitoxina por ml. Si la toxina de prueba se conserva en forma de polvo, reconstituirla en un líquido apropiado. Preparar una serie de mezclas de la solución de la preparación patrón de antitoxina patrón (0,5 UI por ml) y de la solución de la toxina en ensayo, de tal manera que cada mezcla contenga 2,0 ml de la solución de preparación patrón y una serie gradual de volúmenes de la toxina de prueba. Ajustar el volumen final de cada mezcla a 5,0 ml, con un líquido apropiado. Mantener las mezclas protegidas de la luz durante 60 minutos. Empleando seis ratones para cada mezcla, inyectar una dosis de 0,5 ml subcutánea en cada ratón. Mantener los ratones en observación durante 96 horas. Los ratones que sufran parálisis pueden ser sacrificados. La dosis de prueba de la toxina es la contenida en 0,5 ml de la mezcla preparada con la menor cantidad de toxina capaz de provocar a pesar de su neutralización parcial por la preparación patrón de antitoxina, la parálisis de los seis ratones a los que se inyectó, durante el período de observación.

Determinación de la potencia de la inmunoglobulina - Preparar una solución de la preparación patrón, con un líquido apropiado, de tal manera que contenga 0,5 UI de antitoxina por ml. Preparar una solución de la toxina de prueba, en un líquido apropiado de forma tal que contenga cinco dosis de prueba por ml. Preparar una serie de mezclas de la solución de la toxina de prueba y de la inmunoglobulina a ser examinada, de manera tal que cada mezcla contenga 2,0 ml de la solución de la toxina de prueba y una serie gradual de volúmenes de la inmunoglobulina a ser examinada. Ajustar el volumen final de cada mezcla a 5,0 ml, con un líquido apropiado. Preparar una segunda serie de mezclas de la solución de la toxina de prueba y porciones de la antitoxina patrón, de forma tal que cada mezcla contenga 2,0 ml de la solución de la toxina de prueba y una serie gradual de volúmenes de la preparación de referencia; en esta segunda serie de mezclas, la dilución media de la preparación de referencia corresponde a una mezcla que contenga 1 UI (2,0 ml) de la solución de la preparación patrón. Ajustar el volumen final de las mezclas a 5,0 ml, con un líquido apropiado. Mantener las mezclas de las dos series protegidas de la luz durante 60 minutos. Empleando seis ratones para cada mezcla, inyectar una dosis de 0,5 ml subcutánea en cada ratón. Mantener los ratones en observación durante 96 horas. Los ratones que sufran parálisis pueden ser sacrificados. La mezcla que contenga el mayor volumen de

inmunoglobulina que no protege a ningún ratón de la parálisis contiene 1 UI. Esta cantidad se usa para calcular la potencia de la inmunoglobulina en UI por ml.

El ensayo solo es válido si todos los ratones que hayan sido inyectados con mezclas que contengan 2,0 ml o menos de la solución de la preparación de referencia sufran parálisis y todos aquellos que hayan sido inyectados con mezclas que contengan más de esa cantidad sigan presentando movilidad.

CONSERVACIÓN

Para preparaciones líquidas, en envases de vidrio incoloro protegido de la luz.

Para preparaciones liofilizadas, en envases herméticos, de vidrio incoloro protegido de la luz.

ENSAYOS

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Inmunoglobulina Humana Normal*, excepto en lo referente al número mínimo de donantes y al contenido mínimo en *Proteínas totales*.

VALORACIÓN

Determinar la potencia por comparación del título de anticuerpos de la inmunoglobulina a ser examinada con el de una Preparación Patrón Internacional, calibrada en UI, mediante un inmunoensayo de sensibilidad y especificidad adecuadas (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). La Unidad Internacional es la actividad contenida en una determinada cantidad de la Preparación de Referencia Internacional de inmunoglobulina antitetánica. La equivalencia en Unidades Internacionales de la Preparación Patrón Internacional es establecida por la Organización Mundial de la Salud. La potencia declarada no debe ser menor de 100 UI de antitoxina tetánica por mililitro. La potencia estimada no debe ser menor que la potencia declarada. Los límites de confianza de la potencia estimada ($P = 0,95$) no deben ser menores del 80 % ni mayores del 125 %.

ROTULADO

Indicar en el rótulo:

- Para preparaciones líquidas, el volumen de la preparación contenido en el envase y el contenido en proteína expresado en gramos por litro;
- Para preparaciones liofilizadas, la cantidad de proteína contenida en el envase, el nombre o composición y el volumen de líquido reconstituyente.

Indicar en el rótulo, la vía de administración y el número de Unidades Internacionales contenido en el envase.

PLASMA HUMANO PARA FRACCIONAMIENTO

Definición - El Plasma Humano para Fraccionamiento es la fracción líquida de la sangre humana, remanente de la separación de los elementos celulares de la sangre colectada en un recipiente que contiene anticoagulante o separada por filtración continua o centrifugación de sangre anticoagulada en un procedimiento de aféresis. Se destina a la producción de hemoderivados.

Caracteres generales - Antes de la congelación, líquido límpido o ligeramente turbio, sin signos visibles de hemólisis, amarillo pálido a verde.

CONSERVACIÓN

A temperatura no mayor a -20°C . El plasma puede ser utilizado para fraccionamiento si la temperatura se mantiene entre -20°C y -15°C por no más de 72 horas sin exceder los -15°C en ninguna ocasión y siempre que se haya mantenido a una temperatura no mayor a -5°C .

PRODUCCIÓN

Dadores

Sólo podrán aceptarse dadores cuidadosamente seleccionados para quienes pueda comprobarse, después de examen médico, ensayos de laboratorio y estudio de la historia médica del dador, que son libres de agentes detectables de infección transmisible por derivados plasmáticos.

Registros - Los registros de dadores y donaciones deben ser llevados de forma tal que, manteniendo el grado de confidencialidad requerido acerca de la identidad del donante, pueda ser trazable la información referida al origen de cada donación en un pool de plasma, los resultados de los procedimientos de aceptación de dadores y los resultados de los ensayos de laboratorio.

Ensayos de laboratorio - Se deben llevar a cabo sobre cada donación individual los siguientes ensayos de laboratorio para la detección de marcadores virales:

1. Anticuerpos contra Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (anti-HIV-1)
2. Anticuerpos contra Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2 (anti-HIV-2)
3. Antígeno de Superficie de Virus de Hepatitis B (HBsAg)
4. Anticuerpos contra Virus de Hepatitis C (a-HCV)

Los métodos usados deben ser de sensibilidad y especificidad apropiadas y deben estar aprobados por la autoridad competente. Si se obtiene un resultado reactivo repetido en algunos de estos ensayos, la donación debe rechazarse.

UNIDADES DE PLASMA INDIVIDUALES

Cuando se obtiene a partir de sangre entera el plasma debe prepararse por un método que remueva células y detritos celulares tan completamente como sea posible y por un método diseñado de forma tal que prevenga la introducción de microorganismos. No se deben agregar agentes antimicrobianos ni antifúngicos al plasma. Los envases deben cumplir los requisitos en *Envases de vidrio* <430> y *Envases primarios de plástico* <420>. Los envases deben cerrarse de forma de prevenir la contaminación.

Si se mezclan dos o más unidades de plasma antes del congelamiento, las operaciones deben llevarse a cabo bajo condiciones asépticas empleando dispositivos de conexión estériles que no hayan sido previamente utilizados. Los envases deben ser cerrados de manera de prevenir la contaminación.

Cuando se obtiene por plasmaféresis, el plasma que se utilizará para la recuperación de proteínas lábiles debe ser congelado a $-30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ o temperatura inferior, tan rápido como sea posible dentro de las 24 horas de su recolección.

El plasma que se utilizará para la recuperación de proteínas lábiles se separa de los elementos celulares y se congela a $-30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ o temperatura inferior tan rápido como sea posible dentro de las 24 horas de su recolección.

Cuando se obtiene a partir de sangre entera, el plasma que se utilizará únicamente para la recuperación de proteínas que no son lábiles se separa de los elementos celulares y se congela a -20°C o temperatura inferior tan rápido como sea posible dentro de las 72 horas de su recolección.

[NOTA: no está previsto realizar en cada unidad de plasma los ensayos de *Proteínas totales* y *Valoración del factor VIII de coagulación sanguínea*. Estos ensayos son aconsejables en el contexto de las buenas prácticas de fabricación, siendo aplicable el ensayo *Valoración del factor VIII de coagulación sanguínea* en el caso del plasma destinado a la preparación de concentrados de proteínas lábiles. El contenido de proteínas totales de una unidad de plasma depende del contenido en proteínas séricas del donante y de la dilución inherente al proceso de donación. Cuando el plasma proviene de un donante apropiado y se ha empleado la proporción necesaria de solución anticoagulante, el contenido en *Proteínas totales*

cumple con el límite de 50 g por litro. Si se recolecta un volumen de plasma o de sangre más pequeño que el previsto sobre la solución anticoagulante, el plasma resultante no es necesariamente inadecuado para su mezcla y fraccionamiento. La conservación del factor VIII en la donación depende del procedimiento de recolección y posterior manipulación de la sangre y del plasma. Siguiendo las buenas prácticas, habitualmente es posible obtener 0,7 UI por mililitro, pero unidades de plasma que posean una actividad inferior pueden utilizarse igualmente para la producción de concentrados de factores de coagulación. El fin de las buenas prácticas de fabricación es conservar los componentes lábiles tanto como sea posible.]

Proteínas totales

Llevar a cabo el ensayo a partir de la mezcla de no menos de 10 unidades. Diluir la preparación a examinar, si fuera necesario, con una solución de cloruro de sodio 9 g por litro para obtener una solución de aproximadamente 15 mg de proteína en 2 ml. Transferir 2,0 ml a un tubo de centrifuga de fondo redondo y agregar 2,0 ml de una solución de molibdato de sodio de 75 g por litro y 2,0 ml de una mezcla de agua y ácido sulfúrico libre de nitrógeno (30:1). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar el líquido sobrenadante y dejar escurrir el tubo invertido sobre un papel de filtro. Determinar el contenido de nitrógeno en el residuo (ver 200. *Determinación de nitrógeno*) y calcular el contenido de proteínas multiplicando el resultado por 6,25. El contenido en proteínas totales no debe ser menor de 50 g por litro.

Factor VIII

Proceder según se indica en *Valoración del factor VIII de coagulación sanguínea* (ver 385. *Ensayos en hemoderivados*). Realizar el ensayo a partir de la mezcla de no menos de 10 unidades. Descongelar las muestras en ensayo a una temperatura no mayor de 37 °C, si fuera necesario. Llevar a cabo el ensayo empleando un plasma de referencia calibrado frente a la Preparación Internacional de Referencia para factor VIII de coagulación sanguínea en plasma. La actividad no debe ser menor de $0,7 \pm 0,14$ UI por mililitro.

MEZCLA DE PLASMAS

Deben efectuarse sobre la primera mezcla homogénea de plasma usado para la fabricación de hemoderivados. Los ensayos de Antígeno de Superficie de Virus de la Hepatitis B (HBsAg), Anticuerpos contra el Virus de la Hepatitis C (anti-HCV) y Anticuerpos contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (anti-HIV) empleando

métodos de sensibilidad y especificidad apropiada: la mezcla debe dar resultados no reactivos para estos ensayos.

La mezcla inicial de plasma también debe someterse a la determinación de ARN de Virus de Hepatitis C por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, empleando un método validado. En la realización del ensayo debe incluirse un control positivo conteniendo 100 UI por ml de ARN de virus de Hepatitis C y, para probar la presencia de inhibidores se debe incluir un control interno preparado por adición de un marcador adecuado a la mezcla de plasmas a ser ensayada. El ensayo no es válido si el control positivo resulta no reactivo o si el resultado obtenido con el control interno indica la presencia de inhibidores. La mezcla de plasma cumple con el ensayo si no se detecta la presencia de ARN de virus de Hepatitis C.

ROTULADO

El rótulo debe contener la información necesaria que permita rastrear cada unidad individual de plasma hasta su dador específico.

PRODUCTOS BIOLÓGICOS

APARTADO DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS

ÍNDICE

Monografías

Heparina Cálcica
Heparina Sódica
Heparina, Solución Inyectable
Insulina Bovina e Insulina Porcina
Insulina Humana
Insulina, Preparaciones Inyectables
Insulina Corriente, Solución Inyectable
Insulina Cinc Amorfa, Suspensión Inyectable
Insulina Cinc Cristalina, Suspensión Inyectable
Insulina Cinc, Suspensión Inyectable
Insulina Cinc Protamina, Suspensión Inyectable
Insulina Bifásica, Suspensión Inyectable
Insulina Isofana, Suspensión Inyectable
Insulina Isofana Bifásica, Suspensión Inyectable
Oxitocina
Oxitocina, Solución a granel
Protamina, Sulfato de
Protamina, Sulfato de, Solución Inyectable

HEPARINA CÁLCICA

Definición - Heparina Cálcica es la sal cálcica de un glucosaminoglicano sulfatado presente en los tejidos de mamíferos. Se obtiene a partir de pulmón del ganado bovino o de la mucosa intestinal del ganado bovino o porcino. Se produce de manera de minimizar o eliminar la contaminación microbiana y las sustancias hipotensoras. Por hidrólisis total, se libera *D*-glucosamina, ácido *D*-glucurónico, ácido *L*-idurónico, ácido acético y ácido sulfúrico. Presenta la propiedad característica de retrasar la coagulación de la sangre recientemente extraída. La actividad de la Heparina Cálcica destinada a la administración parenteral no debe ser menor de 150 UI por miligramo, calculada sobre la sustancia seca. La actividad de la Heparina Cálcica no destinada a la administración parenteral no debe ser menor de 120 UI por miligramo, calculada sobre la sustancia seca. Heparina Cálcica debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Polvo blanco o casi blanco. Moderadamente higroscópico. Fácilmente soluble en agua.

Sustancias de referencia - Heparina Bovina SR-FA. Heparina Porcina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos de cierre inviolable.

Precaución - Los animales a partir de los cuales la Heparina se obtiene deben cumplir los requerimientos de animales sanos apropiados para el consumo humano, con la autorización de la Autoridad Sanitaria competente. El proceso de manufactura deberá estar validado para demostrar la apropiada inactivación o remoción de cualquier contaminación por virus u otro agente infeccioso.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe retrasar la coagulación de sangre recién extraída.

B - Examinar por electroforesis de zona (ver 300. *Electroforesis*) empleando agarosa para electroforesis como soporte [NOTA: también se puede emplear como soporte para electroforesis tiras de acetato de celulosa]. Para equilibrar la agarosa y como solución electrolítica, emplear una mezcla de 50 ml de ácido acético glacial y 800 ml de agua. Ajustar a pH 3 con hidróxido de litio y diluir a 1 litro con agua.

Solución muestra - Disolver 25 mg de Heparina Cálcica en agua y diluir a 10 ml con el mismo solven-

te.

Solución estándar - Diluir la Heparina SR-FA correspondiente con agua para obtener una solución similar a la *Solución muestra*.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la tira entre 2 y 3 µl de *Solución estándar* y *Solución muestra*. Aplicar una corriente eléctrica de 1 a 2 mA por centímetro de ancho de tira, a una diferencia de potencial de 300 V, durante aproximadamente 10 minutos. Teñir las tiras empleando una solución de azul de toluidina al 0,1 % y lavar para eliminar el exceso de colorante. La relación entre la movilidad de la banda principal o de las bandas en el electroforegrama obtenido a partir de la *Solución muestra* y la movilidad de la banda en el electroforegrama obtenido con la *Solución estándar* debe estar comprendido entre 0,9 y 1,1.

C - Una solución de Heparina Cálcica debe responder a los ensayos para *Calcio* <410>

Determinación de la rotación óptica <170>

Rotación específica: No menos de +35, determinada a 20 °C sobre la sustancia seca.

Solución muestra: 40 mg por ml, en agua.

Determinación del pH <250>

Entre 5,5 y 8,0, determinado sobre una solución de Heparina Cálcica de aproximadamente 10 mg por ml en agua libre de dióxido de carbono.

Impurezas proteicas y nucleotídicas

Disolver 40 mg de Heparina Cálcica en agua, transferir a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. La absorbancia de esta solución (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*), determinada a 260 y 280 nm, no debe ser mayor de 0,20 y 0,15, respectivamente.

Determinación de Nitrógeno <200>

Método I. No más de 2,5 %, con respecto a la sustancia seca; determinado sobre 100 mg.

Calcio

Pesar exactamente alrededor de 200 mg de Heparina Cálcica, transferir a un erlenmeyer de 500 ml y agregar 300 ml de agua. Agregar 6 ml de solución de hidróxido de sodio al 42 % y 15 mg de una mezcla de cloruro de sodio y ácido calcona carboxílico (99:1). Titular con edetato disódico 0,1 M (SV) hasta que el color cambie de violeta a azul nítido (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de edetato disódico 0,1 M equivale a 4,008 mg de Ca. No debe contener menos de 9,5 ni más de 11,5 % de Ca, calculado sobre la sustancia seca.

Determinación del residuo de ignición <270>

Entre 32,0 y 40,0 %, con respecto a la sustancia seca; determinado sobre 200 mg.

Límite de metales pesados <590>

Método VI. No más de 0,003 %, determinado sobre 500 mg. Preparar la *Solución estándar* empleando 1,5 ml de *Solución estándar de plomo (10 ppm)*.

Pérdida por secado <680>

Secar 1,0 g de Heparina Cálcica sobre pentóxido de fósforo a una presión no mayor de 5 mm Hg, a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 8,0 % de su peso.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando en el rótulo se indique que la Heparina Cálcica se destina a la preparación de formas farmacéuticas inyectables que no se someten a un tratamiento posterior de eliminación de endotoxinas bacterianas, no debe contener más de 0,01 Unidades de Endotoxina por UI de Heparina. [NOTA: puede ser necesaria la adición de cationes divalentes para cumplir con el criterio de validación.]

Ensayos de esterilidad <370>

Cuando en el rótulo se indique que la Heparina Cálcica es estéril, debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

La actividad anticoagulante de la heparina se determina *in vitro* por comparación de su capacidad, en condiciones dadas, para retrasar la coagulación de plasma sustrato citratado y recalificado, con la de una preparación de referencia de heparina calibrada en Unidades Internacionales. [NOTA: los volúmenes citados en el texto se dan a título indicativo y pueden ser adaptados al equipo empleado, siempre que se respeten las proporciones indicadas en esta monografía.]

Plasma sustrato - [NOTA 1: el *Plasma sustrato* puede ser reemplazado por un reactivo comercial humano u ovino]. [NOTA 2: para la extracción y manipulación de la sangre, emplear un equipo hidrofóbico fabricado a partir de materiales plásticos adecuados o de vidrio siliconado]. Recolectar un volumen de sangre a partir de no menos de 5 corderos. Resulta conveniente un volumen de sangre de 285 ml añadido a 15 ml de solución anticoagulante, aunque pueden extraerse volúmenes menores, de animales vivos o en el momento de su sacrificio. Emplear una aguja adaptada a una cánula, de longitud suficiente para alcanzar el fondo del envase colector. Desechar los primeros mililitros y recolectar únicamente la sangre que fluye libremente. Mezclar la sangre con una cantidad suficiente de una solución anticoagulante que contenga 8,7 g de citrato de sodio y 4 mg de aprotinina en 100 ml de agua, para obtener una proporción final de 19 volúmenes de sangre por 1 volumen de solución anticoagulante. Durante la

extracción de sangre e inmediatamente después, mezclar por rotación de modo que se mezclen ambos líquidos sin formación de espuma. Cuando la extracción haya terminado, cerrar el frasco y enfriar entre 10 y 15 °C. Una vez frío, reunir el contenido de todos los frascos, excepto de aquellos que presenten signos evidentes de hemólisis o de coagulación, y mantener la sangre recolectada entre 10 y 15 °C. En cuanto sea posible y siempre antes de las 4 horas siguientes a la extracción, centrifugar la sangre recolectada a 1.000-2.000 g a una temperatura entre 10 y 15 °C, durante 30 minutos. Separar el líquido sobrenadante y centrifugarlo a 5.000 g durante 30 minutos. Puede realizarse una centrifugación más rápida (por ej., a 20.000 g durante 30 minutos). Separar el líquido sobrenadante y, sin demora, mezclar cuidadosamente y fraccionar el plasma en envases pequeños que deben taparse al finalizar la operación. La cantidad en cada envase debe ser suficiente para permitir una valoración completa de la heparina. De inmediato, congelar rápidamente a una temperatura inferior a -70 °C (por ej., sumergiendo los frascos en nitrógeno líquido) y conservar a una temperatura inferior a -30 °C. El plasma preparado en estas condiciones puede emplearse como *Plasma sustrato* en la valoración de heparina, siempre que, en las condiciones de la valoración, se obtenga un tiempo de coagulación adecuado al método de detección que se emplee y si proporciona curvas de logaritmo de la dosis en función del logaritmo de la respuesta, reproducibles y con pendiente significativa. En el momento de su uso, descongelar una cierta cantidad de *Plasma sustrato* en un baño de agua a 37 °C, removiendo suavemente hasta licuefacción completa. Una vez líquido, el plasma debe mantenerse entre 10 y 20 °C y emplearse sin demora. El *Plasma sustrato* descongelado puede centrifugarse ligeramente si fuera necesario; no se debe emplear ningún procedimiento de filtración.

Reactivo de cefalina - [NOTA: este reactivo puede reemplazarse por un reactivo comercial apropiado]. Entre 0,5 y 1 g de polvo de cerebro de buey desecado con acetona, agregar 20 ml de acetona y dejar en reposo durante 2 horas. Centrifugar a 500 g durante 2 minutos y decantar el líquido sobrenadante. Secar el residuo a presión reducida y agregar 20 ml de cloroformo al material seco. Dejar en reposo durante 2 horas, con agitación frecuente. Luego de eliminar el material sólido por filtración o centrifugación, evaporar el cloroformo a presión reducida. Preparar una suspensión del residuo obtenido en un volumen de 5 a 10 ml de solución fisiológica (SR). [NOTA: los solventes empleados para preparar este reactivo deben contener un antioxidante adecuado, como por ej., butilhidroxianisol a una concentración de 0,02 g/l].

Una vez congelado o liofilizado conservar no más de 3 meses.

Preparación estándar - Diluir la Heparina bovina SR-FA o la Heparina Porcina SR-FA, según corresponda, con solución fisiológica (SR) de modo que contenga un número exactamente conocido de Unidades Internacionales por mililitro.

Preparación muestra - Diluir Heparina Cálctica con solución fisiológica (SR) de modo de obtener una actividad presumiblemente similar a la actividad de la *Preparación estándar*.

Procedimiento - Llevar a cabo la valoración empleando uno de los métodos siguientes para la determinación del comienzo de la coagulación, empleando los tubos y el equipo apropiados al método elegido.

a) observación visual directa, preferiblemente empleando una iluminación indirecta y observando contra un fondo negro no brillante;

b) registro espectrofotométrico de la variación de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm aproximadamente;

c) detección visual del cambio en la fluidez, inclinando los tubos manualmente;

d) registro mecánico del cambio de fluidez al agitar, teniendo cuidado de causar la mínima perturbación de la solución durante la fase inicial de la coagulación.

Empleando solución fisiológica (SR) y a partir de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, preparar una serie de diluciones en progresión geométrica, cuya concentración sea tal que el tiempo de coagulación obtenido con la concentración más baja sea mayor a 1,5 veces el tiempo de recalcificación del blanco y que el obtenido con la concentración más alta sea tal que la curva logaritmo dosis - respuesta sea satisfactoria, tal como se determina en un ensayo preliminar. Colocar doce tubos en un baño de hielo, rotulándolos por duplicado, como M_1 , M_2 y M_3 para las diluciones de la *Preparación muestra* y E_1 , E_2 y E_3 para las diluciones de la *Preparación estándar*. Agregar a cada tubo 1,0 ml de *Plasma sustrato* descongelado y 1,0 ml de la dilución apropiada de la *Preparación muestra* o la *Preparación estándar*, según corresponda. Mezclar luego de cada adición, evitando la formación de espuma. Tratar los tubos según el orden, E_1 , E_2 , E_3 , M_1 , M_2 , M_3 y transferir cada tubo a un baño de agua a 37 °C, dejar que la temperatura se equilibre durante aproximadamente 15 minutos y agregar a cada tubo 1 ml de una dilución de *Reactivo de cefalina* al que se le ha agregado un activador, como caolín, de modo que se obtenga un tiempo de recalcificación adecuado. [NOTA: cuando se emplee caolín preparar una mezcla de volúmenes iguales de *Reactivo de cefalina* y de una suspensión de caolín liviano al 0,4 % en solución fisiológica (SR)

en el momento de su uso]. Exactamente después de 2 minutos agregar 1 ml de una solución de cloruro de calcio al 0,37 % y registrar como tiempo de coagulación el intervalo en segundos entre esta última adición y el comienzo de la coagulación, medido según el método elegido. Al principio y al final del procedimiento, determinar el tiempo de recalcificación del blanco de la misma manera, empleando 1 ml de solución fisiológica (SR) en lugar de una de las diluciones de heparina. Los dos valores obtenidos para el blanco no deben diferir significativamente y este no debe ser mayor de 60 segundos. Transformar los tiempos de coagulación en sus logaritmos, tomando el valor medio de los tubos duplicados. Repetir el proceso empleando nuevas diluciones y realizando la incubación en el orden M_1 , M_2 , M_3 , E_1 , E_2 , E_3 . Calcular los resultados según los métodos estadísticos habituales (ver 10. *Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*). Efectuar no menos de tres valoraciones independientes. Para cada una de ellas preparar diluciones nuevas de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra* y una fracción distinta de *Plasma sustrato*, descongelado inmediatamente antes de su uso. Calcular la potencia de la Heparina Cálctica en ensayo combinando los resultados de los diferentes ensayos según los métodos estadísticos habituales. Cuando la varianza debida a las diferencias entre los ensayos es significativa para $p = 0,01$, se puede obtener una estimación combinada de la potencia a partir de las potencias medias no ponderadas. La actividad estimada no debe ser menor de 90 % ni mayor de 111 % de la potencia declarada. Los límites de confianza del error de la potencia estimada ($P = 0,95$) no deben ser menor de 80 % ni mayor de 125 % de la potencia declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo de Heparina Cálctica el número de Unidades Internacionales por miligramo; el tejido y las especies animales de las cuales fue obtenida; el nombre y la cantidad de cualquier sustancia agregada; y si corresponde, que la Heparina Cálctica es estéril y apirógena.

HEPARINA SÓDICA

Definición - Heparina Sódica es la sal sódica de un glucosaminoglicano sulfatado presente en los tejidos de mamíferos. Se obtiene a partir de pulmón del ganado bovino o de la mucosa intestinal del ganado bovino o porcino. Se produce de manera de minimizar o eliminar la contaminación microbiana y las sustancias hipotensoras. Por hidrólisis total, se libera *D*-glucosamina, ácido *D*-glucurónico, ácido *L*-idurónico, ácido acético y ácido sulfúrico. Presenta la propiedad característica de retrasar la coagulación de la sangre recientemente extraída. La actividad de la Heparina Sódica destinada a la administración parenteral no debe ser menor de 150 UI por miligramo, calculada sobre la sustancia seca. La actividad de la Heparina Sódica no destinada a la administración parenteral no debe ser menor de 120 UI por miligramo, calculada sobre la sustancia seca. Heparina Sódica debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Polvo blanco o casi blanco. Moderadamente higroscópico. Facilmente soluble en agua.

Sustancias de referencia - Heparina Bovina SR-FA. Heparina Porcina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos de cierre inviolable.

Precaución - Los animales a partir de los cuales la Heparina se obtiene deben cumplir los requerimientos de animales sanos apropiados para el consumo humano, con la autorización de la Autoridad Sanitaria competente. El proceso de manufactura deberá estar validado para demostrar la apropiada inactivación o remoción de cualquier contaminación por virus u otro agente infeccioso.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe retrasar la coagulación de sangre recientemente extraída.

B - Examinar por electroforesis de zona (ver 300. *Electroforesis*) empleando agarosa para electroforesis como soporte [NOTA: también se puede emplear como soporte para electroforesis tiras de acetato de celulosa]. Para equilibrar la agarosa y como solución electrolítica, emplear una mezcla de 50 ml de ácido acético glacial y 800 ml de agua. Ajustar a pH 3 con hidróxido de litio y diluir a 1 litro con agua.

Solución muestra - Disolver 25 mg de Heparina Sódica en agua y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar - Diluir la Heparina SR-FA correspondiente con agua para obtener una solución similar a la *Solución muestra*.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la tira entre 2 y 3 µl de *Solución estándar* y *Solución muestra*. Aplicar una corriente eléctrica de 1 a 2 mA por centímetro de ancho de tira, a una diferencia de potencial de 300 V, durante aproximadamente 10 minutos. Teñir las tiras empleando una solución de azul de toluidina al 0,1 % y lavar para eliminar el exceso de colorante. La relación entre la movilidad de la banda principal o de las bandas en el electroforegrama obtenido a partir de la *Solución muestra* y la movilidad de la banda en el electroforegrama obtenido con la *Solución estándar* debe ser de 0,9 a 1,1.

C - El residuo obtenido en el ensayo de *Determinación del residuo de ignición* debe responder a la reacción de identificación para *Sodio* <410>.

Determinación de la rotación óptica <170>

Rotación específica: No menos de +35° determinada a 20 °C sobre la sustancia seca.

Solución muestra: 40 mg por ml, en agua.

Determinación del pH <250>

Entre 5,5 y 8,0, determinado sobre una solución de Heparina Sódica de aproximadamente 10 mg por ml en agua libre de dióxido de carbono.

Impurezas proteicas y nucleotídicas

Disolver 40 mg de Heparina Sódica en agua, transferir a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con el mismo solvente y mezclar. La absorbancia de esta solución (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*), determinada a 260 y 280 nm, no debe ser mayor de 0,20 y 0,15, respectivamente.

Determinación de Nitrógeno <200>

Método I. No más de 2,5 %, con respecto a la sustancia seca; determinado sobre 100 mg.

Sodio

Determinar por espectrofotometría de absorción atómica (ver *Método I* en 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

Solución madre del estándar - Transferir una cantidad de cloruro de sodio que corresponda a 0,509 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 100 ml, disolver y completar a volumen con agua. Inmediatamente antes de su empleo, transferir 1,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Esta solución debe contener 200 ppm de sodio.

Soluciones estándar - Preparar soluciones de aproximadamente 25, 50 y 75 ppm de sodio, a partir de *Solución madre del estándar* diluida con ácido clorhídrico 0,1 M que contenga 1,27 mg de cloruro de

cesio por mililitro.

Solución muestra - Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Heparina Sódica, disolver en ácido clorhídrico 0,1 M que contenga 1,27 mg de cloruro de cesio por mililitro y diluir a 100 ml con el mismo solvente.

Procedimiento - Determinar concomitantemente las absorbancias de las *Soluciones estándar* y la *Solución muestra* a 330,3 nm con un espectrofotómetro de absorción atómica, equipado con una lámpara de sodio de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de aire-acetileno de composición adecuada (aproximadamente 11 litros de aire y 2 litros de acetileno por minuto). Debe contener entre 9,5 y 12,5 % de sodio, con respecto a la sustancia seca.

Determinación del residuo de ignición <270>

Entre 30,0 y 43,0 %, con respecto a la sustancia seca; determinado sobre 200 mg.

Límite de metales pesados <590>

Método VI. No más de 0,003 %, determinado sobre 500 mg. Preparar la *Solución estándar* empleando 1,5 ml de *Solución estándar de plomo (10 ppm)*.

Pérdida por secado <680>

Secar 1,0 g de Heparina Sódica sobre pentóxido de fósforo a una presión no mayor de 5 mm Hg, a 60 °C durante 3 horas: no debe perder más de 8,0 % de su peso.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando en el rótulo se indique que la Heparina Sódica se destine a la preparación de formas farmacéuticas inyectables que no deben someterse a un tratamiento posterior de eliminación de endotoxinas bacterianas, no debe contener más de 0,01 Unidades de Endotoxina por UI de Heparina.

Ensayos de esterilidad <370>

Cuando en el rótulo se indique que la Heparina Sódica es estéril, debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* para *Heparina Cálcica*, sustituyendo la solución de Heparina Cálcica por solución de Heparina Sódica preparada según se indica en *Preparación muestra*. La actividad estimada no debe ser menor de 90 % ni mayor de 111 % de la potencia declarada. Los límites de confianza del error de la potencia estimada ($P = 0,95$) no deben ser menor de 80 % ni mayor de 125 % de la potencia declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo de Heparina Sódica el número

de Unidades Internacionales por miligramo; el tejido y las especies animales de las cuales fue obtenida; el nombre y la cantidad de cualquier sustancia agregada; y si corresponde, que la Heparina Sódica es estéril y apirógena.

HEPARINA

SOLUCIÓN INYECTABLE

La Solución Inyectable de Heparina debe cumplir con los requisitos especificados en *Inyectables en 1050. Formas Farmacéuticas*.

Definición - Heparina Inyectable es una solución estéril de Heparina Cálctica o Heparina Sódica en *Agua para Inyectables*.

Caracteres generales - Líquido límpido, incoloro o ligeramente amarillento.

Sustancias de referencia - Heparina Bovina SR-FA. Heparina Porcina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases de vidrio Tipo I. Almacenar a temperatura no mayor de 25° C.

ENSAYOS

Identificación

A - Proceder según se indica en *Valoración*. El tiempo de coagulación no debe ser menor de 1.5 veces del tiempo de recalcificación del blanco.

B - Proceder según se indica en el ensayo de *Identificación B* en *Heparina Cálctica*.

Solución muestra - Disolver un volumen de la Solución Inyectable de Heparina en suficiente agua para obtener una solución de aproximadamente 375 UI por ml.

Solución estándar - Diluir una cantidad apropiada de Heparina SR-FA con agua para obtener una solución similar a la *Solución muestra*.

C - Proceder según se indica en el ensayo de *Identificación C* en *Heparina Cálctica o Heparina Sódica*.

Determinación del pH <250>

Entre 5,5 y 8,0.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 0,03 Unidades de Endotoxina por UI de Heparina. [NOTA: puede ser necesaria la adición de cationes divalentes para cumplir con el criterio de validación.]

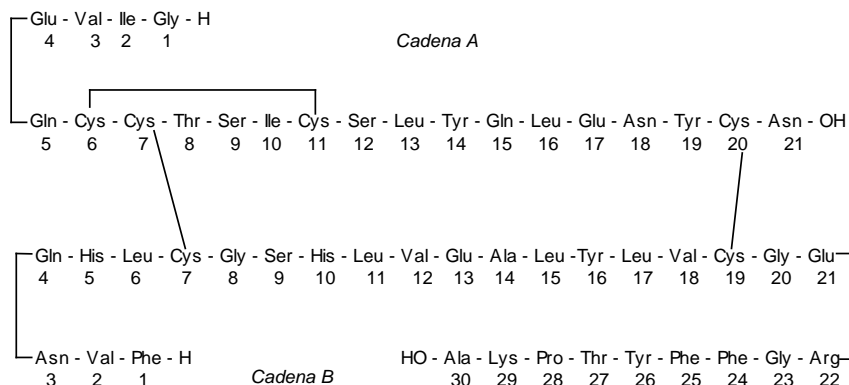
VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración en Heparina Cálctica*. La actividad estimada no debe ser menor de 90 % ni mayor de 111 % de la potencia declarada. Los límites de confianza del error de la potencia estimada ($P = 0,95$) no deben ser menor de 80 % ni mayor de 125 % de la potencia declarada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la actividad en Unidades Internacionales por mililitro en envase multidosis, la actividad en Unidades Internacionales en un volumen determinado en envase monodosis, el tejido y la especie animal de origen. Indicar si la preparación inyectable es sal sódica o cálcica y que debe descartarse la porción de solución no empleada cuando no posee conservante antimicrobiano.

INSULINA BOVINA e INSULINA PORCINA

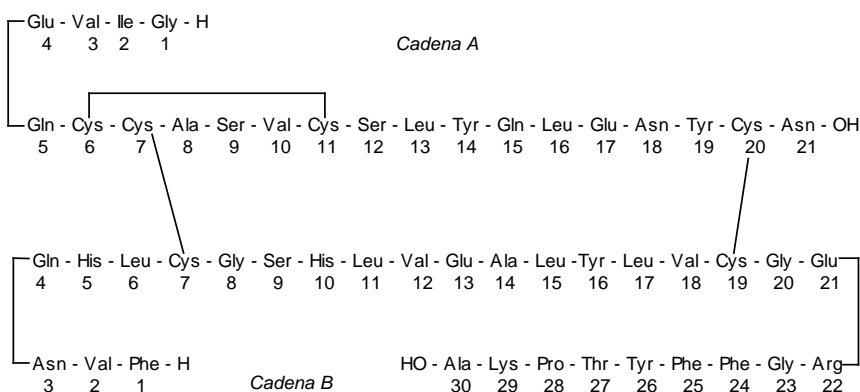


Insulina Porcina

$C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$

PM: 5.777,6

12584-58-6



Insulina Bovina

$C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$

PM: 5.733,5

11070-73-8

Definición - La Insulina es una hormona producida por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas cuya función es regular la glucosa sérica y consiste en una proteína con dos cadenas de aminoácidos, A y B, conectados por dos puentes disulfuro. Se obtiene del páncreas de animales bovinos o porcinos sanos, o de ambos, purificada adecuadamente. El contenido de Insulina Bovina o de Insulina Porcina más el correspondiente a la desamido insulina A-21 cuando corresponda, debe ser no menor de 95,0 por ciento ni mayor de 105,0 por ciento, calculado con respecto a la sustancia seca y deben cumplir con las siguientes especificaciones. [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina equivale a 0,0342 mg de Insulina Bovina y a 0,0345 mg de Insulina Porcina.]

Caracteres generales - Polvo blanco o casi blanco. Soluble en ácidos minerales diluidos y con descomposición del producto en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos; prácticamente insoluble en agua y alcohol.

Sustancias de referencia - Insulina Bovina SR-FA. Insulina Porcina SR-FA. Insulina Humana SR-FA. Reactivo de Referencia Internacional para Proinsulina Bovina. Reactivo de Referencia Internacional para Proinsulina Porcina.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos herméticos, a una temperatura de -20°C hasta su liberación por el fabricante. Cuando se descongela, la Insulina se debe conservar

entre 2 y 8 °C.

Precaución - Los animales a partir de los cuales la Insulina Bovina o Porcina se obtiene deben cumplir los requerimientos de animales sanos apropiados para el consumo humano, con la autorización de la Autoridad Sanitaria competente. El proceso de manufactura deberá estar validado para demostrar la apropiada inactivación o remoción de cualquier contaminación por virus u otro agente infeccioso.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico de insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* debe ser similar al obtenido con la *Preparación estándar A* o con la *Preparación estándar B*, acorde a la Insulina empleada.

B - Examinar mediante mapeo peptídico.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 10 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice totalmente porosas de 3 µm de diámetro. Mantener la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1 ml por minuto. El cromatógrafo se debe programar del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0-60	90 → 30	10 → 70	Gradiente lineal
60-65	30 → 0	70 → 100	Gradiente lineal
65-70	0	100	Isocrático

Solución reguladora de sulfato - Sulfato de amonio 2,0 M y ácido sulfúrico 0,5 M (50:50). Filtrar y ajustar a pH 2, si fuera necesario.

Solución A - Mezclar 700 ml de agua, 200 ml de *Solución reguladora de sulfato* y 100 ml de acetonitrilo para cromatografía. Filtrar y desgasificar.

Solución B - Mezclar 400 ml de acetonitrilo para cromatografía, 400 ml de agua y 200 ml de *Solución reguladora de sulfato*. Filtrar y desgasificar.

Fase móvil - Emplear mezclas de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución de enzima - Preparar una solución a partir de un polvo liofilizado de *Staphylococcus aureus cepa V-8* en agua grado HPLC para obtener una concentración de 1 mg por ml de proteasa la cual contiene

una actividad comprendida entre 500-1.000 unidades por mg de sólido.

Solución reguladora de HEPES - Transferir 2,38 g de HEPES (ácido *N*-(2-hidroxiethyl)piperazina-*N'*-2-etanosulfónico) a un matraz aforado de 100 ml, disolver con aproximadamente 90 ml de agua. Ajustar a pH 7,5 con hidróxido de sodio 5 M, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de digestión muestra - Preparar una solución de 2 mg por ml de la Insulina correspondiente en ácido clorhídrico 0,01 N y transferir 500 µl de la solución resultante a un recipiente con tapa apropiado. Agregar 2,0 ml de *Solución reguladora de HEPES* y 400 µl de *Solución de enzima*, tapar e incubar a 25 °C durante 6 horas. Inhibir el proceso de digestión agregando 2,9 ml de *Solución reguladora de sulfato*.

Solución de digestión estándar - Preparar al mismo tiempo y de la misma manera que la *Solución de digestión muestra*, pero empleando el estándar correspondiente.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de digestión muestra* y la *Solución de digestión estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de digestión muestra* debe tener un perfil cromatográfico similar al obtenido con la *Solución de digestión estándar*. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de digestión estándar* identificar los picos debidos a los fragmentos de digestión I, II y III. El factor de asimetría de los picos de los fragmentos de digestión II y III no debe ser mayor de 1,5; la resolución *R* entre los mismos no debe ser menor de 1,9. [NOTA: el fragmento I consiste en los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido A5 y el A17 y entre el aminoácido B1 y el B13. El fragmento II consiste en los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido A18 y el A21 y entre el aminoácido B14 y el B21. El fragmento III consiste en los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido B22 y el B30. El fragmento IV consiste en los aminoácidos comprendidos entre el aminoácido A1 y el A4. A y B son las cadenas respectivas en la Insulina Bovina y Porcina]. [NOTA: el fragmento I eluye con el mismo tiempo de retención en Insulina Bovina y en Insulina Humana; el fragmento II eluye con el mismo tiempo de retención en todas las Insulinas y el fragmento III eluye con igual tiempo de retención en Insulina Bovina y en Insulina Porcina].

Procedimiento - Inyectar un blanco empleando el programa de gradiente según se indica en *Sistema cromatográfico*. Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µl) de la *Solución de digestión estándar* y la *Solución de digestión muestra*, registrar los cromatogra-

mas y medir las respuestas de los picos. [NOTA: dejar equilibrar el sistema en las condiciones iniciales durante 15 minutos entre cada inyección].

Bioidentidad

Método: Convulsiones en ratones

Emplear no menos de 36 ratones adultos jóvenes con un intervalo de peso no mayor de 5 g. Antes de comenzar el ensayo dejar los animales en ayunas no menos de 2 horas ni más de 20 horas. Para la correcta elección de las dosis a emplear en el ensayo, conviene realizar una curva dosis respuesta con la solución patrón y a partir de ella, elegir dos dosis que produzcan aproximadamente un 15 y un 85 % de respuestas. Esas dosis estarán en un orden de magnitud de aproximadamente 5 a 15 miliunidades de insulina por ratón para la menor y 10 a 30 miliunidades de insulina por ratón para la mayor dependiendo de la cepa de animales y estarán contenidas en no más de 0,5 ml de solución. La muestra a ensayar deberá diluirse de modo de obtener dos soluciones que produzcan respuestas semejantes a las obtenidas con las soluciones estándar. Como diluyente emplear una solución que contenga 0,1 a 0,25 % de metacresol o fenol y 1,4 a 1,8 % de glicerol y ajustar a pH entre 2,5 y 3,5 con ácido clorhídrico. La relación entre las dos dosis de la muestra deberá ser la misma que la relación existente entre las dos dosis de la solución estándar.

Procedimiento - Distribuir los animales al azar en cuatro grupos iguales e inyectarlos por vía subcutánea con las soluciones estándar y desconocido en un lapso no mayor de 20 minutos. Distribuir los ratones homogéneamente dentro de un incubador apropiado, que permita su correcta observación y ventilación y mantenerlos a temperatura y humedad controlada (29-35 °C). Observar los animales durante 90 minutos luego de la inyección y registrar el número de animales que entran en convulsión o mueren.

[NOTA: es posible observar otros síntomas que revelen la inminencia de la convulsión, como la pérdida del reflejo de enderezamiento por más de 3 segundos, evitando de este modo la muerte de los animales. Estos animales y aquéllos que ya entraron en convulsión, se pueden recuperar mediante inyección subcutánea o intraperitoneal de 0,5 ml de solución de *Glucosa Anhidra* al 15 %. El grupo de animales puede volver a emplearse cada siete días.]

Cálculo - Se realiza la estimación de potencia de rectas paralelas con respuestas cuantales (factorial 2+2).

Interpretación - Cumple el ensayo de bioidentidad si el valor de potencia representa no menos del 70 % de la potencia declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Cuando la Insulina Bovina o Porcina esté destina-

da a la preparación de formas farmacéuticas inyectables sin posterior tratamiento de esterilización, debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando la Insulina Bovina o Porcina esté destinada a la preparación de formas farmacéuticas inyectables sin posterior tratamiento de eliminación de endotoxinas bacterianas por un procedimiento apropiado, debe contener menos de 10 Unidades de Endotoxina por mg.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 200 mg de la Insulina correspondiente, secar entre 100 y 105 °C durante 24 horas: no debe perder más de 10,0 % de su peso.

Determinación del residuo de ignición <270>

No más de 2,5 %, determinado a partir de 200 mg de la Insulina correspondiente y calculado sobre la sustancia seca.

Proteínas relacionadas

Solución A, Solución B, Solución estándar A, Solución estándar B, Solución de comparación A, Solución de comparación B, Solución de resolución y Solución muestra - Proceder según se indica en *Valoración*. [NOTA: mantener las soluciones entre 2 y 10 °C y emplear dentro de las 24 horas siguientes.]

Sistema cromatográfico - Proceder según se indica en *Valoración*, programando el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0-30	42	58	Isocrático
30-44	42→11	58→89	Gradiente Lineal
44-50	11	89	Isocrático

Fase móvil - Emplear mezclas de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Determinar la resolución y linealidad procediendo según se indica en *Valoración*. Si fuera necesario, se pueden ajustar las proporciones relativas de la *Fase móvil* para asegurar la elución completa de la desamido insulina A-21 porcina o bovina antes del comienzo del gradiente. El perfil del gradiente puede ajustarse para asegurar la elución completa de todas las impurezas relacionadas de la insulina. Si fuera necesario, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µl de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de linealidad según se indica en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales de la *Solución estándar*

dar A o la Solución estándar B, según corresponda, y la Solución muestra, registrar los cromatogramas aproximadamente durante 50 minutos y medir las respuestas de los picos. En el cromatograma obtenido con cualquiera de las Soluciones estándar, la desamido insulina A-21 aparece como un pequeño pico después del pico principal y tiene un tiempo de retención de aproximadamente 1,3 respecto al pico principal. En el cromatograma obtenido a partir de la Solución muestra, la respuesta del pico correspondiente a desamido insulina A-21 no debe ser mayor que 3,0 % de la respuesta total de los picos. A excepción de los picos correspondiente a la insulina y a la desamido insulina A-21, la suma de las respuestas de todos los picos no debe ser mayor de 3,0 % de la respuesta total de los picos.

Inmunorreactividad similar a la de proinsulina (IPI)

No más de 10 ppm, calculado sobre la sustancia seca y determinado por un método inmunoquímico sensible y apropiado como por ejemplo, radioinmunoanálisis (ver 635. Métodos inmunoquímicos), empleando el Reactivo de Referencia Internacional para proinsulina porcina o proinsulina bovina, según corresponda, para calibrar el método.

Impurezas con peso molecular mayor que la insulina

Sistema cromatográfico - Examinar la Insulina correspondiente por cromatografía de exclusión por tamaño molecular, empleando un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de 30 cm × 7,5 mm con fase estacionaria constituida por gel de sílice hidrofílico de 5 a 10 µm de diámetro en un grado apropiado para la separación del monómero de Insulina de los dímeros y polímeros. El caudal debe ser aproximadamente 0,5 ml por minuto.

Solución de arginina - Preparar una solución de L-arginina en agua de aproximadamente 1 mg por ml.

Fase móvil - Solución de arginina, acetonitrilo y ácido acético glacial (65:20:15). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver Aptitud del sistema en 100. Cromatografía).

Solución de resolución - Emplear una solución de Insulina de aproximadamente 4 mg por ml, que contenga más de 0,4 % de proteínas de alto peso molecular.

Se puede emplear una preparación inyectable de Insulina, tanto si es una solución como una suspensión, que ha sido aclarada con una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 N, que contenga el porcentaje indicado de proteínas de elevada masa molecular o una solución preparada a partir de Insulina en polvo, disuelta en ácido clorhídrico 0,01 N. Esta última se

puede preparar dejando en reposo la Insulina en polvo a temperatura ambiente durante 10 días aproximadamente. [NOTA: mantener la temperatura de las soluciones entre 2 y 10 °C y emplearlas en un lapso de 7 días].

Solución muestra - Disolver 4 mg de la Insulina correspondiente en 1,0 ml de ácido clorhídrico 0,01 N.

[NOTA: si se emplea un inyector automático, mantener la temperatura entre 2 y 10 °C.]

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Equilibrar la columna mediante al menos tres inyecciones repetidas de Solución de resolución. La columna está equilibrada cuando se obtienen resultados repetitivos en dos inyecciones consecutivas. Cromatografiar la Solución de resolución y registrar las respuestas de los picos según se indica en Procedimiento: los tiempos de retención deben ser de 13 a 17 minutos para los complejos de insulina poliméricos; aproximadamente 17,5 minutos para los dímeros de insulina covalentes; aproximadamente 20 minutos para los monómeros de insulina, y aproximadamente 22 minutos para las sales; la resolución R definida por la relación entre la altura del pico del dímero y la altura del valle de separación entre los picos del monómero y del dímero debe ser mayor o igual de 2,0.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo 100 µl de la Solución muestra, registrar el cromatograma aproximadamente durante 35 minutos y medir las respuestas de los picos, ignorando cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el del pico de la Insulina. La suma de las respuestas de los picos con un tiempo de retención menor que el del pico principal no debe ser mayor de 1,0 % de la respuesta total de los picos.

Cinc

No debe contener más de 1 % de cinc, calculado sobre la sustancia seca.

MÉTODO A

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad apropiada de cinc en ácido clorhídrico 0,01 N para obtener una solución de aproximadamente 5 mg por ml.

Soluciones estándar - Preparar soluciones que contengan 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 y 1,6 µg de cinc por ml, preparadas en el momento de su uso por dilución de la Solución madre del estándar.

Solución muestra - Disolver 50,0 mg de la Insulina correspondiente en ácido clorhídrico 0,01 N y diluir a un volumen de 25,0 ml con el mismo ácido. Si fuera necesario, diluir con ácido clorhídrico 0,01 N hasta obtener una concentración de aproximadamente 0,4 a 1,6 µg de cinc por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de las *Soluciones estándar* y de la *Solución muestra* en la línea de emisión del cinc a 213,9 nm, con un espectrofotómetro de absorción atómica (ver 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*) equipado con una lámpara de cinc de cátodo hueco y una llama de acetileno-aire (aproximadamente 2 litros de acetileno y 11 litros de aire por minuto). Graficar las absorbancias de las *Soluciones estándar* en función de la concentración en µg por ml de cinc y determinar la concentración de cinc en µg por ml en la *Solución muestra*.

MÉTODO B

Proceder según se indica en *Determinación de cinc <150>*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. Mantener la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1 ml por minuto.

Solución A - Disolver 28,4 g de sulfato de sodio anhidro en 1 litro de agua, agregar 2,7 ml de ácido fosfórico y ajustar a pH 2,3 con etanolamina, si fuera necesario. Filtrar y desgasificar.

Solución B - *Solución A* y acetonitrilo (55:45). Calentar la solución a una temperatura no inferior a 20 °C con el fin de evitar la precipitación (la mezcla es endotérmica). Filtrar y desgasificar.

Fase móvil - Emplear una mezcla de *Solución B* y *Solución A* (58:42). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar A - Disolver el contenido de un vial de Insulina Porcina SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 N para obtener una solución de aproximadamente 4 mg por ml.

Preparación estándar B - Si la sustancia a ensayar es Insulina Bovina, disolver 40,0 mg de Insulina Bovina SR-FA en 10 ml de ácido clorhídrico 0,01 N.

Solución de comparación A - Transferir 1,0 ml de *Preparación estándar A* a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 N y mezclar.

Solución de comparación B - Transferir 1,0 ml de *Preparación estándar B* a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 N y mezclar.

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 40 mg de la Insulina correspondiente, transferir a un matraz aforado de 10 ml, disolver y completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 N y mezclar.

Solución de resolución - Disolver el contenido de un vial de Insulina Humana SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 N para obtener una solución de aproximadamente 4 mg por ml. Mezclar 1,0 ml de esta solución con 1,0 ml de *Preparación estándar A*.

[NOTA: mantener las soluciones a una temperatura entre 2 y 10 °C y emplearlas dentro de las 48 horas siguientes. Si se emplea un inyector automático, mantener la temperatura entre 2 y 10 °C].

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y la *Preparación estándar A* según se indica en *Procedimiento* y registrar las respuestas de los picos de la *Solución de resolución* hasta que la respuesta correspondiente al pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación estándar A* se registre. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de resolución*, identificar el pico debido a la insulina porcina y humana. El ensayo es válido si la resolución *R* entre los picos correspondientes a la insulina porcina y a la insulina humana no es menor de 1,2. Si fuera necesario, ajustar la concentración de acetonitrilo en la *Fase móvil* hasta lograr la resolución requerida.

Para *Insulina Porcina* - Cromatografiar la *Preparación estándar A* y la *Solución de comparación A* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el ensayo sólo es válido si la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación estándar A* es $10 \pm 0,5$ veces la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Solución de comparación A*. Si el ensayo no es válido, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µl, con el fin de estar comprendido dentro del intervalo de linealidad del detector.

Para *Insulina Bovina* - Cromatografiar la *Preparación estándar B* y la *Solución de comparación B* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el ensayo sólo es válido si la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación estándar B* es $10 \pm 0,5$ veces la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Solución de comparación B*. Si el ensayo no es válido, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µl, con el fin de estar comprendido dentro del intervalo de linealidad del detector.

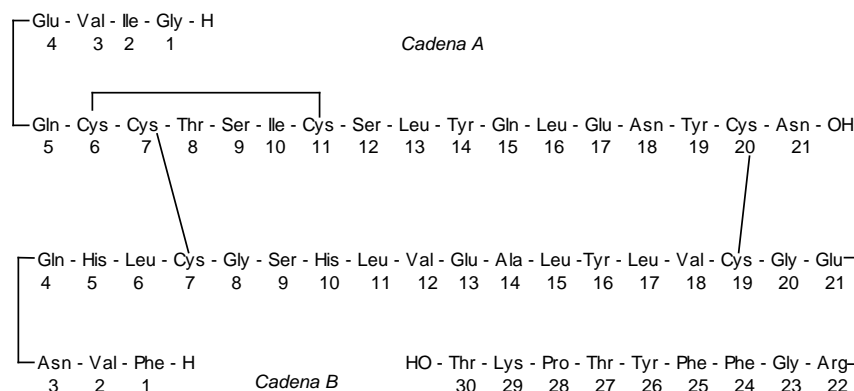
Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra*, la *Preparación estándar A* y la *Solución de comparación A* para la Insulina Porcina o, para la Insulina Bovina, de la *Preparación estándar B* y de la *Solución de comparación B*; registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el contenido en Insulina Bovina o Porcina, según corresponda, más el correspondiente a la desamido insulina A-21, a partir de la respuesta del

pico principal y de la respuesta del pico debido a la desamido insulina A-21 en los cromatogramas obtenidos con la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* apropiada, y el contenido declarado de Insulina Porcina más el de la desamido insulina porcina A-21 en la Insulina Porcina SR-FA, o de la Insulina Bovina más el de la desamido insulina bovina A-21 en la Insulina Bovina SR-FA.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la especie o especies animales de las cuales fue obtenida. Se debe indicar en el rótulo cuando la Insulina sea estéril y apirógena.

INSULINA HUMANA



Insulina Humana

$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$

PM: 5807,6

11061-68-0

Definición - La Insulina Humana es una proteína que tiene la estructura de la hormona producida por el páncreas humano. El contenido de Insulina Humana más el correspondiente a desamido insulina A-21, debe ser no menor de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento, calculado sobre la sustancia seca. [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina equivale a 0,0347 mg de Insulina Humana]. Se produce por modificación enzimática (semisintética) y apropiada purificación a partir de insulina obtenida del páncreas porcino o por un método basado en tecnología de ADN recombinante (ADNr).

Caracteres generales - Polvo blanco o casi blanco. Soluble en ácidos minerales diluidos y con descomposición del producto, en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos; prácticamente insoluble en agua, alcohol y éter.

Sustancias de referencia - Insulina Humana SR-FA. Insulina Porcina SR-FA. Reactivo de Referencia Internacional para Proinsulina Porcina. Reactivo de Referencia Internacional para Proinsulina Humana.

Producción - La Insulina Humana debe ser obtenida a condiciones apropiadas para minimizar la contaminación microbiana. Para la Insulina Humana producida por modificación enzimática de la insulina obtenida del páncreas porcino, el proceso de manufactura debe ser validado para demostrar la remoción de cualquier componente con actividad proteolítica. Para Insulina Humana producida por un método basado en tecnología ADNr, antes de la liberación de cada lote de materia prima pura se deben realizar los siguientes ensayos: contenido de proteínas derivadas de

la célula hospedadora determinado mediante un método apropiado y validado el que no debe ser mayor de 10 ppm y debe cumplir además con el ensayo de *ADN derivado de la célula hospedadora y del vector*, con los límites aprobados por la Autoridad Sanitaria (ver 1120. *Productos biotecnológicos*).

CONSERVACIÓN

En envases inactivos herméticos, a una temperatura de -20 °C. Cuando se descongela, la insulina se debe conservar entre 2 y 8 °C y se debe emplear en la fabricación de preparaciones dentro de un período de tiempo corto.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* debe ser similar al obtenido con la *Preparación estándar A*.

B - Examinar mediante mapeo peptídico.

Sistema cromatográfico, Solución reguladora de sulfato, Fase móvil, Solución de enzima, Solución reguladora de HEPES y Procedimiento - Proceder según se indica para el ensayo de *Identificación B* en *Insulina Bovina e Insulina Porcina*.

Solución de digestión muestra - Preparar una solución de 2 mg por ml de Insulina Humana en ácido clorhídrico 0,01 N y transferir 500 µl de la solución resultante a un recipiente con tapa apropiado. Agregar 2,0 ml de *Solución reguladora de HEPES* y 400 µl de *Solución de enzima*, tapar e incubar a 25 °C durante 6 horas. Inhibir el proceso de digestión agre-

gando 2,9 ml de *Solución reguladora de sulfato*.

Solución de digestión estándar - Preparar al mismo tiempo y de la misma manera que la solución de digestión de la muestra, pero empleando el estándar de Insulina Humana SR-FA.

Aptitud del sistema (ver 100 *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de digestión muestra* y la *Solución de digestión estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de digestión muestra* debe tener un perfil cromatográfico similar al cromatograma obtenido con la *Solución de digestión estándar*. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de digestión estándar* identificar los picos debidos a los fragmentos de digestión I, II y III. El factor de asimetría de los picos de los fragmentos de digestión II y III no debe ser mayor de 1,5; la resolución *R* entre los mismos no debe ser menor de 3,4. [NOTA: el tiempo de retención para el fragmento I debe ser el mismo para la insulina porcina y para la insulina humana; el tiempo de retención del fragmento II debe ser el mismo para todas las insulinas; el tiempo de retención del fragmento III debe ser el mismo para la Insulina Porcina SR-FA].

Bioidentidad

Proceder según se indica en el ensayo de Bioidentidad en *Insulina Bovina e Insulina Porcina* - El ensayo es válido si el valor de potencia representa no menos de 70 % de la potencia declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Cuando la Insulina Humana esté destinada a la preparación de formas farmacéuticas inyectables sin posterior tratamiento de esterilización debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando la Insulina Humana esté destinada a la preparación de formas farmacéuticas inyectables sin posterior tratamiento de eliminación de endotoxinas bacterianas por un procedimiento apropiado, debe contener menos de 10 Unidades de Endotoxina por mg.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 200 mg de Insulina Humana y secar entre 100 y 105 °C durante 24 horas: no debe perder más de 10,0 % de su peso.

Determinación del residuo de ignición <270>

No más de 2,5 %, determinado a partir de 200 mg de Insulina Humana y calculado sobre la sustancia seca.

Proteínas relacionadas

Sistema cromatográfico, Solución A, Solución B y Solución de comparación A - Proceder según se

indica en *Valoración*.

Fase móvil y Aptitud del sistema - Proceder según se indica para el ensayo de *Proteínas relacionadas en Insulina Bovina e Insulina Porcina*.

Solución estándar A - Emplear la *Preparación estándar A* según se indica en *Valoración*.

Solución estándar B - Emplear la *Preparación estándar B* según se indica en *Valoración*.

Solución muestra - Emplear la *Preparación muestra* según se indica en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra*, la *Solución estándar A*, la *Solución estándar B* y la *Solución de comparación A*, registrar los cromatogramas aproximadamente durante 50 minutos y medir las respuestas de los picos. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar A*, la desamido insulina A-21 aparece como un pequeño pico después del pico principal y tiene un tiempo de retención aproximadamente de 1,3 respecto del pico principal. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, la respuesta del pico correspondiente a la desamido insulina A-21 no debe ser mayor de 2,0 % de la respuesta total de los picos. A excepción de las respuestas de los picos de insulina y desamido insulina A-21, la suma de las respuestas de todos los picos no debe ser mayor de 2,0 % de la respuesta total de los picos. Sólo para insulina humana semisintética: en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*, la respuesta de cualquier pico correspondiente al pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar B* no debe ser mayor que la respuesta del pico correspondiente en el cromatograma obtenido con la *Solución de comparación A* (1 % de insulina porcina en la Insulina Humana).

Inmunorreactividad similar a la de proinsulina (IPI)

No más de 10 ppm, calculado sobre la sustancia seca y determinado por un método inmunoquímico sensible y apropiado, como por ejemplo, radioinmunoanálisis (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Para Insulina Humana producida por modificación enzimática de Insulina Porcina emplear el Reactivo de Referencia Internacional para Proinsulina Porcina para calibrar el método. Para Insulina Humana producida por tecnología ADNr emplear el Reactivo de Referencia Internacional para Proinsulina Humana cuando corresponda realizar este ensayo.

Impurezas con peso molecular mayor que la insulina

Proceder según se indica para *Impurezas de peso molecular mayor que la Insulina* en *Insulina Bovina e Insulina Porcina*. La suma de las respuestas de los

picos con un tiempo de retención menor que el del pico principal no debe ser mayor de 1,0 % de la respuesta total de los picos.

Cinc

Proceder según se indica para *Cinc* en *Insulina Bovina e Insulina Porcina*. No debe contener más de 1 % calculado sobre la sustancia seca.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución A, Solución B y Fase móvil - Proceder según se indica en *Valoración de Insulina Bovina e Insulina Porcina*.

Preparación estándar A - Disolver el contenido de un vial de Insulina Humana SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 N para obtener una solución de aproximadamente 4 mg por ml.

Preparación estándar B - Disolver el contenido de un vial de Insulina Porcina SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 N para obtener una solución de aproximadamente 4 mg por ml.

Solución de comparación A - Transferir 1,0 ml de *Preparación estándar B* a un matraz aforado de 50 ml, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 N y mezclar. A 1,0 ml de esta solución agregar 1,0 ml de *Preparación estándar A*.

Solución de comparación B - Transferir 1,0 ml de la *Preparación estándar A* a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 N y mezclar.

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 40 mg de Insulina Humana, disolver en ácido clorhídrico 0,01 N y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución de resolución - Emplear una mezcla de 1,0 ml de *Preparación estándar A* y 1,0 ml de *Preparación estándar B*.

[NOTA: mantener las soluciones a una temperatura entre 2 y 10 °C y emplearlas dentro de las 48 horas siguientes. Si se emplea un inyector automático, mantener la temperatura entre 2 y 10 °C.]

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y la *Preparación estándar B*, registrar las respuestas de los picos de la *Solución de resolución* hasta que la respuesta correspondiente al pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación estándar B* se registre. En el cromatograma obtenido con la *Solución de resolución*, identificar el pico debido a insulina porcina y a insulina humana. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de resolución*, la resolución *R* entre los picos correspondientes a la insulina porcina y a la insulina humana no debe ser menor de 1,2. Si fuera necesario, ajustar la concentración de acetonitrilo en la *Fase móvil* hasta lograr la

resolución requerida. Cromatografiar la *Preparación muestra*, *Preparación estándar A* y la *Solución de comparación B*, registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el ensayo sólo es válido si la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación estándar A* es $10 \pm 0,5$ veces la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Solución de comparación B*. Si el ensayo no es válido, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 μ l, con el fin de que la respuesta esté comprendida en el intervalo de linealidad del detector.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ l) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar A*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el contenido en Insulina Humana, más el correspondiente a la desamido insulina humana A-21, a partir de la respuesta del pico principal y de la respuesta del pico debido a la desamido insulina humana A-21 en los cromatogramas obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar A*, y el contenido declarado de Insulina Humana más el de la desamido insulina porcina A-21 en la Insulina Humana SR-FA.

ROTULADO

Indicar en el rótulo si la Insulina Humana se ha producido por modificación enzimática de la Insulina Porcina o por tecnología de ADN recombinante. Se debe indicar en el rótulo cuando la Insulina Humana sea estéril y apirógena.

INSULINA

PREPARACIONES INYECTABLES

Las Preparaciones Inyectables de Insulina deben cumplir con los requisitos para *Inyectables* en 1050. *Formas farmacéuticas*.

La presente monografía se aplica a la siguiente lista de Preparaciones de Insulina:

Insulina Corriente Solución Inyectable
Insulina Cinc Amorfa Suspensión Inyectable
Insulina Cinc Cristalina Suspensión Inyectable
Insulina Cinc Suspensión Inyectable
Insulina Cinc Protamina Suspensión Inyectable
Insulina Bifásica Suspensión Inyectable
Insulina Isófana Suspensión Inyectable
Insulina Isófana Bifásica Suspensión Inyectable.

Definición - Las Preparaciones Inyectables de Insulina son preparaciones estériles e isotónicas de *Insulina Humana*, *Insulina Bovina* o *Insulina Porcina*. Deben contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de insulina y deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancias de referencia - Insulina Bovina SR-FA. Insulina Humana SR-FA. Insulina Porcina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos estériles, apirógenos herméticos y con cierre de seguridad, en un refrigerador. No congelar.

ENSAYOS

Determinación del pH <250>

Entre 6,9 y 7,8, determinado sobre una solución o suspensión, excepto que se indique lo contrario en la monografía correspondiente.

Proteínas relacionadas

Solución A, *Solución B*, *Preparaciones estándar A*, *B*, *C*, *D* y *E*, *Solución de comparación A*, *Solución de comparación B*, *Solución de resolución* y *Preparación muestra* - Proceder según se indica en *Valoración*. [NOTA: mantener las soluciones entre 2 y 10 °C y emplear dentro de las 24 horas de su preparación].

Sistema cromatográfico - Proceder según se indica en *Valoración*. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0-30	42	58	Isocrático
30-44	42→11	58→89	Gradiente Lineal
44-50	11	89	Isocrático

Fase móvil - Emplear mezclas de la *Solución A* y la *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Determinar la resolución y linealidad del sistema procediendo según se indica en *Valoración*. Si fuera necesario, se pueden ajustar las proporciones relativas de la *Fase móvil* para asegurar la elusión completa de la desamido insulina A-21 porcina antes del comienzo del gradiente. El perfil del gradiente puede ajustarse para asegurar la elusión completa de todas las impurezas relacionadas de la insulina. Si fuera necesario, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µl de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de linealidad según se indica en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 o 20 µl) de la *Preparación estándar A*, *B*, *C*, o *D*, según corresponda para las preparaciones que contienen 100 UI por ml, o *Preparación estándar E* para las preparaciones que contienen 40 UI por ml y la *Preparación muestra*. Registrar los cromatogramas aproximadamente durante 50 minutos y medir las respuestas de los picos. Si fuera necesario, realizar ajustes posteriores en la *Fase móvil* con el fin de asegurar que los conservantes antimicrobianos presentes en la *Preparación muestra* se separen bien de la insulina y presenten un tiempo de retención más corto. Una pequeña disminución en la concentración de acetonitrilo incrementa, relativamente más, el tiempo de retención de los picos de insulina que el de los conservantes. En el cromatograma obtenido con cualquiera de las *Preparaciones estándar*, la desamido insulina A-21 debe aparecer como un pequeño pico después del pico principal de insulina y debe tener un tiempo de retención relativo de aproximadamente 1,3 respecto de éste. En el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra*, la respuesta del pico correspondiente a desamido insulina A-21 no debe ser mayor que 5,0 % de la respuesta total de los picos. A excepción de los picos correspondientes a la insulina y a la desamido insulina A-21, la suma de las respuestas de todos los picos no debe ser mayor de 6,0 % de la respuesta total de los picos. Ignorar

cualquier pico correspondiente a los conservantes y a la protamina (picos que eluyen primero).

Insulina en el líquido sobrenadante

No más de 2,5 % del contenido total de insulina para Preparaciones Inyectables de Insulina que son suspensiones, salvo indicación contraria.

Procedimiento - Centrifugar 10 ml de la suspensión, a 1.500 g durante 10 minutos y separar cuidadosamente el líquido sobrenadante del residuo. Determinar el contenido de insulina en el líquido sobrenadante (S) por un método apropiado, por ejemplo empleando las condiciones cromatográficas descritas en *Valoración*. Calcular el porcentaje de insulina en solución, por la fórmula siguiente:

$$100S/T$$

en la cual *T* es el contenido total de insulina determinada.

Impurezas con peso molecular mayor que la insulina

Sistema cromatográfico - Examinar la Insulina correspondiente por cromatografía de exclusión por tamaño molecular, empleando un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de 30 cm x 7,5 mm con fase estacionaria constituida por gel de sílice hidrofílico de 5 a 10 µm de diámetro en un grado apropiado para la separación del monómero de Insulina de los dímeros y polímeros. El caudal debe ser aproximadamente 0,5 ml por minuto.

Solución de arginina - Preparar una solución de L-arginina en agua de aproximadamente 1 mg por ml.

Fase móvil - *Solución de arginina*, acetonitrilo y ácido acético glacial (65:20:15). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100 *Cromatografía*).

Solución de resolución - Emplear una solución de Insulina de aproximadamente 4 mg por ml, que contenga más de 0,4 % de proteínas de alto peso molecular. Se puede emplear una Preparación Inyectable de Insulina, tanto si es una solución como una suspensión, que ha sido aclarada con una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 N, que contenga el porcentaje indicado de proteínas de elevada masa molecular o una solución preparada a partir de Insulina en polvo, disuelta en ácido clorhídrico 0,01 N. Esta última se puede preparar dejando en reposo a temperatura ambiente durante 10 días aproximadamente, la solución preparada con insulina en polvo. [NOTA: mantener la temperatura de las soluciones entre 2 y 10 °C y emplearlas dentro de las 30 horas (Preparaciones

Inyectables de Insulina Soluble) o antes de 7 días (otras Preparaciones de Insulina) de su preparación. Si se emplea un inyector automático mantener la temperatura entre 2 y 10 °C].

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Antes de emplear una columna nueva, equilibrar la columna mediante al menos tres inyecciones repetidas de *Solución de resolución*. La columna está equilibrada cuando se obtienen resultados repetitivos en dos inyecciones consecutivas. Si se van a analizar las muestras que contienen protamina, el equilibrado de la columna se realiza empleando una solución que contenga protamina.

Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención deben ser aproximadamente entre 13 y 17 minutos para los complejos de insulina poliméricos o complejos covalentes de insulina-protamina; 17,5 minutos para los dímeros de insulina covalentes; 20 minutos para los monómeros de insulina y 22 minutos para las sales. Si la solución en ensayo contiene conservantes, como por ejemplo metilparabeno, *m*-cresol o fenol, estos compuestos deben eluir más tarde; la resolución *R* entre el pico de dímero y el valle de separación entre los picos de monómero y dímero debe ser mayor o igual a 2,0.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 100 µl de la *Solución muestra*, registrar el cromatograma aproximadamente durante 35 minutos y medir las respuestas de los picos. Ignorar cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el del pico de la Insulina. La suma de las respuestas de los picos con un tiempo de retención menor que el del pico principal no debe ser mayor de 3,0 % (para las preparaciones que contienen protamina) y del 2,0% (para las preparaciones que no la contienen) de la respuesta total de los picos.

Cinc total

No debe contener más de la cantidad indicada en cada monografía.

Proceder del siguiente modo, salvo indicación contraria de la monografía correspondiente.

MÉTODO A

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad apropiada de cinc en ácido clorhídrico 0,01 N para obtener una solución de aproximadamente 5 mg por ml.

Soluciones estándar - Diluir la *Solución madre del estándar* con ácido clorhídrico 0,01 N para obtener soluciones de aproximadamente 0,4; 0,8;

1,0; 1,2 y 1,6 µg de cinc por ml. [NOTA: preparar estas soluciones en el momento de su uso].

Solución muestra - Transferir un volumen de la Preparación Inyectable de Insulina que contenga 200 UI por ml de Insulina, a un matraz aforado de 25,0 ml, disolver en ácido clorhídrico 0,01 N, agitando suavemente y completar a volumen con el mismo solvente. Si fuera necesario, diluir con ácido clorhídrico 0,01 N para obtener una solución entre 0,4 y 1,6 µg de cinc por ml.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de las *Soluciones estándar* y la *Solución muestra* en la línea de emisión del cinc a 213,9 nm, con un espectrofotómetro de absorción atómica (ver 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*) equipado con una lámpara de cinc de cátodo hueco y una llama de acetileno-aire (aproximadamente 2 litros de acetileno y 11 litros de aire por minuto). Graficar las absorbancias de las *Soluciones estándar* en función de la concentración en µg por ml de cinc y determinar la concentración de cinc en µg por ml en la *Solución muestra*.

MÉTODO B

Proceder según se indica en *Determinación de cinc <150>*.

Cinc en solución

Cuando corresponda, el contenido no debe ser mayor al indicado en la monografía correspondiente.

MÉTODO A

Solución madre del estándar, Soluciones estándar y Procedimiento - Proceder según se indica en *Método A* en *Cinc total*.

Solución muestra - Diluir 1 ml del líquido sobrenadante límpido obtenido mediante centrifugación de la Preparación Inyectable de Insulina a 25,0 ml con agua. Diluir con agua, si fuera necesario, para obtener una solución entre 0,4 y 1,6 µg de cinc por ml.

MÉTODO B

Proceder según se indica en *Determinación de cinc <150>*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 80 Unidades de Endotoxina por 100 UI de Insulina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida

por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. Mantener la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1 ml por minuto.

[NOTA: preparar y mantener las soluciones a una temperatura no menor de 20 °C con el fin de evitar la precipitación].

Solución A - Disolver 28,4 g de sulfato de sodio anhidro en 1 litro de agua. Agregar 2,7 ml de ácido fosfórico y ajustar a pH 2,3 con etanolamina, si fuera necesario.

Solución B - *Solución A* y acetonitrilo (55:45). Calentar la solución a una temperatura no inferior a 20 °C.

Fase móvil - *Solución B* y *Solución A* (58:42). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar A - Disolver el contenido de un envase de Insulina Porcina SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 N para obtener una solución de aproximadamente 4 mg por ml.

Preparación estándar B - Si la sustancia en ensayo es Insulina Bovina, disolver 40,0 mg de Insulina Bovina SR-FA en 10 ml de ácido clorhídrico 0,01 N.

Preparación estándar C - Disolver el contenido de un envase de Insulina Humana SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 N para obtener una solución de aproximadamente 4 mg por ml.

[NOTA: las *Preparaciones estándar A, B o C* se emplean para preparaciones que contienen una sola especie de insulina].

Preparación estándar D - Mezclar 1 ml de *Preparación estándar A* y 1 ml de *Preparación estándar B*. [NOTA: esta solución se emplea para preparaciones que contienen mezcla de Insulina Bovina e Insulina Porcina].

Preparación estándar E - Diluir 4 ml de la *Preparación estándar A, B, C o D* correspondiente en 10 ml ácido clorhídrico 0,01 N.

Solución de comparación A - Transferir 1,0 ml de *Preparación estándar A, B, C o D* según corresponda a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 N y mezclar.

Solución de comparación B - Transferir 1,0 ml de *Preparación estándar E*, acorde a la muestra a analizar, a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 N y mezclar.

Preparación muestra - Agregar a la Preparación Inyectable de Insulina (solución o suspensión en ensayo) 4 µl de ácido clorhídrico 6 N por ml, para obtener una solución límpida de insulina. Cuando la muestra es una suspensión, agitar el material previamente con el fin de obtener una muestra homogénea. Si la suspensión no se

vuelve límpida dentro de los 5 minutos siguientes a la adición inicial de ácido clorhídrico, agregar más ácido en pequeñas alícuotas (en el orden de 4 µl por ml) hasta solubilización. Las preparaciones con concentraciones mayores a 100 UI por ml deben ser diluidas con ácido clorhídrico 0,01 N con el fin de evitar la sobrecarga de la columna con el monómero de insulina.

Solución de resolución - Mezclar 1,0 ml de *Preparación estándar C* con 1,0 ml de *Preparación estándar A*.

[NOTA: mantener las soluciones entre 2 y 10 °C y emplearlas dentro de las 48 de su preparación. Si se emplea un inyector automático, mantener la temperatura entre 2 y 10 °C].

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y la *Preparación estándar A* según se indica en *Procedimiento* y registrar las respuestas de los picos de la *Solución de resolución* hasta que la respuesta correspondiente al pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación estándar A* se registre. En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de resolución*, identificar el pico de insulina porcina y humana. El ensayo sólo es válido si la resolución *R* entre los picos correspondientes a la insulina porcina y a la insulina humana no es menor de 1,2. Si fuera necesario, ajustar la concentración de acetonitrilo en la *Fase móvil* hasta lograr la resolución requerida.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra*, la *Preparación estándar correspondiente A, B, C o D* y la *Solución de comparación A* para preparaciones de insulina que contienen 100 UI por ml o *Preparación estándar E* y *Solución de comparación B* para preparaciones de insulina que contienen 40 UI por ml. Si fuera necesario, realizar nuevos ajustes en la *Fase móvil*, para asegurar que los conservantes antimicrobianos presentes en la *Preparación muestra* se separen bien de la insulina y muestren tiempos de retención menores. Una pequeña reducción de la concentración de acetonitrilo incrementa el tiempo de retención de los picos de insulina más que el de los conservantes. Si fuera necesario, después de la cromatografía, lavar la columna con una mezcla, de volúmenes iguales, de acetonitrilo y agua, durante el tiempo suficiente para asegurar la elusión de sustancias que puedan interferir, antes de inyectar la solución siguiente. El ensayo solo es válido si la respuesta del pico principal del cromatograma obtenido con las *Preparaciones estándar A, B, C o D* o *Solución de comparación A* es $10 \pm 0,5$ veces la respuesta del

pico principal del cromatograma obtenido con la *Solución de comparación A* o *B*. Si el ensayo no es válido, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µl, con el fin de estar dentro de los límites de linealidad del detector.

Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el contenido en Insulina Bovina, Porcina o Humana según corresponda, más el correspondiente a la desamido insulina A-21, a partir de la respuesta del pico principal y de la respuesta del pico correspondiente a la desamido insulina A-21 en los cromatogramas obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* correspondiente empleando la cantidad declarada de Insulina más la correspondiente de la desamido insulina A-21 en Insulina Porcina SR-FA, en Insulina Bovina SR-FA y en Insulina Humana SR-FA. Para preparaciones que contengan Insulina Bovina y Porcina, emplear la suma de las respuestas de ambos picos de insulina bovina y porcina y la suma de las respuestas de los correspondientes picos de las desamido insulina A-21, bovina y porcina. [NOTA: 100 UI corresponden a 3,47 mg de insulina humana, a 3,45 mg de insulina porcina y a 3,42 mg de insulina bovina].

ROTULADO

Indicar en el rótulo:

- la actividad de la insulina en UI por ml,
- la concentración en términos del número de mg de insulina por ml (para preparaciones que contengan tanto insulina bovina como porcina, la concentración se expresa como la suma de las cantidades de ambas),
- cuando corresponda, indicar: que la insulina se ha obtenido por modificación enzimática de la insulina porcina o mediante técnicas de recombinación de ADN; la especie animal de origen; que la preparación debe ser resuspendida antes de su uso.

En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: “No congelar”.

INSULINA CORRIENTE

SOLUCIÓN INYECTABLE

La Solución Inyectable de Insulina Corriente debe cumplir con los requisitos especificados en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

Definición - La Solución Inyectable de Insulina Corriente es una solución neutra y estéril de *Insulina Bovina*, *Insulina Porcina* o *Insulina Humana*. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Líquido límpido e incoloro.

CONSERVACIÓN

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar* correspondiente.

Cinc total

Proceder según se indica en *Cinc total* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. No debe contener más de 40 µg de cinc por 100 UI de insulina.

Solución muestra - Transferir un volumen de la Solución Inyectable de Insulina Corriente, equivalente a 200 UI de insulina, a un matraz aforado de 25 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Diluir con agua, si fuera necesario, para obtener una solución entre 0,4 µg y 1,6 µg de cinc por ml.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ROTULADO

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

INSULINA CINC AMORFA

SUSPENSIÓN INYECTABLE

La Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Amorfa debe cumplir con los requisitos especificados en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

Definición - La Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Amorfa es una suspensión neutra y estéril de *Insulina Bovina*, *Insulina Porcina* o *Insulina Humana*, formando un complejo con una sal de cinc. La insulina se encuentra en una forma prácticamente insoluble en agua y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Suspensión de color blanco que sedimenta cuando está en reposo, dando lugar a un sedimento blanco y un líquido sobrenadante incoloro o casi incoloro; el sedimento se resuspende completamente por agitación suave. Cuando se examina al microscopio, las partículas que se observan no tienen forma homogénea y su tamaño máximo raramente excede los 2 μm .

CONSERVACIÓN

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar* correspondiente.

Cinc total

Proceder según se indica en *Cinc total* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Debe contener entre 0,12 y 0,25 mg de cinc por 100 UI de insulina.

Cinc en solución

Proceder según se indica en *Cinc en solución* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Entre 20 y 65 % del cinc total debe presentarse en la forma de cinc en solución.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ROTULADO

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

INSULINA CINC CRISTALINA

SUSPENSIÓN INYECTABLE

La Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Cristalina debe cumplir con los requisitos especificados en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

Definición - La Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Cristalina es una suspensión neutra y estéril de *Insulina Bovina*, *Insulina Porcina* o *Insulina Humana*, formando un complejo con una sal de cinc. La insulina está en una forma prácticamente insoluble en agua y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Suspensión de color blanco que sedimenta cuando está en reposo, dando lugar a un sedimento blanco y un líquido sobrenadante incoloro o casi incoloro; el sedimento se resuspende completamente por agitación suave. Cuando se examina al microscopio, la mayoría de las partículas aparecen como cristales romboédricos, cuya dimensión máxima, medida de vértice a vértice del cristal, es superior a 10 µm, pero raramente excede los 40 µm.

CONSERVACIÓN

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar* correspondiente.

Insulina no extraíble con solución reguladora en acetona

Solución reguladora en acetona - Disolver 8,15 g de acetato de sodio y 42 g de cloruro de sodio en agua. Agregar 68 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, 150 ml de acetona y diluir a 500 ml con agua.

Procedimiento - Centrifugar un volumen de la Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Cristalina equivalente a 200 UI de insulina y descartar el líquido sobrenadante. Resuspender el residuo en 1,65 ml de agua, agregar 3,3 ml de *Solución reguladora en acetona*, agitar durante 3 minutos, centrifugar nuevamente descartando el líquido sobrenadante y repetir todas las operaciones con el residuo.

Disolver el residuo en ácido clorhídrico 0,1 N hasta un volumen final de 2,0 ml. Determinar el contenido de insulina en el residuo (*R*) así como el contenido total de insulina (*T*) de un volumen igual de la suspensión. Calcular el porcentaje de insulina no extraíble con *Solución reguladora de acetona* por la fórmula siguiente:

$$100R/T$$

El porcentaje no debe ser mayor de 90 % de la cantidad total de insulina.

Cinc total

Proceder según se indica en *Cinc total* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Debe contener entre 0,12 y 0,25 mg de cinc por 100 UI de insulina.

Cinc en solución

Proceder según se indica en *Cinc en solución* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Entre 20 y 65 % del cinc total debe presentarse en la forma de cinc en solución.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ROTULADO

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

INSULINA CINC

SUSPENSIÓN INYECTABLE

La Suspensión Inyectable de Insulina Cinc debe cumplir con los requisitos especificados en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

Definición - La Suspensión Inyectable de Insulina Cinc es una suspensión neutra y estéril de *Insulina Bovina*, *Insulina Porcina*, ambas o *Insulina Humana*, formando un complejo con una sal de cinc. Es una mezcla de 7 partes de Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Cristalina y 3 partes de Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Amorfa. La insulina debe presentarse en una forma prácticamente insoluble en agua.

Caracteres generales - Suspensión de color blanco que sedimenta cuando está en reposo, dando lugar a un sedimento blanco y un líquido sobrenadante incoloro o casi incoloro; el sedimento se resuspende por agitación suave. Cuando se examina al microscopio, la mayoría de las partículas aparecen como cristales romboédricos, cuya dimensión máxima, medida de vértice a vértice del cristal, es superior a 10 μm , pero raramente excede los 40 μm ; una proporción considerable de las partículas no presentan forma homogénea y tienen una dimensión máxima que raramente excede de 2 μm .

CONSERVACIÓN

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. Para preparaciones obtenidas a partir de una única especie de insulina (bovina, porcina o humana) el tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar* correspondiente. Para preparaciones obtenidas a partir de una mezcla de insulina porcina y bovina, los tiempos de retención de los picos correspondientes a las dos insulinas en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se deben corresponder con los de la *Preparación estándar* correspondiente.

Insulina no extraíble con solución reguladora en acetona

Proceder según se indica en *Insulina no extraíble con solución reguladora en acetona* en *Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Cristalina*.

El porcentaje debe estar comprendido entre 63 y 77 % de la cantidad total de insulina.

Cinc total

Proceder según se indica en *Cinc total* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Debe contener entre 0,12 y 0,25 mg de cinc por 100 UI de insulina.

Cinc en solución

Proceder según se indica en *Cinc en solución* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Entre 20 y 65 % del cinc total debe presentarse en la forma de cinc en solución.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ROTULADO

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

INSULINA CINC PROTAMINA SUSPENSIÓN INYECTABLE

ROTULADO

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

La Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Protamina debe cumplir con los requisitos especificados en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

Definición - La Suspensión Inyectable de Insulina Cinc Protamina es una suspensión neutra y estéril de *Insulina Bovina*, *Insulina Porcina* o *Insulina Humana*, formando un complejo con *Sulfato de Protamina* u otra sal de protamina y cloruro de cinc u otra sal de cinc. Debe contener una cantidad de Sulfato de Protamina entre 1,0 y 1,7 mg por 100 UI de insulina. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Suspensión de color blanco que sedimenta cuando está en reposo, dando lugar a un sedimento blanco y un líquido sobrenadante incoloro o casi incoloro; el sedimento se resuspende completamente por agitación suave. Cuando se examina al microscopio, aproximadamente el 50 % de las partículas que se observan no tienen forma homogénea y su tamaño máximo raramente excede los 2 μm . Las partículas remanentes aparecen como cristales cilíndricos alargados, la mayoría de un tamaño superior a 10 μm que raramente excede los 100 μm .

CONSERVACIÓN

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar* correspondiente.

Cinc total

Proceder según se indica en *Cinc total* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Debe contener entre 20,0 y 25,0 mg de cinc por 100 UI de insulina.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

INSULINA BIFÁSICA, SUSPENSIÓN INYECTABLE

La Suspensión Inyectable de Insulina Bifásica debe cumplir con los requisitos especificados en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

Definición - La Suspensión Inyectable de Insulina Bifásica es una suspensión estéril de cristales de *Insulina Bovina* en una solución de *Insulina Porcina* y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Suspensión de color blanco. Cuando se examina al microscopio, la mayoría de las partículas aparecen como cristales romboédricos, cuya dimensión máxima, medida de vértice a vértice del cristal, es superior a 10 µm, pero raramente excede los 40 µm.

CONSERVACIÓN

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar* correspondiente.

Determinación del pH <250>

Entre 6,6 y 7,2.

Insulina en el líquido sobrenadante

Proceder según se indica en *Insulina en el líquido sobrenadante* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Debe contener entre 22,0 y 28,0 % de insulina en solución.

Cinc total

Proceder según se indica en *Cinc total* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Debe contener entre 26,0 y 37,5 µg de cinc por 100 UI de insulina.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ROTULADO

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

INSULINA ISÓFANA

SUSPENSIÓN INYECTABLE

La Suspensión Inyectable de Insulina Isófana debe cumplir con los requisitos especificados en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

Definición - La Suspensión Inyectable de Insulina Isófana es una suspensión estéril de *Insulina Bovina*, *Insulina Porcina* o *Insulina Humana*, formando un complejo con *Sulfato de Protamina* u otra protamina. La cantidad de protamina se debe corresponder con la proporción de isófana y no debe ser menor que el equivalente a 0,3 mg ni mayor de 0,6 mg de sulfato de protamina por cada 100 UI de insulina en el complejo. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Suspensión de color blanco que sedimenta cuando está en reposo, dando lugar a un sedimento blanco y un líquido sobrenadante incoloro o casi incoloro; el sedimento se resuspende completamente por agitación suave. Cuando se examina al microscopio las partículas aparecen como cristales cilíndricos alargados, la mayoría de un tamaño superior a 1 μm que raramente excede los 60 μm , sin que existan agregados grandes.

CONSERVACIÓN

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar* correspondiente.

Cinc total

Proceder según se indica en *Cinc total* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. No debe contener más de 40 μg de cinc por 100 UI de insulina.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ROTULADO

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

INSULINA ISÓFANA BIFÁSICA SUSPENSIÓN INYECTABLE

La Suspensión Inyectable de Insulina Isófana Bifásica debe cumplir con los requisitos especificados en *Preparaciones Inyectables de Insulina*, con excepción del ensayo de *Insulina en el líquido sobrenadante*.

Definición - La Suspensión Inyectable de Insulina Isófana Bifásica es una suspensión amortiguada estéril de *Insulina Porcina* o *Insulina Humana*, formando un complejo con *Sulfato de Protamina* u otra protamina, en una solución de insulina de la misma especie. Es una mezcla, en proporciones definidas, de la *Solución Inyectable de Insulina Corriente* y la *Suspensión Inyectable de Insulina Isófana*. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Suspensión de color blanco que sedimenta cuando está en reposo, dando lugar a un sedimento blanco y un líquido sobrenadante incoloro o casi incoloro; el sedimento se resuspende por completo por agitación suave. Cuando se examina al microscopio las partículas aparecen como cristales cilíndricos alargados, la mayoría de un tamaño superior a 1 μm que raramente excede los 60 μm , sin que existan agregados grandes.

CONSERVACIÓN

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar* correspondiente.

Cinc total

Proceder según se indica en *Cinc total* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. No debe contener más de 40 μg de cinc por 100 UI de insulina.

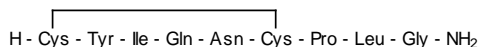
VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Preparaciones Inyectables de Insulina*.

ROTULADO

Debe cumplir con los requisitos en *Preparaciones Inyectables de Insulina*. Indicar en el rótulo la proporción de la *Solución Inyectable de Insulina Corriente* y la *Suspensión Inyectable de Insulina Isófana* empleadas en el proceso de manufactura de la *Preparación Inyectable de Insulina Isófana Bifásica*.

OXITOCINA



$\text{C}_{43}\text{H}_{66}\text{N}_{12}\text{O}_{12}\text{S}_2$ PM: 1.007,2 50-56-6

Definición - Oxitocina es un nonapéptido cíclico, cuya estructura es la de la hormona producida por el lóbulo posterior de la glándula hipofisiaria. Se obtiene por síntesis química y está disponible en forma liofilizada como acetato. Debe contener no menos de 93,0 por ciento y no más de 102,0 por ciento del péptido, calculado sobre la sustancia anhidra y libre de ácido acético. Por convención para el rotulado de las preparaciones de Oxitocina, 1 mg de péptido equivale a 600 UI de actividad biológica. Oxitocina debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Polvo blanco o casi blanco. Higroscópico. Muy soluble en agua y en soluciones diluidas de ácido acético y de etanol.

Sustancias de referencia - Oxitocina SR-FA. Mezcla para validación de Oxitocina/Desmopresina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos herméticos, entre 2 y 8 °C. Si la sustancia es estéril el envase debe estar provisto de cierre inviolable.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 6,0, determinado sobre una solución de Oxitocina de aproximadamente 20 mg por ml en agua libre de dióxido de carbono.

Aminoácidos

Examinar la Oxitocina empleando un analizador de aminoácidos. [NOTA: para la validación del método emplear un estándar interno apropiado, como *DL-norleucina*].

Solución muestra - Transferir 1,0 mg de Oxitocina a un tubo de vidrio grueso, de 100 mm de longitud y 6 mm de diámetro interno. Agregar una cantidad apropiada de ácido clorhídrico 6 N. Introducir el tubo en una mezcla de congelación a -5 °C, reducir la presión por debajo de 1 mm Hg y sellar. Calentar entre 110 y 115 °C durante 16 horas. Enfriar, transferir el

contenido a un matraz de 10 ml con ayuda de cinco porciones de agua de 0,2 ml cada una y evaporar hasta sequedad sobre hidróxido de potasio a presión reducida. Recolectar el residuo en agua y evaporar a sequedad sobre hidróxido de potasio a presión reducida.

Repetir una vez más estas operaciones. Recolectar el residuo en una solución reguladora apropiada para el analizador de aminoácidos utilizado y diluir hasta un volumen apropiado con la misma solución reguladora.

Procedimiento - Calibrar el analizador de aminoácidos con una mezcla de cantidades equimolares de amoniaco, glicina y la forma *L* de los siguientes aminoácidos: lisina, serina, metionina, histidina, ácido glutámico, isoleucina, arginina, prolina, leucina, ácido aspártico, alanina, tirosina, treonina, valina y fenilalanina, junto con la mitad de la cantidad equimolar de *L*-cistina. Aplicar al analizador de aminoácidos un volumen exactamente medido de *Solución muestra* de manera tal que el pico que origine el aminoácido presente en proporción más alta alcance una altura próxima a la máxima del registrador. Expresar la cantidad de cada aminoácido en moles. Calcular las proporciones relativas de cada aminoácido considerando una sexta parte de la suma de moles de ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, glicina, isoleucina y leucina como igual a uno. Los valores deben estar comprendidos entre los límites siguientes:

Aminoácido	Intervalo de valores
ácido aspártico	0,95-1,05
ácido glutámico	0,95-1,05
prolina	0,95-1,05
glicina	0,95-1,05
leucina	0,90-1,10
isoleucina	0,90-1,10
tirosina	0,7-1,05
hemicistina	1,4-2,1
otros	trazas

Péptidos relacionados

Sistema cromatográfico, Solución A, Solución B, Fase móvil, Solución de resolución, Preparación muestra y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo 50 µl de la *Preparación muestra*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de todos los picos. A excepción del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra*, ninguna respuesta individual debe ser mayor de 1,5 % de la suma total de las respuestas de todos los picos, incluido el pico principal; y la suma de todos los picos, a excepción del principal, no debe ser mayor de 5 % de la suma total de las respuestas de todos los picos, incluido el principal. Descartar cualquier pico debido al solvente o al conservante antimicrobiano y cual-

quier pico con una respuesta menor de 0,1 % del pico principal.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 5 %, determinada sobre 50 mg.

Ácido acético

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 210 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,2 ml por minuto. El cromatógrafo se debe programar del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0 - 5	95	5	Equilibrio
5 - 10	95 → 50	5 → 50	Gradiente lineal
10 - 20	50	50	Meseta
20 - 22	50 → 95	50 → 5	Retorno a las condiciones iniciales
22 - 30	95	5	Re-equilibrio

Solución A - Diluir 0,7 ml de ácido fosfórico a 1 litro con agua. Ajustar a pH 3 con una solución de hidróxido de sodio al 42 % p/v en agua.

Solución B - Metanol.

Fase móvil - Emplear mezclas variables de *Solución A* y *Solución B*, según se indica en *Sistema cromatográfico*. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Diluyente - *Solución A* y *Solución B* (95:5).

Solución muestra - Pesar exactamente alrededor de 15 mg de Oxitocina, transferir a un matraz aforado de 10 ml, disolver con *Diluyente* y completar a volumen con *Diluyente*.

Solución estándar - Preparar una solución de ácido acético glacial que contenga 0,10 g por litro en *Diluyente*.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. El tiempo de retención del pico correspondiente al ácido acético debe estar comprendido entre 3 y 4 minutos. La línea de base debe presentar un aumento agudo luego del comienzo del gradiente lineal, que corresponde a la elución del péptido. Calcular la cantidad de ácido acético presente en la *Solución muestra*: debe contener entre 6,0 y 10,0 %.

Ensayos de esterilidad <370>

Cuando en el rótulo se indique que la Oxitocina está destinada a la preparación de formas farmacéuticas de administración parenteral que no deben someterse a un tratamiento posterior de esterilización, debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando en el rótulo se indique que la Oxitocina está destinada a la preparación de formas farmacéuticas de administración parenteral que no deben someterse a un tratamiento posterior de eliminación de endotoxinas bacterianas, debe contener menos de 300 Unidades de Endotoxina por mg de Oxitocina.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 220 nm y una columna de 12 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto. Equilibrar la columna con una mezcla de *Solución A* y *Solución B* (70:30). El cromatógrafo se debe programar del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0 - 30	70 → 40	30 → 60	Gradiente lineal
30 - 30,1	40 → 70	60 → 30	Retorno a las condiciones iniciales
30,1 - 45	70	30	Re-equilibrio

Solución A - Solución de fosfato monobásico de sodio 0,1 M.

Solución B - Acetonitrilo y agua (1:1).

Fase móvil - Emplear mezclas variables de *Solución A* y *Solución B*, según se indica en *Sistema cromatográfico*. Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver el contenido de un vial de Oxitocina SR-FA en *Solución A* y diluir a 20,0 ml con la misma solución.

Preparación muestra - Disolver una cantidad apropiada de Oxitocina en *Solución A* para obtener una solución de aproximadamente 0,25 mg por ml.

Solución de resolución - Disolver el contenido de un vial de Mezcla para validación de Oxitocina/Desmopresina SR-FA en 0,5 ml de *Solución A*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Inyectar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimien-*

to: los tiempos de retención deben ser aproximadamente 7,5 y 10 minutos para oxitocina y desmopresina, respectivamente; la resolución R entre los picos de oxitocina y desmopresina no debe ser menor de 5,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 μ l) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el contenido de Oxitocina a partir de las respuestas de los picos obtenidos en los cromatogramas de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, considerando la cantidad declarada de Oxitocina SR-FA.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el contenido de péptido de oxitocina ($C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$) y, si corresponde, que la Oxitocina es estéril y apirógena.

OXITOCINA

SOLUCIÓN A GRANEL

Definición - La Solución a Granel de Oxitocina es una solución de Oxitocina, un nonapéptido cíclico, disponible como una solución a granel con una concentración no menor a 0,25 mg de Oxitocina por mililitro, en un solvente que puede contener un conservante antimicrobiano apropiado. Debe contener no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad del péptido declarada por mililitro y debe cumplir con las siguientes especificaciones. Por convención, 1 mg de péptido equivale a 600 UI de actividad biológica.

Caracteres generales - Líquido límpido e incoloro.

Sustancias de referencia - Oxitocina SR-FA. Mezcla para validación de Oxitocina/Desmopresina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos herméticos, entre 2 y 8 °C. Si la sustancia es estéril el envase debe estar provisto de cierre inviolable.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 3,0 y 5,0.

Aminoácidos

Examinar la Solución a Granel de Oxitocina empleando un analizador de aminoácidos. [NOTA: para la validación del método emplear un estándar interno apropiado, como *DL-norleucina*].

Solución muestra - Transferir un volumen de Solución a Granel de Oxitocina que contenga aproximadamente 0,25 mg de péptido a un tubo de vidrio grueso, de 100 mm de longitud y 6 mm de diámetro interno. Evaporar hasta sequedad y proceder según se indica para la *Solución muestra* en el ensayo de *Aminoácidos* en *Oxitocina* comenzando donde dice "Agregar una cantidad apropiada de ácido clorhídrico...".

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* en el ensayo de *Aminoácidos* en *Oxitocina*.

Péptidos relacionados

Sistema cromatográfico, Solución A, Solución B, Fase móvil, Solución de resolución, Preparación muestra y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo 50 µl de la *Preparación muestra*. A excepción del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra*, la respuesta de ningún pico individual debe ser mayor de 1,5 % de la suma total de la respuesta de todos los picos, incluido el principal; y la suma de todos los picos, a excepción del principal, no debe ser mayor de 5 % de la suma total de las respuestas de todos los picos, incluido el principal. Descartar cualquier pico debido al solvente o al conservante antimicrobiano y cualquier pico con una respuesta menor de 0,1 % del pico principal.

Ensayos de esterilidad <370>

Proceder según se indica en *Oxitocina*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Proceder según se indica en *Oxitocina*.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico, Solución A, Solución B, Fase móvil, Solución de resolución, Preparación estándar y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración* en *Oxitocina*.

Preparación muestra - Emplear la Solución a Granel de Oxitocina.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el contenido de Oxitocina a partir de las respuestas de los picos obtenidos en los cromatogramas de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, considerando la cantidad declarada de Oxitocina SR-FA.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el contenido de péptido de Oxitocina en mg por ml, el nombre del conservante antimicrobiano empleado y si corresponde, que la Oxitocina solución a granel es estéril y apirógena.

PROTAMINA, SULFATO DE

Definición - Sulfato de Protamina es una mezcla de péptidos básicos sulfatados, extraídos del esperma o de los huevos de peces, generalmente de especies de *Salmonidae* y de *Clupeidae*. En solución se une a la heparina inhibiendo su actividad anticoagulante. Calculado sobre la sustancia seca, 1 mg de Sulfato de Protamina debe precipitar no menos de 100 U.I. de heparina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Polvo blanco o casi blanco. Higroscópico. Moderadamente soluble en agua; prácticamente insoluble en alcohol.

Sustancia de referencia - Heparina Bovina SR-FA o Heparina Porcina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases hermético con cierre inviolable.

ENSAYOS

Identificación

A - Sulfato de Protamina debe formar un precipitado en las condiciones de *Valoración*.

B - Disolver 200 mg de Sulfato de Protamina en agua y diluir a 10 ml con el mismo solvente. Calentar 2 ml de esta solución en un baño de agua a 60 °C y agregar 0,1 ml de una solución preparada del siguiente modo: disolver 1 g de óxido mercurio amarillo en una mezcla de 20 ml de agua y 4 ml de ácido sulfúrico. Mezclar: no se debe formar precipitado. Cuando se enfria la mezcla en un baño de hielo, se debe formar un precipitado.

C - Una solución de Sulfato de Protamina debe cumplir con el ensayo para *Sulfatos* <410>.

D - Disolver 200 mg de Sulfato de Protamina en agua y diluir a 10 ml con el mismo solvente. A 0,5 ml de esta solución agregar 4,5 ml de agua, 1 ml de solución de hidróxido de sodio al 10 % p/v y 1 ml de solución de 1-naftol al 0,02 % p/v y mezclar. Enfriar la mezcla a 5 °C. Agregar 0,5 ml de solución de hipobromito de sodio preparada del siguiente modo: en un baño de hielo mezclar 20 ml de una solución de hidróxido de sodio al 42 % p/v y 500 ml de agua, agregar 5 ml de bromo (SR1) y agitar por rotación hasta disolución completa [NOTA: preparar esta solución en el momento de su uso]. Se debe producir un intenso color rojo.

Determinación de la rotación óptica <170>

Rotación específica: Entre -65° y -85°, determinado sobre la sustancia seca.

Solución muestra: disolver 1 g de Sulfato de Protamina en ácido clorhídrico 0,1 N y diluir a 100 ml con el mismo solvente.

Absorbancia

Pesar exactamente alrededor de 200 mg de Sulfato de Protamina, disolver en 10 ml de agua. Diluir 2,5 ml de esta solución a 5,0 ml con agua. La absorbancia medida entre 260 y 280 nm no debe ser mayor de 0,1.

Sulfato

Pesar exactamente alrededor de 150 mg de Sulfato de Protamina, transferir a un vaso de precipitados y disolver en 15,0 ml de agua. Agregar 5 ml de ácido clorhídrico al 7,3 % p/v. Calentar hasta ebullición y agregar lentamente a la solución hirviendo 10,0 ml de una solución de cloruro de bario al 10 %. Tapar el vaso de precipitados y calentar en un baño de agua durante 1 hora. Filtrar, lavar varias veces el precipitado con agua caliente, secar y calcinar el residuo a 600 °C hasta peso constante. Un gramo del residuo equivale a 0,4117 g de sulfato (SO₄). No debe contener menos de 16 % ni más de 24 % de sulfato calculado sobre la sustancia seca.

Límite de hierro <580>

Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de Sulfato de Protamina, disolver en agua con ayuda de calor y diluir a 10,0 ml con el mismo solvente (10 ppm).

Límite de mercurio

Pesar exactamente alrededor de 2,0 g de Sulfato de Protamina, transferir a un erlenmeyer de 250 ml con tapa esmerilada, agregar 20,0 ml de una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico (1:1). Calentar a reflujo empleando un refrigerante durante 1 hora, enfriar y diluir cuidadosamente con agua. Mantener en ebullición hasta que los vapores nitrosos hayan desaparecido. Enfriar la solución, diluir cuidadosamente a 200 ml con agua, mezclar y filtrar. Transferir 50 ml del filtrado a una ampolla de decantación. Agitar sucesivamente con pequeñas porciones de cloroformo hasta que la fase clorofórmica permanezca incolora. Descartar las fases clorofórmicas. Agregar a la fase acuosa 25 ml de ácido sulfúrico diluido, 115 ml de agua y 10 ml de una solución de clorhidrato de hidroxilamina al 20 % p/v. Titular con solución de ditizona (SR1); luego de cada adición, agitar veinte veces la mezcla y al finalizar la valoración dejar separar las fases y descartar la fase clorofórmica. Titular hasta color verde azulado. Calcular el contenido de mercurio empleando el equivalente en µg de mercurio por ml de solución de ditizona (SR1), determinado en la normalización de la solución de ditizona (SR1): no debe contener más de 10 ppm.

Determinación de nitrógeno

Determinar el contenido de nitrógeno mediante mineralización con ácido sulfúrico, emplear 10 mg y calentar durante 3 a 4 horas. No debe contener menos de 21 % ni más de 26 % calculado sobre la sustancia seca.

Límite de metales pesados

Método VII. Preparar la *Solución estándar* empleando 2 ml de *Solución estándar de plomo (10 ppm)*. No más de 0,002 %.

Pérdida por secado <680>

Secar entre 100 y 105 °C durante 3 horas: no debe perder más de 5,0 % de su peso.

Ensayos de esterilidad <370>

Cuando en el rótulo se indique que Sulfato de Protamina está destinado a la preparación de formas farmacéuticas parenterales, debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando en el rótulo se indique que Sulfato de Protamina está destinado a la preparación de formas farmacéuticas parenterales, no debe contener más de 7,0 Unidades de Endotoxinas por mg de Sulfato de Protamina.

Ensayo de toxicidad anormal <360>

Realizar el ensayo con cinco ratones. Inyectar a cada uno por vía endovenosa, una solución que contenga 0,5 mg de Sulfato de Protamina en 0,5 ml de *Agua para Inyectables*.

VALORACIÓN

Solución de titulación – Preparar una solución acuosa de 170 UI/ml de Heparina Bovina SR-FA o Heparina Porcina SR-FA.

Preparación muestra A - Pesar exactamente alrededor de 15,0 mg de Sulfato de Protamina, disolver en agua y diluir a 100 ml con el mismo solvente.

Preparación muestra B - A 2 ml de la *Solución muestra A* agregar 1 ml de agua.

Preparación muestra C - Diluir 1,0 ml de la *Preparación muestra A* a 3,0 ml con agua.

Procedimiento - Titular cada una de las *Preparaciones muestra A, B y C* por duplicado del siguiente modo: colocar en la celda con tapa del espectrofotómetro, un volumen exactamente medido de la solución que se va a valorar (por ej., 1,5 ml). Ajustar el aparato para medir a una longitud de onda en la región del visible (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*). Agregar pequeños volúmenes de la *Solución de titulación* hasta producir un incremento brusco de la absorbancia y anotar el volumen agregado.

Realizar tres ensayos independientes. Para cada titulación individual, calcular el número de Unidades Internacionales de heparina en el volumen agregado de *Solución de titulación* en el punto final por miligramo de Sulfato de Protamina. Calcular la potencia como la media de 18 valores. Comprobar la linealidad de la respuesta, mediante métodos estadísticos (ver 10. *Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*). Calcular las tres desviaciones estándar de los resultados obtenidos con cada una de las tres *Preparaciones muestra*. Calcular las tres desviaciones estándar de los resultados obtenidos con cada uno de los tres ensayos independientes. El resultado solo es válido si cada una de las seis desviaciones estándar es menor de 5,0 % del resultado medio.

ROTULADO

Cuando el Sulfato de Protamina esté destinado a la preparación de formas farmacéuticas parenterales, se debe indicar que es estéril y apirógena.

PROTAMINA SULFATO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Sulfato de Protamina es una solución estéril de *Sulfato de Protamina en Agua para Inyectables*. Debe contener no menos de 80,0 por ciento de la cantidad declarada de sulfato de protamina y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Sustancia de referencia - Heparina Bovina SR-FA o Heparina Porcina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases monodosis de vidrio Tipo I, en un refrigerador.

ENSAYOS

Identificación

A - La Solución Inyectable de Sulfato de Protamina debe formar un precipitado en las condiciones de *Valoración*.

B - Calentar 2 ml de la Solución Inyectable de Sulfato de Protamina en un baño de agua a 60 °C y agregar 0,1 ml de una solución preparada según se indica en ensayo de *Identificación B* en *Sulfato de Protamina*: no se debe formar precipitado. Enfriar la mezcla en un baño de hielo: se debe formar un precipitado blanco.

C - Debe responder al ensayo para *Sulfato* <410>.

D - Diluir un volumen de Solución Inyectable de Sulfato de Protamina en agua para obtener una solución de aproximadamente 2 mg de sulfato de protamina por ml. A 5 ml de esta solución agregar 1 ml de solución de hidróxido de sodio al 10 % y 1 ml de solución de 1-naftol al 0,02 % y mezclar. Enfriar la mezcla a 5 °C. Agregar 0,5 ml de *Solución de hipobromito de sodio* preparada según se indica en ensayo de *Identificación D* en *Sulfato de Protamina*. Se debe producir un intenso color rosa.

Determinación de la rotación óptica <170>

Rotación específica: Entre $-0,52^{\circ}$ y $-0,68^{\circ}$.

Solución muestra: Diluir la Solución Inyectable de Sulfato de Protamina en ácido clorhídrico 0,5 N para obtener una solución de aproximadamente 8 mg de sulfato de protamina por ml.

Absorbancia

Diluir la Solución Inyectable de Protamina, si fuera necesario, con agua para obtener una solución de aproximadamente 10 mg de sulfato de protamina por ml. La absorbancia medida entre 260 y 280 nm no debe ser mayor de 0,1.

Determinación del pH <250>

Entre 2,5 y 3,5.

Determinación del contenido extraíble del envase <210>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 7,0 Unidades de Endotoxina por mg de Sulfato de Protamina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Partículas en inyectables <650>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Solución de titulación - Preparar según se indica en *Sulfato de Protamina*.

Preparación muestra A - Diluir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Sulfato de Protamina en agua para obtener una solución de aproximadamente 0,15 mg sulfato de protamina por ml.

Preparación muestra B - Diluir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Sulfato de Protamina en agua hasta obtener una solución de aproximadamente 0,10 mg sulfato de protamina por ml.

Preparación muestra C - Diluir un volumen exactamente medido de Solución Inyectable de Sulfato de Protamina en agua hasta obtener una solución de aproximadamente 0,05 mg sulfato de protamina por ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en , *Sulfato de Protamina*.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la dosis administrada de la Solución Inyectable de Sulfato de Protamina es calculada a partir de las determinaciones de la cantidad requerida para producir un tiempo de coagulación aceptable en el paciente.

PRODUCTOS MÉDICOS

APARTADO DE PRODUCTOS MÉDICOS

ÍNDICE

Métodos Generales de Análisis

<383> - Ensayos de Suturas

<435> - Envases para Productos Médicos Estériles

<475> - Esterilización

Monografías

Algodón Hidrófilo

Gasa Hidrófila

Sutura Quirúrgica Absorbible

Sutura Quirúrgica no Absorbible

383. ENSAYOS DE SUTURAS

IDENTIFICACIÓN

Las suturas no absorbibles pueden identificarse con ensayos químicos. Los materiales de origen natural pueden identificarse también mediante examen microscópico de la morfología de estas fibras. Para materiales sintéticos, puede utilizarse también la identificación por espectrofotometría de absorción en el infrarrojo o calorimetría diferencial de barrido.

Lino

Definición - La sutura de lino estéril se compone de las fibras pericíclicas del tallo de *Linum usitatissimum* L. Las fibras básicas de 2,5 a 5 cm de largo se ensamblan en haces de 30 a 80 cm de longitud y se hilan en longitudes continuas de diámetro predeterminado.

Identificación

A - Cortar el extremo de una sutura. Separar algunas fibras con una aguja o una pinza fina. Cuando se examina al microscopio deben observarse fibras de 12 a 31 μm de ancho, y a lo largo de su longitud presentan paredes gruesas, marcadas algunas veces con finas estriaciones longitudinales y un lumen estrecho. Las fibras se estrechan gradualmente, terminando en una punta fina. Algunas veces se encuentran engrosamientos unilaterales con líneas transversales.

B - Impregnar las fibras aisladas con solución de cloruro de zinc iodado (SR). Las fibras deben tomar un color azul-violeta.

Poliamida-6*

Definición - La sutura quirúrgica estéril de poliamida-6 está constituida por monofilamentos cilíndricos lisos o filamentos trenzados lisos, o bien hilos ligeramente retorcidos revestidos en el mismo material. Se obtiene pasando a través de una matriz determinada un material plástico sintético proveniente de la polimerización de ϵ -caprolactama. Las suturas pueden teñirse con un colorante atóxico

Caracteres generales - Es prácticamente insoluble en solventes orgánicos. No es atacada por soluciones alcalinas diluidas (ej. solución de hidróxido de sodio al 10 %) pero es atacada por ácidos minerales diluidos (ej. solución de ácido sulfúrico al 2 %), ácido acético glacial caliente y solución 70 % p/p de ácido fórmico anhidro.

[NOTA: * el nombre Nylon -6 como sinónimo de poliamida-6 puede usarse en algunos países y no en otros por derechos de propiedad exclusivos.]

Identificación

A - Calentar 50 mg de sutura con 0,5 ml de ácido clorhídrico 25 % p/p en un tubo de ensayo cerrado a 110° C durante 18 horas, y luego dejar reposar durante 6 horas. No deben observarse cristales.

B - 50 mg de sutura se disuelven en 20 ml de una solución 70 % p/p de ácido fórmico anhidro.

Monómeros y oligómeros

La poliamida-6 cumple con un ensayo adicional: en un aparato de extracción continua tratar 1 g de sutura con 30 ml de metanol efectuando tres extracciones por hora durante 7 horas, evaporar a sequedad y secar el residuo a 110 °C durante 10 minutos, dejar enfriar en un desecador y pesar. El residuo no debe pesar más de 20 mg (2 %).

Poliamida- 6/6*

Definición - La sutura quirúrgica estéril de poliamida 6/6 está constituida por monofilamentos cilíndricos lisos o filamentos trenzados lisos, o bien hilos ligeramente retorcidos revestidos en el mismo material. Se obtiene por pasaje a través de una matriz determinada de un material plástico sintético proveniente de la policondensación de hexametilenediamina y ácido adípico. Las suturas pueden teñirse con un colorante atóxico

Caracteres generales - Es prácticamente insoluble en solventes orgánicos. No es atacada por soluciones alcalinas diluidas (ej. solución de hidróxido de sodio al 10 %) pero es atacada por ácidos minerales diluidos (ej. solución de ácido sulfúrico al 2 %), ácido acético glacial caliente y solución 80 % p/p de ácido fórmico anhidro.

Identificación

A - Al contacto con la llama se funde y arde formando un glóbulo residual duro y emite un olor característico parecido al apio.

B - Colocar 50 mg de sutura en un tubo de ignición sostenido en posición vertical y calentar suavemente hasta que se desprenda un humo espeso, cuando el humo llena el tubo retirar de la llama e introducir una tira de papel de nitrobenzaldehído (Sumergir la mitad inferior de una tira de papel de filtro de 10 cm de largo y de 0,8 a 1 cm de ancho, en una solución preparada una hora antes de su uso, disolviendo 0,2 g de nitrobenzaldehído en 10 ml de una solución de hidróxido de sodio 200 g en un litro. Absorber el exceso de reactivo entre dos hojas de papel de filtro y emplear inmediatamente). Aparece lentamente un

color pardo violeta en el papel que se esfuma lentamente en el aire. El color desaparece de inmediato por lavado con ácido sulfúrico 1 M.

C - A 50 mg de sutura agregar 10 ml de ácido clorhídrico 25 % p/p. El material se desintegra en frío y se disuelve en pocos minutos.

D - 50 mg no se disuelven en 20 ml de solución de ácido fórmico anhidro al 70 % p/p pero se disuelven en 20 ml de solución de ácido fórmico anhidro al 80 % p/p.

Polietilentereftalato (poliéster)

Definición - Se obtiene trenzando un número determinado de filamentos muy finos, obtenidos por pasaje de polietilentereftalato a través de una matriz predeterminada; pudiendo ser blanquecino o coloreado con colorantes o pigmentos autorizados

Caracteres generales - Es prácticamente insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos, pero es atacado por soluciones alcalinas fuertes. Es incompatible con fenoles.

Identificación

A - 50 mg de sutura se disuelven con dificultad al calentar con 50 ml de dimetilformamida.

B - Añadir 10 ml de ácido clorhídrico 25 % p/p a 50 mg de sutura. El material debe permanecer intacto después de 6 hs de inmersión.

Polipropileno

Definición - La sutura de polipropileno se obtiene pasándola a través de una matriz predeterminada. Se presenta como monofilamentos cilíndricos.

Caracteres generales - El polipropileno es soluble en decahidronaftaleno, 1-cloronaftaleno y tricloroetileno. No es soluble en alcohol, éter y ciclohexanona.

Identificación

A - Se ablanda entre 160 y 170 °C. Arde con llama azul, emitiendo un olor de parafina quemada y de alcohol octílico.

B - Añadir 10 ml de tolueno a 0,25 g de sutura y calentar a reflujo durante 15 minutos. Llevar a ebullición con un condensador de reflujo durante aproximadamente 15 minutos. Colocar unas gotas de la solución sobre un disco de cloruro de sodio, correr y evaporar el solvente en estufa a 80 °C. Examinar por espectrofotometría infrarroja (<460>. *Espectrofotometría infrarroja*), comparándolo con el espectro obtenido para el polipropileno.

C - Añadir 100 ml de agua a 2 g de sutura y hervir bajo condensador de reflujo durante 2 horas. Dejar enfriar. La densidad relativa de la muestra

determinada con una balanza hidrostática, debe estar comprendida entre 0,89 y 0,91 g/ml. <160>

Seda trenzada

Definición - La Sutura Seda Trenzada, se obtiene trenzando un número de hebras según el diámetro requerido de la seda desgomada obtenida de los capullos del gusano de seda *Bombix mori* L. La sutura puede colorearse con pigmentos o colorantes aprobados. Ver 50. *Colorantes de uso farmacéutico*.

Identificación

A - Cortar el extremo de una sutura. Aislar algunas hebras con una aguja o pinza fina. Cuando se examinan al microscopio las hebras pueden presentar estriaciones longitudinales muy finas, paralelas a su eje, la sección transversal es aproximadamente triangular o semicircular, con los extremos redondeados y sin lumen.

B - Impregnar algunas hebras aisladas con solución yodada de yoduro de potasio, preparada disolviendo 2 g de yodo y 4 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua, completar a 100 ml con agua. Las mismas toman un color amarillo pálido.

Acero inoxidable

Definición - Las suturas quirúrgicas estériles de acero inoxidable mono y multifilamento tienen una composición química según normas internacionales vigentes. Están formadas por monofilamentos cilíndricos, o filamentos retorcidos o trenzados lisos.

Identificación

Se identifican verificando que su composición está de acuerdo con normas internacionales vigentes.

DIÁMETRO

Se utiliza calibrador del tipo de peso muerto, mecánico o eléctrico, equipado con un dial de lectura directa, un visor digital o una impresora. Emplear un calibre graduado de 0,002 mm o menor. El yunque es de aproximadamente 50 mm de diámetro, y el pie compresor es aproximadamente de 12,70 de diámetro. Graduar el pie compresor y las partes móviles conectadas a éste de manera que se aplique una carga total de 210 ± 3 g a la muestra. Las superficies del pie compresor y del yunque son planas, con desviaciones no mayores de 0,005 mm, y paralelas entre sí con una aproximación de 0,005 mm. Para medir el diámetro de las suturas de 0,4 mm y menor tamaño métrico, retirar el peso adicional del pie compresor para que la carga total sobre la sutura no exceda de 60 g.

Sutura de colágeno - Se mide el diámetro inmediatamente después de haberla retirado del envase primario y extendido sin irregularidades ni tensión. Colocar el hilo entre el centro del yunque y el pie compresor y bajar suavemente el pie hasta que todo su peso descansa sobre la sutura. Medir el diámetro de cada hilo en tres puntos correspondientes, aproximadamente a un cuarto, a la mitad y a tres cuartos de su longitud.

Sutura quirúrgica no absorbible - Colocar el hilo a través del centro del yunque y el pie compresor y bajar suavemente el pie hasta que todo su peso descansa sobre la sutura. Medir las suturas no absorbibles, ya sea que estén envasadas en seco o en líquido, inmediatamente después de haberlas retirado del envase, sin secado ni acondicionamiento previo. Se mide el diámetro de la sutura en tres puntos correspondientes, aproximadamente a un cuarto, a la mitad y a tres cuartos de su longitud. En el caso de suturas trenzadas de tamaños mayores de 000 (tamaño métrico 2), hacer dos mediciones en cada punto, una en ángulo recto respecto de la otra, y emplear el promedio como el diámetro observado en ese punto.

Sutura quirúrgica absorbible sintética - Se procede según se indica para *Sutura quirúrgica no absorbible*.

Suturas de multifilamento - Fijar una porción de la sección designada del hilo en una pinza fija, de manera que el hilo quede sobre el centro del yunque. Mientras se sostiene el hilo en el mismo plano que la superficie del yunque, someter el hilo a

tensión por medios adecuados, como por ejemplo, pasando el extremo libre del hilo alrededor de un cilindro o polea uniéndolo a una pesa de aproximadamente la mitad del valor mínimo de resistencia a la tensión para la sutura de Clase I del tamaño en cuestión, con cuidado de no dejar que el hilo, si fuera retorcido, pierda la torsión. Medir el diámetro en los puntos designados en el hilo y calcular el diámetro promedio según las indicaciones dadas.

ENGARZADO DE AGUJAS

Las suturas quirúrgicas absorbibles (de colágeno y sintéticas) y las no absorbibles pueden tener agujas sujetas firmemente.

Procedimiento - Tomar cinco suturas y colocar una por una en el tensilómetro, sujetando la aguja con la pinza fija, dejando toda la parte engarzada expuesta, y en la misma dirección de la fuerza que ejerce la pinza móvil sobre la sutura. Determinar la fuerza necesaria para desprender la sutura de la aguja. La sutura puede romperse sin desprenderse de la aguja. El engarzado cumple con los requisitos si el promedio de los cinco valores y ningún valor individual es inferior al límite fijado para el tamaño especificado en la *Tabla*.

Si no más de uno de los valores individuales se encuentra fuera de los límites establecidos, repetir la prueba con diez suturas adicionales. Cumple con los requisitos si ninguno de los diez valores adicionales se encuentra fuera de los requisitos del límite individual.

Tabla. Engarzado de aguja estándar para suturas absorbibles y no absorbibles

NÚMERO	Diámetro (mm)		Límites de engarzado de aguja				
	Sutura convencional	Sutura absorbible de colágeno	Sutura no absorbible y absorbible sintética	Promedio (mínimo) (kgf)	Individual (mínimo) (Newton)	Promedio (mínimo) (kgf)	Individual (mínimo) (Newton)
11/0			0,1	0,007	0,069	0,005	0,049
10/0			0,2	0,014	0,137	0,010	0,098
9/0	0,4		0,3	0,021	0,206	0,015	0,147
8/0	0,5		0,4	0,050	0,490	0,025	0,245
7/0	0,7		0,5	0,080	0,784	0,040	0,392
6/0	1		0,7	0,17	1,67	0,08	0,784
5/0	1,5		1	0,23	2,25	0,11	1,08
4/0	2		1,5	0,45	4,41	0,23	2,25
3/0	3		2	0,68	6,67	0,34	3,33
2/0	3,5		3	1,10	10,8	0,45	4,41
0	4		3,5	1,50	14,7	0,45	4,41
1	5		4	1,80	17,6	0,60	5,88
2 y superior	6 y superior		5 y superior	1,80	17,6	0,70	6,86

RESISTENCIA A LA TENSIÓN

Determinar la resistencia a la tensión de las suturas quirúrgicas en un instrumento que emplee el principio de velocidad de carga constante sobre la muestra o el principio de velocidad de elongación constante de la muestra, según se describe a continuación. El aparato tiene dos pinzas para sostener un hilo de la sutura. Una de estas pinzas es móvil. Las pinzas están diseñadas para que la sutura que se va a probar pueda ser fijada sin que se deslice. La longitud ensayada se define como la distancia interior entre las dos pinzas. Debe ser entre 125 a 200 mm y la pinza móvil ser accionada a una velocidad de elongación constante de 30 ± 5 cm por minuto. Medir la resistencia a la tensión de la sutura, ya sea que esté envasada en seco o con líquido, inmediatamente después de haberla retirado del envase, sin secado ni acondicionamientos previos. Sujetar uno de los extremos de la sutura a la pinza del extremo de carga de la máquina, pasar el otro extremo a través de la pinza opuesta, aplicando tensión suficiente para que la muestra quede tirante entre las pinzas, y cerrar la segunda pinza. Realizar tantas determinaciones como las especificadas en la monografía individual. Si la ruptura ocurre en cualquiera de las pinzas, descartar la lectura de la muestra.

Procedimiento para un instrumento que opera por el principio de velocidad de carga constante sobre la muestra - Esta descripción se aplica al instrumento conocido como Comprobador de Plano inclinado. El carro empleado en cualquier prueba es de un peso tal que al ocurrir la ruptura, la posición de la pluma registradora sobre la gráfica queda entre 20 y 80 % de la capacidad que pueda registrarse en la gráfica. La fricción en el carro es suficientemente baja como para permitir que la pluma registradora se aparte de la línea cero de la gráfica en un punto que no exceda el 2,5 % de la capacidad de la gráfica cuando no haya ninguna muestra sujeta entre las pinzas.

Para suturas quirúrgicas de tamaños intermedios y más gruesas, la pinza para sostener la muestra es del tipo rodillo, con una superficie de sujeción plana. El rodillo tiene un diámetro de 19 mm y la superficie de sujeción plana no es menor de 25 mm de longitud. La longitud de la muestra, una vez que se inserta en las pinzas, es de por lo menos 127 mm de un extremo a otro. La velocidad de inclinación del plano del comprobador es tal que alcanza su inclinación máxima de 30° sobre la horizontal en 20 ± 1 segundo desde el comienzo de la prueba.

Para suturas quirúrgicas de menor calibre, la pinza apropiada tiene una superficie de sujeción plana de no menos de 13 mm de longitud. La

velocidad de inclinación del plano es tal que alcanza su inclinación máxima de 30° sobre la horizontal en 60 ± 5 segundos desde el comienzo de la prueba.

Salvo cuando en la monografía individual se indica tracción recta, sin nudo, atar la sutura de prueba realizando un nudo de cirujano con una vuelta de sutura, alrededor de un tubo de goma flexible con un diámetro interno de 6,5 mm y un espesor de pared de 1,6 mm. El nudo de cirujano es un nudo en el cual el extremo libre se pasa primero dos veces por el lazo, en lugar de una vez, y se ajusta tirante, luego se pasa una vez por un segundo lazo y se tensan los extremos de manera que quede un nudo sencillo superpuesto a un nudo doble. Comenzar el primer nudo con el extremo izquierdo sobre el extremo derecho, ejerciendo tensión suficiente para atar el nudo con firmeza. Cuando la muestra de prueba incluya un nudo, colocar la muestra en el dispositivo de prueba con el nudo aproximadamente a media distancia entre las pinzas. Dejar el tubo de goma flexible en su lugar mientras dure la prueba.

Procedimiento para un instrumento que opera por el principio de velocidad de elongación constante de la muestra - Excepto cuando en la monografía individual se indique tracción recta, sin nudo, atar la sutura de prueba por medio de un nudo simple, colocando un extremo del hilo, sostenido con la mano derecha, por encima del otro extremo, sostenido con la mano izquierda, pasando un extremo sobre el hilo y a través del lazo que se formó y luego ajustando el nudo con firmeza. La muestra se coloca en el dispositivo de prueba con el nudo aproximadamente a media distancia entre las pinzas.

[NOTA: *Calibre*: se puede expresar en forma de calibre métrico que representa el grosor de la sutura en décimas de milímetro: métrico 0,1 (0,010-0,019 mm) a métrico 10 (1,00-1,09 mm), o bien, en calibre convencional, que expresa el grosor en forma convencional: 11/0 (0,010-0,019 mm) a calibre 6 (1,00-1,09 mm).]

435. ENVASES PARA PRODUCTOS MÉDICOS ESTÉRILES

En este capítulo se describen los requisitos y métodos de ensayos que deben reunir los materiales y sistemas de envases para ser utilizados como empaque primario en productos médicos que serán sometidos a esterilización terminal y destinados a mantener la esterilidad del producto.

Los materiales empleados para envases de productos médicos se clasifican en:

Materiales porosos: papel en bobinas, resmas, bolsas o componentes de bolsas mixtas termosellables, papel con recubrimiento adhesivo para paquetes termosellables.

Materiales no porosos: telas no tejidas de poliolefinas con o sin recubrimiento adhesivo para bolsas mixtas, film de polietileno, film de polipropileno orientado, laminados de poliolefinas y poliéster, laminas de PET (polietilentereftalato) y PVC para termoformar.

Las materias primas utilizadas en los materiales de embalaje pueden ser vírgenes o recicladas siempre que cumplan con los ensayos descriptos y se conozca su trazabilidad.

Los adhesivos utilizados no deben mostrar reacción, contaminar, transferirse o afectar al producto envasado, antes y después de la esterilización. No deben contener componentes tóxicos en cantidades suficientes como para causar daño a la salud.

La composición química y los ensayos de identificación y caracterización de los polímeros plásticos están descriptos en 420. *Envases primarios de plástico.*

Características generales

El envase del producto médico estéril debe ser tal que:

- Sea barrera microbiana.
- Sea barrera mecánica.
- No presente interacción con el producto médico que contiene.
- Adecuado para el método de esterilización aplicado.

A continuación se describen los ensayos para materiales porosos y no porosos que permiten el cumplimiento de las características generales.

Además se consideran los ensayos vinculados a la funcionalidad del envasado final conteniendo el producto médico estéril y el ensayo de envejecimiento acelerado para determinar la vida útil del envase.

ENSAYOS PARA MATERIALES

Determinación del gramaje

El gramaje es la masa por unidad de área de papel determinada por el método de ensayo normalizado. Se expresa en gramos por metro cuadrado (g.m^2).

La determinación del gramaje es aplicable a papel, papel con recubrimiento adhesivo y tela no tejida con y sin recubrimiento adhesivo.

La masa promedio de un metro cuadrado de papel acondicionado debe estar entre $\pm 5\%$ del valor nominal declarado por el fabricante.

La masa promedio de un metro cuadrado de papel con adhesivo debe estar entre $\pm 7,5\%$ del valor nominal declarado por el fabricante.

La masa promedio para tela no tejida sin recubrimiento adhesivo debe estar entre $\pm 7\%$ del valor nominal declarado por el fabricante.

La masa promedio para tela no tejida con recubrimiento adhesivo debe estar entre $\pm 15\%$ del valor nominal declarado por el fabricante.

Aparatos -

Dispositivo de corte: el dispositivo de corte deberá ser capaz de cortar repetidamente probetas cuya área se encuentre en un entorno de $\pm 1\%$ de un área conocida. Esto debe ser controlado frecuentemente por medición y siempre que se logre la exactitud mencionada anteriormente, el área promedio obtenida en estos controles debe ser utilizada para el cálculo del gramaje. Con ciertos papeles se encontrará, después de llevar a cabo esta determinación de área, que las probetas no pueden ser cortadas con la precisión anteriormente definida; en tales casos, el área de cada probeta deberá ser determinada individualmente.

Balanza: La balanza deberá ser lo suficientemente exacta, en el rango de utilización, para pesar dentro del $0,5\%$ de la masa real. Deberá ser lo suficientemente sensible como para detectar un cambio de $\pm 0,2\%$ de la masa a ser determinada y, si la balanza es del tipo de lectura directa, deberá estar graduada de manera tal que se puedan tomar lecturas con ese grado de precisión.

Se puede usar balanzas especiales para la determinación de gramaje, diseñadas para pesar probetas de un tamaño determinado e indicar directamente su gramaje, si se cumplen totalmente las condiciones antes detalladas y el área de cada probeta no es menor que 500 cm^2 y no mayor que 1.000 cm^2 .

Mientras está en uso, la balanza deberá ser protegida de las corrientes de aire.

Muestreo -

La selección de unidades y la toma de ejemplares de ensayo deberá ser lo más representativo posible. El número de ejemplares de ensayo empleado (por lo menos cinco) deberá ser suficiente para por lo menos 20 probetas.

Preparación de las muestras -

Las muestras deberán acondicionarse a una atmósfera de 23 ± 1 °C y 50 ± 2 % humedad relativa por el tiempo requerido para obtener estas condiciones. Se considera que se ha alcanzado el equilibrio en temperatura y humedad cuando dos pesadas consecutivas de la muestra, efectuadas en un intervalo de no menos de una hora no difieran en más de 0,25 % de la masa total.

Procedimiento -

Para la determinación de gramaje se preparan y se pesan las probetas en las mismas condiciones atmosféricas del acondicionamiento. Utilizando el *Dispositivo de corte*, se corta, de por lo menos 5 ejemplares de ensayo, un mínimo de 20 probetas; si es posible el mismo número de probetas de cada ejemplar de ensayo.

Siempre que sea posible cada probeta deberá tener un área de por lo menos 500 cm^2 y no más de 1.000 cm^2 ; si es necesario, puede estar compuesta de varios trozos más pequeños.

Se determina el área de las probetas por cálculo a partir de las medidas tomadas, redondeando a 0,5 mm.

Se pesa cada probeta y se expresa las masas con tres cifras significativas.

Se calcula el gramaje g , en gramos por metro cuadrado, de cada probeta, por la fórmula siguiente:

$$g = 10.000(m/A)$$

en la cual m es la masa de la probeta, en gramos, y A es el área de la probeta, en cm^2 .

Alternativamente se calcula el gramaje por la fórmula siguiente:

$$g = 10.000(m_{1/2}/\bar{A})$$

en la cual $m_{1/2}$ es la masa promedio de las probetas, en gramos, y \bar{A} es el área promedio de las probetas, en cm^2 .

Si se ha usado una balanza diseñada para pesar probetas de un tamaño determinado, se utiliza la siguiente fórmula:

$$g = g_1(A_1/A)$$

en la cual g_1 es el gramaje indicado de la probeta, en gramos por metro cuadrado, A_1 es el área de la probeta para la cual está calibrada la balanza, en cm^2 , A es el área de la probeta pesada, en cm^2 .

Se calcula el promedio de los resultados y la desviación estándar y se expresan con tres cifras significativas.

Determinación del pH

La determinación del pH (ver 250. *Determinación del pH*) es aplicable a papel y papel con recubrimiento adhesivo.

El pH de un extracto acuoso del papel debe estar comprendido entre 5 y 8.

Principio -

Se extrae una muestra de 2 gramos de material durante 1 hora con 100 ml de agua destilada fría e hirviendo y se mide el pH del extracto.

Reactivos -

Agua destilada o desionizada. La conductividad no debe exceder 0,1 mS/m después de hervir y enfriarse.

Soluciones reguladoras patrón, con valor de pH tal como 4; 6,9 y 9,2.

Muestreo -

Lo selección de unidades y la toma de muestra deberá ser lo más representativo posible.

Preparación de la muestra -

Se corta o rasga la muestra en trozos aproximados de $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$, porciones que no hayan sido tocadas por manos descubiertas y asegurándose que las muestras se coloquen solo sobre superficies limpias.

Se mezclan los trozos completamente. Las muestras preparadas se guardan en recipientes limpios y tapados.

Preparación del extracto acuoso: se pesan $2 \pm 0,1$ g, en base a la sustancia seca, de muestra para realizar el *Extracto en caliente* y la misma cantidad para el *Extracto en frío*.

Extracción en caliente: se colocan 100 ml de agua destilada en un frasco con condensador de reflujo y se calienta hasta la temperatura de ebullición. Se desensambla el condensador y el agua casi hirviendo se trasvasa a otro frasco para condensador de reflujo que contiene los trozos de muestra. Se adapta el condensador y se hierve durante 1 hora a fuego moderado. Se permite el enfriamiento rápido hasta temperatura entre 20 y 25 °C con el condensador colocado. Se espera la decantación de las fibras y se trasvasa el extracto sobrenadante a un vaso pequeño. La muestra se realiza por duplicado.

Extracción en frío: se colocan 100 ml de agua destilada en un frasco esmerilado con tapón de vidrio y se agregan los trozos de la muestra. Se tapa el frasco y se deja reposar durante 1 hora entre 20 y 25 °C, agitando por lo menos una vez durante

este tiempo. Se espera la decantación de las fibras y se trasvasa el extracto sobrenadante a un vaso pequeño. La muestra se realiza por duplicado.

Medición del pH -

Se realiza la medición de pH de los extractivos realizados en frío y en caliente. Se expresa el pH como el promedio de las dos determinaciones redondeando a 0,1 unidad. Los resultados individuales no deben diferir en más de 0,2 unidades. Si esto ocurre se repiten las determinaciones y se informa el promedio y rango de todas las medidas.

Determinación del color

La determinación de color es aplicable a papel, papel con recubrimiento adhesivo, tela no tejida con o sin recubrimiento.

El color no se debe lixiviar cuando se realice el extracto acuoso en frío y en caliente de igual forma que para la determinación de pH.

Determinación de cloruros y sulfatos

La determinación de cloruros y sulfatos es aplicable a papel y papel con recubrimiento adhesivo.

El contenido de cloruros como cloruro de sodio no debe exceder el 0,05 %.

El contenido de sulfato como sulfato de sodio no debe exceder el 0,25 %.

Preparación de la muestra -

Se pesan entre 2 y 5 g de muestra, se corta en trozos aproximados de 5 mm × 5 mm.

Procedimiento -

Se transfiere la muestra a un desintegrador y se agregan 250 ± 2 ml de agua destilada a 23 ± 2 °C. Se procede a la acción del desintegrador durante 2 horas.

Se retira una alícuota de la suspensión con una jeringa con filtro de 0,2 µm para prevenir el arrastre de fibras. Es esencial que la alícuota esté libre de material suspendido.

Sobre la alícuota se determina cloruros como ion Cloruro y sulfatos como ion sulfato por cromatografía iónica.

Determinación de la fluorescencia

La determinación de la fluorescencia es aplicable a papel y papel con recubrimiento adhesivo.

Aparatos -

Fuente de radiación ultravioleta, que produzca un pico a 366 nm. La salida luminosa de la lámpara debe ser tal que se obtenga la iluminación requerida de la superficie de la probeta acondicionada.

Preparación de la muestra -

Se corta un trozo del papel en ensayo de 100 mm × 10 mm y se acondiciona de igual forma que para el ensayo de *Determinación del gramaje* a 23 ± 1 °C y 50 ± 2 % de humedad relativa por el tiempo requerido.

Procedimiento -

Se enciende la lámpara y se deja hasta que desarrolle su rendimiento completo. Se ajusta la distancia entre la lámpara y la superficie de la probeta de ensayo de manera tal que la radiación ultravioleta incidente sobre la superficie de la probeta de ensayo sea 300 ± 20 µW/cm².

Se observa el aspecto general de la probeta y la presencia de manchas fluorescentes.

El papel con o sin recubrimiento adhesivo no debe tener más de cinco focos de fluorescencia, cada uno con un eje mayor a 1 mm/dm².

Determinación de la resistencia al estallido en húmedo y en seco

La resistencia al estallido es la máxima presión uniformemente distribuida, aplicada en ángulo recto a su superficie, que una hoja de papel puede soportar bajo las condiciones de ensayo.

La determinación de la resistencia al estallido en húmedo es aplicable a papel y papel con recubrimiento adhesivo.

En seco es aplicable además a tela no tejida con o sin recubrimiento adhesivo.

Para papel, la resistencia en seco no debe ser menor a 230 kPa y en húmedo 35 kPa, empleando un tiempo de inmersión de 10 minutos.

Para papel para la fabricación de paquetes para uso médico que deben ser esterilizados con óxido de etileno o radiación y papel con recubrimiento adhesivo: en seco 200 kPa y en húmedo 35 kPa, con tiempo de inmersión de 10 minutos.

Si será sometido a radiación no es aplicable la resistencia en húmedo.

Principio -

El ensayo consiste en colocar una probeta de ensayo sobre un diafragma circular elástico, se la amordaza rígidamente en el perímetro, pero dejándola curvarse sobre el diafragma. Se bombea fluido hidráulico a velocidad constante, expandiendo el diafragma hasta que la hoja se rompa. La resistencia al estallido de la probeta es el valor máximo de la presión hidráulica aplicada.

Aparatos -

Diafragma: circular, de material elástico, amordazado firmemente con su superficie superior aproximadamente 3,5 mm por debajo del plano superior del elemento de fijación inferior. El material y la construcción del diafragma deberán

ser tales que la presión requerida para expandir al diafragma 9 mm por sobre la superficie superior del elemento de fijación inferior sea de 30 ± 10 kPa.

Sistema de amordazado: para sostener la probeta, firme e uniformemente entre dos superficies anulares planas, que deberán ser suaves (pero no pulidas) y acanaladas. Se debe asegurar que la presión de amordazado esté distribuida en forma pareja. La presión de amordazado deberá ser suficiente para evitar el deslizamiento durante el ensayo, pero no demasiado grande como para dañar la probeta. Normalmente no debe ser menor a 430 kPa.

Sistema hidráulico: para aplicar una presión hidráulica controlada en el lado inferior del diafragma hasta que se produzca el estallido de la probeta. No deberá haber burbujas de aire en el sistema hidráulico ni en el líquido utilizado. La velocidad de bombeo deberá ser de 95 ± 15 ml por min.

Manómetro: tipo Bourdon con indicador de lectura máxima de capacidad adecuada o un transductor de presión calibrado y un registrador de presión con una precisión de 0,2 %.

Preparación de las muestras -

Las probetas de ensayo deberán tener un área mayor que la de las mordazas del aparato y ninguna parte cubierta por las mordazas en un ensayo podrá ser incluida en áreas de ensayo subsiguientes. Las probetas no deben incluir áreas que contengan marcas de agua, pliegues, o daño visible. Deben ser acondicionadas a 23 ± 1 °C y 50 ± 2 % de humedad relativa durante 24 horas.

Procedimiento -

Los ensayos se deberán realizar en la atmósfera normalizada, usada para acondicionar las probetas.

Se levanta la mordaza y se coloca la probeta en una posición que permita usar toda la superficie de amordazado. Luego se aplica la mordaza firmemente sobre la probeta aplicando la presión especificada. Se aplica la presión hidráulica a la velocidad establecida hasta que se produzca el estallido de la probeta. Se lee y registra la presión indicada en el manómetro con tres cifras significativas. Se deberán descartar las lecturas cuando haya ocurrido deslizamiento apreciable de la probeta o cuando el tipo de falla indica que la probeta fue dañada por una presión excesiva o por la rotación de las mordazas durante el amordazamiento.

Si la lectura fuera menor a 70 kPa, se ensaya un número mínimo de hojas simultáneamente para obtener una lectura superior a este valor. Las hojas deben estar dispuestas con uno de los lados (por ejemplo, lado fieltro) en contacto con el otro lado

(por ejemplo, lado tela) y las direcciones de máquina paralelas.

Resultados -

La resistencia al estallido P expresada en kPa, está dada por la fórmula siguiente:

$$P = B/N$$

en la cual B es el valor de la presión hidráulica máxima en kPa, N es el número de hojas ensayadas simultáneamente.

Para la determinación en húmedo se preparan las muestras como en seco, luego se sumergen 10 minutos en agua siguiendo el mismo procedimiento que para tracción en húmedo y luego se realiza la determinación de la resistencia al estallido.

Determinación de la resistencia a la tracción en húmedo y en seco

La resistencia a la tracción es la máxima fuerza de tracción por unidad de ancho que puede soportar el papel antes de romperse, bajo las condiciones definidas de ensayo.

La determinación de la resistencia a la tracción en húmedo y en seco es aplicable a papel, papel con recubrimiento adhesivo y tela no tejida con y sin recubrimiento.

Para papel, la resistencia a la tracción en seco no debe ser menor a 4,40 kN por metro en dirección de máquina y no menor a 2,20 kN por metro en dirección cruzada. En húmedo no debe ser menor a 0,90 kN por metro en dirección de máquina y 0,45 kN por metro en dirección cruzada.

Para papel para la fabricación de paquetes para uso médico que deben ser esterilizados con óxido de etileno o radiación y papel con recubrimiento adhesivo: la resistencia a la tracción en seco debe ser no menor a 4,0 kN por metro en dirección de máquina y 2,0 kN por metro en dirección cruzada. En húmedo, 0,80 kN por metro en dirección de máquina y 0,40 kN por metro en dirección cruzada.

Si el proceso al cual será sometido es radiación no se aplica el ensayo en húmedo.

Para tela no tejida sin o con recubrimiento solo se determina en seco y no debe ser menor a 5,0 kN por metro en dirección de máquina y cruzada.

Principio -

El ensayo consiste en estirar hasta su ruptura una probeta de dimensiones normalizadas a una velocidad de aplicación de carga constante, usando un aparato de ensayo de tracción que mida la fuerza y que registre la tracción máxima.

Aparatos -

Equipo para ensayo de tracción: diseñado para estirar una probeta de dimensiones patrones a una velocidad de aplicación de carga constante y para medir la fuerza de tracción. La velocidad de carga deberá ser ajustada de modo de lograr la ruptura de la probeta en 20 ± 5 segundos.

Equipo para medición de fuerza de tracción: con una precisión de ± 1 %.

Mordazas: para sostener las probetas.

Preparación de las muestras para la determinación en seco -

Las muestras se deberán acondicionar a 23 ± 1 °C y 50 ± 2 % de humedad relativa y las probetas se prepararán y ensayarán en las mismas condiciones.

Se preparan las probetas a partir de ejemplares tomados al azar. No deberán ser incluidas en el área de ensayo arrugas, grietas, o marcas de agua y las probetas no deberán incluir partes de la muestra comprendidas a 15 mm del borde de cualquier hoja o bobina.

Las probetas se cortan una por vez, se corta un número suficiente de probetas como para asegurar 10 resultados válidos obtenidos en cada dirección del papel, es decir en dirección de máquina y en dirección transversal. Los bordes largos de la probeta deberán ser perfectamente rectos, paralelos con una tolerancia de $\pm 0,1$ mm y sin rebordes.

Las dimensiones de las probetas deberán ser las siguientes: el ancho deberá ser 15 mm, 25 mm ó 50 mm, con tolerancia de $\pm 0,1$ mm. El largo deberá ser tal, que la probeta pueda ser colocada en las mordazas sin tocar con las manos la sección que va entre las mismas.

Preparación de las muestras para la determinación en húmedo -

Se preparan las muestras y las probetas igual que para la determinación en seco.

Luego se forma un anillo con la probeta, con la porción central hacia arriba y se sumerge la parte inferior del anillo en agua destilada a 23 ± 2 °C. Se mojan las probetas a saturación, normalmente esto significa un tiempo de inmersión de 1 hora. Luego de la inmersión se sacan las probetas del recipiente, levemente embebidos en agua, se les quita el agua en exceso y se las ensaya de igual forma que en seco.

Procedimiento -

Se ajusta el aparato de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Se coloca la probeta en las mordazas, se alinea y ajusta la probeta. Se comienza el ensayo, continuando hasta que se rompa la probeta. Se

registra la máxima fuerza de tracción ejercida y el tiempo en que se llegó a la ruptura, redondeando a 1 segundo.

Se ensayan por lo menos diez probetas, cortadas en cada una de las direcciones del papel. Se registran todas las lecturas, excepto las de aquellas probetas que se rompan a menos de 10 mm de las mordazas.

Resultados -

Se calculan y expresan separadamente los resultados obtenidos en cada una de las direcciones del papel. Se calcula la resistencia a la tracción de las probetas, expresada en kN por metro a partir de la fórmula siguiente:

$$S = F/w$$

en la cual S es la fuerza de tracción en kN por metro, F es la fuerza de tracción promedio, en N, y w es el ancho de la probeta en milímetros.

El resultado se expresa con tres cifras significativas.

Determinación de la resistencia al desgarro o rasgado interno

La resistencia al desgarro es la fuerza necesaria para continuar el desgarro comenzado por un corte inicial, en una única hoja de papel. Si el corte se encuentra en dirección de máquina, o si se encuentra transversal a la dirección de máquina, el resultado se expresa indicando la condición.

La determinación de la resistencia al desgarro o rasgado interno es aplicable a papel, papel con recubrimiento adhesivo, tela no tejida con y sin recubrimiento.

Para papel, la resistencia al desgarro no debe ser menor a 550 mN en dirección de máquina y cruzada.

Para papel para la fabricación de paquetes para uso médico que deben ser esterilizados por óxido de etileno o radiación con y sin recubrimiento, debe ser no menor a 300 mN en ambas direcciones.

Tela no tejida con y sin recubrimiento, no menor a 1.000 mN en ambas direcciones.

Principio -

Una probeta conformada por hojas superpuestas, generalmente cuatro, es rasgada a una distancia fijada, usando un péndulo que aplica la fuerza de desgarro moviéndose en un plano perpendicular al plano inicial de la probeta.

El trabajo realizado al desgarrar la probeta se mide por la pérdida de energía potencial de péndulo. La fuerza de desgarro promedio es indicada por una escala ubicada en el péndulo, o por un indicador digital.

La resistencia al desgarro del papel se determina a partir de la fuerza promedio y de la cantidad de hojas que componen la probeta.

Aparatos -

Se utiliza un aparato para determinar la resistencia al desgarro, tipo Elmendorf, de capacidad adecuada para cumplir los requerimientos de ensayo, y masas crecientes o pendientes intercambiables para aumentar la fuerza en desgarro del aparato.

Medios para preparar la probeta, como por ejemplo, una guillotina.

Muestreo -

La selección de unidades y la toma de muestras deberá ser lo más representativa posible. Las muestras deben acondicionarse a una atmósfera de 23 ± 1 °C y 50 ± 2 % de humedad relativa.

Preparación de las muestras -

Se preparan las probetas en la misma atmósfera de acondicionamiento usada para las muestras. No deberá haber arrugas, pliegues u otros defectos visibles en el área de la que se cortará la probeta y ésta no deberá incluir partes de la muestra que se encuentren a menos de 15 mm del borde de la hoja o bobina.

Si en la probeta se encuentran marcas de agua, este hecho deberá ser establecido en el informe.

Se identifican las dos caras del papel. Con la misma cara hacia arriba, se corta de cada ejemplar de ensayo cuatro hojas rectangulares del mismo tamaño, entre 50 ± 2 mm y 76 ± 2 mm de ancho, con los bordes paralelos a la dirección de ensayo; y de un largo tal que después que se haya hecho el corte inicial, ya sea como parte de la preparación de la probeta o con la cuchilla integrada, el largo sin desgarrar sea $43,0 \pm 0,5$ mm.

Se agrupa las hojas cortadas en conjunto de cuatro para formar la probeta.

Alternativamente se agrupan cuatro ejemplares de ensayo con sus direcciones de máquina paralelas y con las caras colocadas de la misma forma, y se corta la probeta como se indica más arriba. El largo no desgarrado será el especificado más arriba.

Los bordes de la hoja que conformen la probeta deberán estar limpios.

Se corta una cantidad de probetas suficiente como para realizar un mínimo de diez ensayos válidos en cada dirección requerida del papel.

Procedimiento -

Se realizan los ensayos en la misma atmósfera de acondicionamiento utilizada para acondicionar las muestras.

Se ajusta y controla el equipo. Se medirán algunos pocos ensayos para seleccionar el péndulo

apropiado, o la combinación de péndulo-masa creciente a ser usadas. Es conveniente realizar el ajuste de modo que el promedio de las lecturas esté en un rango entre el 20 % y el 80 % del total de la escala de lectura.

Se realiza el ensayo en dirección de máquina y en dirección transversal.

Resultados -

Por cada dirección del papel ensayada se calcula el promedio de las lecturas de escala, y a partir de las siguientes fórmulas, la resistencia al desgarro:

$$F = F_1 p / n$$

en la cual F es la resistencia al desgarro en mN, F_1 es el promedio de las lecturas de escala en mN, p es la cantidad de hojas desgarradas simultáneamente, para la cual ha sido calibrada la escala del péndulo para dar una lectura directa de la resistencia al desgarro en mN y n es la cantidad de hojas desgarradas simultáneamente.

La dirección de desgarro puede desviarse de la dirección del corte inicial. Si la desviación promedio excede 10 mm en una o dos de los diez ensayos, se deberá descartar estos resultados y realizar ensayos posteriores para llevar el número de resultados satisfactorios a los diez requeridos. Si la desviación excede 10 mm en más de dos probetas, se deberá incluir estos resultados y registrar este hecho en el informe.

Si en lugar de desgarrarse de manera normal, el papel de cualquier probeta se delamina, presentando una banda ancha de papel delaminado, se debe aplicar el criterio del párrafo anterior a la línea central de la banda desgarrada a través de las probetas.

Si la resistencia al desgarro del papel, o el péndulo, o la combinación péndulo-masa creciente disponible no permite obtener resultados satisfactorios a partir de probetas hechas con cuatro hojas, se deberá utilizar más hojas y aclararlo en el informe.

Determinación de la repelencia al agua

La determinación de la repelencia al agua es aplicable a papel y papel con recubrimiento adhesivo.

Aparatos -

Fuente de luz ultravioleta, con los mismos requisitos que para determinación de fluorescencia.

Desecador.

Cronómetro.

Dosificador de polvo, con un extremo cerrado y el otro con tamiz con un tamaño de apertura nominal entre 0,125 mm y 0,150 mm.

Placa de petri, de aproximadamente 200 mm × 150 mm × 15 mm.

Termómetro de escala adecuada.

Reactivos -

Polvo indicador seco preparado según se describe a continuación: se muelen 20 g de sacarosa en un mortero y se pasa a través de un tamiz con un tamaño de apertura nominal entre 0,063 mm y 0,075 mm. Se seca la sacarosa tamizada en un desecador sobre silicagel o en una estufa regulada entre 105 °C y 110 °C. Se mezclan 10 g de sacarosa seca con 10 mg de fluoresceína sódica seca y se pasa la mezcla cinco veces por el tamiz de apertura nominal entre 0,063 mm y 0,075 mm. Finalmente, se transfiere el polvo indicador seco al dosificador de polvo. El polvo indicador seco en el dosificador se almacena en un desecador o en una estufa entre 105 °C y 110 °C, hasta su uso.

Procedimiento -

Se toman diez porciones de papel a ensayar, cada una de 60 mm × 60 mm, acondicionado a 23 ± 1 °C y 50 ± 2 % de humedad relativa.

Se separan las muestras en dos grupos de cinco, un grupo sobre una cara y el otro sobre la otra. A cada muestra se le hacen dos dobleces de 10 mm de altura y en ángulo recto a lo largo de los dos lados.

Se llena la placa de petri con agua purificada a la temperatura de acondicionamiento hasta una profundidad de 10 mm. Se enciende la lámpara ultravioleta y se deja estabilizar. Se ajusta la distancia de la lámpara de forma tal que la radiación sobre la superficie del agua sea de 300 ± 20 μ W por cm^2 .

Se esparce el polvo indicador sobre la superficie de la muestra hasta formar una película fina. Se deja flotar la muestra debajo de la lámpara ultravioleta y se observa el tiempo para que aparezca la fluorescencia generalizada. Se repite el procedimiento con las nueve porciones restantes.

La repelencia al agua del papel está influenciada considerablemente por la temperatura del agua, la cual se debe mantener entre los límites especificados, 23 ± 1 °C.

La repelencia al agua del papel y papel con recubrimiento adhesivo debe ser tal, que el tiempo de penetración no sea menor a 20 segundos.

Si el papel será de uso en esterilización por radiación no se aplica esta determinación.

Determinación del tamaño de poro

La determinación del tamaño de poro es aplicable a papel y papel con recubrimiento adhesivo.

Principio -

El método consiste en observar la presión requerida para forzar a las burbujas de aire a pasar por los intersticios (poros) de un material humedecido con un líquido o que tenga una película del mismo líquido aplicada en la parte superior de su superficie. La presión junto con la tensión superficial conocida del líquido son usadas para establecer el tamaño de los intersticios del material (poros).

Líquido de ensayo -

El líquido de ensayo debe permitir que el papel sea humedecido completamente, que tenga un bajo poder solvente de los materiales de ensayo, que no produzca hinchazón de las fibras, que tenga una tensión superficial constante, que no sea tóxico, con bajo nivel de inflamabilidad, exento de espuma y de costo moderado. Un líquido que reúne estas condiciones es el etanol.

Aparatos -

El equipo requerido para el ensayo se muestra en la *Figura 1*, y consta de las siguientes partes:

- 1) cabezal de ensayo (1) que consta de: un recipiente cilíndrico de un material apropiado (ejemplo bronce) sobre el cual la muestra "a" se pueda sujetar con un anillo o abrazadera "b" y un tornillo "c". El vaso se ajusta con un empaque de caucho sintético "d" de diámetro interno 50 mm para sellar la muestra.
- 2) Manómetro
- 3) Válvula de corte que sirve para dirigir el aire al cabezal de ensayo.
- 4) Una válvula reguladora de presión.
- 5) Una válvula de corte que dirige el aire al manómetro.
- 6) Depósito de aire de 2,5 litros de capacidad conectado a "1". Esto garantiza que la velocidad de flujo de aire, necesaria para mantener la elevación de la presión requerida, sea tal que la pérdida de aire a través del material, cuando comienza el burbujeo, no disminuya la velocidad de elevación de la presión.
- 7) Suministro de aire.

Usando el equipo representado en la *Figura 1*, se realiza el ensayo de la siguiente manera:

Se abren el suministro de aire y la válvula "3" para dirigir el aire al cabezal a través del recipiente "6" al mismo tiempo se ajusta la válvula "4" para graduar el gradiente de presión requerido. Se mantiene abierta la válvula "5" durante el ensayo. Cuando aparezcan las primeras burbujas en el

material que se está ensayando, se cierra “5” para permitir la lectura de presión en el manómetro “2”.

El equipo para la medición del tamaño de poro equivalente tendrá las siguientes características:

a) debe disponer de los medios adecuados para sujetar la muestra del material de forma que:

- esté horizontal.
- un área circular del material de 50 mm de diámetro será sometida a un incremento constante de presión por la cara inferior del material.
- que no haya fugas del líquido de ensayo.
- que la muestra no se desprenda de las abrazaderas.

b) La tasa de incremento de la presión de aire debe ser de 2,0 kPa por minuto a 2,5 kPa por minuto (220 mm a 250 mm de agua por minuto).

c) el manómetro conectado al cabezal de ensayo debe estar calibrado en kPa (o en mm de agua).

d) El manómetro debe tener un rango adecuado de medición de la presión.

[NOTA 1: las abrazaderas deben estar recubiertas con un material elástico que sea resistente al líquido de ensayo como por ejemplo caucho sintético.]

[NOTA 2: para la mayoría de los materiales se considera apropiado un manómetro que suministre una presión de hasta 6 kPa. Los equipos hasta 10 kPa se recomiendan para mediciones sobre materiales muy cerrados como por ejemplo indumentaria para áreas limpias, campos quirúrgicos.]

Preparación de las muestras -

Después de su recepción se debe manipular el material muy poco, no doblarlo, plancharlo ni someterlo a algún tratamiento diferente al acondicionamiento. Se deben cortar muestras del material de una forma adecuada para su manipulación y sujeción.

Se deben tomar las muestras de diferentes lugares del material evitando los pliegues, de forma que las muestras sean representativas de todo el material. Se recomienda cortar muestras del material de un tamaño de 75 mm × 75 mm.

A menos que se estipule lo contrario, se deben emplear diez especímenes de la muestra del material.

Procedimiento:

1) se realiza el ensayo en condiciones ambientales estandarizadas especificadas, 23 ± 1 °C y 50 ± 2 % de humedad relativa.

2) Se determina la tensión superficial del líquido de ensayo con algún

método apropiado con una precisión de 0,5 mN por metro.

3) Se sumergen aproximadamente 15 mm de la muestra dentro del líquido de ensayo en una placa de petri durante 3 minutos. Se retira la muestra con pinzas y se coloca en el cabezal de ensayo. Se vierten unos pocos ml del líquido de ensayo sobre la superficie del material en cantidad suficiente para cubrirlo completamente antes de someterlo a la presión de prueba. Se registra la temperatura del líquido de ensayo.

[NOTA: el material muy abierto se puede analizar más fácilmente si se permite que la presión del aire aumente sobre la parte posterior de la muestra antes de verter el líquido de ensayo para cubrir completamente la superficie del material.]

4) Después de aumentar la presión del aire aparecen burbujas en diferentes sitios sobre la parte superior de la superficie; se observa ésta permanentemente mientras se incrementa la presión. En el momento en que aparece la primera burbuja se registra el valor de la presión expresada en mm de columna de agua.

5) Se ensayan los demás especímenes hasta obtener el número de resultados requerido.

Resultados -

Cálculo y expresión de los resultados: se calcula el radio del poro R equivalente, en μm , de cada muestra por medio de la siguiente fórmula:

$$R = 20T/D.P.G$$

o la fórmula simplificada:

$$R = 204T/P$$

en la cual T es la tensión superficial del líquido de ensayo a la temperatura de análisis expresada en mN por metro; G es la aceleración de la gravedad en mm por s^2 ; D es la densidad del agua a la temperatura de ensayo, en mg por mm^3 y P es la presión de la burbuja, expresada en mm de agua.

Se calcula el radio promedio del poro y se expresa el resultado como diámetro del poro.

[NOTA 1: el error introducido al tomar D igual a 1 mg por mm^3 para la densidad relativa del agua a la temperatura de la atmósfera normalizada es pequeño comparado con la variabilidad de los resultados del ensayo.]

[NOTA 2: de forma similar, aunque se sabe que G varía alrededor del 0,5 % de lugar a lugar, el

error introducido al asumir un valor constante de 9.810 mm por s², es pequeño comparado con la variabilidad del ensayo.]

Desarrollo de la fórmula para el cálculo del radio del poro equivalente: para un tubo cilíndrico, la presión P expresada en Pascales, necesaria para forzar el líquido a través de él, está dada por la fórmula siguiente:

$$P = 2T\cos Q/R$$

en la cual T es la tensión superficial del líquido en N por metro; Q es ángulo de contacto en la interfase líquido-sólido-aire, expresado en grados; y R es el radio del tubo, en metros.

El ángulo de contacto es muy difícil de medir y por lo tanto se escoge un líquido que humedece completamente el material, por lo tanto el valor del $\cos Q$ sea 1 y la ecuación se convierte en la siguiente expresión:

$$P = 2T/R$$

Esta ecuación es la misma que la ecuación simplificada mencionada para la expresión del radio del poro.

La presión se mide normalmente en mm de columna de agua, debido a que se emplea un manómetro de agua o a que el manómetro ha sido calibrado en mm de columna de agua. Por lo tanto:

$$P = Pb.D.G$$

en la cual Pb es la presión equivalente a la columna de agua, en mm de columna de agua; D es la densidad del agua, en mg por mm³; G es la aceleración debida a la gravedad, en mm por s².

Para papel, el diámetro máximo equivalente al tamaño de poro no debe ser mayor a 50 micrones con un valor medio de 35 micrones.

Para papeles que se usarán para esterilización por óxido de etileno y radiación, con y sin recubrimiento adhesivo, el promedio de los diámetros de poro, debe ser menor o igual a 20 micrones y ninguno de los valores obtenidos debe ser mayor a 30 micrones.

Determinación de la permeabilidad al aire

La permeabilidad al aire está definida como el flujo medio de aire que pasa a través de una unidad de área sometida a una unidad de diferencia de presión, en una unidad de tiempo, en condiciones específicas. Utilizando el principio de medida conocido como GURLEY

La determinación de la permeabilidad al aire es aplicable a papel, papel con recubrimiento y tela no tejida con o sin recubrimiento.

Para papel no debe ser menor de 3,4 $\mu\text{m}/\text{Pa.s}$ con una presión de aire de 1,47 kPa.

Papel para ser utilizado en esterilización por óxido de etileno y radiación con y sin recubrimiento adhesivo, no debe ser menor de 0,2 $\mu\text{m}/\text{Pa.s}$ y no mayor de 6,0 $\mu\text{m}/\text{Pa.s}$

Para tela no tejida sin recubrimiento: no debe ser menor a 1 $\mu\text{m}/\text{Pa.s}$ con una presión de aire de 1,47 kPa.

Para tela no tejida con recubrimiento no debe ser menor a 0,3 $\mu\text{m}/\text{Pa.s}$ con una presión de 1,47 kPa.

Principio -

La presión de aire es ejercida por el peso de un cilindro vertical flotando en un líquido.

La probeta del material a ensayar está en contacto con el aire comprimido y el cilindro baja de manera uniforme mientras el aire pasa a través de la probeta. A partir de él se calcula la permeabilidad al aire del material de la probeta.

Aparatos -

Aparato de medida de resistencia al aire tipo GURLEY

Preparación de la muestra -

El material es acondicionado en condiciones ambientales estandarizadas especificadas, 23 ± 1 °C y 50 ± 2 % de humedad relativa.

El muestreo se realiza del modo más representativo posible

Cuando el aparato a utilizar posee las mordazas de fijación en la parte superior del cilindro interior, el tamaño de las probetas conveniente es 50 mm \times 120 mm. Para el aparato que tiene el sistema de fijación en la base, el tamaño de las probetas apropiado es 50 mm \times 50 mm.

Procedimiento -

Se ensayan cinco probetas con una cara hacia arriba y las otras cinco probetas con la otra cara hacia arriba.

El ensayo se realiza en las mismas condiciones atmosféricas que las utilizadas para el acondicionamiento de las muestras.

Se coloca el aparato sobre una superficie horizontal para que los cilindros queden verticales. El cilindro exterior debe estar lleno de aceite hasta una altura de 120 mm.

Cuando el aparato tiene la fijación en la base, se eleva el cilindro interior hasta que su borde quede sujeto por la presilla, se fija la probeta entre las mordazas, se suelta la presilla y se baja el cilindro interior hasta que flote.

Para el aparato que tiene la fijación en la parte superior, se eleva el cilindro interior con una mano, se fija la probeta con la otra mano y luego se baja el cilindro interior y se lo deja flotar en el aceite.

Se mide el tiempo en segundos que tarda el borde del cilindro exterior en enfrentar las marcas de los dos primeros intervalos consecutivos de 50 ml a partir del punto cero; o sea que se mide el tiempo necesario para el pasaje de 100 ml de aire, con la siguiente precisión:

- menor o igual a 60 segundos, se redondea a 0,2 segundos;
- entre 61 y 180 segundos, se redondea a 1 segundos;
- mayor a 180 segundos, se redondea a 5 segundos.

En el caso de papeles relativamente impermeables, la lectura puede tomarse al final del primer intervalo de 50 ml.

Para papeles muy abiertos puede cronometrarse el tiempo a mayor volumen de aire.

Resultados -

Se calcula la permeabilidad al aire con dos cifras significativas a partir de la fórmula siguiente:

$$P = 127/t$$

en la cual P es la permeabilidad al aire en, $\mu\text{m}/\text{Pa}\cdot\text{seg}$, y t es el tiempo promedio necesario para el pasaje de 100 ml de aire, en segundos. Si se utiliza un volumen distinto a 100 ml, la fórmula será:

$$P = 1,27V/t$$

en la cual V es el volumen cuyo tiempo de pasaje se cronometró, en ml, y los otros términos son los definidos anteriormente.

Si se necesita la desviación estándar, se calcula a partir de las medidas duplicadas del tiempo y se corrige utilizando la fórmula siguiente:

$$P = 127/t$$

Si la resistencia medida al aire es significativamente diferente en las dos caras y se requiere reflejarlo en el informe, se ensayarán diez muestras de cada cara.

Determinación de la absorción superficial de agua (Método de Cobb)

La determinación de la absorción superficial es aplicable a papel con y sin recubrimiento adhesivo.

La absorción superficial de agua es la masa calculada de agua, absorbida por 1 m^2 de papel, en un tiempo especificado.

La absorción superficial de cada uno de los lados del papel, papel para óxido de etileno y radiación con y sin recubrimiento, no debe ser mayor a 20 g por m^2 , empleando un tiempo de exposición de 60 segundos.

Reactivos y aparatos -

- Agua destilada o desionizada a $23 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$.
- Papel secante con gramaje de $250 \pm 25\text{ g}$ por m^2 .
- Medidor de absorción de agua. Puede utilizarse cualquier tipo de aparato que permita:
 - a) un contacto inmediato y uniforme del agua con la parte de la probeta sujeta a ensayo.
 - b) una remoción rápida y controlada del agua no absorbida por la probeta al final del periodo de contacto.
 - c) una remoción rápida de la probeta sin riesgo de contacto con agua fuera del área de ensayo.

El aparato consiste en una base rígida con una superficie plana lisa y un cilindro de metal rígido con un diámetro interno de $112,8 \pm 0,2\text{ mm}$ (correspondiente a un área de ensayo de aproximadamente 100 cm^2) y con un medio que permita el ajuste firme a la placa base. El borde del cilindro en contacto con la probeta debe ser plano y alisado, con un espesor suficiente como para evitar que corte la probeta.

- Rodillo de metal, con una superficie lisa, de 200 mm de ancho, un diámetro de $90 \pm 10\text{ mm}$ y una masa de $10 \pm 0,5\text{ kg}$.
- Balanza con una precisión de 1 mg.
- Cronómetro graduado en segundos, capaz de realizar medidas de hasta por lo menos 30 minutos.
- Cilindro graduado, u otros medios para medir alícuotas apropiadas.

Preparación de la muestra -

Las muestras deben ser representativas y previamente acondicionadas a $23 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ y $50 \pm 2\%$ de humedad relativa.

Se preparan las probetas de ensayo en las mismas condiciones atmosféricas en las que se prepararon las muestras. Se debe evitar tocar el área de ensayo con las manos o los dedos. Se cortan de los ejemplares de ensayo por lo menos diez probetas de un tamaño suficiente como para exceder el diámetro del cilindro en por lo menos 10 mm, cuidando que el área de ensayo no tenga dobleces, quiebres, hendiduras u otros defectos.

Procedimiento -

El ensayo se realiza en las mismas condiciones atmosféricas en las que se acondicionaron las muestras.

Se pesa la probeta redondeando a 1 mg y se coloca con la superficie a ser ensayada hacia arriba sobre la placa base. Se coloca el cilindro con el borde alisado en contacto con la probeta y se lo ajusta lo suficientemente firme para evitar que se escape el agua entre ambos. Se vierte dentro del cilindro $100 \pm 5\text{ ml}$ de agua e inmediatamente se activa el cronómetro. A los 45 ± 1 segundos,

teniendo cuidado que el agua no entre en contacto con la superficie de la probeta fuera del área de ensayo se quita el exceso de agua. Se quita la probeta del cilindro y se coloca, con la cara de ensayo hacia arriba, sobre una hoja de papel secante previamente colocada sobre una superficie rígida plana.

Luego de 60 ± 2 segundos después de haber iniciado el ensayo, se coloca una segunda hoja de papel secante sobre la superficie de la probeta y se quita el exceso de agua, usando el rodillo de mano, con dos pasadas sin ejercer presión alguna sobre el rodillo.

Inmediatamente después del secado se dobla la probeta con el lado húmedo hacia adentro y se pesa nuevamente, de modo que el incremento en masa debido a la absorción de agua pueda ser determinado antes de que se produzca cualquier pérdida por evaporación.

Las probetas deben descartarse si el agua pasó a través de la misma, o muestra señales de pérdidas alrededor del área ajustada, o muestra exceso de agua después del secado.

Resultados -

Se calcula la absorción de agua A , expresada en gramos por metro cuadrado, con una cifra decimal para cada probeta, por la fórmula siguiente:

$$A = (m_2 - m_1)F$$

en la cual A es la absorción de agua en g por m^2 , m_1 es la masa seca en g de la probeta, m_2 es la masa húmeda en g de la probeta, F es igual a $10.000/\text{área}$ de ensayo (para aparatos normales esto es 100 cm^2).

Para cada lado ensayado se calcula la absorción de agua promedio redondeando a $0,5 \text{ g por } m^2$ y la desviación estándar.

Determinación de la impermeabilidad o ausencia de poros en film y laminados plásticos

Aparatos y reactivos -

1- esponja normal, hecha de un bloque de esponja de celulosa con unas dimensiones nominales de $110 \text{ mm} \times 75 \text{ mm} \times 32 \text{ mm}$ unida con adhesivo a prueba de agua a una placa metálica de $110 \text{ mm} \times 75 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$ de modo que la masa total es 800 ± 50 gramos.

2- Bandeja, no menor de 15 mm de profundidad y dimensiones mínimas de $130 \text{ mm} \times 95 \text{ mm}$.

3- Papel absorbente, blanco, filtro de absorción media o media rápida o papel de cromatografía.

4- Superficie de vidrio plano.

5- Solución acuosa de tinción, 1 g por 100 ml de rojo amaranto que contenga 0,005 % de cetrimida como agente humectante.

Preparación de las muestras -

Se toman cinco bolsas mixtas (pouch) o tramos de rollo no menor a 250 mm de largo y se remueve la capa de plástico identificando la cara externa para determinación en laminados plásticos. Se toman cinco envases flexibles plásticos para el caso de film plásticos de la misma medida.

Procedimiento -

Se coloca un pedazo de papel absorbente de tamaño similar a la muestra sobre el vidrio plano y se coloca la cara interna de la película a ser ensayada en contacto con el papel absorbente.

[NOTA: para bolsas mixtas o rollos con fuelle, el ensayo debe ser realizado sobre una sola capa de lámina plástica incluyendo el área que se encuentra doblada.]

Se vierte la tinta en la bandeja y se coloca la esponja en la bandeja por un minuto. Se retira la esponja removiendo el exceso de tinta con el borde de la bandeja.

Se coloca la esponja sobre la muestra asegurándose que la esponja no esté a menos de 15 mm del borde y se deja por 2 minutos. Se retira la esponja y se examina el papel absorbente buscando manchas causadas por la penetración de la tinta. Se repite el procedimiento para el resto de las muestras.

Se informa el número de muestras que permitieron que se manchara con la tinta el papel absorbente.

La película plástica debe estar libre de perforaciones.

Determinación del factor de rompimiento de la película plástica:

El factor de rompimiento de la película plástica no debe ser menor de 20 Newtons por 15 mm de ancho.

Principio -

El ensayo consiste en estirar hasta la ruptura una probeta normalizada de película plástica a una determinada velocidad de ensayo, utilizando un aparato de ensayo de tracción que mida fuerza.

Aparatos -

Equipo para ensayo de tracción que se adapte a las características de las probetas y las condiciones de ensayo.

Preparación de las muestras -

Las muestras deben ser acondicionadas a 23 ± 2 °C y 50 ± 5 % de humedad relativa por no menos de 40 horas previas al ensayo.

El número de muestras a ensayar será de cinco en el caso de materiales isotrópicos. Para materiales anisotrópicos, se utilizará un mínimo de diez muestras, cinco para dirección normal y cinco en dirección de la anisotropía.

Las muestras consisten en tiras de ancho y espesor uniforme, con un mínimo de 50 mm más largas que la mordaza de separación utilizada. El ancho de las tiras no debe ser menor que 5,0 mm ni mayor a 25,4 mm.

Se debe tener especial atención al corte de las tiras para prevenir marcas y roturas dentro de lo posible que pueden causar falla prematura.

La variación de espesor de las tiras puede ser del 10 % para materiales de 0,25 mm de espesor o menos y dentro del 5 % en el caso de materiales con espesor mayor a 0,25 mm pero menor que 1,00 mm.

La longitud estándar de las tiras será de 250 mm.

Procedimiento -

Se mide el área de sección transversal de la muestra a varios puntos a lo largo de su longitud. Se mide el ancho con una exactitud de 0,25 mm o mayor. Se mide el espesor con una exactitud de 0,0025 mm o mayor para films menores que 0,25 mm de espesor y con una exactitud de 1 % o mayor para films mayores a 0,25 mm pero menores que 1,0 mm de espesor.

Se coloca la probeta muestra entre las mordazas. Se selecciona un rango de carga tal que la falla en la muestra ocurra por encima de los dos tercios. La separación inicial de las mordazas dependerá del porcentaje de elongación que tenga el material. Se especifica en *Tabla 1*.

La velocidad de ensayo debe ser calculada desde el requerimiento inicial de tensión como se indica en *Tabla 1*.

La tasa de separación de las mordazas puede calcularse como:

$$A = B.C$$

en la cual *A* es la tasa de separación de las mordazas en mm por minuto, *B* es la distancia inicial entre las mordazas en mm, y *C* es la tensión inicial en mm/mm.min.

Se mide la máxima fuerza aplicada que rompió la película.

Resultado -

El factor de rompimiento se calculado dividiendo la máxima fuerza por el ancho mínimo de la muestra. Los resultados se expresan en fuerza

por unidad de extensión en ancho, usualmente N/15 mm de ancho.

Determinación de la resistencia a la delaminación de las láminas plásticas en bolsas mixtas

El ensayo es aplicable a todos los envases mixtos.

Preparación de las muestras -

Se toman diez bolsas mixtas y se llenan hasta la mitad con gasa de algodón.

Procedimiento -

Se sellan las muestras de acuerdo a las recomendaciones del fabricante con una selladora de calor.

Se colocan las muestras en un esterilizador. El ciclo de operación debe ser ajustado a los límites definidos por el fabricante para el material de empaque y los parámetros validados del ciclo operativo.

Se lleva a cabo el ciclo, se retiran y examinan las muestras visualmente.

Resultados -

Se reporta el número de muestras que han estallado y el número de láminas de plástico en las cuales se presenta desprendimiento de las capas o se opacan.

El envase no debe estallar y la lámina plástica no debe delaminarse ni opacarse.

ENSAYOS FUNCIONALES PARA ENVASADO FINAL

Determinación de la pelabilidad en los productos papel/laminado plástico

Equipos

Regla graduada en intervalos de 0,5 mm.

Procedimiento -

Lenta y cuidadosamente se despega el termosellado con las manos. Visualmente se revisa que el termosellado se extienda a lo largo de todo el ancho y largo de las líneas de sellado y que no haya un desprendimiento de papel mayor a 10 mm desde las líneas de sellado.

Cuando el termosellado se desprende generalmente se muestra una apariencia mate donde el sellado se llevó a cabo, pero la apariencia brillante se conserva donde no hubo un sellado satisfactorio.

Se mide el ancho del termosellado en la cara interna del plástico en cinco partes diferentes.

Resultados -

Se reporta el promedio y anchos mínimos del termosellado (con aproximación a 0,5 mm) y cualquier tipo de imperfección en la línea de sellado o desprendimiento del papel mayor a 10 mm del borde del sellado.

El sello debe cubrir el ancho total y el largo total de las líneas individuales del termosellado y no debe haber rasgado de papel más de 10 mm desde el borde de la línea de termosellado.

Determinación de la resistencia de la línea de termosellado para bolsas mixtas

Aparatos -

a- Esterilizador, conforme al proceso validado.

b- Medidor de tensión con una tasa de separación continua, con una variación de ± 10 mm por minuto que permita determinar la resistencia a la tensión al momento de falla con una precisión de ± 1 %.

Preparación de las muestras -

a- Seco: se cortan cinco tiras de $15 \pm 0,1$ mm de ancho y con un largo suficiente para usar el equipo con la bolsa mixta a ensayar, a ángulo recto o perpendicular a la línea de sellado, quedando ésta aproximadamente en el centro de la tira.

b- Seco-esterilizado: se corre el ciclo de esterilización y se preparan cinco tiras como está indicado en *a*.

c- Húmedo: se preparan cinco tiras como en *a*. Inmediatamente antes de ensayar la muestra se sumerge la parte central en agua purificada a 23 ± 2 °C con la línea de sellado al centro de la sección húmeda. Después de un minuto de inmersión se retira la tira, se remueven los excesos de agua con un trozo de papel absorbente y se ensaya.

d- Húmedo esterilizado: se corre el ciclo de esterilización y se preparan las muestras de acuerdo a *c*.

Procedimiento -

Se sujeta la punta de la lámina de plástico en una de las pinzas de la máquina y la otra punta de papel en la otra pinza dejando un pequeño margen desde la punta. Se despega el sello a una tasa de separación de 200 ± 10 mm por minuto y se registra la fuerza máxima.

Resultados -

Se reporta la resistencia del termosellado de cada muestra en Newtons por 15 mm de ancho.

La resistencia del termosellado con muestra seca no debe ser menor a 1,5 N por 15 mm de ancho, antes y después de someterse al proceso de esterilización.

La resistencia del termosellado con muestras húmedas no debe ser menor a 1,2 N por 15 mm de ancho, antes y después de someterlo al proceso de esterilización.

Determinación de fugas por emisión de burbujas

Este método cubre la determinación completa de fugas en envases flexibles no porosos conteniendo headspace (espacio libre superior).

La sensibilidad es limitada a 1.10^{-5} atm.cm³/s (1.10^{-6} Pa.m³/s).

Pequeñas fugas pueden no ser detectadas por este método. Los efectos visco-elásticos de los productos, o el aire atrapado, puede ser significativo y ocluir pequeñas aberturas.

La presión positiva dentro del envase después del vacío puede forzar a tapar pequeñas fugas. El tamaño de la fuga que puede ser detectado es dependiente del producto que contiene, de la naturaleza del material de envase y de los parámetros seleccionados del ensayo.

Aparatos -

Cámara de vacío: contenedor transparente capaz de resistir aproximadamente 1 atm de presión diferencial, adecuada con una tapa ajustada. Manómetro para vacío, un tubo de entrada de la fuente de vacío y un tubo de salida a la atmósfera que puede conectarse con la tapa de la cámara. Los tubos de entrada y salida pueden ser equipados con válvulas manuales. Adjunto a la parte inferior de la tapa, un plato con las dimensiones aproximadas de la cámara.

Reactivos -

Fluido de inmersión: se debe usar un fluido de inmersión que no degrade el envase a ensayar. Fluidos con baja tensión superficial son más sensibles, como por ejemplo, agua, agua tratada con un agente humectante, alcohol desnaturalizado, aceite mineral.

Muestras -

El número de muestras a usar puede ser variable acorde con la naturaleza del producto, el costo, el tamaño, y el tamaño del lote de producción. El envase puede estar con o sin contenido.

Las muestras y el fluido deben estar en equilibrio con la temperatura ambiente.

Procedimiento -

1- Sumergir la muestra en el fluido contenido en la cámara. La superficie

superior de la muestra debe estar cubierta por no menos de 25 mm de fluido. Una o más muestras pequeñas pueden ensayarse al mismo tiempo, siempre que todas las partes de los envases bajo ensayo puedan ser observados.

2- Colocar la tapa a la cámara de vacío, cerrar la válvula de salida, aplicar vacío lentamente (1 inHg/s) hasta el nivel de vacío seleccionado. El nivel de vacío elegido debe ser lo más largo posible para asegurar óptima sensibilidad del ensayo. El factor límite puede incluir la fragilidad del envase, el grado de expansión del envase y la presión de vapor del fluido.

3- Durante el aumento del vacío, observar la muestra sumergida por fugas, en forma de progresión continua de burbujas del envase. Burbujas aisladas causadas por aire atrapado no son consideradas. Además considerar el incremento aproximado del volumen del envase. La presión diferencial del ensayo está inversamente relacionada con el aumento de volumen en la muestra; por lo tanto un incremento significativo del volumen disminuye o desmerece la severidad del ensayo. Envases flexibles con una pequeña cabeza o espacio libre no pueden ser realmente evaluados por este método.

4- El vacío debe ser sostenido por un espacio de tiempo especificado [NOTA: 30 segundos es lo recomendado.]

5- Liberar el vacío, remover la tapa y examinar la muestra para ver presencia de fluido dentro del envase.

Interpretación de resultados -

1- Si hay burbujas definidas durante la aplicación de vacío se considera que la muestra falló el ensayo.

2- Si hay fluido dentro del envase, falló el ensayo.

3- Si no hay burbujas y no hay fluido dentro del envase, la muestra pasó el ensayo.

Determinación de fugas en el sellado por penetración de colorante

El método de determinación de fugas por medio de penetración de colorante detecta una fuga igual o mayor a la producida por un canal de 50 micrones en la unión del sellado de un envase formado por un film transparente y un material de papel poroso.

El método se encuentra limitado a materiales porosos que pueden retener la solución colorante y prevenir la decoloración del área de sellado por un mínimo de 20 segundos. Papeles no recubiertos son especialmente susceptibles a fugas y deben ser evaluados cuidadosamente de un lado y otro. El método requiere que la solución colorante tenga buen contraste con el color original del envase.

Este procedimiento de penetración de colorante es aplicable solo para fugas individuales en el sellado del envase.

Aparatos y reactivos -

Dispositivo para aplicación del colorante dentro del envase que puede ser una jeringa con aguja.

Microscopio o lente óptico con una resolución de 5X a 20X.

Solución de colorante: solución acuosa con 0,5 % de Tritón X-100 y 0,05 % de azul de tolueno. La solución se prepara agregando a un recipiente apropiado el 10 % de la cantidad de agua requerida; luego se agrega el Tritón y se bate la mezcla. Una vez que el Tritón se dispersa, el remanente de agua puede ser volcado y se agrega la tintura de azul de tolueno. Otro colorante o tintura fluorescente puede utilizarse pero su precisión debe ser determinada.

Muestras -

Las muestras de envases a las cuales se determinará fuga, deberán contener producto dentro. Los envases deben estar libres de condensaciones o de cualquier otra forma de agua líquida. La existencia de agua en la parte defectuosa del sellado puede volver la fuga indetectable por este método. Las muestras deben ser acondicionadas antes del ensayo a 23 ± 2 °C y 50 ± 2 % de humedad relativa por 24 horas.

Procedimiento -

Limpiar el envase previo a la aplicación del colorante. Inyectar suficiente colorante para cubrir la longitud de la unión a una profundidad de 5 mm. Permitir a la solución tomar contacto con el sellado por un tiempo mínimo de 5 segundos y un tiempo máximo de 20 segundos. Las fallas serán detectadas durante este periodo, pero más allá de este tiempo, la solución colorante ingresará al material poroso y dará color a la totalidad del sellado.

Girar el envase lo necesario como para exponer todo el sellado a la solución colorante. Inyectar si es necesario más colorante para asegurar la completa exposición del sellado.

Examinar con lente óptico el área de sellado a través del lado transparente del sellado.

Las fallas en el sellado serán detectadas porque el colorante ingresará rápidamente al área adyacente

a la falla, haciendo una mancha más grande que el tamaño de ésta.

La evidencia de penetración de colorante al otro lado del sellado o en el interior de éste debe ser tomada como indicador de presencia de un sitio de fuga.

La evidencia de penetración de colorante a través del material poroso formando un área húmeda no debe ser tomada como presencia de un sitio de fuga.

Este método no es cuantitativo. Del ensayo no se desprenden indicadores del tamaño de la fuga.

Ensayo de envejecimiento acelerado de envases de productos médicos estériles

El ensayo de envejecimiento acelerado permite determinar en forma rápida los efectos del pasaje del tiempo y efectos ambientales sobre la integridad de envases estériles y las propiedades físicas de sus materiales constitutivos relacionadas con la seguridad y función del material de empaque.

El ensayo se basa en la suposición de que las reacciones químicas involucradas en el deterioro de los materiales y sus propiedades siguen la función de Arrhenius. Esta función manifiesta que un aumento o disminución de 10 °C en la temperatura de un proceso homogéneo resulta en cambios de aproximadamente 2 a 2,5 tiempos en la velocidad de reacción química Q_{10} .

Aparatos -

Estufa o gabinete con circulación de aire a la temperatura y humedad relativa seleccionados para el ensayo, con controladores capaces de mantener los parámetros seleccionados y con los límites de tolerancia propuestos.

Preparación de las muestras -

Previo a la determinación del ensayo se deberá realizar la caracterización de los materiales de envases a ensayar como:

- morfología (vítrea, amorfa, semicristalina, altamente cristalina, porcentaje de cristalinidad, etc.).
- transiciones térmicas: T_m (temperatura de fusión); T_g (temperatura de transición vítrea); T_a (temperatura de distorsión por calor).
- Aditivos, agentes ayuda proceso, catalizadores, etc.

La caracterización del material de empaque establecerá los límites de temperatura de ensayo a utilizar.

Las muestras deberán ser sometidas al proceso de esterilización validado al que se someterá normalmente el empaque.

El número de muestras a utilizar deberá ser representativo del lote de producción. Se recomienda como mínimo un número de 5 muestras para cada tiempo ensayado.

Procedimiento -

1- Selección de la temperatura de ensayo: la temperatura de ensayo se selecciona teniendo en cuenta las características del material. Altas temperaturas no son recomendables, porque si bien acortan los tiempos de envejecimiento acelerado, pueden tener un efecto sobre el material que no ocurre en tiempo real o a temperatura ambiente y, a temperaturas mayores a 60 °C los cambios en los sistemas poliméricos no son lineales. Las temperaturas deben estar por debajo de las que produzcan transiciones térmicas en el material como por ejemplo menor de 10 °C de su T_g .

2- Determinación del Factor de envejecimiento acelerado (F_{EA}). Es el índice de tiempo calculado para producir los mismos cambios en el envase que en tiempo real.

$$F_{EA} = Q_{10}^{(T_{EA} - T_{TR}) / 10}$$

en la cual T_{EA} es la temperatura a la cual se realizará el ensayo de envejecimiento; y T_{TR} es la temperatura que representa las condiciones de almacenamiento real. El valor de Q_{10} para estos ensayos se estandariza en 2.

3- Se determina el t_{EA} (tiempo de ensayo para el envejecimiento acelerado) como:

$$t_{EA} = \text{tiempo real o deseado} / F_{EA}$$

Se determinan además los intervalos de tiempo a usar para realizar los ensayos, además del tiempo cero y el tiempo de envejecimiento acelerado.

4- Se definen las propiedades del material a ensayar a los distintos tiempos, utilizándose el ensayo de integridad y el ensayo de resistencia física tales como la resistencia de sellado, la integridad de sello, la resistencia a la tracción, la resistencia al desgarro, la resistencia al impacto, etc. Se definen las cantidades de muestras a evaluar y los criterios de aceptación de acuerdo a la propiedad a evaluar. Las propiedades seleccionadas del envase a evaluar serán aquellas que resulten las más críticas para el

envejecimiento, resultante del stress del tiempo.

5- Se realiza el ensayo sometiendo las muestras luego del proceso de esterilización a la estufa con la temperatura de ensayo determinada.

6- Se evalúan las propiedades del material a los tiempos establecidos del ensayo.

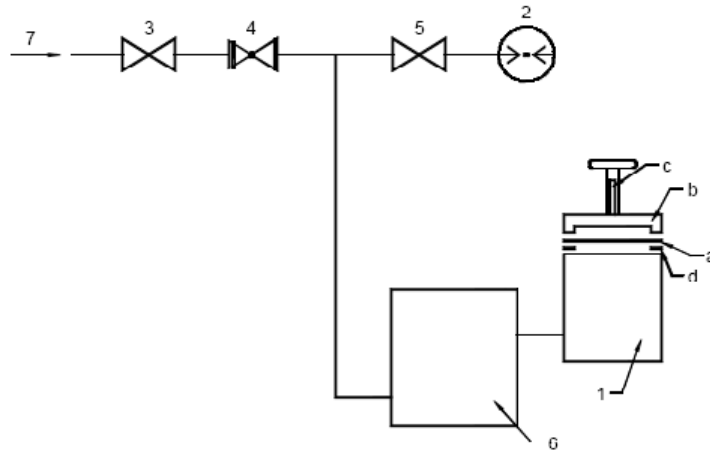
Resultados:

- a) Si los resultados del ensayo de envejecimiento acelerado se encuentran dentro de los límites de aceptación, entonces la durabilidad del envase puede asumirse al tiempo real presumido para el ensayo.
- b) Si los resultados del ensayo de envejecimiento acelerado no se encuentran dentro de los límites de aceptación, se debe evaluar una durabilidad menor o a tiempo real.
- c) Los resultados del ensayo siempre deben comprobarse a tiempo real para considerar validada la fecha de caducidad.

Tabla 1 - Determinación del factor de rompimiento de la película plástica

<i>% de elongación a la rotura</i>	<i>Tasa de tensión inicial (mm/mm.min)</i>	<i>Separación inicial de mordazas (mm)</i>	<i>Tasa de separación de mordazas (mm/min)</i>
menor que 20	0.1	125	12.5
entre 20 y 100	0.5	100	50
mayor que 100	10.0	50	500

Figura 1 – Equipo para la determinación del tamaño de poro



1-Cabezal de ensayo.

2-manómetro.

3-válvula de corte.

4-válvulas reguladoras de presión.

5-válvula de corte.

6-depósito de aire.

7-suministro de aire.

a- muestra

b- abrazadera

c- tornillo

d- empaque de caucho.

475. ESTERILIZACIÓN

Se denomina esterilización al proceso validado por medio del cual se obtiene un producto libre de microorganismos viables. El proceso de esterilización debe ser diseñado, validado y llevado a cabo de modo de asegurar que es capaz de eliminar la carga microbiana del producto o un desafío más resistente.

Dado que la esterilidad no puede demostrarse de manera absoluta sin causar la destrucción completa de todas las unidades del lote de producto terminado, se define la esterilidad en términos probabilísticos, en donde la probabilidad de que una unidad de producto esté contaminada es aceptablemente remota. Se considera que un producto crítico es estéril cuando la probabilidad de que un microorganismo esté presente en forma activa o latente es igual o menor de 1 en 1.000.000 (coeficiente de seguridad de esterilidad 10^{-6}).

Para llevar a cabo los procesos de esterilización se requiere:

- Instalaciones y suministros calificados;
- Equipamiento calificado y con mantenimiento preventivo periódico;
- Precauciones para disminuir la carga microbiana inicial del producto hasta un valor mínimo;
- Procesos de esterilización validados;
- Personal calificado y entrenado;
- Controles sobre el ambiente y sobre el personal;
- Monitoreo y registro de los procesos de rutina.

La validación es el procedimiento que permite obtener, registrar e interpretar datos con el fin de demostrar que un equipo o proceso cumple en todas las ocasiones con las especificaciones predeterminadas. Aplicado a los procesos de esterilización, la validación evalúa la aptitud del esterilizador y califica su funcionamiento con la carga del producto. Consta de las siguientes actividades secuenciales documentadas:

- Calificación de la Instalación
- Calificación Operativa
- Calificación de Desempeño

Calificación de la Instalación

Implica demostrar en forma documentada que todos los aspectos de la instalación y los suministros del equipo son los correctos y se cumplen las especificaciones del fabricante.

Consiste en verificar el cumplimiento de las especificaciones de diseño y de las características de construcción, verificar la correspondencia de

todos los componentes del equipo y planos; verificar la calidad, capacidad, presión, tipo y pureza (de ser aplicable) de todos los suministros. Los instrumentos destinados a evaluar las variables críticas del proceso se deben calibrar frente a un estándar o patrón de referencia nacional. En el caso que exista un programa que ejecute el proceso de esterilización (microprocesador), el mismo debe validarse por un procedimiento establecido.

Calificación operativa

Su objetivo es verificar que todos los componentes del equipo funcionan de acuerdo a lo especificado. Para este efecto se deben poner a prueba de operación normal todos los dispositivos del equipo y evaluar la uniformidad y reproducibilidad de las variables críticas del proceso, sin carga de producto.

Calificación o certificación de desempeño

Implica demostrar en forma documentada que el equipo produce un producto apropiado (coeficiente de seguridad de esterilidad 10^{-6}) cuando opera de acuerdo con las especificaciones del proceso.

Para estos efectos, es necesario definir el tipo y patrón de carga a esterilizar considerando los artículos y sus respectivos empaques. El patrón de carga es un aspecto crítico en relación a la distribución del calor o del agente esterilizante dentro de la cámara.

La Calificación de desempeño incluye la Calificación de Parámetros físicos y la Calificación microbiológica

Calificación de desempeño física - La primera fase en la Calificación de desempeño consiste en desarrollar perfiles de temperatura en la carga, evaluando la efectividad de la penetración del calor en el producto, y caracterizar los cambios de presión a lo largo del ciclo.

Calificación de desempeño microbiológica - Consiste en validar los ciclos en cuanto a la capacidad de eliminación de microorganismos utilizando indicadores biológicos incorporados a los productos, o en su defecto utilizando productos simulados inoculados con portadores biológicos. Durante la calificación microbiológica se debe verificar que finalizado el ciclo se ha alcanzado en el producto la probabilidad de supervivencia de 10^{-6}

Habitualmente cuando el producto es termoestable se utiliza la aproximación de sobremuerte, en este enfoque no se tiene en cuenta el tipo ni la cantidad de microorganismos

contenidos inicialmente en el producto a esterilizar, utilizando como referencia solamente la población y resistencia del bioindicador.

El segundo enfoque, aproximación de supervivencia, es aplicable solamente al desarrollo y validación de ciclos en los que el producto puede ser alterado por el proceso de esterilización, por ejemplo, la esterilización por calor húmedo de productos sensibles al calor.

Se denomina esterilización terminal al proceso aplicable cuando el producto se esteriliza en su envase definitivo. Cuando la naturaleza del producto impide su esterilización terminal se debe proceder a esterilizar en forma separada cada uno de sus componentes por cualquiera de los métodos de esterilización terminal descriptos a continuación, seguido de un proceso de preparación aséptica del producto final.

Los procesos de preparación aséptica de productos estériles a partir de componentes preesterilizados deben también ser certificados y validados; algunos puntos críticos de la validación del proceso incluyen ensayos de eficacia de los sistemas de filtración de aire y el procesamiento de un producto simulado estéril.

Métodos y condiciones de esterilización

Se debe llevar a cabo el proceso de Esterilización por alguno de los métodos que se describen a continuación, teniendo en cuenta las características del producto médico, como por ejemplo su resistencia térmica.

Clasificación

- Físicos
 - Calor húmedo,
 - Calor seco,
 - Radio-esterilización,
 - Filtración.
- Químicos
 - Óxido de etileno,
 - Vapor a baja temperatura con formaldehído,
 - Plasma de peróxido de hidrógeno.

Esterilización por calor húmedo Vapor de agua saturado

Es el método de elección siempre que sea aplicable. Su efecto esterilizante se fundamenta en la acción del calor transmitido por el vapor saturado a presión superior a la normal sobre los componentes celulares, produciendo coagulación proteica, ruptura de DNA y RNA y pérdida de material de bajo peso molecular, logrando así inactivación de los microorganismos. Los parámetros críticos del proceso son temperatura,

tiempo y vapor saturado, siendo la temperatura de referencia para el proceso 121 °C. La selección del tipo de ciclo de esterilización a emplear depende de la configuración del producto y de la capacidad del mismo y del empaque para soportar las temperaturas, la presión y el calor transferidos. Los factores que pueden influenciar la esterilización de los productos son: tipo de empaque según su densidad y porosidad, composición y complejidad del dispositivo en cuanto a diseño y resistencia térmica, y el tipo de carga en el esterilizador, homogénea o heterogénea, volumen de la cámara ocupado, etc.

Los ejemplos de tiempos de exposición en ciclos de vapor saturado son 134 °C para un tiempo de exposición mínimo de 3 minutos y, 121 °C para un tiempo de exposición mínimo de 15 minutos. Pueden ser utilizadas relaciones tiempo-temperatura distintas de las mencionadas. En todos los casos debe validarse cada proceso en particular.

Un ciclo típico de esterilización por vapor consta de una etapa inicial de eliminación previa del aire de la cámara y de los productos, lo que se consigue habitualmente por medio de vacío fraccionado alternado con inyecciones de vapor saturado, seguido de la etapa de esterilizado o tiempo de contacto con el vapor saturado a la temperatura preestablecida; finalmente se procede al secado del material, etapa fundamental para mantener las propiedades barrera del envase.

Cuando el material no admite ser sometido a la acción del vacío se utiliza la remoción previa del aire por desplazamiento gravitacional; en estos casos se omite la etapa de secado posterior al esterilizado, ya que la naturaleza de los productos (generalmente líquidos en envases flexibles o rígidos), no lo requiere.

Controles de proceso

- Ensayo de eliminación del aire y penetración del vapor ó Test de Bowie-Dick,
- Temperatura en la cámara y en la carga,
- Presión en cámara,
- Indicador químico de proceso,
- Indicador biológico.

No puede utilizarse para procesar materiales termosensibles, alterables por la humedad, sustancias oleosas, grasas, polvos y materiales eléctricos.

Concepto de F_0 y aplicación a la esterilización por vapor

El valor de F_0 de un proceso de esterilización por vapor saturado es la letalidad lograda en el producto en su envase definitivo, expresada en

términos de tiempo equivalente en minutos, a una temperatura de 121 °C, referenciando la carga biológica del producto a la de un microorganismo hipotético que posee un valor Z de 10 °C

El valor Z relaciona la resistencia al calor de un microorganismo con los cambios de temperatura.

Z se define como el cambio de temperatura en grados centígrados requerido para modificar el tiempo de reducción decimal D en un factor de 10, siendo D para una dada temperatura de esterilizado, el tiempo requerido para reducir el número de microorganismos viables a un 10 por ciento del número original.

La utilización del concepto matemático de F_0 es particularmente útil en la esterilización de productos termosensibles a temperaturas inferiores a 121 °C, ya que permite calcular el tiempo equivalente a 121 que produciría el mismo efecto letal que el tiempo de exposición a las temperaturas y condiciones reales a las que es sometido el producto.

El F_0 total de un proceso tiene en cuenta las fases de calentamiento y enfriamiento del ciclo y se puede calcular por integración de las tasas de letalidad con respecto al tiempo, a intervalos distintos de temperatura a la que está siendo sometido el producto a esterilizar.

Cuando se diseña y se valida un ciclo de esterilización por vapor tomando como base el concepto de F_0 , el criterio microbiológico es el de aproximación de supervivencia, en lugar del más habitual criterio de sobremuerte; debiendo el proceso entregar al producto la mínima cantidad de calor (F_0 mínimo) para alcanzar el nivel de seguridad de esterilidad de 10^{-6} , sin afectar adversamente sus características por excesivo calentamiento.

En estos procesos es preciso tomar precauciones para asegurar que se consigue en forma repetitiva una garantía adecuada de esterilidad, debiéndose demostrar que los parámetros microbiológicos garantizan un nivel de aseguramiento de esterilidad de 10^{-6} o menor.

Esterilización por calor seco

El mecanismo de acción microbicida se basa en la acción oxidante del aire seco caliente que circula por convección forzada a través de los productos.

Los parámetros críticos del proceso son temperatura y tiempo, siendo las relaciones sugeridas, 160 °C durante 2 horas y 170 °C durante 1 hora. Estas temperaturas se relacionan con el tiempo de exposición después de haberse logrado la temperatura específica en el punto más frío de la carga y no incluye tiempos de calentamiento.

El método de calor seco se utiliza también para la esterilización y despirogenación simultánea de envases de vidrio, ya sea operando en lotes o como un proceso continuo, en este último caso como parte integral de un proceso de llenado aséptico de producto. En los procesos de despirogenado las temperaturas empleadas son más elevadas que las requeridas con fines de esterilización únicamente, utilizándose habitualmente 250 °C por 5 minutos; la implementación de un proceso continuo como parte de un llenado aséptico requiere un control estricto de la calidad microbiológica del aire circulante en la cámara durante el esterilizado y el enfriamiento posterior.

Para los procesos de despirogenado, el programa de validación debe incluir en la calificación de desempeño la demostración de la destrucción de endotoxinas por debajo del límite permitido en el ensayo de referencia (ver 330. *Ensayo de endotoxinas bacterianas*).

Controles de proceso

- Temperatura en distintos puntos de la cámara y de la carga
- Indicador químico de proceso e indicador biológico.

El método permite la esterilización de polvos, aceites, soluciones no acuosas, y el despirogenado de materiales resistentes al calor (ejemplo, envases de vidrio). Debido a que el aire caliente se estratifica debe utilizarse circulación forzada en los equipos.

Esterilización por radiación

La radio-esterilización se basa en la aplicación de radiación ionizante procedente de una fuente de radioisótopos de Co^{60} o Cs^{137} emisoras de radiación gamma, o de un haz de electrones de alta energía, obtenida con un acelerador de electrones o de un generador de rayos X. En ambos casos el parámetro crítico del proceso es la dosis absorbida por el producto.

Aunque históricamente se ha utilizado 25 kGy como dosis absorbida de referencia, la preselección de esta dosis debe ser convalidada experimentalmente; en muchos casos es recomendable la utilización de dosis menores o mayores que la de referencia, dependiendo de las propiedades del material, el grado de contaminación del producto, y el coeficiente de seguridad de esterilidad buscado.

En la radio-esterilización la determinación de la dosis se debe establecer dentro de un rango de dosis máxima-dosis mínima que asegure que las propiedades del artículo no se vean alteradas.

La validación de un proceso de esterilización por radiación incluye el estudio de la compatibilidad de los artículos a esterilizar con la radio-esterilización, evaluando el posible deterioro o degradación; el establecimiento del patrón de carga del producto; la demostración mediante dosímetros que se ha alcanzado la dosis de esterilización preestablecida, el mapeo de dosis en el contenedor de esterilización (incluyendo la identificación de zonas de dosis máxima y dosis mínima); y la determinación del tiempo de exposición para lograr esta distribución de dosis en el producto.

Es aplicable sobre una amplia variedad de productos, aunque se debe considerar la posibilidad de cambios cualitativos luego de la aplicación de este método, puesto que produce ruptura de uniones químicas en las macromoléculas, y formación de especies reactivas (radicales libres) que pueden provocar alteraciones variadas en los materiales.

Filtración

Este método está indicado para soluciones lábiles al calor. Los microorganismos presentes son removidos mediante el pasaje de la solución a través de un medio filtrante de tamaño de poro adecuado. Los elementos que entren en contacto con la solución deben ser estériles, el ambiente de contaminación controlada y la técnica aséptica.

A pesar de que las sustancias que han sido filtradas por este método se denominan “estériles”, por estar libres de bacterias y hongos y sus esporas, éstas pueden contener virus activos que no son removidos por el filtro.

Otros factores fundamentales a tener en cuenta son la posible adsorción de drogas, aditivos o conservadores por el material filtrante, el contenido de endotoxinas y la carga microbiana de la solución; éste último factor condiciona la selección de otros parámetros críticos del proceso, tales como la presión de filtración y la velocidad de filtración.

Los materiales de filtración disponibles actualmente incluyen acetato de celulosa, nitrato de celulosa, acrílicos, policarbonato, poliéster, PVC, nylon, vinilo, PTFE, y membranas metálicas entre otros. En todos los casos las membranas deben tener la capacidad de retener el 100% de un cultivo de 10^7 de *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19146) por cm^2 de superficie de la membrana a una presión de no menos de 30 psi (2,0 bares). La clasificación nominal de estas membranas es de 0,2 o 0,22 μm dependiendo del fabricante.

Las membranas diseñadas para la retención de Micoplasmas deben tener un tamaño nominal de 0,1 μm .

La integridad del dispositivo filtrante debe ser verificada antes y después del procedimiento a los efectos de determinar la eficacia del proceso. Dentro de las metodologías habitualmente utilizadas para este fin se incluyen los ensayos de punto de burbuja, difusión y mantenimiento de la presión. Los valores de aceptación deben ser provistos por el fabricante del dispositivo.

La esterilización por filtración no garantiza la eliminación de virus, micoplasmas ni priones. La presencia de estos agentes debe evitarse mediante selección, control y manejo adecuado de la materia prima.

Esterilización por óxido de etileno

El óxido de etileno es un agente alquilante que reacciona con grupos químicos presentes de los ácidos nucleicos y proteínas de los microorganismos. Su utilización como alternativa a métodos físicos se justifica exclusivamente cuando por su naturaleza el producto pueda sufrir alteraciones por calor.

Los parámetros críticos del proceso son temperatura, concentración del gas, humedad relativa porcentual y tiempo de esterilizado.

El proceso de esterilización consta de varias etapas secuenciales:

- Preacondicionamiento del producto,
- Ciclo propiamente dicho: remoción del aire, acondicionamiento del producto, inyección del gas, esterilizado y desgasificación o lavado del gas de la cámara,
- Aireación forzada del producto, la que puede efectuarse en la misma cámara del esterilizador o en una cámara o recinto independiente.

Usualmente también se utilizan instalaciones independientes para preacondicionar la carga hasta lograr la temperatura y humedad relativa requeridos para el proceso, minimizando así el tiempo de acondicionamiento del producto en la cámara del esterilizador.

La validación del proceso exige requisitos adicionales a los necesarios para procesos basados en la acción del calor; tales como la caracterización estricta de las variaciones de presión en cámara a lo largo de las distintas etapas del ciclo, la medición del tenor de humedad relativa en las etapas de preacondicionamiento y acondicionamiento, la medición de la concentración de gas en el esterilizado, y la determinación de las condiciones de aireación forzada de los productos esterilizados de modo de lograr niveles de residuos y productos

de reacción compatibles con los límites máximos permitidos.

Controles de proceso

- temperatura de la cámara y de la carga,
- control directo o indirecto de la humedad relativa porcentual en cámara y de la concentración de gas en cámara alcanzada en el esterilizado,
- tiempo de esterilizado,
- indicador químico de proceso e indicador biológico.

El método tiene aplicación sobre amplia variedad de productos médicos, permitiendo operar aún a temperaturas inferiores a 40 °C. El óxido de etileno es tóxico, inflamable y explosivo, por lo que se requiere para la operación de los esterilizadores establecimientos equipados con las instalaciones y medidas de seguridad necesarias para el almacenamiento y manipuleo correcto de este producto.

La emisión ambiental debe estar controlada, por tratarse de una sustancia cancerígena e irritante de mucosas, piel y vías respiratorias. La aireación posterior a la esterilización implica tiempos de cuarentena prolongados.

La esterilización con óxido de etileno no es compatible con soluciones acuosas ni grasas; sin embargo, está documentada la esterilización por óxido de etileno de drogas en polvo alterables por radio-esterilización.

Esterilización con plasma de peróxido de hidrógeno

Es un procedimiento de esterilización que se basa en la oxidación de moléculas biológicas mediante el plasma generado por acción de energía de radiofrecuencia, utilizando como precursor vapor de peróxido de hidrógeno, a baja temperatura y a presión subatmosférica. El vapor de peróxido de hidrógeno se disocia en la etapa de plasma del ciclo de esterilización en radicales libres y otras especies microbicidas activas. Tras la etapa de plasma se recombinan los radicales libres en forma de moléculas estables, dando origen en su mayor parte a agua y oxígeno.

Los esterilizadores poseen un catalizador que descompone el peróxido de hidrógeno para el tratamiento de los gases descargados de la cámara, garantizando de este modo una emisión ambiental controlada para el operador.

Los parámetros críticos del proceso son concentración de peróxido de hidrógeno en cámara, energía de radiofrecuencia, presión y tiempo en las etapas de difusión de la solución de peróxido de hidrógeno y de generación de plasma.

El proceso es corto, no deja residuos tóxicos, y permite esterilizar a temperaturas iguales o menores de 50 °C.

El producto a procesar debe estar perfectamente seco, existiendo restricciones de difusión del agente esterilizante con respecto a los lúmenes; es incompatible con celulosa, polvos y líquidos.

Esterilización con vapor a baja temperatura y formaldehído

El método basa su acción esterilizante en la actividad alquilante del formaldehído, sustancia que reacciona inactivando grupos químicos esenciales de los ácidos nucleicos y proteínas de los microorganismos, en sinergismo con vapor de agua a presión subatmosférica.

Los parámetros críticos del proceso son temperatura, concentración del formaldehído, humedad relativa porcentual y tiempo de esterilizado.

Básicamente el proceso consiste en realizar vacíos fraccionados alternados con inyecciones de solución de formaldehído, eliminando así el aire de la cámara y facilitando la penetración completa y reproducible del agente esterilizante en la carga.

En la etapa de esterilizado el producto permanece en contacto con el agente esterilizante a presión y temperatura constantes el tiempo especificado para el proceso; por último se procede a la eliminación o lavado con vapor de agua de los residuos del agente químico del producto y de los empaques, seguido del secado final del producto.

Controles de proceso

- temperatura de la cámara,
- control directo de la concentración del formaldehído,
- tiempo de esterilizado,
- indicador químico de proceso e indicador biológico.

La temperatura del ciclo oscila en general entre 60 y 80 °C

La validación del proceso exige requisitos adicionales a los necesarios para procesos basados en la acción del calor; tales como la caracterización estricta de las variaciones de presión en cámara a lo largo de las distintas etapas del ciclo, la medición de la concentración de gas en la etapa de esterilización, y la determinación de las condiciones de aireación de los productos esterilizados

Finalizado el proceso, quedan residuos de formaldehído y sustancias de reacción aún

detectables en los productos, no estando aún claramente definidos los límites máximos permitidos.

El método no es compatible con soluciones, grasas ni polvos.

La emisión ambiental debe estar controlada, por tratarse de una sustancia cancerígena e irritante.

Almacenamiento

La vida útil de los productos médicos estériles estará determinada por el envejecimiento de los componentes y por la integridad de su envase, por lo que el almacenamiento debe realizarse de manera que se preserve la integridad del mismo, respetando las condiciones ambientales indicadas por el fabricante.

El riesgo de daño del envase se relaciona con el cuidado en la manipulación del mismo durante la esterilización, el transporte y el almacenamiento.

Indicadores biológicos

Los indicadores biológicos son preparaciones normalizadas de microorganismos seleccionados que se utilizan para valorar la eficacia de los procedimientos de esterilización. Habitualmente se presentan bajo la forma de una población de esporas bacterianas dispuestas sobre un soporte inerte o portador (disco o tira de papel de filtro, vidrio, o plástico). Pueden emplearse también indicadores biológicos con más de una especie de bacteria sobre un mismo soporte. El portador inoculado se encuentra dentro de un empaque o envase primario que lo protege de cualquier deterioro o contaminación, pero que permite el pasaje del agente esterilizante.

En otras presentaciones el indicador biológico se presenta en un envase primario autocontenido que incluye un medio de cultivo estéril; en este caso el diseño del envase ofrece mínima resistencia al paso del agente esterilizante.

En ambos casos los envases primarios se vehiculizan en un envase secundario de forma que los bioindicadores puedan ser transportados y almacenados en condiciones adecuadas. En el rótulo de los indicadores biológicos deberá figurar el nombre del organismo de ensayo empleado como microorganismo de referencia, el nombre o abreviatura de la colección de cultivo y el número de referencia de la especie, el número de lote, la indicación del método de esterilización para el cual el indicador biológico puede ser utilizado, el número de esporas viables por transportador, datos

de la resistencia del microorganismo de ensayo y la fecha de vencimiento.

El fabricante del bioindicador debe además suministrar con el producto instrucciones de uso, incluyendo las condiciones para la recuperación de los organismos en ensayo después del proceso de esterilización y las instrucciones para su disposición final.

Una tercera forma de bioindicadores la constituyen suspensiones de esporas que se incorporan a unidades representativas del producto a esterilizar, o en su defecto a productos simulados. A estos bioindicadores se los llama productos inoculados, preparados a partir de suspensiones de esporas de población y resistencia conocida.

La elección del organismo indicador para el método de esterilización se realiza de acuerdo a los siguientes requisitos:

- Resistencia elevada de la cepa de ensayo al método de esterilización previsto, en comparación a la resistencia de todos los microorganismos patógenos y de los que pueden producir contaminación en el producto.

- La cepa de ensayo no debe ser patógena.

- La cepa de ensayo debe poder cultivarse con facilidad.

Se recomienda que se coloquen los indicadores biológicos en los lugares menos accesibles al agente esterilizante y bajo las mismas condiciones de empaque que el material a procesar.

Después de la incubación, la existencia de crecimiento de los microorganismos de referencia que han sido sometidos al proceso de esterilización demuestra que dicho procedimiento ha sido ineficiente.

- Para esterilización por vapor se recomienda el uso de las esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953. El número de esporas viables por soporte debe ser no menor de 1×10^5 y el valor de D a 121°C superior a 1,5 minutos. Se debe verificar que luego de la exposición de los indicadores al calor húmedo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 minutos queden esporas capaces de germinar y que no haya crecimiento del microorganismo de referencia después que los indicadores biológicos hayan sido expuestos al agente esterilizante durante 15 minutos.

- En el caso de la esterilización por calor seco, se recomiendan las esporas de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372. El número de esporas viables por soporte debe ser no menor de 1×10^5 y el valor D a 160°C debe estar comprendido entre 5 y 10 minutos.

- Cuando se utiliza radiación ionizante, los indicadores utilizados contienen esporas de *Bacillus pumilus* (ATCC27.142, NCTC 10327, NCIMB 110692 o CIP 77.25). El número de esporas por soporte debe ser mayor de 1×10^7 y el valor de *D* mayor a 1,9 kGy. Se debe comprobar que no haya crecimiento de los microorganismos de referencia luego de una exposición de los indicadores biológicos a 25 kGy (dosis mínima absorbida).

- Para el sistema de *Esterilización por Plasma de peróxido de hidrógeno* se recomienda el uso de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953.

- En el caso de esterilización por óxido de etileno se recomiendan las esporas de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372. El número de esporas viables por soporte debe ser superior a 1×10^6 (valores de población nominal mínima para uso en monitoreos de rutina; para ensayos de validación o aplicaciones especiales puede requerirse

poblaciones nominales mayores) y el valor *D* no debe ser menor de 12,5 minutos cuando se expongan a 600 ± 30 mg/l de óxido de etileno, 60 ± 10 % de humedad relativa y 30 ± 1 °C, y/o 2,5 minutos cuando se expongan a 600 ± 30 mg/l de óxido de etileno, 60 ± 10 % de humedad relativa y 54 ± 1 °C.

- Cuando se utiliza el *Vapor a baja temperatura con formaldehído* se recomienda el uso de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, NCBI 8224, DSM 6790, ATCC 7953, ATCC 10149 y ATCC 12980. El número de esporas viables por soporte debe ser mayor de 1×10^5 .

Ensayo de Esterilidad

Proceder según se indica en 370. *Ensayos de Esterilidad*.

ALGODÓN HIDRÓFILO

Definición – El Algodón Hidrófilo está constituido por los pelos de las semillas de diferentes especies de *Gossypium* (Malváceas), exento de sustancias extrañas y sustancias grasas; blanqueado y cardado, dispuesto en capas uniformes.

Características generales – El pelo está constituido por una célula tubular, aplanada, retorcida, algo engrosada en los bordes; de hasta 4 cm de largo y 40 µm de ancho, insoluble en solventes ordinarios.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

Identificación

El Algodón Hidrófilo se colorea de violeta por agregado de una solución de cloruro de cinc iodurada, preparada disolviendo 2 g de cloruro de cinc y 0,2 g de ioduro de cinc, en cantidad suficiente de agua destilada reciente hervida y enfriada, hasta completar un volumen de 100 ml y luego filtrar.

Sustancias solubles en agua

Colocar 10 g, pesados con exactitud, en un vaso de precipitados que contenga 1000 ml de agua y llevar a ebullición moderada durante 30 minutos, agregando agua, según sea necesario, para mantener el volumen. Verter el agua en otro vaso a través de un embudo y extraer el exceso de agua del algodón, presionando con una varilla de vidrio. Lavar el algodón en el embudo con dos porciones de 250 ml de agua hirviendo, presionando el algodón después de cada lavado. Filtrar la combinación del extracto y los lavados hasta obtener un volumen pequeño, transferir a una cápsula tarada de porcelana o platino, evaporar hasta sequedad y secar el residuo a 105 °C hasta peso constante: el residuo no pesa más de 35 mg (0,35%)

Sustancias tensioactivas

Transferir una porción de 20 ml del líquido obtenido en *Sustancias solubles en agua* a una probeta de 25 ml. Agitar enérgicamente 30 veces en 10 segundos. Dejar reposar durante 10 minutos. No debe quedar espuma. [NOTA: se acepta un pequeño anillo de espuma que quede en la probeta.]

Acidez o alcalinidad

Sumergir aproximadamente 10 g de Algodón Hidrófilo en 100 ml de agua destilada hasta embeberse. Dejar en reposo durante 2 horas. Transferir dos porciones de 25 ml a dos cápsulas de porcelana blanca. Agregar a una de ellas 3 gotas de solución

de fenofaleína (SR) y una gota de solución de anaranjado de metilo (SR) a la segunda: no debe producirse coloración rosada en ninguna de las dos cápsulas.

Colorantes

Pesar exactamente alrededor de 10 g de Algodón Hidrófilo. Macerar durante 6 hs en 100 ml de alcohol a temperatura ambiente, agitando en forma intermitente. Examinar el líquido a través de una capa de 20 cm de profundidad, sobre fondo blanco: podrá presentar coloración amarillenta pero no azul o verde. Iluminar con luz ultravioleta: no debe observarse fluorescencia.

Jabones y resinas

Transferir el líquido obtenido en *Colorantes* a un recipiente previamente pesado, evaporar hasta sequedad en un baño de agua o en plancha calefactora, completar el secado en estufa a 102 ± 2 °C hasta peso constante, enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar: el residuo no debe ser mayor del 0,5 %.

Humedad

Pesar exactamente alrededor de 10 g de Algodón Hidrófilo. Secar en estufa a 102 ± 2 °C hasta peso constante. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar: no debe perder más de 7 % de su peso.

Determinación del residuo de ignición <270>

Pesar exactamente alrededor de 5 g de Algodón Hidrófilo y colocar en una cápsula de porcelana previamente pesada. Calentar suavemente hasta que se carbonice, luego en una mufla a 800 ± 50 °C hasta calcinación total. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar: el peso del residuo no debe ser mayor de 0,2 %.

Materias grasas

Precaución – El éter es un solvente altamente inflamable. No calentar a llama directa. Realizar el ensayo bajo campana.

Pesar exactamente alrededor de 10 g de Algodón Hidrófilo. Colocar el Algodón Hidrófilo en un extractor Soxhlet, con un colector (matraz o balón) previamente pesado. Extraer con éter etílico durante 5 horas, ajustando la velocidad de extracción para que el éter circule no menos de 4 veces por hora calentando el colector sobre plancha metálica o manto calefactor. El extracto etéreo en el colector no debe mostrar indicios de color azul, verde o pardo. Evaporar el extracto hasta sequedad, completar el secado en estufa a 102 ± 2 °C hasta peso constante: el residuo no deberá ser mayor al 0,6 %.

Poder hidrófilo (tiempo de inmersión)

Tomar un trozo de Algodón Hidrófilo de aproximadamente 0,5 g. Colocarlo sobre la superficie de un litro de agua contenida en una probeta de 6 cm de diámetro interno: el trozo debe embeberse totalmente en un tiempo no mayor a 3 segundos y llegar al fondo de la probeta en no más de 10 segundos.

GASA HIDRÓFILA

Definición – La Gasa Hidrófila es un tejido de algodón, de tejido de punto tipo tubular o tejido plano tipo rectilíneo, limpiada, blanqueada, desengrasada y sin apresto, de color blanco, suave al tacto, no quebradiza y no crujiente al apretarla con la mano. No debe contener blanqueador óptico. Puede suministrarse en diversas medidas de largo y ancho.

Características generales - La Gasa Hidrófila con tejido de punto debe tener no menos de 4 pasadas por cm, 4 cadenas por cm, con una suma de ambos de 10. En gasa de tejido plano, no menos de 10 hilos por cm en urdimbre y no menos de 6 hilos por cm en trama (16 hilos por cm^2). Debe pesar entre 22 y 36 gramos por m^2 .

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

ENSAYOS

[NOTA: acondicionar toda la Gasa Hidrófila durante no menos de 4 horas en una atmósfera de 65 ± 2 % de humedad relativa a una temperatura de $21 \pm 1,1$ °C antes de realizar el ensayo de *Masa y Tiempo de inmersión*. Retirar la Gasa Hidrófila de su envoltura antes de colocarla en las condiciones atmosféricas detalladas. Si se presenta en rollos, cortar la cantidad necesaria para las diversas pruebas, excluyendo los dos últimos metros cuando la cantidad total de gasa disponible así lo permita.]

Longitud

Desplegar o desenrollar, aplanar sin extender y medir su longitud a lo largo de la línea central: el largo no debe ser menor del 98,0 % del valor declarado en el rótulo.

Ancho

Proceder según se indica en *Longitud*. Medir el ancho en tres puntos diferentes: el promedio de las tres mediciones debe ser no menor del 98,0 % del valor declarado en el rótulo.

Peso por m^2

Pesar exactamente alrededor de 10 g de Gasa Hidrófila. Puede tratarse de un conjunto de trozos rectangulares o cuadrados, cortados con una tijera, correspondientes a la misma unidad de muestreo. Extender los trozos, determinar el área de cada uno y sumarlas. Calcular el peso por la fórmula siguiente:

$$P/A$$

en la cual P es el peso en g de gasa tomada y A es la suma de las áreas en m^2 . El peso se debe encontrar entre 22 y 36 g por m^2 .

Sustancias solubles en agua

Pesar exactamente alrededor de 10 g de Gasa Hidrófila y transferir a un vaso de precipitados. Agregar 250 ml de agua destilada a ebullición y mantener entre 95 y 100 °C durante 10 minutos, agitando y comprimiendo la gasa con una varilla de vidrio. Filtrar el líquido, lavar la Gasa Hidrófila con pequeñas porciones de agua destilada a ebullición, agitando y comprimiendo repetidas veces la gasa. Combinar los líquidos de lavado y dejar enfriar. Transferir a un matraz aforado de 250 ml y homogeneizar. Evaporar hasta sequedad 200 ml de este líquido en una cápsula de porcelana previamente pesada y completar el secado en estufa a 105 ± 2 °C hasta peso constante. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar: el peso del residuo no debe ser mayor 0,25 %.

Sustancias tensioactivas

Transferir una porción de 20 ml del líquido obtenido en *Sustancias solubles en agua* a una probeta de 25 ml. Agitar enérgicamente 30 veces en 10 segundos. Dejar reposar durante 10 minutos. No debe quedar espuma. [NOTA: se acepta un pequeño anillo de espuma que quede en la probeta.]

Almidón

A una porción de 20 ml del líquido obtenido en *Sustancias solubles en agua* agregar una gota de solución de iodo (SR): no debe producirse coloración violácea, roja o azul.

Solubilidad en hidróxido de tetraaminocobre (II)

Solución de hidróxido de tetraaminocobre (II) – Disolver 55 g de sulfato cúprico en un vaso de precipitados que contenga 700 ml de agua destilada. Agregar 35 g de cloruro de amonio, agitando continuamente. Agregar hidróxido de potasio en cantidad necesaria para precipitar totalmente el hidróxido de cobre (II). Centrifugar y lavar el precipitado con agua. Este precipitado debe mantenerse húmedo durante todo el procedimiento y usarse en esas condiciones. Disolver el hidróxido de cobre (II) obtenido en 200 ml de hidróxido de amonio.

Procedimiento – Sumergir una porción de 5 g de Gasa Hidrófila previamente deshinchada en un vaso de precipitados que contenga *Solución de hidróxido de tetraaminocobre (II)*: se debe disolver totalmente en 10 minutos.

Acidez o alcalinidad

Sumergir aproximadamente 10 g de Gasa Hidrófila en 100 ml de agua destilada hasta embeberse. Dejar en reposo durante 2 horas. Transferir dos

porciones de 25 ml a dos cápsulas de porcelana blanca. Agregar a una de ellas 3 gotas de solución de fenoftaleína (SR) y una gota de solución de anaranjado de metilo (SR) a la segunda: no debe producirse coloración rosada en ninguna de las dos cápsulas.

Colorantes

Pesar exactamente alrededor de 10 g de Gasa Hidrófila y macerar con etanol en un erlenmeyer tapado durante 6 horas. Examinar el líquido a través de una capa de 20 cm de profundidad, sobre fondo blanco: podrá presentar coloración amarillenta pero no azul o verde.

Blanqueador óptico

Irradiar el líquido obtenido en *Colorantes* con luz ultravioleta, a 365 nm: no debe presentar fluorescencia.

Jabones y resinas

Transferir el líquido obtenido en *Blanqueador óptico* a un recipiente previamente pesado, evaporar hasta sequedad en un baño de agua o en plancha calefactora, completar el secado en estufa a 105 ± 2 °C hasta peso constante, enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar: el residuo no debe ser mayor del 0,5 %.

Humedad

Pesar exactamente alrededor de 10 g de Gasa Hidrófila. Secar en estufa a 105 ± 2 °C hasta peso constante. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar: no debe perder más de 7 % de su peso.

Determinación del residuo de ignición <270>

Pesar exactamente alrededor de 5 g de Gasa Hidrófila y colocar en una cápsula de porcelana previamente pesada. Calentar suavemente hasta que se carbonice, luego en una mufla a 500 ± 50 °C hasta calcinación total. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar: el peso del residuo no debe ser mayor de 0,2 %.

Materias grasas

Precaución – El éter es un solvente altamente inflamable. No calentar a llama directa. Realizar el ensayo bajo campana.

Pesar exactamente alrededor de 10 g de Gasa Hidrófila. Colocar la Gasa Hidrófila en un extractor Soxhlet, con un colector (matraz o balón) previamente pesado. Extraer con éter etílico durante 5 horas, ajustando la velocidad de extracción para que el éter circule no menos de 4 veces por hora calentando el colector sobre plancha metálica o manto calefactor. El extracto etéreo en el colector no debe mostrar indicios de color azul, verde o pardo. Evaporar el extracto hasta sequedad, com-

pletar el secado en estufa a 105 ± 2 °C hasta peso constante: el residuo no deberá ser mayor al 0,6%.

Poder hidrófilo (tiempo de inmersión)

Tomar un trozo de gasa de aproximadamente 0,5 g y comprimirlo adecuadamente. Colocarlo sobre la superficie de un litro de agua contenida en una probeta de 6 cm de diámetro interno: el trozo debe embeberse totalmente en un tiempo no mayor a 3 segundos y llegar al fondo de la probeta en no más de 10 segundos.

Esterilización <475>

Los procedimientos apropiados son calor húmedo o radiación. La esterilización por óxido de etileno resulta inadecuada a causa de la retención de etilenglicol considerada sustancia tóxica.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la denominación del producto, el tipo de hilado y de tejido, la longitud, el ancho y el número de piezas contenidas. Indicar si la Gasa Hidrófila es estéril, debiéndose incluir en el envase un indicador químico de viraje que certifique el proceso de esterilización. Indicar que el contenido puede no ser estéril si el envase muestra señales de daño o de haber sido previamente abierto.

SUTURA QUIRÚRGICA ABSORBIBLE

Definición – La Sutura Quirúrgica Absorbible es una hebra estéril, que puede ser metabolizada o degradada en tejido vivo y se elabora a partir de colágeno (llamada *Sutura de colágeno* o *Catgut*) proveniente de mamíferos sanos o de un polímero sintético (llamada *Sutura sintética absorbible*). La *sutura sintética absorbible* estéril proviene de uno o mas polímeros o copolímeros sintéticos, que al ser introducida en un organismo vivo es absorbida sin provocar irritación indebida de los tejidos.

Características generales - La *Sutura Quirúrgica Absorbible de colágeno (Catgut)* se prepara con segmentos uniformes y firmemente retorcidos obtenidos de la hendidura longitudinal del tejido submucoso del intestino delgado de mamíferos sanos de acuerdo a normas que permitan garantizar el origen y procesamiento de la materia prima, para evitar el riesgo de transmisión de agentes causantes de encefalopatía espongiforme transmisible. Por ello debe asegurarse que los intestinos provengan exclusivamente de animales nacidos y criados en países categorizados con nivel de riesgo I(uno) establecido por la Organización Internacional de Epizootias y demostrando trazabilidad con procedimiento acorde a Buenas Prácticas de Fabricación y Control.

La sutura de colágeno podrá ser simple es decir, no tratada previamente por cualquier proceso que pueda alterar su absorción media normal, o lenta, es decir tratada por procedimientos químicos con el fin de retardar el tiempo de absorción, siempre que las sustancias no reduzcan la aceptabilidad por parte de los tejidos.

La sutura preparada a partir de polímero sintético puede presentarse en forma de monofilamento o de multifilamento. Debe ser absorbida por tejidos de mamíferos vivos, y puede ser tratada para modificar su resistencia a la absorción. Su diámetro y resistencia a la tensión corresponden a la designación de tamaño que se indica en el rótulo, dentro de los límites que se describen en la presente monografía. Puede presentar modificaciones con respecto al cuerpo o la textura. Puede ser impregnada o tratada con agentes de recubrimiento, reblandecimiento o antimicrobianos apropiados. Puede teñirse con un colorante atóxico <50> *Colorantes de uso farmacéutico*.

CONSERVACIÓN

En seco o en líquido en envases diseñados de manera tal que la esterilidad se mantenga hasta que se

abra el envase. La sutura de colágeno estéril se preserva en soluciones conservantes a las que pueden agregarse antimicrobianos pero no antibióticos, dentro de un envase primario individual de cierre hermético que mantenga la esterilidad y permita su retiro y uso en condiciones asépticas. Para proteger el envase primario es imprescindible un envase secundario. Pueden colocarse una cantidad de dichos envases en un embalaje protector.

ENSAYOS

[NOTA: si la Sutura está envasada con un líquido, realizar las cuatro pruebas siguientes dentro de los 2 minutos después de retirarla del mismo.]

Longitud

Medir la longitud de la sutura mientras la hebra está extendida sin irregularidades ni tensión, en una superficie plana. La longitud de cada hebra no debe ser menor de 95% de la longitud declarada en el rótulo.

Diámetro (ver 383. *Ensayos de suturas*)

Sutura de colágeno - Medir el diámetro de diez hebras de sutura. El diámetro promedio, y no menos de veinte de las mediciones de la muestra de diez hebras está dentro de los valores del diámetro promedio descrito en la *Tabla 1* para su respectivo tamaño. Ninguna de las mediciones individuales es menor que el punto medio del intervalo para el tamaño próximo inferior ni mayor que el punto medio del intervalo para el tamaño inmediato superior.

Sutura sintética absorbible - Medir el diámetro de diez hebras de sutura. El diámetro promedio de las hebras que se mide está dentro de las tolerancias descritas en la *Tabla 2* para su respectivo tamaño. Ninguna de las mediciones individuales es menor que el punto medio del intervalo para el tamaño próximo inferior ni mayor que el punto medio del intervalo para el tamaño inmediato superior.

Resistencia a la tensión (ver 383. *Ensayos de suturas*)

Sutura de colágeno - Medir la resistencia a la tensión en no menos de diez hebras de sutura. La resistencia a la tensión, se determina como la resistencia mínima de cada hebra probada y calculada como la resistencia promedio de cualquier lote. En caso de que sólo una hebra no cumpla con el límite para hebras, repetir la prueba con no menos de veinte hebras adicionales: los requisitos de la prueba se cumplen si ninguna de las hebras adicionales está por debajo del límite para hebras y si la resistencia promedio de todas las hebras probadas no es inferior al límite establecido en la *Tabla 1*:

Tabla 1

Convencional	Tamaño métrico (calibre N°)	Diámetro promedio (mm)		Resistencia a la tensión del nudo (kgf)		Resistencia a la tensión del nudo (N)	
		Mínimo	Máximo	mínimo del promedio	mínimo cuerda individual	mínimo del promedio	mínimo cuerda individual
9/0	0,4	0,040	0,049	0,030	0,010	0,29	0,10
8/0	0,5	0,050	0,069	0,045	0,025	0,44	0,25
7/0	0,7	0,070	0,099	0,07	0,055	0,69	0,54
6/0	1	0,10	0,149	0,18	0,10	1,7	0,9
5/0	1,5	0,15	0,199	0,38	0,20	3,7	1,9
4/0	2	0,20	0,249	0,77	0,40	7,5	3,9
3/0	3	0,30	0,339	1,25	0,68	12,2	6,6
2/0	3,5	0,35	0,399	2,00	1,04	19,6	10,1
0	4	0,40	0,499	2,77	1,45	27,1	14,2
1	5	0,50	0,599	3,80	1,95	37,2	19,1
2	6	0,60	0,699	4,51	2,40	44,2	23,5
3	7	0,70	0,799	5,90	2,99	57,8	29,3
4	8	0,80	0,899	7,00	3,49	68,6	34,2

Sutura sintética absorbible - Medir la resistencia a la tensión en no menos de diez hebras de sutura. La resistencia a la tensión mínima de

cada tamaño, calculada como resistencia promedio de cada lote individual, se establece en la *Tabla2*:

Tabla 2

convencional	Tamaño métrico (N° de calibre)	Diámetro promedio (mm)		Resistencia a la tensión (kgf)	Resistencia a la tensión (N)
		Mínimo	Máximo	Promedio mínimo	Promedio mínimo
12/0	0,01	0,001	0,009	-	-
11/0	0,1	0,010	0,019	-	-
10/0	0,2	0,020	0,029	0,025*	0,25*
9/0	0,3	0,030	0,039	0,050*	0,49*
8/0	0,4	0,040	0,049	0,07	0,69
7/0	0,5	0,050	0,069	0,14	1,37
6/0	0,7	0,070	0,099	0,25	2,45
5/0	1	0,10	0,149	0,68	6,67
4/0	1,5	0,15	0,199	0,95	9,32
3/0	2	0,20	0,249	1,77	17,4
2/0	3	0,30	0,349	2,68	26,3
0	3,5	0,35	0,399	3,90	38,2
1	4	0,40	0,499	5,08	49,8
2	5	0,50	0,599	6,35	62,3
3	6	0,60	0,699	7,29	71,5
4	7	0,70	0,799	-	-

* medida por tracción recta/sin nudo.

Engarzado con aguja

La sutura que posee la aguja engarzada sin ojo cumple con los requisitos según se indica en *Sujeción de agujas en 383. Ensayos de suturas.*

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Colorante extraíble (si la sutura está teñida)

preparar la *Solución de comparación* que corresponda al colorante extraíble de la Sutura combinando las *Soluciones Colorimétricas* (SC) en las proporciones indicadas a continuación y agregando agua, si fuera necesario, hasta obtener 10,0 partes de solución.

Composición de la solución de referencia (partes en volumen)				
Colorante de Sutura (Colorante extraíble)	Partes de Cloruro Cobaltoso (SC)	Partes de Cloruro Férrico (SC)	Partes de Sulfato cúprico (SC)	Agua
Marrón amarillento	0,2	1,2	-	8,6
Rojo rosado	1,0	-	-	9,0
Azul verdoso	-	-	2,0	8,0
Violeta	1,6	-	8,4	-

Pesar una cantidad de sutura, equivalente a no menos de 250 mg, y colocarla en un matraz o erlenmeyer que contenga 1,0 ml de agua por cada 10 mg de muestra. Tapar y dejar en reposo a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Enfriar, decantar el agua de la sutura y compararla con la *Solución de comparación*: si se presenta color, este no debe ser más intenso que el color de la *Solución de comparación* apropiada.

Ensayo de compuestos solubles de cromo

Colocar 250 mg de muestra en un matraz con 25 ml de agua purificada. Tapar el matraz y dejar en reposo a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Dejar enfriar y decantar. Colocar 5 ml de esta solución en un tubo de ensayo y añadir 2 ml de una solución de 1,5- difenilcarbazida al 1 % P/V en alcohol y 2 ml de ácido sulfúrico 1 M. La solución resultante no se debe colorear más intensamente que otra solución preparada en forma simultánea usando 5 ml de solución con $2,83 \mu\text{g}$ por ml de dicromato de potasio en lugar de los 5 ml del extracto de la sustancia examinada (1 ppm cromo).

ROTULADO

Indicar en el rotulado de la sutura el material del que está hecha, el calibre, longitud y tipo de sutura, de corresponder tamaño y tipo de aguja. El calibre de la sutura se debe designar por el tamaño métrico (número de calibre), pudiendo incluir equivalencia con otros sistemas de medida. Se debe indicar la composición del líquido de envasado que se utilice.

SUTURA QUIRÚRGICA NO ABSORBIBLE

Definición – Hebra estéril flexible de procedencia animal, vegetal, metálica o sintética, resistente al efecto metabólico y físico de los tejidos de mamíferos vivos y compatible con ellos.

Características generales - Puede presentarse en forma de mono o multifilamento. Si es una hebra multifilamento, los filamentos individuales pueden combinarse mediante hilado, torsión, trenzado o por cualquier combinación de éstos. Su diámetro y resistencia a la tensión corresponden a los límites especificados para el tamaño que se indica en el rótulo. Puede recibir tratamientos para modificar la textura, la capilaridad, y otras características de superficie. Puede ser impregnada o tratada con un agente adecuado de recubrimiento de reblandecimiento o antimicrobiano. Puede teñirse con un colorante atóxico. *<50> Colorantes de uso farmacéutico.* La Sutura Quirúrgica No Absorbible se clasifica como: Sutura *Clase I:* compuesta de seda o fibras sintéticas en forma de monofilamento, torcidas o trenzadas en donde el recubrimiento, si existe, no afecta significativamente el grosor (por ejemplo, seda, poliéster o poliamida (Nylon) trenzados; polipropileno o poliamida (Nylon) monofilamento. Sutura *Clase II:* compuesta de fibras de algodón o de lino o fibras recubiertas naturales o sintéticas en donde el recubrimiento afecta significativamente el grosor pero no contribuye significativamente a la resistencia (por ejemplo, suturas de seda virgen). Sutura *Clase III:* compuesta de alambre metálico monofilamento o multifilamento

CONSERVACIÓN

Conservar la sutura en envases diseñados de manera tal que la esterilidad se mantenga hasta la apertura de los mismos. Es imprescindible un envase secundario y puede colocarse una cantidad de dichos envases en un embalaje protector.

ENSAYOS

Identificación

Proceder según se indica en *Identificación* en 383. *Ensayos de suturas*, de acuerdo al material correspondiente.

Longitud

Medir la longitud de la sutura mientras la hebra está extendida sin irregularidades y sin tensión, en una superficie plana. La longitud de cada hebra no debe ser menor de 95% de la longitud declarada en el rótulo.

Diámetro (ver 383. *Ensayos de suturas*)

Medir el diámetro de diez hebras de Sutura. El diámetro promedio de las hebras que se miden debe encontrarse dentro de las tolerancias descriptas en *Tabla* para el tamaño declarado en el rótulo. En el caso de suturas trenzadas o retorcidas, ninguno de los diámetros observados debe ser menor que el punto medio del intervalo para el tamaño próximo inferior o mayor que el punto medio del intervalo para el tamaño inmediato superior.

Resistencia a la tensión (ver 383. *Ensayos de suturas*)

Medir la resistencia a la tensión en no menos de diez hebras de sutura. Promediar todas las observaciones obtenidas: la resistencia a la tensión promedio no debe ser menor que la establecida en *Tabla* para la clase y tamaño declarado en el rótulo.

Tabla. Resistencia a la tensión, para sutura quirúrgica no absorbible.

Tamaño métrico (calibre N°)	Convencional	Diámetro promedio (mm)		Resistencia a la tensión promedio (kgf)			Resistencia a la tensión promedio (Newton)		
		Mín.	Máx.	mínimo Clase I	mínimo Clase II	mínimo Clase III	mínimo Clase I	mínimo Clase II	mínimo Clase III
0,01	12/0	0,001	0,009	0,001*	-	0,002*	0,01*	-	0,02*
0,1	11/0	0,010	0,019	0,006*	0,005*	0,02*	0,06*	0,05*	0,20*
0,2	10/0	0,020	0,029	0,019*	0,014*	0,06*	0,194*	0,14*	0,59*
0,3	9/0	0,030	0,039	0,043*	0,029*	0,07*	0,424*	0,28*	0,68*
0,4	8/0	0,040	0,049	0,06	0,04	0,11	0,59	0,39	1,08
0,5	7/0	0,050	0,069	0,11	0,06	0,16	1,08	0,59	1,57
0,7	6/0	0,070	0,099	0,20	0,11	0,27	1,96	1,08	2,65
1	5/0	0,10	0,149	0,40	0,23	0,54	3,92	2,26	5,30
1,5	4/0	0,15	0,199	0,60	0,46	0,82	5,88	4,51	8,04
2	3/0	0,20	0,249	0,96	0,66	1,36	9,41	6,47	13,3
3	2/0	0,30	0,339	1,44	1,02	1,80	14,1	10	17,6
3,5	0	0,35	0,399	2,16	1,45	3,40*	21,2	14,2	33,3*
4	1	0,40	0,499	2,72	1,81	4,76*	26,7	17,8	46,7*
5	2	0,50	0,599	3,52	2,54	5,90*	34,5	24,9	57,8*

6	3 y 4	0,60	0,699	4,88	3,68	9,11*	47,8	36,1	89,3*
7	5	0,70	0,799	6,16	-	11,4*	60,4	-	112*
8	6	0,80	0,899	7,28	-	13,6*	71,4	-	133*
9	7	0,90	0,999	9,04	-	15,9*	88,6	-	156*
10	8	1,00	1,099	-	-	18,2*	-	-	178*
11	9	1,100	1,199	-	-	20,5*	-	-	201*
12	10	1,200	1,299	-	-	22,8*	-	-	224*

* la resistencia a la tensión de Suturas Quirúrgicas no Absorbibles se mide con nudo excepto para diámetros menores a 8/0 (métrico 0,4) y para suturas monofilamento (metálicas) Clase III de diámetros mayores que 2/0 (métrico 3)

Las suturas no absorbibles de plata deben cumplir con la resistencia a la tensión de las suturas de Clase I pero se prueban de la misma manera que las suturas de Clase III.

Si los ensayos de resistencia a la tensión para suturas no absorbibles Clase I y II se realizan con suturas no estériles, los valores tabulados son aproximadamente 25% superiores.

Engarzado con agujas

Las suturas que tienen agujas ciegas adheridas deben cumplir con los requisitos según se indica en *Sujeción de Agujas en 383. Ensayos de suturas*

Ensayos de esterilidad <370>

Las suturas declaradas estériles deben cumplir con los requisitos.

Colorante extraíble (si la Sutura está teñida)

Proceder según se indica en *Colorante extraíble en Sutura Quirúrgica Absorbible*, pero en lugar de dejar en reposo a $37,0 \pm 0,5$ °C durante 24 horas, tapar el matraz con un embudo de vástago corto, calentar hasta ebullición, mantener durante 15 minutos, enfriar y restablecer el volumen mediante el agregado de agua, si fuera necesario, para reponer la pérdida por evaporación.

ROTULADO

Indicar en el rotulado de la sutura el material del que está hecha, el calibre, longitud y tipo de sutura, de corresponder tamaño y tipo de aguja. El calibre de la sutura se debe designar por el tamaño métrico (número de calibre), pudiendo incluir equivalencia con otros sistemas de medida.

PRODUCTOS RADIOFARMACÉUTICOS

APARTADO DE PRODUCTOS RADIOFARMACÉUTICOS

ÍNDICE

Textos de Información General

<1110> - Preparaciones radiofarmacéuticas

Monografías

Cianocobalamina (^{57}Co)

Cápsulas

Solución

Galio (^{67}Ga), Citrato de

Solución Inyectable

Indio (^{111}In), Cloruro de

Solución

Indio (^{111}In) Oxina

Solución

Indio (^{111}In), Pentetato de

Solución Inyectable

m-Iodobencilguanidina (^{131}I)

Solución Inyectable

Sodio, Ioduro (^{123}I) de,

Solución

Sodio, Ioduro (^{131}I) de,

Solución

Sodio, Pertecneciato ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) de

Solución Inyectable

Talio (^{201}Tl), Cloruro de

Solución Inyectable

Tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) Albúmina Humana

Solución Inyectable

Tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) Azufre Coloidal

Solución Inyectable

Tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Gluconato de

Solución Inyectable

Tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) Macroagregados de Albúmina

Suspensión Inyectable

Tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Medronato de

Solución Inyectable

Tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Pentetato de

Solución Inyectable

Tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Succímero de

Solución Inyectable

1110. PREPARACIONES RADIOFARMACÉUTICAS

Los conceptos generales del presente capítulo serán de aplicación a las monografías sobre Preparaciones Radiofarmacéuticas incluidas en esta Farmacopea.

A los fines pertinentes la manipulación y el empleo de preparaciones radiofarmacéuticas deben ajustarse a todas las normas, regulaciones, disposiciones nacionales y/o internacionales vigentes en materia de radioprotección emanadas de la Autoridad Nuclear competente y de la Autoridad Sanitaria jurisdiccional de acuerdo a su competencia.

DEFINICIONES

Preparación Radiofarmacéutica (Radiofármaco) - Es todo producto farmacéutico que, una vez terminado y listo para ser empleado, contiene uno o más nucleídos radiactivos (radioisótopos), incluidos con un propósito médico.

Generador de radionucleídos - Cualquier sistema que incorpora un radionucleído *madre* fijado a una matriz apropiada, a partir del cual se produce un radionucleído *hija*, la que se eluye o separa de la *madre* por cualquier método apropiado. La *hija* será empleada en una preparación radiofarmacéutica.

Juego de reactivos (kit) para preparaciones radiofarmacéuticas - Es todo producto farmacéutico para ser reconstituido y/o combinado con radionucleídos en la preparación radiofarmacéutica final, usualmente con anterioridad a su administración. El procedimiento para combinar el radionucleído con el juego de reactivos se denomina marcación radiactiva. Estos productos estarán sujetos a las normas generales establecidas para medicamentos y en particular, cuando sea pertinente, a las previstas para medicamentos inyectables. La calidad de estos productos se debe establecer teniendo en cuenta los criterios de pureza especificados en este capítulo y en las monografías correspondientes.

Pureza radionucleídica - Es la fracción porcentual de radiactividad del radionucleído declarado de una preparación radiofarmacéutica en relación a su radiactividad total. Las impurezas radionucleídicas relevantes se indican con sus límites, cuando son previsibles, en las monografías correspondientes.

Pureza radioquímica - Es la fracción porcentual de radiactividad del radionucleído declarado que está presente en la preparación radiofarmacéutica en la forma química declarada en relación a la radiactividad total de ese radionucleído. Las

impurezas radioquímicas relevantes se indican con sus límites, cuando son previsibles, en las monografías correspondientes.

Pureza química - Es la fracción porcentual de la masa de sustancia bajo la forma química indicada y la masa total de materia contenida en la fuente, exceptuando los excipientes y disolventes eventuales.

Biodistribución o Distribución biológica - A los efectos de este capítulo se entiende por Biodistribución como la fracción de la actividad administrada que se localiza en los diferentes tejidos, órganos o sistemas del organismo.

Portador isotópico - Se refiere a un isótopo estable del mismo elemento que el radionucleído correspondiente a la preparación radiofarmacéutica, presente o agregado a la preparación radiactiva en la misma forma química que se encuentra el radionucleído.

Actividad (A) - Es el número de núcleos radiactivos que desintegra en la unidad de tiempo. La unidad de actividad en el Sistema Internacional es 1 Becquerel o 1 Becquerelio (Bq) que corresponde a 1 desintegración por segundo.

Actividad específica - Es la radiactividad de un radionucleído por unidad de masa del elemento o de la forma química de la que forma parte.

Concentración de actividad - Es la radiactividad de un radionucleído por unidad de volumen o de masa de la preparación radiactiva.

Radiactividad total - Es la radiactividad del radionucleído expresado por unidad de la forma de la preparación radiofarmacéutica (frasco, cápsula, ampolla, generador, etc.).

Autorradiólisis - Es el proceso de descomposición de las moléculas de un sistema como consecuencia de la interacción directa o indirecta de las partículas y/o radiaciones emitidas por un nucleído radiactivo. Su importancia depende del tiempo y de la concentración de actividad.

Fuente radiactiva - Material radiactivo empleado por su propiedad de emitir radiaciones ionizantes.

Fuente sellada - Fuente radiactiva preparada para ser empleada de tal manera que la sustancia radiactiva no se encuentre en contacto directo con el medio ambiente. Está constituida por material radiactivo firmemente incorporado a materiales sólidos e inactivos o contenido en un envase sellado con resistencia suficiente para prevenir cualquier dispersión del material radiactivo y cualquier posibilidad de contaminación, en las condiciones normales de empleo.

Fuente no sellada - Fuente radiactiva prevista para ser empleada de tal manera que la sustancia radiactiva se encuentre en contacto directo con el medio ambiente. En una fuente no sellada, el material radiactivo es directamente accesible. Generalmente, se admite que pueda ser sometida a manipulaciones físicas o químicas, durante el transcurso de las cuales puede ser transferida de un envase a otro. Las preparaciones radiofarmacéuticas entran dentro de esta categoría.

Fecha de vencimiento (ver. *Consideraciones Generales*) - Se establece teniendo en cuenta las propiedades radiactivas del producto y los resultados de estudios de estabilidad de la forma farmacéutica final.

Fecha de elaboración - Fecha en la que ha finalizado el ciclo productivo de la preparación farmacéutica.

Fecha de ensayo - Fecha (y hora en caso de corresponder) en la que es efectivamente realizado el ensayo para radiactividad.

Fecha de calibración - Fecha y hora asignada en forma arbitraria en la que se calcula la radiactividad del producto para conveniencia del usuario.

MEDICION DE RADIATIVIDAD

Uno de los objetivos del control de calidad de las preparaciones radiofarmacéuticas consiste en determinar su actividad y controlar su pureza. Con tal objeto se emplean distintos detectores que basados en que las partículas o radiaciones que con ellos interactúan producen fenómenos que permiten medir la cantidad y eventualmente la energía de las partículas y radiaciones detectadas.

En los detectores se puede emplear la ionización de gases, la formación de pares electrón-vacante positiva en semiconductores o combinación de semiconductores o el fenómeno de centelleo tanto en sólidos como en líquidos. Cada uno de estos detectores tiene sus aplicaciones y posibilidades que deben ser conocidas por el profesional que los emplea. En todos los casos, como resultado de la interacción entre la partícula o radiación con el detector se producirán cargas que pueden hacerse evidentes registrando la actividad mediante pulsos (caídas de tensión sumamente breves) o mediante una diferencia de potencial a la salida del detector. Una u otra forma de registro depende del producto, de la resistencia, R , y de la capacidad, C , acoplada al detector. Cuando el producto RC , denominada constante de tiempo, es menor que el tiempo transcurrido entre la llegada de una partícula o radiación y la próxima, tendremos un circuito diferenciador y se obtiene un pulso por cada partícula o radiación detectada. La magnitud de la

caída de tensión de dicho pulso se denomina altura de pulso y es directamente proporcional a la energía de la partícula o radiación detectada. Es la forma más frecuente de detectar actividades y se emplea cuando la actividad de la muestra es constante durante el tiempo de medición. Cuando esto no es el caso, se aumenta el valor de RC de forma tal de no detectar cada pulso separadamente sino en forma acumulada. Tendremos entonces un circuito integrador, en el que a la salida del detector se genera una diferencia de potencial que es proporcional al número de pulsos por segundo y a la actividad de la muestra. En el caso particular de las cámaras de ionización es posible registrar directamente la intensidad de corriente que circula a través de ella, valor que, una vez llegado a saturación, es proporcional a la actividad de la muestra radiactiva. La pendiente inicial de la curva de intensidad en función de tiempo, $[(di/dt)_{t=0}]$, también es proporcional a dicha actividad.

Independientemente del método de su determinación, el número de pulsos por segundo será proporcional a la actividad. El factor de proporcionalidad es la eficiencia de medición del detector, E , que se expresa en pulsos o cuentas por desintegración.

La eficiencia de medición está determinada esencialmente por la eficiencia intrínseca (la tracción detectada por partícula que entra al volumen sensible del detector), la geometría (la fracción de partículas emitidas que llega al detector), el factor de corrección por el tiempo muerto del detector, el factor de corrección por retrodispersión, el factor de corrección por autoabsorción y autodispersión en la muestra. El tiempo muerto de un detector está relacionado con el tiempo que debe transcurrir luego de la detección de un pulso para que el detector pueda volver a detectar otro pulso. Si durante este tiempo muerto, τ , entra una partícula o radiación al detector éste no la detectará. En este caso se produce una pérdida por coincidencia. Cuanto mayor es τ , más importantes serán las pérdidas por coincidencia. Si se simboliza como n al número de pulsos por segundo corregidos por errores de coincidencia y como m al número de pulsos observado, se verifica que $t = [(1/m) - (1/n)]$. Si se prepara una serie de muestras de actividad creciente es posible determinar experimentalmente el tiempo muerto. Una vez conocido éste, la corrección de la actividad medida observada se realiza con la ecuación siguiente:

$$n = m / (1 - m\tau)$$

La retrodispersión se define como el reenfoque de una partícula o radiación emitida en una dirección que teóricamente no debiera ser detectada a una dirección en la que es detectada. En el caso de las partículas beta este reenfoque se realiza por choque con los electrones de los átomos que componen el soporte de la muestra radiactiva. En el caso de los fotones gamma la retrodispersión de fotones se debe a que generalmente el fotón proveniente del efecto Compton tiene una distribución angular de 180° , o sea es enfocado hacia la fuente emisora de fotones. La autoabsorción y autodispersión se refieren respectivamente a los fenómenos en función de los cuales una partícula o una radiación emitida en una fuente sólida o líquida es absorbida o dispersada por ésta.

Esta somera descripción de los factores que influyen en el número de pulsos registrados por segundo, demuestra que el cálculo teórico de la eficiencia es prácticamente imposible por lo que en general se la determina con *Patrones de referencia* debidamente certificados. En todos los casos, cuando se determina el número de pulsos por segundo bruto de una muestra radiactiva debe restársele el número de pulsos por segundo sin la muestra, denominado fondo. Esta diferencia será el número de pulsos por segundo *neto*. A los efectos de definir las condiciones óptimas de medición, conviene tener en cuenta, además de la eficiencia, un parámetro denominado cifra de mérito, que se define como E^2/fondo .

Las determinaciones de radiactividad varían estadísticamente debido fundamentalmente a la naturaleza aleatoria intrínseca del fenómeno radiactivo. La estadística que sigue la desintegración radiactiva es Binomial, que se aproxima a la de Poisson cuando la probabilidad es muy baja, tal como sucede en las desintegraciones radiactivas. En este caso, la desviación estándar de cada medición es igual a la raíz cuadrada del número de pulsos acumulados. Toda determinación de radiactividad deberá estar acompañada por la clara expresión del error de la determinación, dado por el valor medio ± 2 desviaciones estándar. La determinación repetida del número de pulsos por segundo de una muestra radiactiva dará valores acordes con una distribución normal. Las desviaciones de estos valores de una distribución normal se pueden determinar mediante la prueba del "chi" cuadrado (χ^2), que se emplea frecuentemente para comprobar el funcionamiento correcto de los equipos de detección de radiactividad.

Cámara de ionización - Es un aparato basado en la ionización de gases al que se le aplica un

campo eléctrico moderado a los fines de coleccionar en los electrodos correspondientes los electrones y los iones positivos formados en el fenómeno de ionización. La intensidad de corriente por unidad de actividad es una constante conocida como factor de calibración que es característica para cada nucleído en una cámara de ionización dada. Dicho factor viene determinado por el fabricante y una cámara calibrada en estas condiciones, conocida con el nombre de activímetro, puede emplearse para una determinación aproximada de la actividad de un determinado nucleído. Todo activímetro debe estar calibrado y certificado por la Autoridad Nuclear competente con la periodicidad que ésta determine. La actividad de cada preparación radiofarmacéutica debe ser determinada por el usuario antes de su administración al paciente, razón por la cual todo centro de medicina nuclear debe contar con un activímetro debidamente certificado y controlado con la periodicidad que la Autoridad Nuclear competente determine.

Contadores proporcionales - Son detectores basados en la ionización de gases, cuyo campo eléctrico es mayor que el de la cámara de ionización. Su aplicación rutinaria prácticamente está restringida a los radiocromatógrafos mono y bidimensionales. Estos son instrumentos que permiten la detección y ubicación de una o más zonas radiactivas en un radiocromatograma y además generalmente disponen de un integrador de áreas para determinar la actividad correspondiente a cada zona. Los contadores proporcionales requieren la renovación permanente del gas, que debe secarse previamente y que se ioniza cuando entra una partícula en el volumen sensible del detector, por lo cual se los suele denominar también contador de flujo.

Tubo Geiger Müller - El tubo Geiger Müller también se basa en la ionización de gases pero a diferencia de la cámara de ionización y de los contadores proporcionales, en estos detectores el campo eléctrico es tan alto que se produce la ionización de todo el gas contenido en el tubo detector, por lo que la altura del pulso primario será mayor pero será imposible determinar la naturaleza y energía de las partículas o radiaciones detectadas. Es un detector pequeño, generalmente portátil y que funciona con pilas. El registro de la actividad se realiza en forma auditiva y/o con un instrumento indicador analógico. Se emplea como monitor, es decir que, permite detectar cualitativamente la presencia de material radiactivo en un lugar determinado. Todo laboratorio que emplea material radiactivo debe contar por lo menos con un monitor para realizar este control.

Cristal de centelleo sólido de NaI(Tl).
Espectrometría gamma - Es un detector apto para determinar la actividad de nucleídos que emiten fotones gamma y/o X con buena eficiencia, permitiendo además estimar la energía de dichos fotones con regular precisión. El detector generalmente es un cristal de NaI activado con Talio para acelerar la desexcitación de los electrones del cristal y disminuir así la duración de los pulsos [NaI(Tl)]. En la práctica los fotones gamma emitidos por nucleídos empleados en preparaciones radiofarmacéuticas generalmente interactúan por efecto fotoeléctrico y Compton. 'En el primero el fotón entrega toda su energía a un electrón orbital, arrancándolo de su órbita. Este electrón a su vez excita a los electrones del cristal de centelleo, los que al desexcitarse emiten fotones visibles o del ultravioleta cercano, que inciden en el fotocátodo de un fotomultiplicador que amplifica el electrón primario producido en el fotocátodo. Una vez amplificado el pulso, su altura es proporcional a la energía del fotón gamma incidente. El factor de proporcionalidad depende únicamente de las condiciones electrónicas del espectrómetro y, en condiciones apropiadas, se mantiene constante en función del tiempo. Por lo tanto, la forma del espectro de altura de pulsos y la eficiencia de detección deben mantenerse constantes en función del tiempo. La proporcionalidad entre la altura del pulso debido al efecto fotoeléctrico y la energía del fotón debe controlarse mediante la calibración de energías, realizando un gráfico de la energía de los fotones gamma determinados en función de la base del discriminador en la que se observa la máxima actividad del pico producido por esta interacción. Sin embargo, en dicho pico se integran además los fotones de retrodispersión (ver más abajo), y los fotones de aniquilación cuando el radionucleído emite partículas beta positivas y/o emite fotones de suficiente energía como para formar pares electrón-positrón. Por este motivo el pico producido por todos estos efectos se denomina pico de energía plena (PEP). El mencionado control debe realizarse con la frecuencia establecida por la Autoridad Nuclear pertinente. De la misma manera debe controlarse periódicamente la eficiencia de medición con patrones apropiados y el cumplimiento de la prueba del χ^2 .

Dado que los fotones provenientes de una desintegración dada poseen la misma energía, la altura de los pulsos provenientes de la interacción de los fotones gamma por efecto fotoeléctrico tendrán aproximadamente la misma altura, con una distribución estadística más o menos precisa que depende de varios factores, entre ellos el tamaño del cristal. Estos pulsos provenientes de la interacción

de fotones por efecto fotoeléctrico generalmente forman, junto con lo ya mencionado anteriormente, el PEP, cuyo ancho a mitad de altura se define como resolución. Si dicha resolución es razonable, es posible estimar con alguna precisión la energía de los fotones gamma o X emitidos por el radionucleído.

En la interacción Compton un fotón incide en un electrón, de dicha interacción resulta un fotón de menor energía y diferente dirección de propagación, el electrón adquiere el resto de energía. La energía transferida es variable por lo que los electrones Compton tendrán una distribución continua de energía y el espectro de altura de pulsos también lo será. En el espectro de altura de pulsos aparecerá también un pico de retrodispersión, originado por la interacción Compton del fotón gamma con el entorno. En el caso de los emisores de positrones se observará un efecto fotoeléctrico correspondiente a 511 keV.

La determinación de la altura de los pulsos detectados se puede realizar mediante un discriminador espectrométrico, cuya función consiste en dejar pasar solamente aquellos pulsos cuya altura está comprendida entre un valor base (base del discriminador) y un valor techo. La diferencia de tensión entre la base y el techo del discriminador se denomina ancho de ventana o canal. Cuando este canal es muy pequeño y deja pasar los pulsos cuya altura está comprendida por ej., entre un valor dado y un 1 % del discriminador total, el número de pulsos por segundo registrado en cada canal será un espectro de altura de pulsos y permitirá determinar la ubicación del fotopico, la de la distribución Compton y la del pico de retrodispersión. Sin embargo, cuando el espectrómetro de centelleo sólido se emplea para medir el número de pulsos por segundo en condiciones óptimas de eficiencia, se debe abrir el canal o ventana de forma tal que abarque por ej., la totalidad del pico de energía plena. Otra posibilidad consiste en eliminar el techo y efectuar la determinación con un espectrómetro simple, en cuyo caso, si bien puede aumentar algo la eficiencia, en general suele disminuir la cifra de mérito. La altura de pulsos también se puede analizar con un convertidor analógico digital asociado a un espectrómetro multicanal.

En los casos en que la energía de los fotones de una probable impureza radionucleídica es mucho mayor que la de los fotones del radionucleído de interés, la espectrometría gamma con un cristal de NaI(Tl) permite su detección con una razonable probabilidad.

Detectores de semiconductores - Son detectores de estado sólido para la detección de partículas y

radiaciones pero con una excelente resolución de energías, por ello son insustituibles para la determinación de energías de partículas o radiaciones con la precisión apropiada para establecer fehacientemente la pureza radionucleídica de una muestra radiactiva dada.

Los semiconductores son sustancias como el silicio (Si) o el germanio (Ge), que poseen cuatro electrones en su órbita de valencia. Cuando el átomo integra un sólido cristalino esos electrones poseen una energía intermedia entre la de un metal y un aislante para pasar a la banda de conducción. Si una partícula o una radiación interactúa con un semiconductor se produce su ionización al igual que en el caso de un gas. Sin embargo, dado que los semiconductores son sólidos, la energía que entrega la partícula o radiación arranca electrones de los átomos del semiconductor, los que pasan a la banda de conducción; la energía necesaria para ello es aproximadamente la décima parte de la que se requiere para formar un par de iones en un gas. En la órbita electrónica de los átomos del retículo cristalino de los cuales la partícula o radiación arrancó un electrón, quedará un *agujero* o *vacante* positiva. Los electrones y las *vacantes* se desplazan en un campo eléctrico con la misma velocidad. Por lo tanto el número de pares electrón-agujero positivo es unas diez veces el número de pares de iones formados en gases y además la velocidad de formación de los pulsos es sustancialmente mayor. Por todo ello, la precisión de la proporcionalidad entre la altura del pulso obtenido y la energía de la partícula o radiación incidente es mucho mayor que en la de cualquier otro aparato de detección de radiactividad.

Cierto tipo de detectores de silicio (de ion implantado) permiten determinar las energías de partículas alfa y beta con alta precisión. Otra clase de detectores del mismo semiconductor permite realizar espectrometría de alta resolución de fotones de baja energía (rayos X y gamma hasta 100 keV aproximadamente). Para realizar espectrometría gamma de mayores energías se emplean detectores de GeHP (hiperpuro).

Dado que la energía que requiere el electrón en estos cristales para pasar a la banda de conducción es muy baja, se los debe mantener permanentemente a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, para lo cual están montados sobre una barra de cobre que está sumergida en su mayor extensión en nitrógeno líquido contenido en un crióstato. Cuando se emplean estos detectores es imprescindible conectarlos con un analizador espectrométrico multicanal de varios miles de canales para poder apreciar en el registro la precisión de la respuesta del detector.

Espectrometría de centelleo líquido - Este tipo de detector es fundamentalmente empleado para la determinación de actividades de emisores de partículas beta de energía media o baja y partículas alfa.

En el caso de partículas beta de alta energía es posible emplear como alternativa la determinación de actividad por medición de la radiación de *erenkov* en el mismo espectrómetro. En este último caso es suficiente disolver el radionucleído en agua.

En la espectrometría de centelleo se prepara una solución centelleadora en la que la muestra radiactiva se encuentra en íntimo contacto con un solvente apropiado y uno o más sustancias que tienen la propiedad de emitir fotones cuando se desexcitan luego de una excitación (fluorescencia). La energía de la partícula beta se transfiere al solvente y luego a la o las sustancias centelleadoras, de manera tal que el número de fotones que llega al fotomultiplicador también es proporcional a la energía de la partícula beta que les dio origen. Sin embargo, dado que en este caso la muestra radiactiva y el centelleador forman un conjunto, las eventuales diferencias de las propiedades físicas, químicas o fisicoquímicas en cada una de las muestras analizadas puede variar en forma significativa. Por esta razón debe admitirse que en este tipo de detectores el factor de proporcionalidad entre la altura del pulso y la energía de la partícula beta varía de muestra en muestra. Esto implica que cada muestra tendrá su propio espectro de altura de pulsos y su eficiencia. La eficiencia de la cadena de transferencia de energía de la partícula beta al solvente, a la o las sustancias centelleadoras y finalmente la salida de los fotones del recipiente que contiene la solución centelleadora para incidir en el fotocátodo del fotomultiplicador, puede disminuir por varios factores, como ser, entre otros, la presencia de sustancias químicas, coloreadas o no, la falta de homogeneidad de la solución centelleadora y aún problemas en las paredes del recipiente que contiene la solución centelleadora. Se denomina *quenching* o *extinción* al fenómeno por el cual disminuye la eficiencia de esta cadena de transferencia de energía. Un aumento de *quenching* trae como consecuencia el corrimiento del espectro de altura de pulsos a alturas menores (hacia la izquierda) y una disminución de la eficiencia de medición. Por estos motivos, el resultado de una medición de radiactividad con estos aparatos solamente es válido si se expresa el resultado en Bq.

Determinación de la actividad - La determinación experimental de la actividad con detectores distintos a los ya mencionados en este capítulo puede ser necesaria en los centros de

producción de radioisótopos. Al respecto cabe mencionar que tanto el activímetro como los espectrómetros de centelleo líquido permiten determinar A pero requieren su calibración con patrones debidamente calibrados y certificados.

En general existen dos tipos de métodos para determinar A sin recurrir a patrones previamente calibrados. Uno de ellos es el método de coincidencia, que en general, puede ser beta-gamma o gamma-gamma o aún más complejo y suele requerir aparatos sofisticados y un cabal conocimiento del esquema de desintegración del nucleído en cuestión.

Otro método para determinar la actividad de emisores de partículas cargadas sin recurrir a patrones previamente calibrados es el que hace uso de los detectores 4π , que son dos contadores proporcionales iguales enfrentados y unidos entre sí. La muestra es una microgota de volumen conocido depositada en el centro de la esfera formada por ambos contadores sobre una folia ultradelgada. Dado que la geometría y todos los demás factores que modifican la eficiencia de medición son iguales a 1, la actividad medida expresada en pulsos por segundo será igual al número de partículas emitidas por segundo. Si en la desintegración de un núcleo se emite una sola partícula, dicho resultado será igual a A. El conocimiento del esquema de desintegración es esencial para la aplicación de este método, que es conceptualmente simple pero requiere una considerable habilidad experimental.

CRITERIOS GENERALES PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LAS PREPARACIONES RADIOFARMACEUTICAS

Los ensayos específicos que deben satisfacer cada preparación radiofarmacéutica se describen en la monografía correspondiente. A continuación se describen los ensayos generales.

Pureza radionucleídica - La pureza radionucleídica de una preparación radiofarmacéutica se determina verificando la identidad de todos los radionucleídos presentes y su actividad (A). Esta última debe ser informada para un tiempo determinado, la precisión de esta indicación depende del período de semidesintegración del radionucleído en cuestión, debiendo indicar, día, hora y eventualmente minutos. El método de detección a emplear dependerá del radionucleído a evaluar.

Debido a que cada radionucleído posee su propio período de semidesintegración, la pureza radionucleídica de una preparación radiofarmacéutica dada puede sufrir cambios desde

el momento de su producción. El requerimiento de pureza radionucleídica establecido en cada caso debe cumplirse a lo largo de todo el período de validez de cada preparación radiofarmacéutica. Cuando el período de semidesintegración del radionucleído es muy corto, a menudo resulta difícil o imposible efectuar la determinación de la pureza radionucleídica antes de la liberación de la preparación radiofarmacéutica a los centros de empleo. En este caso, la determinación de esta pureza constituye un valioso control de proceso.

Pureza radioquímica - La determinación de la pureza radioquímica requiere la separación de las diferentes sustancias que contienen el radionucleído y la estimación de la fracción de radiactividad asociada con la sustancia declarada. Las impurezas radioquímicas pueden originarse por uno o más de los siguientes factores: problemas en la producción del radionucleído; problemas en los subsiguientes procedimientos radioquímicos; problemas derivados de defectuosos procedimientos de separación o purificación durante la elaboración de la preparación radiofarmacéutica y la aparición de impurezas radioquímicas durante el almacenamiento de la preparación radiofarmacéutica, especialmente aquéllas debidas a los procesos de autorradiólisis.

El requerimiento de la pureza radioquímica de cada preparación radiofarmacéutica debe mantenerse hasta la fecha de vencimiento del producto. Para su determinación puede emplearse cualquier procedimiento analítico de separación. En la práctica los más usuales son las cromatografías en papel y en placa delgada (ver 100. *Cromatografía*) y eventualmente la electroforesis (ver 300. *Electroforesis*). Debe cuidarse que los pulsos por segundo permitan ser determinados sin cometer errores por coincidencia apreciables. En algunos casos puede ser necesario agregar un portador isotópico. Las posiciones en que se encuentra radiactividad y su intensidad se determinan por autorradiografía y posterior densitometría de la placa revelada con metodología normalizada o por determinación de los pulsos por segundo a lo largo de toda la corrida, mediante un radiocromatógrafo mono o bidimensional con accesorios apropiados. En la práctica se cortan las zonas de interés de acuerdo a posiciones predeterminadas en la puesta a punto del método y se determinan los pulsos por segundo con un detector apropiado. Las relaciones entre los pulsos por segundo determinados provee la relación entre las concentraciones de las distintas sustancias radiactivas que componen la preparación radiofarmacéutica.

Actividad específica y concentración de actividad - El cálculo de la actividad específica puede efectuarse mediante la división de la concentración de actividad por la concentración de la sustancia en cuestión, en tanto la pureza radionucleídica y la pureza radioquímica hayan sido previamente certificadas. La actividad específica y la concentración de actividad cambian en función del tiempo, por lo que deben ser establecidas para un determinado tiempo, especificando la fecha, las horas y minutos, de acuerdo con el período de semidesintegración del radionucleído.

Pureza química - La constatación de la pureza química de la preparación radiofarmacéutica requiere la determinación cuantitativa de cada una de las especies químicas que contiene la preparación y deben ser especificadas en la monografía correspondiente junto con el método que debe emplearse a tal fin.

Controles Físico-Químicos - Además de la determinación de pH, debe controlarse el aspecto físico de un radiofármaco en el momento de la producción, recepción, luego de la marcación (cuando corresponda) y antes de ser administrado.

Se recomienda efectuar la observación directa del producto marcado interponiendo un vidrio plomado o indirectamente a través de un espejo. Cualquier desviación del color y claridad de una solución debe ser analizada, ya que puede reflejar cambios en el radiofármaco que podrían alterar eventualmente su comportamiento biológico.

El tamaño de las partículas coloidales debe determinarse mediante los métodos físicos indicados en cada caso en <290>. *Distribución de tamaño de partículas en polvos*. El control de su número y tamaño en macroagregados y microsferas se efectuará en un microscopio óptico con un ocular micrométrico.

Controles biológicos

a) Biodistribución

Toda preparación radiofarmacéutica que se emplea con fines médicos tanto para estudios diagnósticos como para fines terapéuticos debe localizarse preferentemente en el órgano o sistema cuya forma, función o metabolismo se desea evaluar.

Por ello es imprescindible efectuar un prolijo estudio de biodistribución en el desarrollo de toda preparación radiofarmacéutica.

La monografía correspondiente provee los detalles para la ejecución del estudio y los valores límites que deben cumplirse para cada preparación radiofarmacéutica. Una distribución biológica acorde con los requerimientos, asegurará en principio una distribución de las sustancias radiactivas en el ser humano tal que se concentre

una radiactividad mayor que un cierto mínimo en el órgano blanco y una actividad menor que un cierto máximo en las áreas que no son blanco.

El estudio deberá desarrollarse según: a cada uno de tres animales se les administra por la vía que corresponda la preparación a ensayar. Si es relevante a los fines del estudio, la especie, sexo, cepa y masa y/o edad de los animales se especifican en la monografía correspondiente. La administración de la preparación radiofarmacéutica se realiza igual que en el ser humano. Es conveniente establecer una relación apropiada entre la actividad administrada al animal y al ser humano.

Una vez administrada la preparación se ubica a cada animal en una jaula separada, si es necesario, colectando orina y heces y previniendo la contaminación de la superficie corporal del animal. Una vez transcurrido el tiempo especificado, los animales se sacrifican por un método apropiado, que, en el caso de requerirlo así las especificaciones de la monografía correspondiente, debe permitir recolectar una cantidad suficiente de sangre. Se disecan los órganos y sistemas especificados, se los lava y seca y, si así está establecido se determina su masa para poder calcular la concentración de actividad. Se determina la radiactividad de los órganos y sistemas separados, respetando la geometría de la medición en cada caso. La distribución biológica se calcula según los casos, relacionando la actividad de cada órgano o sistema con la actividad inyectada o con la suma de las actividades de los órganos y del remanente del animal. En algunos casos puede ser conveniente determinar también la concentración de actividad de los órganos.

En general se admite que una preparación radiofarmacéutica cumple con los requisitos de distribución biológica si en dos de los tres animales ensayados se obtienen resultados acordes a los criterios especificados. En las preparaciones radiofarmacéuticas de radionucleídos con período de semidesintegración corto o muy corto, la autorización de liberación de los lotes para su empleo es generalmente realizada antes de la obtención de los resultados del ensayo. En este último caso, el ensayo constituye un control de proceso.

b) Endotoxinas bacterianas o piretógenos.

Para ciertas preparaciones radiofarmacéuticas, se encuentra indicado el ensayo de endotoxinas bacterianas. Este ensayo debe realizarse conforme a lo establecido en <330>. *Ensayo de endotoxinas bacterianas*. El límite de endotoxinas bacterianas para cada preparación se encuentra especificado en la monografía correspondiente.

Si la preparación radiofarmacéutica contiene sustancias que provocan interferencias con este ensayo de tal forma que inhiban o activen la reacción y no resulte posible eliminar dichos factores, será necesario realizar el ensayo de pirogénos, según se establece en <340>. *Ensayo de pirogénos*. El volumen y la actividad que se inyecten al conejo será calculada teniendo en cuenta los valores de volumen y actividad que se inyectan en el humano, ateniéndose a las normas nacionales y/o internacionales de radioprotección.

Cuando el período de semidesintegración del radionucleído presente en la preparación sea corto, la autorización de liberación de los lotes para su empleo es generalmente realizada antes de la obtención de los resultados del ensayo. En este último caso, el ensayo constituye un control de proceso. Se aconseja por lo tanto, comprobar previamente la ausencia de pirogénos en los componentes empleados en las preparaciones radiofarmacéuticas.

c) Toxicidad.

En el desarrollo de una nueva preparación radiofarmacéutica es necesario considerar el balance riesgo-beneficio que resulta de su empleo en seres humanos. Uno de los riesgos está relacionado con la toxicidad. Cuando corresponda, la misma será establecida de acuerdo a las normas fijadas en <360>. *Ensayo de toxicidad anormal* debiendo considerarse el volumen a inyectar determinado en la monografía correspondiente.

Controles microbiológicos-Esterilidad - Las preparaciones radiofarmacéuticas que se administran por vía parenteral deben ser elaboradas empleando precauciones que eliminen la contaminación microbiana y aseguren su esterilidad. El ensayo de esterilidad debe realizarse según lo establecido en <370>. *Ensayo de esterilidad*. No obstante ello, la realización del ensayo de esterilidad de preparaciones radiofarmacéuticas puede presentar dificultades especiales debidas, por ej., al pequeño tamaño de los lotes y a los riesgos de irradiación para el analista.

Por otra parte, y debido a que el período de semidesintegración de la mayoría de los radionucleídos empleados en medicina nuclear es mucho más corto que el tiempo que demanda la finalización del ensayo, no siempre es posible esperar el resultado del mismo antes de autorizar la liberación para uso del lote. El ensayo constituye entonces un control de la elaboración. Por lo expuesto, la validación del proceso de elaboración empleado resulta crítica en estos casos.

Cuando la preparación radiofarmacéutica contenga un agente bacteriostático, la naturaleza y concentración del mismo deben estar especificadas en la monografía correspondiente e indicada en el rótulo del envase.

Rotulado - El envase de la preparación radiofarmacéutica deberá contener, además de lo establecido para rotulado de medicamentos, la siguiente información: volumen, actividad total y/o concentración de actividad con indicación de día y hora, día y hora límite de empleo de la preparación radiofarmacéutica, nombre y concentración del agente bacteriostático o estabilizador agregado, vía de administración, si fuera necesario, especificar cualquier condición especial de almacenamiento y las indicaciones correspondientes a material radiactivo, de acuerdo a las normas pertinentes fijadas por la Autoridad Nuclear competente.

Almacenamiento - Las preparaciones radiofarmacéuticas deben ser almacenadas en envases herméticos, con el blindaje apropiado a las normas de radioprotección nacionales y/o internacionales vigentes. En el caso de preparaciones radiofarmacéuticas con radionucleídos de períodos de semidesintegración medianos o largos, durante su almacenamiento los envases y las soluciones pueden colorearse debido a la radiación emitida.

Período de vida útil - El período de vida útil de una preparación radiofarmacéutica expresado en días, horas, etc., debe estar claramente indicado en el rótulo del envase. Para las preparaciones radiofarmacéuticas marcadas con radionucleídos cuyos períodos de semidesintegración no exceden los 60 días, el intervalo de empleo no puede superar tres períodos de semidesintegración. Para los radionucleídos con períodos de semidesintegración más largos, ese intervalo no debe exceder los 6 meses.

Los factores que determinan estos límites incluyen la disminución de la radiactividad del radionucleído que obliga a administrar una masa mayor de sustancia a medida que transcurre el tiempo.

El período de vida útil de los juegos de reactivos (kits) se determinará de acuerdo a las normas generales establecidas para medicamentos.

Por otra parte, la descomposición por autorradiólisis que depende fuertemente del tiempo y puede alterar la pureza radioquímica de la preparación, juega un papel importante en la fijación de estos límites que serán especificados en la monografía correspondiente.

CIANOCOBALAMINA (⁵⁷Co)

CÁPSULAS

Sinonimia - Vitamina B₁₂ ⁵⁷Co.

Definición - Las Cápsulas de Cianocobalamina (⁵⁷Co) contienen vitamina B₁₂ marcada con cobalto-57. El cobalto-57 es un isótopo radiactivo del cobalto que se obtiene por irradiación del níquel con protones. No menos de 90 por ciento del cobalto-57 debe estar en forma de cianocobalamina. Las Cápsulas de Cianocobalamina deben cumplir con los requisitos para *Cápsulas rígidas* (ver 1050. *Formas Farmacéuticas*), salvo excepción justificada y autorizada. Deben cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Cápsulas de gelatina rígida. El cobalto-57 decae por captura electrónica, emite radiaciones gamma y tiene un período de semidesintegración de 271,8 días.

Sustancia de referencia - Cianocobalamina SR-FA

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos herméticos, en un sitio frío.

ENSAYOS

Identificación

A - Obtener y registrar el espectro de radiaciones gamma mediante un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado. La identificación y cuantificación se llevará a cabo con datos según la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intens. % ⁽¹⁾
Co-57	271,8 d	122,1	85,5
		136,5	10,7

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza radioquímica*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Solución estándar*.

Actividad específica

No menos de 18,5 kBq (0,5 μCi) por μg de cianocobalamina.

Contenido de cianocobalamina

Determinar el contenido en μg por ml de cianocobalamina. Proceder según se indica en *Valoración en Cianocobalamina*.

Disgregación <310>

Deben cumplir con los requisitos, con la excepción de emplear una sola cápsula en lugar de seis.

Uniformidad de contenido

Determinar en no menos de diez Cápsulas de Cianocobalamina, la actividad de cada cápsula con un activímetro debidamente calibrado y en idénticas condiciones geométricas. Calcular la actividad media por cápsula. Ninguna cápsula debe presentar una actividad que difiera en más del 10 % del valor medio. La desviación estándar relativa no debe ser mayor de 3,5 %.

Pureza radionucleídica

Obtener y registrar el espectro de radiaciones gamma empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado. El espectro corresponde al cobalto-57. Determinar las cantidades relativas de cobalto-57, cobalto-56, cobalto-58 y cobalto-60 y de otras impurezas radionucleídicas presentes, cuyos datos nucleares más importantes se indican en la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intens. % ⁽¹⁾
Co-56	77,236 d	511	39,2
		846,8	99,9
		1037,8	14,0
		1238,3	66,4
		1771,3	15,5
		2598,4	17,0
		otros	< 10 c/u
Co-58	70,83 d	511	30,0
		810,8	99,45
		otros	< 1 c/u
Co-60	5,271 a	1173,2	99,85
		1332,5	99,98
		otros	< 0,01 c/u

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

La actividad debida al cobalto-60 no debe ser mayor al 1 % de la radiactividad total y no más de 2 % de la radiactividad es debida al cobalto-58, cobalto-60 y otras impurezas radionucleídicas.

Pureza radioquímica

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 361 nm, un detector gamma ajustado para cobalto-57 y una columna de acero inoxidable de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 μm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Solución reguladora pH 3,5 - Disolver 10 g de fosfato dibásico de sodio en agua, ajustar a pH 3,5 con ácido fosfórico y diluir a 1 litro con agua.

Fase móvil - Solución reguladora pH 3,5 y metanol (74: 26). [NOTA: emplear dentro de los dos días de su preparación].

Solución muestra - Disolver el contenido de una Cápsula de Cianocobalamina en 1,0 ml de agua y dejar reposar durante 10 minutos. Centrifugar a 2.000 rpm durante 10 minutos. Emplear el sobrenadante.

Solución estándar - Transferir 10 mg de Cianocobalamina SR-FA a un matraz aforado de 100 ml, disolver en *Fase móvil* y completar a volumen con el mismo solvente. Transferir 2 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con *Fase móvil*. [NOTA: emplear dentro de la hora de su preparación].

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 μ l) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra* y registrar los cromatogramas durante tres veces el tiempo de retención de cianocobalamina. Determinar las respuestas de los picos empleando el detector gamma y calcular el porcentaje de cobalto-57 en forma de cianocobalamina, por la fórmula siguiente:

$$100(r_M/r_T)$$

en la cual r_M es la respuesta del pico correspondiente a cianocobalamina-Co-57 obtenida a partir de la *Solución muestra* y r_T es el total de las respuestas de los picos en el radiocromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra*. No menos del 90 % de la radiactividad total se encuentra como cianocobalamina-Co-57.

RADIATIVIDAD

La actividad media determinada en *Uniformidad de contenido* no debe ser menor de 90,0 % y no más de 110,0 % de la actividad debida al cobalto-57 declarada en el rótulo.

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

CIANOCOBALAMINA (⁵⁷Co)

SOLUCIÓN

Sinonimia - Vitamina B₁₂ ⁵⁷Co.

Definición - La Solución de Cianocobalamina (⁵⁷Co) es una solución destinada a la administración por vía oral, que contiene vitamina B₁₂ marcada con cobalto-57. El cobalto-57 es un isótopo radiactivo del cobalto que se obtiene por irradiación del níquel con protones. La Solución de Cianocobalamina (⁵⁷Co) debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la actividad, debida al cobalto-57, declarada en el rótulo. No menos del 90 por ciento del cobalto-57 debe estar en forma de cianocobalamina. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Solución límpida, incolora o ligeramente rosada. El cobalto-57 decae por captura electrónica, emite radiaciones gamma y tiene un período de semidesintegración de 271,8 días.

Sustancia de referencia - Cianocobalamina SR-FA.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas.*

ENSAYOS

Identificación

A - Obtener y registrar el espectro de radiaciones gamma empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado. La identificación y cuantificación se llevará a cabo con datos según se indican en *Tabla en Identificación A en Cápsulas de Cianocobalamina (⁵⁷Co).*

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza radioquímica.* El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Solución estándar.*

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 6,0.

Contenido de cianocobalamina

Proceder según se indica en *Valoración en Cianocobalamina.* Determinar el contenido en µg de cianocobalamina por ml.

Pureza radionucleídica

Obtener y registrar el espectro de radiaciones gamma empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado.

El espectro corresponde al cobalto-57. Determinar las cantidades relativas de cobalto-57, cobalto-56, cobalto-58 y cobalto-60 y de otras impurezas radionucleídicas presentes, cuyos datos nucleares más importantes son los descritos en *Tabla en Pureza radionucleídica en Cápsulas de cianocobalamina.*

La actividad debida al cobalto-60 no debe ser mayor al 1 % de la radiactividad total y no más de 2 % de la radiactividad es debida al cobalto-58, cobalto-60 y otras impurezas radionucleídicas.

Pureza radioquímica

Sistema cromatográfico, Solución reguladora pH 3,5, Fase móvil y Solución estándar - Proceder según se indica en *Pureza radioquímica en Cápsulas de Cianocobalamina (⁵⁷Co).*

Solución muestra - Emplear la Solución de Cianocobalamina (⁵⁷Co).

Procedimiento - Proceder según se indica en *Pureza radioquímica en Cápsulas de Cianocobalamina (⁵⁷Co).* Determinar la respuesta de los picos empleando el detector gamma y calcular el porcentaje de cobalto-57 en forma de cianocobalamina, por la fórmula siguiente:

$$100 (r_M/r_T)$$

en la cual los términos son los definidos en la citada monografía. No menos del 90 % de la radiactividad total se encuentra como cianocobalamina-Co-57.

RADIATIVIDAD

Medir la actividad de la Solución de Cianocobalamina empleando un activímetro debidamente calibrado (ver *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas.*)

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas.*

GALIO (⁶⁷Ga), CITRATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Citrato de Galio (⁶⁷Ga) es una solución estéril de galio-67 en forma de citrato de galio isotónica preparada por adición de cloruro de sodio y citrato de sodio. Puede adicionarse un conservante antimicrobiano apropiado. El galio-67 es un isótopo radiactivo del galio obtenido por irradiación con protones de cinc enriquecido en cinc-68. El galio-67 puede separarse del cinc por extracción con solventes o por cromatografía en columna. La Solución Inyectable de Citrato de Galio (⁶⁷Ga) debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la actividad del galio-67 declarada en la fecha y hora establecidas en el rótulo. No menos del 99 por ciento de la actividad corresponde al galio-67 y no menos del 97 por ciento al galio-67 en forma de citrato. El galio-66 no representa más del 0,2 por ciento de la radiactividad total. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora. El galio-67 decae por captura electrónica orbital emitiendo radiaciones gamma, con un período de semidesintegración de 3,261 días.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas.*

ENSAYOS

Identificación

A - Registrar el espectro de las radiaciones gamma empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado. El espectro corresponde al Galio-67, según datos de la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
Ga-67	3,261 d	91,3	3,1
		93,3	37,8
		184,6	20,9
		300,2	16,8
		otros	< 5 c/u

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

B - A 0,2 ml de Solución Inyectable de Citrato de Galio (⁶⁷Ga), agregar 0,2 ml de una solución de

cloruro férrico 1 g por litro y ácido clorhídrico al 0,1 % v/v y mezclar. Comparar el color con el de una solución de alcohol bencílico 9 g por litro y cloruro de sodio 7 g por litro tratada del mismo modo. Solamente debe aparecer coloración amarilla en la solución muestra.

Determinación del pH <250>

Entre 4,5 y 8,0.

Pureza química

Ácido acético diluido - Transferir 12 g de ácido acético glacial a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con agua.

Solución reguladora de acetato pH 4,7 - Disolver 136,1 g de acetato de sodio en 500 ml de agua. Mezclar 250 ml de esta solución con 250 ml de **Ácido acético diluido**. Agitar dos veces con una solución recientemente preparada y filtrada de diti-zona (SR1) en cloroformo de 0,1 g por litro. Agitar con tetracloruro de carbono hasta obtener una fase orgánica incolora. Filtrar la fase acuosa para eliminar las trazas de tetracloruro de carbono.

Solución de diti-zona - Disolver 10 mg de diti-zona en 100 ml de metil etil cetona, dejar en reposo 5 minutos, filtrar e inmediatamente antes de emplear diluir diez veces la solución con metil etil cetona.

Solución estándar de cinc - Disolver en agua una cantidad de sulfato de cinc que corresponda a 0,440 g de ZnSO₄ · 7H₂O, agregar 1 ml de ácido acético y completar a 100 ml con agua. Diluir 1 ml de esta solución a 10 ml con agua. Inmediatamente antes de su uso diluir 1 ml de la solución de cinc a 20 ml con agua.

Determinación de Cinc - A 0,1 ml de la Solución Inyectable de Citrato de Galio (⁶⁷Ga), agregar 0,9 ml de agua, 5 ml de **Solución reguladora de acetato pH 4,7**, 1 ml de una solución de tiosulfato de sodio de 250 g por litros y 5,0 ml de **Solución de diti-zona**. Agitar durante 2 minutos y separar la fase orgánica. Determinar la absorbancia de la fase orgánica a 530 nm (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*). La absorbancia no debe ser mayor a la de la fase orgánica obtenida a partir de 0,1 ml de la **Solución estándar de cinc**.

Pureza radionucleídica

Obtener y registrar el espectro de radiaciones gamma empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado. Determinar las cantidades relativas de galio-67 y galio-66 presentes, cuyos datos nucleares más importantes se indican en la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
Ga-66	9,49 h	511,0	112,1

	833,5	5,9
	1039,2	37
	1918,3	2,0
	2189,6	5,3
	2751,8	22,7
	otros	< 2 c/u

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

La actividad debida al galio-67 no debe ser menor al 99 % de la radiactividad total y no más de 0,2 % de la radiactividad es debida al galio-66.

Pureza radioquímica

Fase estacionaria - Emplear una hoja de papel para cromatografía ascendente en papel (ver 100. *Cromatografía*).

Fase móvil - Disolver 1,36 g de acetato de sodio y 0,58 ml de ácido acético glacial en 100 ml de agua.

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de Citrato de Galio (⁶⁷Ga).

Procedimiento - Aplicar sobre la hoja entre 10 y 20 µl de la *Solución muestra* y desarrollar el cromatograma sin dejar secar. Determinar la distribución de la actividad con un detector apropiado. No menos del 97 % de la actividad total debe presentar un valor de R_f mayor o igual a 0,9, correspondiente al citrato de galio (⁶⁷Ga).

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 175/V UI por ml de la inyección, en la cual V es la dosis máxima recomendada por ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Citrato de Galio (⁶⁷Ga) empleando un activímetro debidamente calibrado. (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

INDIO (^{111}In), CLORURO DE SOLUCIÓN

Definición - La Solución de Cloruro de Indio (^{111}In) es una solución apirógena y estéril en ácido clorhídrico diluido apropiado para el marcado radiactivo de proteínas tales como anticuerpos monoclonales, péptidos o pequeñas moléculas orgánicas biológicamente activas. El indio-111 es un isótopo radiactivo del indio obtenido por irradiación neutrónica del cadmio. La Solución de Cloruro de Indio (^{111}In) debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la actividad declarada del indio-111 con fecha y hora indicada en el rótulo. No menos del 95,0 por ciento de la actividad debe corresponder al indio-111 en forma iónica (III). No más del 0,25 por ciento de la actividad total se debe a otros radionucleidos diferentes al indio-111. La actividad específica no debe ser menor de 1,85 GBq (50 mCi) de indio-111 por μg de indio. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora. El indio-111 posee un período de semidesintegración de 2,8 días y emite radiaciones gamma y rayos X.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Obtener y registrar el espectro de radiaciones gamma y rayos X de la Solución de Cloruro de Indio (^{111}In) empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado (ver *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*). El espectro corresponde al indio-111, según los datos nucleares de la siguiente tabla:

Radio-nucleido	$T_{1/2}$	E_{γ} (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
In-111	2,8049 d	γ 171,3	2,60
		γ 167,5	10,0
		γ 245,4	94,1
		otro	< 1
		X 23,1	68,2
		X 26,3	14,7

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones

B - Examinar el cromatograma obtenido en el ensayo de *Pureza radioquímica* ya que la distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación. El pico principal debe presentar un valor de R_f entre 0,5 y 0,8.

C - Agregar 100 μl de solución de nitrato de plata de 17 g por litro a 50 μl de la Solución de Cloruro de Indio (^{111}In). Se debe formar un precipitado blanco.

Determinación del pH <250>

Entre 1,0 y 2,0.

Pureza química

CADMIO

Determinar el cadmio en la Solución de Cloruro de Indio (^{111}In) en μg por ml mediante espectrometría de absorción atómica empleando un horno de grafito para volatilizar el cadmio. Medir absorbancia a 228,8 nm comparando contra un estándar.

COBRE

Determinar el cobre en la Solución de Cloruro de Indio (^{111}In) en μg por ml mediante espectrometría de absorción atómica empleando un horno de grafito para volatilizar el cobre. Medir la absorbancia a 324,8 nm comparando contra un estándar.

HIERRO

Determinar el hierro en la Solución de Cloruro de Indio (^{111}In) en μg por ml mediante espectrometría de absorción atómica empleando un horno de grafito para volatilizar el hierro. Medir la absorbancia a 248,3 nm comparando contra un estándar.

NÍQUEL

Determinar el níquel en la Solución de Cloruro de Indio (^{111}In) en μg por ml mediante espectrometría de absorción atómica empleando un horno de grafito para volatilizar el níquel. Medir la absorbancia a 232 nm comparando contra un estándar.

PLOMO

Determinar el plomo en la Solución de Cloruro de Indio (^{111}In) en μg por ml mediante espectrometría de absorción atómica empleando un horno de grafito para volatilizar el plomo. Medir la absorbancia a 217 nm comparando contra un estándar.

CINC

Solución estándar A - Preparar una solución de aproximadamente 1 μg de cinc por ml en ácido clorhídrico (1 en 100).

Solución estándar B - Transferir 10 ml de la *Solución estándar A* a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con agua una solución de aproximadamente 0,2 μg de cinc por mililitro.

Solución muestra - Transferir 0,1 ml de la Solución de Cloruro de Indio (^{111}In) a un matraz aforado de 10 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de la *Solución estándar A*, la *Solución estándar B* y la *Solución muestra*, a 213,9 nm con un espectrofotómetro de absorción atómica equipado con lámpara de cinc de cátodo hueco y una llama de aire-acetileno, empleando agua como blanco. Determinar la cantidad de cinc en µg por ml en la Solución de Cloruro de Indio (¹¹¹In).

El contenido total iones metálicos no debe ser mayor de 1,0 µg por ml.

Pureza radionucleídica

Obtener y registrar el espectro de radiaciones gamma y rayos X de la Solución de Cloruro de Indio (¹¹¹In) empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

Determinar las cantidades de indio-110, indio-114m, cinc-65 y de otras impurezas radionucleídicas presentes cuyos datos nucleares más importantes se indican en la siguiente tabla.

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
In-110	4,9 h	γ 641,7	25,9
		γ 657,8	98,3
		γ 707,4	29,5
		γ 884,7	92,9
		γ 937,5	68,4
		γ 997,2	10,5
		otros	< 10 c/u
In-114m	49,51 d	X 23,1	59,2
		X 26,3	11,5
		γ 190,3	15,6
		γ 558,4	3,2
		γ 725,2	3,2
Zn-65	244,01 d	X 24,2	28,0
		X 27,3	5,6
		γ 1115,5	50,2
		γ 511	2,8
		otros	< 1 c/u
		X 8,3	39,5

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones

No más del 0,25 por ciento de la actividad total se debe a la suma de las actividades de las impurezas mencionadas anteriormente.

Pureza radioquímica

Fase estacionaria - Emplear una placa de fibra de vidrio (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía.

Solución muestra - Emplear la Solución de Cloruro de Indio (¹¹¹In) a ensayar.

Fase móvil - Solución de 9,0 g por litro de cloruro de sodio, ajustada a pH 2,30 ± 0,05 con ácido clorhídrico diluido.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa 5 µl de la *Solución muestra*. Desarrollar inmediatamente los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 15 cm de la longitud de la placa y dejar secar. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. El cloruro de Indio-111 presenta un valor de *R_f* entre 0,5 y 0,8. No menos del 95 por ciento de la actividad total del cromatograma corresponde al cloruro de indio-111.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 175/V UI/ml de la inyección, en donde *V* es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de la Solución de Cloruro de Indio (¹¹¹In) empleando un activímetro debidamente calibrado. (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*. En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: "No administrar directamente. Solución sólo apta para marcaciones radiactivas".

INDIO (^{111}In) OXINA

SOLUCIÓN

Definición - La Solución de Indio (^{111}In) Oxina es una solución estéril, apirógena e isotónica apropiada para el marcado radiactivo de células sanguíneas, especialmente leucocitos y plaquetas. Contiene indio-111 en forma de un complejo con 8-hidroxiquinoleína. Puede contener agentes tensioactivos. El indio-111 es un isótopo radiactivo del indio obtenido por irradiación neutrónica del cadmio que puede estar enriquecido con cadmio-111 o con cadmio-112. La solución debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la actividad debida al indio-111 declarada en la fecha y hora indicada en el rótulo. La actividad debida al indio-114m no debe ser mayor de 0,2 por ciento de la actividad total calculada en relación a la fecha y hora de administración. No menos del 90,0 por ciento de la actividad debe corresponder al indio-111 en forma de complejo con 8-hidroxiquinoleína. La solución de cloruro de Indio (^{111}In) utilizada para la preparación de la Solución de Indio (^{111}In) Oxina debe cumplir con los requerimientos de *Cloruro de Indio (^{111}In) Solución*.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora. El indio-111 posee un período de semidesintegración de 2,8 días y emite radiaciones gamma y rayos X.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al ensayo de *Identificación A en Solución de Cloruro de Indio (^{111}In)*.

B - Transferir entre 5 y 10 mg de óxido de magnesio a un envase de vidrio de un diámetro inferior de aproximadamente 20 mm. Agregar 20 μl de la solución en ensayo. Debe presentar fluorescencia de color amarillo fuerte al observar la mezcla a la luz ultravioleta a 365 nm.

C - La distribución de la actividad entre las fases orgánica y acuosa, obtenidas en el ensayo de *Pureza radioquímica*, contribuye a la identificación de la preparación.

Determinación del pH <250>

Entre 6,0 y 7,5.

Pureza radioquímica.

Colocar aproximadamente 100 μl de la Solución de Indio (^{111}In) Oxina, diluir con 3 ml de solución

de 9 g por litro cloruro de sodio en una ampolla de decantación y extraer con 6 ml de *n*-octanol, agitando vigorosamente. Permitir que las fases se separen y luego drenar la fase acuosa inferior en un tubo de conteo con tapón. Drenar la fase orgánica residual en un tubo de conteo similar. Lavar la ampolla con 1 ml de *n*-octanol y drenar este enjuague en el tubo de conteo que contiene la fase orgánica. Lavar la ampolla con 5 ml de ácido clorhídrico 2 N y drenar este enjuague en un tercer tubo de conteo. Tapar y medir la actividad en cada uno de los tres tubos en un contador gamma apropiado o en una cámara de ionización calibrada para in-111. La pureza radioquímica se calcula por la fórmula siguiente:

$$(A/B)$$

en la cual *A* es la actividad medida en la fase orgánica y *B* es la suma de la actividad medida en las soluciones orgánica, acuosa y ácida. La actividad del complejo 8 hidroxiquinolina no debe ser menor de 90,0 por ciento de la actividad total y se encuentra en la fase orgánica.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 175/*V* UI/ ml de la inyección, en donde *V* es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIATIVIDAD

Medir la actividad de la Solución de Indio (^{111}In) Oxina empleando un activímetro debidamente calibrado. (ver *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en Rotulado en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas. En el rótulo debe figurar la siguiente leyenda: "No administrar directamente. Solución sólo apta para marcaciones radiactivas".

INDIO (^{111}In), PENTETATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Pentetato de Indio (^{111}In) es una solución estéril, apirógena e isotónica, apropiada para administración intratecal, que contiene indio-111 en forma de dietilentriaminopentaacetato de indio. El indio-111 es un isótopo radiactivo del indio obtenido por irradiación neutrónica del cadmio que puede estar enriquecido con cadmio-111 o con cadmio-112. La solución debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la actividad debida al indio-111 declarada en la fecha y hora indicada en el rótulo. La actividad debida al indio-114m no debe ser mayor de 0,2 por ciento de la actividad total calculada en relación a la fecha y hora de administración. No menos del 95,0 por ciento de la actividad debe corresponder al indio-111 en forma de complejo con pentetato. La solución de cloruro de Indio (^{111}In) utilizada para la preparación de la Solución de Indio (^{111}In) Pentetato debe cumplir con los requerimientos de *Cloruro de Indio (^{111}In) Solución*.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora. El indio-111 posee un período de semidesintegración de 2,8 días y emite radiaciones gamma y rayos X.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Solución de Cloruro de Indio (^{111}In)*.

B - Examinar el cromatograma obtenido en el ensayo de *Pureza radioquímica*. La distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 8,0.

Pureza química

ÁCIDO DIETILETRIAMINOPENTAACÉTICO NO COMPLEJADO

Mezclar en un microtubo de ensayo 100 μl de la Solución Inyectable de Pentetato de Indio (^{111}In) con 100 μl de una solución recientemente preparada de sal de sodio de azul de hidroxinaftol de 1 g por litro en hidróxido de sodio 1 M. Agregar 50 μl de una solución de cloruro de calcio de 0,15 g por litro.

La solución mantiene su coloración rosa-violeta o vira de azul a rosa violeta (0,4 mg por ml).

Pureza radioquímica.

Fase estacionaria - Emplear una placa de fibra de vidrio (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía activada a 110 °C durante 10 min. Emplear una placa tal que, durante el desarrollo, la *Fase móvil* migre entre 10 y 15 cm en aproximadamente 10 minutos.

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de Pentetato de Indio (^{111}In).

Fase móvil - Solución de 9,0 g por litro de cloruro de sodio.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa entre 5 y 10 μl de la *Solución muestra*. Desarrollar inmediatamente el cromatograma hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente entre 10 y 15 cm de la longitud de la placa y dejar secar. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. El complejo pentetato de indio-111 presenta un valor de *R_f* entre 0,8 y 1,0. No menos del 95,0 por ciento de la actividad total del cromatograma corresponde al complejo pentetato de indio-111.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 175/V UI/ ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Pentetato de Indio (^{111}In) empleando un activímetro debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

***m*-IODOBENCILGUANIDINA (¹³¹I)**

SOLUCIÓN INYECTABLE

Sinonimia - Iobenguano(¹³¹I).

Denominación usual - MIBG¹³¹I.

Definición - La Solución Inyectable de *m*-iodobencilguanidina (¹³¹I) para uso diagnóstico o terapéutico es una solución de 1-[3-(¹³¹I) iodobencil]guanidina o de sus sales. Puede contener una solución reguladora apropiada, un catalizador de marcación adecuado, como cobre iónico y un estabilizante de marcación apropiado, como ácido ascórbico. Puede contener conservantes antimicrobianos. El iodo-131 es un isótopo radiactivo del iodo, obtenido mediante irradiación neutrónica del telurio o por separación a partir de los productos de fisión del uranio-235. La Solución Inyectable de *m*-Iodobencilguanidina debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la actividad debida al iodo-131 declarada con fecha y hora indicadas en el rótulo. El porcentaje de iodo-131 en forma de iobenguano no debe ser menor del 94 por ciento para uso diagnóstico y del 92 por ciento para uso terapéutico. La actividad específica de iodo-131 por gramo de iobenguano base no debe ser menor de 20 GBq (540 mCi) para uso diagnóstico y de 400 GBq (10,8 Ci) para uso terapéutico. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Solución límpida, incolora o ligeramente amarilla. El iodo-131 tiene un período de semidesintegración de 8,023 días. Decae por emisión beta (β^-) de energía máxima principal de 0,606 MeV y emite radiaciones gamma.

Sustancia de referencia - Sulfato de Iobenguano SR-FA.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*. Mantener el producto entre -20 y -40 °C hasta el momento de uso.

ENSAYOS

Identificación

A - Registrar el espectro de emisión de las radiaciones gamma y rayos X empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*). El espectro corresponde al iodo-131, según datos de la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
I-131	8,023 d	80,2	2,61
		284,3	6,06
		364,5	81,2
		637,0	7,26
		722,9	1,80
		otros	< 1 c/u

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza radioquímica* ya que la distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

Determinación del pH <250>

Entre 3,5 y 8,0.

Actividad específica

La actividad específica se calcula a partir de los resultados obtenidos en *Pureza radioquímica*. Determinar el contenido en sulfato de iobenguano a partir de las respuestas de los picos correspondientes al iobenguano en los cromatogramas obtenidos con la *Solución muestra* y la *Solución estándar B*. Calcular la concentración en iobenguano base multiplicando el resultado obtenido en *Radiactividad* por 0,85.

Pureza radionucleídica

Obtener y registrar el espectro de emisión de radiaciones gamma empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado. Determinar las cantidades relativas de iodo-131, iodo-133, iodo-135 y de otras impurezas radionucleídicas presentes, cuyos datos nucleares más importantes se indican en la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
I-133	20,8 h	529,9	87,0
		875,3	4,51
		Otros	< 4 c/u
I-135	6,57 h	526,6 ⁽²⁾	13,3
		546,6	7,15
		1038,8	7,98
		1131,5	22,6
		1260,4	28,7
		1791,2	7,72
Otros	< 7 c/u		

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

⁽²⁾ Del Xe-135m, en equilibrio.

La actividad debida al iodo-131 no debe ser menor al 99,9 % de la radiactividad total y no más del 0,1 % de la actividad total es debida al iodo-133, iodo-135 y otras impurezas radionucleídicas.

Pureza radioquímica

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 254 nm, un detector de radiactividad apropiado y una columna de acero inoxidable de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Metanol, amoníaco diluido y solución de nitrato de amonio de 80 g por litro (27:2:1). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de *m*-Iodobencilguanidina en ensayo.

Solución estándar A - Disolver 100 mg de yoduro de sodio en *Fase móvil* y diluir a 100 ml con el mismo solvente.

Solución estándar B - Disolver 20,0 mg de Sulfato de Iobenguano SR-FA en 50 ml de *Fase móvil* y diluir a 100 ml con el mismo solvente.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µl) de las *Soluciones estándar A y B* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. La actividad total encontrada en el pico correspondiente a la *m*-iodobencilguanidina no debe ser menor de 94 % para uso diagnóstico o de 92 % para uso terapéutico. La actividad correspondiente al yoduro no debe representar más de 5 % de la actividad total y la actividad correspondiente a los otros picos no debe ser mayor al 1 % de la actividad total.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 175/V UI/ml de la inyección, en donde *V* es la dosis máxima recomendada por ml a la fecha de vencimiento.

RADIATIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de *m*-iodobencilguanidina empleando un activímetro debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

SODIO, IODURO (¹²³I) DE SOLUCIÓN

Definición - La Solución de Ioduro (¹²³I) de Sodio es una solución destinada a la administración por vía oral o inyectable, que contiene iodo-123 en forma de ioduro de sodio. Contiene tiosulfato de sodio u otro reductor apropiado y puede agregarse un regulador de pH apropiado a la preparación. El iodo-123 es un isótopo radiactivo del iodo obtenido por irradiación neutrónica del telurio enriquecido en telurio-124 o de xenón enriquecido en xenón-124 o por irradiación con deuterones de telurio enriquecido en telurio-122, de forma tal que resulte libre de portador. La Solución de Ioduro (¹²³I) de Sodio debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la actividad debida al iodo-123 declarada con fecha y hora indicadas en rótulo. No menos del 95 por ciento de la actividad debe corresponder al iodo-123 en forma de ioduro. La actividad específica no debe ser inferior a 185 GBq (5 Ci) de iodo-123 por miligramo de iodo. No más del 0,35 por ciento de la actividad total se debe a otros radionucleidos diferentes del iodo-123. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora. El iodo-123 decae por captura electrónica orbital, emite radiaciones gamma y rayos X. Tiene un período de semidesintegración de 13,2 h.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Obtener y registrar el espectro de las radiaciones gamma y rayos X de la Solución de Ioduro (¹²³I) de Sodio empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado (ver *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*). El espectro corresponde al iodo-123, según datos de la siguiente tabla, considerando la eventual presencia de iodo-125, telurio-121 y otras impurezas radionucleídicas:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
I-123	13,223 h	γ 159,0	83,25
		X 27,2	24,7
		X 27,4	46,0
		X 31,0	13,2
		X 31,8	2,9

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza radioquímica* ya que la distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 10,0.

Pureza radionucleídica.

Obtener y registrar el espectro de radiación gamma empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado. Determinar las cantidades relativas de iodo-125, telurio-121 y otras impurezas radionucleídicas presentes. No se debe detectar ningún radionucleído con un período de semidesintegración mayor que la del iodo-125. Para la determinación del iodo-125, iodo-124, telurio-121 y otras impurezas radionucleídicas, retener la Solución de Ioduro (¹²³I) de Sodio a examinar durante un tiempo suficiente para dejar disminuir la actividad del iodo-123 hasta un nivel que permita la detección de impurezas radionucleídicas (6 a 10 días). Registrar el espectro de las radiaciones gamma y rayos X del material decaído empleando un instrumento apropiado, de acuerdo a los datos de la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intens. % ⁽¹⁾
I-125	59,41 d	γ 35,9	6,67
		X 27,2	39,7
		X 27,4	74,0
		X 31,0	21,2
		X 31,8	4,6
I-124	4,176 d	511,0	45,6
		602,7	62,9
		722,8	10,4
		1691,0	10,9
		otros	< 2 c/u
Te-121	19,16 d	γ 212,2	81,4
		X 27,4	28,8

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

No más del 0,35 % de la actividad total se debe a otros radionucleídos distintos del iodo-123. La Solución de Ioduro (¹²³I) de Sodio puede ser autorizada para su uso antes del finalizar el ensayo.

Pureza radioquímica

Fase estacionaria - Emplear una hoja de papel de 250 mm para cromatografía ascendente en papel (ver *100. Cromatografía*).

Fase móvil - Metanol y agua (30:10).

Diluyente - Preparar una solución de ioduro de potasio de 1 g por litro, iodato de potasio de 2 g por litro y bicarbonato de sodio de 10 g por litro.

Solución muestra - Diluir la Solución de Ioduro (¹²³I) de Sodio en ensayo con agua para obtener en

10 µl una actividad apropiada. Agregar un volumen igual de *Diluyente* y mezclar.

Solución estándar A - Disolver 0,1 g de ioduro de potasio en agua y diluir hasta 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar B - Disolver 0,2 g de iodato de potasio en agua y diluir hasta 10 ml con el mismo solvente.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la hoja 20 µl de la *Solución muestra*, 10 µl de la *Solución estándar A* y 10 µl de la *Solución estándar B*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 20 cm de la longitud de la hoja y dejar secar al aire. Determinar las posiciones de ioduro de potasio e iodato de potasio inactivos, aplicando papeles de filtro impregnados con ácido acético e iodato de potasio en el primer caso y con ácido acético e ioduro de potasio en el segundo. Determinar la distribución de la actividad mediante un detector apropiado. No menos del 95 % de la actividad total en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe a la mancha correspondiente al ioduro y el valor de R_f no debe diferir en más de un 5 % del valor de R_f de la mancha correspondiente al ioduro inactivo en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar A*.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de $175/V$ UI/ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de la Solución de Ioduro (^{123}I) de Sodio con un activímetro debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

SODIO, IODURO (¹³¹I) DE SOLUCIÓN

Definición - La Solución de Ioduro (¹³¹I) de Sodio es una solución destinada a la administración por vía oral o inyectable, que contiene iodo-131 en forma de ioduro de sodio. Contiene también tiosulfato de sodio u otro reductor apropiado y puede contener un regulador de pH apropiado. El iodo-131 es un isótopo radiactivo del iodo obtenido por irradiación neutrónica del telurio o por separación a partir de los productos de fisión del uranio-235. La Solución de Ioduro (¹³¹I) de Sodio debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la actividad debida al iodo-131 declarada con fecha y hora indicadas en el rótulo. No más del 0,1 por ciento de la actividad total debe corresponder a radionucleidos distintos del iodo-131. No menos del 95 por ciento de la actividad debe corresponder al iodo-131 en forma de ioduro. La actividad específica no debe ser menor a 185 GBq (5Ci) de iodo-131 por miligramo de iodo, en la fecha y hora indicadas en el rótulo. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora. El iodo-131 tiene un período de semidesintegración de 8,023 días. Decae por emisión beta (β^-) de energía máxima principal de 0,606 MeV y emite radiaciones gamma.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Registrar el espectro de emisión de las radiaciones gamma y rayos X de la Solución de Ioduro (¹³¹I) de Sodio empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*). El espectro corresponde al iodo-131 según datos de la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
I-131	8,023 d	80,2	2,61
		284,3	6,06
		364,5	81,2
		637,0	7,26
		722,9	1,80
	otros		< 1 c/u

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

B - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Pureza radioquímica* ya que la distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

Determinación del pH <250>

Entre 7,0 y 10,0.

Pureza radionucleídica

Obtener y registrar el espectro de emisión de radiaciones gamma empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado. Determinar las cantidades relativas de iodo-131, iodo-133, iodo-135 y de otras impurezas radionucleídicas presentes, cuyos datos nucleares más importantes se indican en la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
I-133	20,8 h	529,9	87,0
		875,3	4,51
		otros	< 4 c/u
I-135	6,57 h	526,6 ⁽²⁾	13,3
		546,6	7,15
		1038,8	7,98
		1131,5	22,6
		1260,4	28,7
		1791,2	7,72
		otros	< 7 c/u

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

⁽²⁾ Del Xe-135m, en equilibrio.

La actividad debida al iodo-131 no debe ser menor al 99,9 % de la actividad total y no más del 0,1 por ciento de la actividad total es debida al iodo-133, al iodo-135 y a las restantes impurezas radionucleídicas.

Pureza radioquímica.

Fase estacionaria - Emplear una hoja de papel de 250 mm para cromatografía ascendente en papel (ver 100. *Cromatografía*).

Fase móvil - Metanol y agua (30:10).

Diluyente - Preparar una solución de ioduro de potasio de 1 g por litro, iodato de potasio de 2 g por litro y bicarbonato de sodio de 10 g por litro.

Solución muestra - Diluir la Solución de Ioduro (¹³¹I) de Sodio en ensayo con agua para obtener en 10 μ l una actividad apropiada. Agregar un volumen igual de *Diluyente* y mezclar.

Solución estándar A - Disolver 0,1 g de ioduro de potasio en agua y diluir hasta 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar B - Disolver 0,2 g de iodato de potasio en agua y diluir hasta 10 ml con el mismo solvente.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la hoja 20 μ l de la *Solución muestra*, 10 μ l de la *Solución estándar A* y 10 μ l de la *Solución estándar B*.

Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 20 cm de la longitud de la hoja y dejar secar al aire. Determinar las posiciones de yoduro de potasio e iodato de potasio inactivos, aplicando papeles de filtro impregnados con ácido acético e iodato de potasio en el primer caso y con ácido acético e yoduro de potasio en el segundo. Determinar la distribución de la actividad mediante un detector apropiado. No menos del 95 % de la actividad total en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución muestra* se debe a la mancha correspondiente al yoduro y el valor de R_f no debe diferir en más de un 5 % del valor de R_f de la mancha correspondiente al yoduro inactivo en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar A*.

Esterilidad

La solución inyectable de Yoduro (^{131}I) debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de $175/V$ UI/ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de la Solución de Yoduro (^{131}I) de Sodio con un activímetro debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en Rotulado en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

SODIO, PERTECNECIATO (^{99m}Tc) DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Sinonimia - Pertecneciato ácido ($\text{H}^{99m}\text{TcO}_4$), sal sódica. Pertecneciato de sodio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$).

Definición - La Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio obtenido es una solución estéril que contiene tecnecio-99m en forma de ión pertecneciato, isotónica preparada por adición de cloruro de sodio. El tecnecio-99m es un radionucleido que se forma por desintegración del molibdeno-99. El molibdeno-99 es un isótopo radiactivo de molibdeno obtenido a partir de los productos de fisión del uranio o a partir de la irradiación neutrónica de molibdeno enriquecido en molibdeno-98. La Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la actividad debida al tecnecio-99m declarada con fecha y hora indicada en el rótulo. No menos del 95 por ciento de la actividad debe corresponder al tecnecio-99m que se encuentra en forma de ión pertecneciato. La actividad debida a radionucleidos distintos del tecnecio-99m y al tecnecio-99 que resulta de la desintegración del tecnecio-99m no debe ser mayor que la actividad indicada a continuación y se expresa como porcentaje de la actividad total en la fecha y hora de administración.

Molibdeno-99	0,1 por ciento
Iodo-131	$5 \cdot 10^{-3}$ por ciento
Rutenio-103	$5 \cdot 10^{-3}$ por ciento
Estroncio-89	$6 \cdot 10^{-5}$ por ciento
Estroncio-90	$6 \cdot 10^{-6}$ por ciento
Impurezas que emiten radiación alfa	$1 \cdot 10^{-7}$ por ciento
Otras impurezas que emiten radiación gamma	0,01 por ciento

La Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio se obtiene por separación química a partir de una preparación estéril de molibdeno-99, en condiciones asépticas. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora. El tecnecio-99m tiene un período de semi-desintegración de 6,007 horas y emite radiación gamma.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

El espectro gamma obtenido con un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*) debe corresponder al del tecnecio 99-m en cuanto a sus energías e intensidades. El fotón gamma principal del tecnecio-99m tiene una energía de 140,5 keV.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 8,0.

Pureza química

Solución muestra - Diluir 1 ml de la Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio a 2,5 ml con agua.

Determinación de Aluminio - [NOTA: determinar cuando en la obtención de la Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio, la separación se efectúe mediante columna de alúmina]. En un tubo de ensayo de 12 mm de diámetro interno, mezclar 1 ml de solución reguladora de acetato pH 4,6 y 2 ml de la *Solución muestra*. Agregar 50 μl de una solución de cromazurol de 10 g por litro. Luego de 3 minutos el color de la solución no debe ser más intenso que el de una solución de referencia preparada de igual modo empleando 2 ml de solución estándar de aluminio (2 ppm Al) (5 ppm).

Pureza radionucleídica

Ensayo preliminar - Obtener una estimación aproximada, antes de usar la Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio, empleando un volumen de solución de tecnecio-99m que contenga aproximadamente 370 MBq (10 mCi) y determinar su actividad con un activímetro debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*) empleando la escala de tecnecio-99m. Registrar la actividad leída. Medir la actividad de molibdeno-99 en la misma muestra cambiando en el activímetro a la escala de molibdeno-99 y colocando la muestra dentro del blindaje de plomo de 6 mm de espesor requerido para dicha determinación. La actividad de molibdeno-99 no debe mayor al 0,1 % de la actividad de tecnecio-99m obtenida anteriormente.

Ensayo definitivo de pureza diferida - Guardar una muestra de la Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio a examinar durante el tiempo suficiente para que la radiactividad del tecnecio-99m decrezca a un nivel suficientemente bajo que permita la detección de las impurezas radionucleídicas de la muestra a examinar (3 a 5 días). Todas las medidas de actividad deberán referirse a la fecha y hora de la administración.

Obtener el espectro de radiación gamma de la muestra empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución. La identificación y cuantificación se llevará a cabo con datos según la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
Mo-99	65,95 h	181,1	6,91
		366,4	1,19
		739,5	12,1
		777,9	4,28
		otros	< 1 c/u
I-131	8,023 d	80,2	2,61
		284,3	6,06
		364,5	81,2
		637,0	7,26
		722,9	1,80
Ru-103	39,26 d	497,1	91,0
		610,3	5,76
		otros	< 1 c/u

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

Estroncio-89 - Determinar la presencia de estroncio-89 en la Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio a examinar con un instrumento apropiado para la detección de radiaciones beta (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*), por comparación con una solución estándar de estroncio-89. Generalmente es necesario llevar a cabo la separación química del estroncio de modo que el estándar y la muestra puedan ser comparados en el mismo estado físico y químico. El estroncio-89 se desintegra con emisión beta de energía máxima de 1,495 MeV y tiene un período de 50,57 días. No más de 6 . 10⁻⁵ % de la actividad total puede ser debida al estroncio-89.

Estroncio-90 / Itrio-90 - Determinar la presencia de estroncio-90 en la muestra a examinar con un instrumento apropiado para la detección de radiaciones beta. Para distinguir estroncio-90 del estroncio-89, se compara la actividad del itrio-90, nucleido de filiación del estroncio-90, con un estándar de itrio-90 después de la separación química del itrio. Si fuese necesario una separación química previa del estroncio las condiciones del equilibrio radiactivo deben estar aseguradas. El estándar de itrio-90 y la muestra se deben comparar con el mismo estado físico y químico. Estroncio-90 e itrio-90 se deben desintegrar con emisiones de radiación beta de energía máxima de 0,546 MeV y 2,280 MeV, respectivamente y períodos de 28,90 años y 64,05 horas, respectivamente. No más de 6 . 10⁻⁶ % de la actividad total puede ser debida al estroncio-90.

Impurezas que emiten radiaciones alfa - Medir la radiactividad alfa de la Solución Inyectable de

Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio a examinar para detectar cualquier impureza de los radionucleidos que emita radiación alfa que deberán, si es posible, ser identificadas y cuantificadas. El total de radiactividad alfa debida a estas impurezas no debe ser mayor de 1 . 10⁻⁷ % de la actividad total.

Pureza radioquímica

Fase estacionaria - Emplear una hoja de papel para cromatografía ascendente en papel (ver 100. *Cromatografía*).

Fase móvil - Metanol y agua (85:15).

Solución muestra - Diluir la Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio en ensayo con agua para obtener una concentración radiactiva apropiada.

Procedimiento - Aplicar sobre la hoja 5 μl de la Solución muestra. Desarrollar el cromatograma y dejar secar el papel. Determinar la distribución de la actividad con un detector apropiado. No menos del 95 % de la actividad total debe presentar un valor de R_f entre 0,9 y 1,0, correspondiente al ión pertecneciato.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 175/V UI/ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada por ml a la fecha de vencimiento.

RADIATIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio empleando un activímetro debidamente calibrado. (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

TALIO (²⁰¹Tl), CLORURO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Cloruro de Talio (²⁰¹Tl) es una solución estéril de talio-201 en forma de cloruro de talio (I), isotónica preparada por adición de cloruro de sodio. Puede contener una cantidad apropiada de un conservante antimicrobiano. El talio-201 es un isótopo radiactivo de talio que se obtiene a partir de un proceso de desintegración del plomo-201. El plomo-201 es un isótopo radiactivo del plomo que puede ser obtenido por irradiación del talio enriquecido en talio-203, con protones de energía apropiada. La Solución Inyectable de Cloruro de Talio (²⁰¹Tl) debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de un 110,0 por ciento de la actividad debida al talio-201 declarada en la fecha y hora que figura en el rótulo. No menos del 97 por ciento de la actividad total debe corresponder al talio-201 y no menos del 95 por ciento en forma de ión talioso. No más del 2,0 por ciento de la actividad total debe corresponder al talio-202. La actividad específica no debe ser menor de 3,7 GBq (100 mCi), por miligramo de talio. Debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora. El talio-201 tiene un período de semidesintegración de 3,042 días y emite radiaciones gamma y rayos X.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Obtener y registrar el espectro de radiaciones gamma y rayos X empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado (ver *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*). La identificación y cuantificación se llevará a cabo con datos de la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
Tl-201	3,042 d	γ 135,3	2,60
		γ 167,5	10,0
		X 68,9	27,3
		X 70,8	46,4
		X 80,2	15,7
		X 82,5	4,6

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

B - Examinar el electroforegrama obtenido en *Pureza radioquímica* ya que la distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 7,5.

Talio

Mezclar y agitar 0,5 ml de la Solución Inyectable de Cloruro de Talio (²⁰¹Tl) en ensayo con 0,5 ml de ácido clorhídrico de 220 g por litro y 50 μl de agua de bromo. Agregar 0,1 ml de solución de ácido sulfosalicílico de 30 g por litro, luego de producirse la decoloración agregar 1,0 ml de una solución de rodamina B de 1 g por litro, agitar, agregar 4 ml de tolueno y agitar durante 60 segundos. Separar la fase de tolueno, cuya coloración no es más intensa que la de la capa de tolueno de una solución de referencia preparada simultáneamente del mismo modo, empleando 0,5 ml de *Solución estándar de talio (10 ppm Tl)*.

Pureza radionucleídica

Obtener y registrar el espectro de radiaciones gamma y rayos X empleando un sistema de espectrometría gamma de alta resolución debidamente calibrado. El espectro corresponde al talio-201. Determinar las cantidades relativas de talio-200, talio-202, plomo-201 y plomo-203 y de otras impurezas radionucleídicas presentes, cuyos datos nucleares más importantes se indican en la siguiente tabla:

Radio-nucleido	T _{1/2}	E _γ (keV)	Intensidad % ⁽¹⁾
Tl-200	26,1 h	γ 367,9	87,2
		γ 579,3	13,8
		γ 828,3	10,8
		γ 1205,7	29,9
		otros	< 5 c/u
		X 68,9	22,9
		X 70,8	38,6
Tl-202	12,23 d	X 80,2	13,6
		X 82,5	3,2
		γ 439,6	91,4
		X 68,9	22,4
		X 70,8	37,7
Pb-201	9,33 h	X 80,2	8,72
		X 82,5	3,15
		γ 135,3	2,60
		γ 167,5	10,0
		X 70,8	25,2
		X 72,9	42,3
		X 82,5	14,9
Pb-203	51,92 h	X 84,9	3,6
		γ 279,2	80,9

γ 401,3	3,35
X 70,8	44,2
X 72,9	42,3
X 82,5	15,5
X 84,9	3,73

⁽¹⁾ N° de fotones por cada 100 desintegraciones.

La actividad debida al talio-202 no debe ser mayor al 2,0 % de la actividad total, no más del 0,3 % al plomo-203 y no menos de 97,0 % al talio-201.

Pureza radioquímica.

Solución muestra - Mezclar volúmenes iguales de la Solución Inyectable de Cloruro de Talio (²⁰¹Tl) a examinar y de la solución electrolítica.

Procedimiento - Examinar por electroforesis de zona (ver *Electroforesis de zona* en 300. *Electroforesis*) empleando como soporte tiras de acetato de celulosa de 150 mm × 25 mm y una solución electrolítica de edetato de sodio de 18,6 g por litro. Agitar constantemente las tiras en la solución electrolítica entre 45 y 60 minutos, retirarlas mediante pinzas, procurando tocar solamente los bordes externos de las tiras y colocarlas entre dos láminas de papel absorbente para eliminar el exceso de solución. En el centro de la tira, previamente señalado con un punto, aplicar 5 μ l de la *Solución muestra*. Aplicar un campo eléctrico de 17 V por centímetro durante 30 minutos. Dejar secar la tira al aire y determinar la distribución de la actividad utilizando un detector apropiado. No menos del 95,0 % de la actividad debe migrar hacia el cátodo.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 175/V UI/ ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de Solución Inyectable de Cloruro de Talio (²⁰¹Tl) con un activímetro debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

TECNECIO () ALBÚMINA HUMANA SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Tecnecio () Albúmina Humana es una solución estéril, apirógena de *Solución de Albúmina Humana* marcada con tecnecio-99m. Contiene sustancias reductoras, como sales de estaño (II) en una concentración no mayor de 1 mg de estaño por ml. Puede contener una solución reguladora apropiada y un conservante antimicrobiano. Debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la actividad debida al tecnecio-99m declarada con fecha y hora indicada en el rótulo. Debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la cantidad de albúmina declarada en el rótulo. No menos del 80,0 por ciento de la actividad se encuentra asociada a las fracciones de albúmina II a V. No más del 5,0 por ciento de la actividad debida al tecnecio-99m corresponde a pertecneciato libre, según se indica en *Pureza radioquímica*.

Se prepara a partir de la *Solución Inyectable de Pertecneciato () de Sodio* empleando componentes estériles y apirógenos.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora o amarilla pálida.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al *Ensayo de Identificación en Solución Inyectable de Pertecneciato () de Sodio*.

B - Debe responder al *Ensayo de Identificación en Solución de Albúmina Humana*.

Determinación del pH <250>

Entre 2,0 y 6,5.

Pureza química

ALBÚMINA

Solución estándar - Diluir una solución de albúmina humana con una solución de cloruro de sodio de 9 g por litro para obtener una concentración de 5 mg de albúmina por ml.

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de Tecnecio (99mTc) Albúmina Humana.

Procedimiento - Agregar 4,0 ml de reactivo de Biuret a 1,0 ml de la *Solución muestra* y a 1,0 ml de la *Solución estándar* y mezclar. Luego de 30 minutos exactos, medir las absorbancias (ver

470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*) a 540 nm, empleando una solución de cloruro de sodio de 9 g por litro tratada de la misma manera como blanco. Calcular el contenido de albúmina en mg por ml en la Solución Inyectable de Tecnecio (99mTc) Albúmina Humana.

Estaño

No más de 1 mg por ml.

Pureza radioquímica

A - Fase estacionaria - Emplear una placa de fibra de vidrio (ver *100. Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía. Calentar la placa a 110 °C durante 10 minutos. Emplear una placa tal que durante el desarrollo la *Fase móvil* migre entre 10 y 15 cm en 10 minutos.

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de Tecnecio (99mTc) Albúmina Humana.

Fase móvil - Metil etil cetona.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa entre 5 y 10 µl de la *Solución muestra* y dejar secar las aplicaciones. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido entre 10 y 15 cm de la longitud de la placa y dejar secar. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. El complejo de tecnecio-99m albúmina humana permanece en el frente del solvente. No más del 5,0 por ciento de la actividad del tecnecio-99m corresponde al tecnecio en la forma de ión pertecneciato.

B - Examinar por cromatografía de exclusión (ver *100. Cromatografía*).

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de exclusión con un inyector de bucle, un detector de actividad ajustado para tecnecio-99m y una columna de acero inoxidable de 60 cm × 7,5 mm, rellena con gel de sílice para cromatografía de exclusión. El caudal debe ser aproximadamente 0,6 ml por minuto.

Fase móvil concentrada - Disolver 1,124 g de fosfato monobásico de potasio, 4,210 g de fosfato dibásico de sodio, 1,17 g de cloruro de sodio y 0,10 g de azida de sodio en 100 ml de agua.

Fase móvil - Fase móvil concentrada y agua (50:50)

Solución muestra - Mezclar 0,25 ml de la Solución Inyectable de Tecnecio (99mTc) Albúmina Humana con 0,25 ml de *Fase móvil (concentrada)*. [NOTA: emplear inmediatamente después de la dilución]

Procedimiento - Inyectar 200 µl de la *Solución muestra*. Cromatografiar durante al menos 10 minutos después de alcanzar la línea base. Los tiempos de retención son los siguientes:

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Compuestos de alta masa molecular	19-20
Albúmina poli III	23-24
Albúmina poli II	25-27
Albúmina poli I	28-29
Albúmina sérica humana	32-33
Estaño coloidal	40-47
Pertecneciato	48

No menos del 80 por ciento de la actividad aplicada a la columna está asociado a las fracciones II a V de la albúmina.

Biodistribución

Inyectar a tres ratas, con peso entre 150 y 250 g, en una vena adecuada, como puede ser la vena caudal o safena, un volumen de la Solución Inyectable de Tecnecio (^{99m}Tc) Albúmina Humana no mayor de 0,5 ml y que contenga no más de 1,0 mg de albúmina. Medir la actividad en la jeringa antes y después de la inyección. Sacrificar los animales 30 minutos luego de la inyección. Obtener muestras de sangre y pesar. Extirpar el hígado y la cola, esto último si se ha empleado la vena caudal para la inyección.

Medir la actividad en hígado, en la muestra de sangre, en la cola (si corresponde) o en el sitio de inyección, mediante un instrumento apropiado según se indica en *Biodistribución* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*. Determinar el porcentaje de actividad en el hígado, por la fórmula siguiente:

$$100 (A/B)$$

en la cual *A* es la actividad en el órgano en cuestión, *B* es la actividad total, que es equivalente a la diferencia entre las dos medidas realizadas con la jeringa menos la actividad en la cola o en el sitio de inyección.

Calcular la actividad por unidad de masa en la sangre y corregirla multiplicando por el factor $m/200$, en la cual *m* es el peso corporal de la rata, expresada en gramos.

En no menos de dos de las tres ratas, la actividad en el hígado no debe ser mayor de 15,0 por ciento, y la actividad en la sangre, luego de efectuada la corrección, no debe ser menor de 3,5 por ciento.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de $175/V$ UI/ml de la inyección, en donde *V* es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIATIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Pertecneciato () de Sodio empleando un activímetro debidamente calibrado. (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

TECNECIO () AZUFRE COLOIDAL SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Tecnecio () Azufre Coloidal es una dispersión coloidal estéril y apirógena de azufre, en la cual las micelas están marcadas con tecnecio-99m. Puede estar estabilizada con un agente protector de los coloides a base de gelatina. El pH de la solución se puede ajustar mediante la adición de una solución reguladora de acetato, citrato o fosfato. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la actividad debida al tecnecio-99, indicada con fecha y hora en el rótulo. No menos del 92 por ciento de la actividad corresponde al tecnecio-99m que se encuentra en forma coloidal. La solución puede contener una cantidad variable de azufre coloidal según el método de fabricación.

Se prepara a partir de la *Solución Inyectable de Pertecneciato () de Sodio* empleando componentes estériles y apirógenos.

Caracteres Generales - Líquido límpido a opalescente, incoloro o ligeramente amarillo.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al *Ensayo de Identificación en Solución Inyectable de Pertecneciato () de Sodio*.

B - Examinar el cromatograma obtenido en *Pureza radioquímica*. La distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

C - Transferir 0,2 ml de la Solución Inyectable de Tecnecio (99mTc) Azufre Coloidal a un tubo de ensayo de 100 mm de longitud y 16 mm de diámetro interno y evaporar hasta sequedad. Disolver el azufre agitando el residuo con 0,2 ml de piridina y agregar aproximadamente 20 mg de benzoína. Tapar el tubo con un papel de filtro impregnado con solución de acetato de plomo y calentar el tubo de ensayo en un baño de glicerina a 150 °C. El papel debe tornarse de color pardo lentamente.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 7,0

Pureza radioquímica.

Fase estacionaria - Emplear una hoja de papel para cromatografía ascendente en papel (ver 100. *Cromatografía*).

Fase móvil - Solución de 9 g por litro de cloruro de sodio.

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de Tecnecio () Azufre Coloidal.

Procedimiento - Aplicar sobre la hoja 10 µl de la *Solución muestra*. Desarrollar el cromatograma hasta que el frente del solvente haya recorrido entre 10 y 15 cm y dejar secar el papel. Determinar la distribución de la actividad con un detector apropiado. El tecnecio-99m en forma coloidal permanece en el punto inicial, y el ión pertecneciato () migra con un *Rf* de aproximadamente 0,6. Pueden aparecer otras impurezas con valor de *Rf* entre 0,8 y 0,9. La actividad correspondiente al tecnecio-99m en forma coloidal representa no menos del 92 por ciento de la actividad total del cromatograma.

Biodistribución

Inyectar a tres ratones con peso entre 20 y 25 g en la vena caudal, un volumen no mayor de 0,2 ml de la Solución Inyectable de Tecnecio () y Azufre Coloidal. Sacrificar los animales 20 minutos luego de la inyección y extirpar el hígado, el bazo y los pulmones.

Medir la actividad en dichos órganos mediante un instrumento apropiado según se indica en *Biodistribución en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*. Luego de haber eliminado la cola, medir la actividad en el resto del cuerpo y calcular el porcentaje de actividad en el hígado, bazo y pulmones, por la fórmula siguiente:

$$100(A/B)$$

en la cual *A* es la actividad en el órgano en cuestión, *B* es la actividad total del hígado, bazo, pulmones y el resto del cuerpo del animal.

En cada uno de los tres ratones, la actividad en el hígado y bazo no debe ser menor de 80,0 por ciento, y en los pulmones no debe ser mayor de 5,0 por ciento. Si la distribución de la actividad en uno de los tres ratones no es la indicada anteriormente, repetir el ensayo en otros tres ratones.

El ensayo solo es válido si la distribución de la actividad es la indicada en cinco de los seis ratones empleados.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de $175/V$ UI/ ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Tecnecio (^{99m}Tc) Azufre Coloidal empleando un activímetro debidamente calibrado. (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

TECNECIO (^{99m}Tc), GLUCONATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Gluconato de Tecnecio (^{99m}Tc) es una solución estéril y apirógena compuesta por el complejo del tecnecio-99m con gluconato de calcio y una sal de estaño (II) u otro agente reductor. Debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la actividad debida al tecnecio-99m, declarada con fecha y hora indicadas en el rótulo. No menos del 90,0 por ciento de la actividad corresponde al complejo de gluconato de tecnecio-99m.

Se prepara a partir de la *Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio* empleando componentes estériles y apirógenos.

Caracteres Generales - Solución límpida e incolora.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al *Ensayo de Identificación en Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio*.

B - Examinar el cromatograma obtenido en *Pureza radioquímica*. La distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

C - Debe responder al *Ensayo de Identificación B para Gluconato de Calcio*, determinado sobre 5 μl de la solución.

Determinación del pH <250>

Entre 6,0 y 8,5.

Pureza radioquímica

A - Fase estacionaria - Emplear una placa de fibra de vidrio (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía. Calentar la placa a 110 °C durante 10 minutos. Emplear una placa tal que durante el desarrollo la *Fase móvil* migre entre 10 y 15 cm en 10 minutos.

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de Gluconato de Tecnecio (^{99m}Tc).

Fase móvil - Solución de 9 g por litro de cloruro de sodio.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa entre 5 y 10 μl de la *Solución muestra* y dejar secar las aplicaciones. Desarrollar el cromatograma hasta

que el frente del solvente haya recorrido entre 10 y 15 cm de la longitud de la placa y dejar secar. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. Las impurezas en forma coloidal permanecen en el origen. El complejo de Gluconato de Tecnecio (^{99m}Tc) y el ión pertecneciato (^{99m}Tc) migran con un Rf cercano a 1.

B - Fase estacionaria y Solución muestra - Proceder según se indica en Ensayo A en *Pureza radioquímica*.

Fase móvil - Metil etil cetona.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Ensayo A en Pureza radioquímica*. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. La impureza bajo forma de ión pertecneciato (^{99m}Tc) migra con un Rf cercano a 1. El complejo de gluconato de tecnecio (^{99m}Tc) y el tecnecio en forma coloidal permanecen en el origen.

La suma de los porcentajes de actividad debida a las impurezas en los cromatogramas obtenidos en los *Ensayos A y B* no debe ser mayor de 10 por ciento.

Biodistribución

Inyectar a tres ratas, con peso entre 150 y 250 g, en una vena adecuada, como puede ser la vena caudal o safena, un volumen no mayor de 0,2 ml de la Solución Inyectable de Gluconato de Tecnecio (^{99m}Tc). Medir la actividad en la jeringa antes y después de la inyección. Sacrificar las ratas 30 minutos luego de la inyección. Obtener muestras de sangre y pesar. Extirpar los riñones, el hígado y la vejiga (incluida la orina). Extirpar la cola si se ha empleado la vena caudal para la inyección.

Medir la actividad en dichos órganos, en la muestra de sangre, en la cola (de corresponder) o en el sitio de inyección, mediante un instrumento apropiado según se indica en *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

Determinar el porcentaje de actividad en cada órgano, por la fórmula siguiente:

$$100 (A/B)$$

en la cual *A* es la actividad en el órgano en cuestión, *B* es la actividad total, que es equivalente a la diferencia entre las dos medidas realizadas con la jeringa menos la actividad en la cola o en el sitio de inyección.

Calcular la actividad por unidad de masa en la sangre y corregirla multiplicando por el factor $m/200$, en la cual *m* es el corporal de la rata, expresada en gramos.

En no menos de dos de las 3 ratas, la actividad en los riñones no debe ser menor de 15 por ciento, en la vejiga y la orina excretada no debe ser menor de 20 por ciento y en el hígado no debe ser mayor de 5 por ciento. La actividad en la sangre, luego de

efectuada la corrección, no debe ser mayor de 0,5 por ciento.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 175/V UI/ ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIATIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Gluconato de Tecnecio (^{99m}Tc) empleando un activímetro debidamente calibrado. (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

TECNECIO (^{99m}Tc), MACROAGREGADOS DE ALBÚMINA SUSPENSIÓN INYECTABLE

Definición - La Suspensión Inyectable de Macroagregados de Albúmina y Tecnecio (^{99m}Tc) es una suspensión estéril y apirógena de albúmina humana que se presenta en forma de agregados irregulares e insolubles, obtenidos por desnaturalización de la *Solución de Albúmina Humana*, en la cual las partículas están marcadas con tecnecio-99m. Contiene sustancias reductoras, como sales de estaño en una concentración no mayor de 3 mg de estaño por ml. Puede contener una solución reguladora apropiada, así como también albúmina humana no desnaturalizada y un conservante antimicrobiano. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la actividad debida al tecnecio-99m, declarada con fecha y hora indicada en el rótulo. No menos del 90,0 por ciento de la actividad se debe al tecnecio-99m unido a partículas en suspensión, como se evidencia al valorar la actividad de las partículas no filtrables. El diámetro medio de las partículas debe estar comprendido entre 10 y 100 µm. La actividad específica no debe ser menor de 37 MBq de tecnecio-99m por mg de agregado de albúmina, en la fecha y hora de la administración.

Se prepara a partir de la *Solución Inyectable de Pertecneciato* (^{99m}Tc) de Sodio empleando componentes estériles y apirógenos.

Caracteres generales - Suspensión blanquecina que puede decantar con el tiempo cuando está en reposo.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al *Ensayo de Identificación* en *Solución Inyectable de Pertecneciato* (^{99m}Tc) de Sodio.

B - Debe responder al *Ensayo de Identificación* en *Solución de Albúmina Humana*.

C - Los ensayos de *Radiactividad de las partículas no filtrables* y *Tamaño de las partículas* contribuyen a la identificación de la preparación.

Determinación del pH <250>

Entre 3,8 y 8,0.

Radiactividad de las partículas no filtrables

Depositar 0,2 mL de la Suspensión Inyectable de Macroagregados de Tecnecio (^{99m}Tc) y Albúmina sobre una membrana filtrante de diámetro comprendido entre 13 y 25 mm. La membrana está constituida por una película de policarbonato de 10 µm de espesor con poros circulares de 3 µm. Filtrar agregando durante la operación 20 mL de una solución de 9 g por litro de cloruro de sodio y determinar la actividad remanente en el filtro. La actividad de las partículas no filtrables no debe ser menor de 90,0 por ciento de la actividad total de la suspensión inyectable en ensayo.

Tamaño de las partículas

Diluir la Suspensión Inyectable de Macroagregados de Tecnecio (^{99m}Tc) y Albúmina si fuera necesario, de modo que se obtenga una densidad de partículas suficientemente baja como para distinguirlas individualmente. Mediante una jeringa provista de una aguja de diámetro interior no menor de 0,35 mm, transferir un volumen apropiado de la suspensión a una cámara para recuento adecuada, como la cuadrícula de un hemocitómetro, teniendo la precaución de no llenarla demasiado. Dejar en reposo durante un minuto y depositar con precaución un cubreobjetos sin presionar la muestra. Examinar al microscopio efectuando un recuento no menor a 100 partículas. No menos de 90% de las partículas agregadas tienen un diámetro comprendido entre 10 µm y 90 µm y ninguna partícula debe presentar un diámetro mayor a 150 µm.

Concentración de proteínas

Suspensión muestra - Transferir 2,0 mL de la Suspensión Inyectable de Macroagregados de Albúmina y Tecnecio (^{99m}Tc) a un tubo de centrífuga y centrifugar a 2000 rpm aproximadamente durante 5 a 10 min. Decantar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 2,0 ml de una solución de 9 g por litro de cloruro de sodio. Centrifugar nuevamente a 2000 rpm durante 5 a 10 minutos, decantar el sobrenadante y agregar 2,0 ml del mismo solvente.

Solución estándar - Transferir 2,0 ml de una solución que contenga 2,0 mg de albúmina humana por mL en una solución de 9 g por litro de cloruro de sodio.

Procedimiento - Agregar 4,0 mL de reactivo de Biuret a cada tubo de ensayo, mezclar y dejar en reposo durante exactamente 30 minutos para permitir el máximo desarrollo del color. Mezclar nuevamente o calentar moderadamente para disolver por completo la albúmina agregada, si fuera necesario. Determinar las absorbancias de la *Suspensión muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorción, a 540 nm, con un espectrofotómetro apropiado, empleando

una solución de 9 g por litro de cloruro de sodio tratada del mismo modo como blanco. Calcular la cantidad en mg de albúmina agregada por ml de la suspensión inyectable en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$2 \left(\frac{A}{B} \right)$$

en la cual A y B son las absorbancias obtenidas a partir de la *Suspensión muestra* y la *Solución estándar*, respectivamente.

La concentración de proteínas no debe ser mayor de 1 mg de albúmina agregada por 37 MBq (1 mCi) de tecnecio-99m en el momento de la administración.

Estaño

No más de 3 mg por ml-

Biodistribución

Inyectar a tres ratas, con peso entre 150 y 250 g, en una vena adecuada, como puede ser la vena caudal o safena, un volumen no mayor de 0,2 ml de la Suspensión Inyectable de Macroagregados de Albúmina y Tecnecio (^{99m}Tc). Sacrificar los animales 15 minutos después de la inyección. Extirpar el hígado, bazo, pulmones y la cola esto último si se ha empleado la vena caudal para la inyección.

Medir la actividad en el hígado, bazo, pulmones y en la cola (si corresponde) mediante un instrumento apropiado según se indica en *Biodistribución* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*. Determinar el porcentaje de actividad en cada órgano, por la fórmula siguiente:

$$100(A/B)$$

en la cual A es la actividad en el órgano en cuestión, B es la actividad del hígado, bazo, pulmones y resto del cuerpo del animal.

En no menos de dos de las tres ratas, la actividad en los pulmones no debe ser menor de 80,0 por ciento y en hígado y bazo no debe ser mayor de 5,0 por ciento.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de $175/V$ UI/ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Pertecniato (^{99m}Tc) de Sodio empleando un activímetro debidamente calibrado. (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*. Indicar en el rótulo la cantidad de estaño por ml, en el caso de que la preparación lo contenga; que la preparación no debe emplearse si no es homogénea luego de la agitación. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: "Agitar antes de usar"; "Almacenar entre 2 y 8 °C".

TECNECIO (^{99m}Tc), MEDRONATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Sinonimia - Metilendifosfonato (^{99m}Tc).

Denominación usual - MDP

Definición - La Solución Inyectable de Medronato de Tecnecio-99m es una solución estéril y apirógena compuesta por el complejo de tecnecio-99m con metilendifosfonato de sodio y una sal de estaño (II). Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la actividad declarada de tecnecio-99m declarada en la fecha y hora indicada en el rótulo. La actividad presente en otras formas químicas que no sean el complejo medronato de tecnecio-99m no debe ser mayor de 10,0 por ciento de la actividad total. La solución contiene una cantidad de estaño (Sn) que no debe ser mayor de 3 mg por ml. Puede contener conservantes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes y soluciones reguladoras apropiadas. La solución inyectable de medronato de tecnecio (^{99m}Tc) se prepara a partir de la *Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio* y componentes estériles y apirógenos.

Caracteres Generales - Solución límpida e incolora.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al ensayo de *Identificación A en Solución Inyectable de Pertecneciato (^{99m}Tc) de Sodio*.

B - Examinar el cromatograma obtenido en el ensayo de *Pureza radioquímica*. La distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

C - Examinar por cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) utilizando como Solución de referencia una solución de ácido medrónico en cloruro de sodio de forma tal de obtener una concentración de medronato y de cloruro de sodio igual a la solución muestra. La mancha principal en el cromatograma obtenido con la solución muestra es similar en posición y color a la mancha en el cromatograma obtenido con la solución de referencia.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 8,0.

Estaño

No debe contener más de 3 mg por mililitro.

Pureza radioquímica

A - Fase estacionaria - Emplear una placa de fibra de vidrio (ver *100. Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía. Emplear una placa tal que, durante el desarrollo, la *Fase móvil* migre entre 10 y 15 cm en aproximadamente 10 minutos.

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de Medronato de Tecnecio (^{99m}Tc).

Fase móvil - Solución de 9,0 g por litro de cloruro de sodio.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa entre 5 y 10 μl de la *Solución muestra*. Desarrollar inmediatamente los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente entre 10 y 15 cm de la longitud de la placa y dejar secar. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. El tecnecio-99m hidrolizado y el tecnecio-99m en forma coloidal permanecen en el punto de origen. El complejo de medronato de tecnecio-99m y el ión pertecneciato (^{99m}Tc) migran con el frente del solvente.

B - Fase estacionaria y Solución muestra - Proceder según se indica en *A*.

Fase móvil - Metiletilcetona.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa entre 5 y 10 μl de la *Solución muestra* y secar rápidamente. Desarrollar inmediatamente los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente entre 10 y 15 cm de la longitud de la placa y dejar secar al aire. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. El ión pertecneciato (^{99m}Tc) migra con el frente del solvente. El complejo de medronato de tecnecio-99m y el tecnecio-99m en forma coloidal quedan retenidos en el punto de origen.

El porcentaje de actividad correspondiente al ión pertecneciato-99m en el cromatograma obtenido en el ensayo *B* no debe ser mayor de 2,0 % y la suma de los porcentajes de actividad correspondientes a las impurezas en los cromatogramas obtenidos en los ensayos *A* y *B*, incluyendo el ión pertecneciato (^{99m}Tc), no debe ser mayor de 10,0 %.

Biodistribución

Injectar a tres ratas, con peso entre 150 y 250 g, en una vena adecuada, como puede ser la vena caudal o safena, un volumen no mayor de 0,2 ml de la Solución Inyectable de Medronato de Tecnecio (^{99m}Tc), equivalente a no más de 0,05 mg de medronato de sodio. Medir la actividad en la jeringa

antes y después de la inyección. Sacrificar los animales dos horas después de la inyección. Extirpar un fémur, el hígado y muestras de sangre. Pesar la sangre. Extirpar la cola si se ha empleado la vena caudal para la inyección.

Medir la actividad de dichos órganos mediante un instrumento apropiado según se indica *Biodistribución* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*. Determinar el porcentaje de actividad en cada órgano respecto a la actividad total, calculada como la diferencia entre dos medidas de la jeringa, menos la actividad de la cola si la inyección se ha realizado en la vena caudal. Determinar el porcentaje de actividad en cada órgano, por la fórmula siguiente:

$$100(A/B)$$

en la cual *A* es la actividad en el órgano en cuestión, *B* es la actividad total, que equivale a la diferencia entre las dos medidas realizadas en la jeringa, menos la actividad en la cola o en el sitio de inyección. Calcular la actividad por unidad de masa en la sangre y corregirla multiplicando por el factor $m/200$ siendo *m* el peso corporal de la rata, expresada en gramos. En no menos de dos de las tres ratas, la actividad en el fémur no debe ser menor de 1,5 % y no más de 1,0 % se debe encontrar en el hígado. La actividad en la sangre, efectuada la corrección, no debe ser mayor de 0,05 %.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de $175/V$ UI/ ml de la inyección, en donde *V* es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Medronato de Tecnecio (^{99m}Tc) empleando un activímetro debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

TECNECIO (^{99m}Tc), PENTETATO DE SOLUCIÓN INYECTABLE

Denominación usual - DTPA.

Definición - La Solución Inyectable de Pentetato de Tecnecio (^{99m}Tc) es una solución estéril y apirógena compuesta por el complejo del tecnecio-99m con dietilentriaminopentaacetato de sodio (DTPA) o de dietilentriaminopentaacetato trisódico cálcico y una sal de estaño (II). Se prepara a partir de la *Solución Inyectable de Pertechnetato (^{99m}Tc) de Sodio* y componentes estériles y apirógenos. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la actividad debida al tecnecio-99m con fecha y hora indicada en el rótulo. No menos del 90,0 por ciento de la actividad debe corresponder al tecnecio-99m en forma de complejo con pentetato de sodio o con pentetato trisódico cálcico. La solución contiene una cantidad variable de estaño que no debe ser mayor de 1 mg por ml. Puede contener conservantes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes y soluciones reguladoras apropiadas.

Caracteres Generales - Solución transparente, incolora o ligeramente amarilla.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al ensayo de *Identificación A* en *Solución Inyectable de Pertechnetato (^{99m}Tc) de Sodio*.

B - Examinar el cromatograma obtenido en el ensayo de *Pureza radioquímica*. La distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

C - Colocar en un tubo de vidrio de 10 ml limpio y seco, un volumen de la Solución Inyectable de Pentetato de Tecnecio (^{99m}Tc) equivalente a 2 mg de pentetato. Diluir con agua a 1 ml, si fuera necesario. Transferir 1 ml de agua a un segundo tubo (blanco). Agregar a cada tubo 0,1 ml de una solución de 1 g por litro de sulfato de níquel, 0,5 ml de una solución de ácido acético glacial 50 % v/v y 0,75 ml de una solución de 50 g por litro de hidróxido de sodio, mezclar y comprobar que el pH no sea mayor de 5. Agregar a cada tubo 0,1 ml de una solución alcohólica de 10 g por litro de dimetilglioxima. Mezclar y dejar reposar durante 2 minutos.

Ajustar a pH no menor de 12 cada tubo mediante la adición de una solución de 100 g por litro de hidróxido de sodio. Mezclar, comprobar que el pH no es inferior a 12 y dejar reposar durante 2 minutos. Calentar los tubos suavemente en un baño de agua durante 2 minutos. El tubo que contiene la solución en ensayo permanece transparente e incoloro durante toda el procedimiento. La solución correspondiente al blanco se torna de color rojo al adicionar la solución de dimetilglioxima y se produce un precipitado rojo al calentar el tubo en un baño de agua.

Determinación del pH <250>

Entre 4,0 y 7,5.

Estaño

No debe contener más de 1 mg por mililitro.

Pureza radioquímica

A - Fase estacionaria - Emplear una placa de fibra de vidrio (ver 100. *Cromatografía*), recubierta con gel de sílice para cromatografía activada a 110 °C durante 10 minutos. Emplear una placa tal que, durante el desarrollo, la *Fase móvil* migre entre 10 y 15 cm en aproximadamente 10 minutos.

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de Pentetato de Tecnecio (^{99m}Tc).

Fase móvil - Solución de 9,0 g por litro de cloruro de sodio.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa entre 5 y 10 μl de la *Solución muestra*. Desarrollar inmediatamente los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente entre 10 y 15 cm de la longitud de la placa y dejar secar. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. Las impurezas correspondientes a la forma coloidal permanecen en el origen. El complejo de pentetato de tecnecio-99m y el ión pertechnetato (^{99m}Tc) migran con un Rf cercano a 1.

B - Fase estacionaria y Solución muestra - Proceder según se indica en A.

Fase móvil - Metiletiletona.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa entre 5 y 10 μl de la *Solución muestra*. Desarrollar inmediatamente los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente entre 10 y 15 cm de la longitud de la placa y dejar secar. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. El ión pertechnetato (^{99m}Tc) migra con un Rf cercano a 1, el complejo de pentetato de tecnecio-99m e impurezas en estado coloidal permanecen en el origen.

La suma de los porcentajes de actividad correspondientes a las impurezas en los cromatogramas obtenidos en los ensayos A y B no debe ser mayor de 10,0 %.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de $175/V$ UI/ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIOACTIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Pentetato de Tecnecio (^{99m}Tc) empleando un activímetro debidamente calibrado (ver 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en 1110. *Preparaciones radiofarmacéuticas*.

TECNECIO () SUCCÍMERO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Denominación usual - DMSA.

Definición - La Solución Inyectable de Tecnecio () Succímero es una solución estéril de ácido *meso*-2,3-dimercaptosuccínico marcado con tecnecio-99m. Contiene sustancias reductoras, como sales de estaño (II) en una concentración no mayor de 1 mg de estaño por ml. Puede contener estabilizantes, antioxidantes como el ácido ascórbico y aditivos inertes. Debe contener no menos del 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la actividad debida al tecnecio-99m, declarada con fecha y hora indicadas en el rótulo. No menos del 95,0 por ciento de la actividad corresponde al succímero-tecnecio-99m.

Se prepara a partir de la *Solución Inyectable de Pertecneiato () de Sodio* empleando componentes estériles y apirógenos. Las jeringas empleadas para la manipulación del producto final o del líquido de elución destinado al marcaje del producto final no debe contener partes de caucho.

Caracteres generales - Solución límpida e incolora.

CONSERVACIÓN

Proceder según se indica en *Almacenamiento en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

ENSAYOS

Identificación

A - Debe responder al *Ensayo de Identificación en Solución Inyectable de Pertecneiato () de Sodio*.

B - Examinar el cromatograma obtenido en *Pureza radioquímica*. La distribución de la actividad contribuye a la identificación de la preparación.

C - Transferir 1 ml de la Solución Inyectable de Tecnecio () y Succímero a un tubo de ensayo, agregar 1 ml de una solución de 20 g por litro de nitroprusiato de sodio y 0,1 ml de ácido acético glacial. Mezclar y agregar con precaución una capa de amoníaco concentrado. Debe formarse un anillo de color violeta entre las dos capas.

Determinación del pH <250>

Entre 2,3 y 3,5.

Pureza radioquímica

Fase estacionaria - Emplear una placa de fibra de vidrio (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía. Calentar la placa a 110 °C durante 10 minutos.

Emplear una placa tal que durante el desarrollo la *Fase móvil* migre entre 10 y 15 cm en 10 minutos.

Solución muestra - Emplear la Solución Inyectable de Tecnecio () y Succímero.

Fase móvil - Metil etil cetona.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa entre 5 y 10 µl de la *Solución muestra* y dejar secar las aplicaciones. Desarrollar el cromatograma hasta que el frente del solvente haya recorrido entre 10 y 15 cm de la longitud de la placa y dejar secar. Determinar la distribución de la actividad empleando un detector apropiado. El complejo tecnecio-succímero permanece en el origen y el ión pertecneiato () migra con el frente del solvente. La actividad correspondiente al complejo tecnecio-99m-succímero representa no menos del 95,0 por ciento de la actividad total. La actividad correspondiente al ión pertecneiato () representa no más del 2,0 por ciento de la actividad total.

Estaño

No más de 1 mg por ml.

Biodistribución

Inyectar a tres ratas, con peso entre 150 y 250 g, en una vena adecuada, como puede ser la vena caudal o safena, un volumen no mayor de 0,2 ml de la Solución Inyectable de Tecnecio () y Succímero, que contenga no más de 0,1 mg de ácido dimercaptosuccínico. Medir la actividad en la jeringa antes y después de la inyección. Sacrificar los animales una hora luego de la inyección. Extirpar los riñones, hígado, estómago, pulmones y la cola, esto último si se ha empleado la vena caudal para la inyección.

Medir la actividad de dichos órganos mediante un instrumento apropiado según se indica *Biodistribución en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*. Determinar el porcentaje de actividad en cada órgano respecto a la actividad total, calculada como la diferencia entre dos medidas de la jeringa, menos la actividad de la cola si la inyección se ha realizado en la vena caudal.

En al menos dos de las tres ratas la actividad en los riñones no debe ser menor de 40,0 por ciento, en el hígado no debe ser mayor de 10,0 por ciento, en el estómago no mayor de 2,0 por ciento y en los pulmones no mayor de 5,0 por ciento.

Esterilidad

Debe cumplir con los requisitos en *Esterilidad en 1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 175/V UI/ ml de la inyección, en donde V es la dosis máxima recomendada en ml a la fecha de vencimiento.

RADIATIVIDAD

Medir la actividad de la Solución Inyectable de Tecnecio (^{99m}Tc) y Succímero empleando un activímetro debidamente calibrado. (ver *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*).

ROTULADO

Proceder según se indica en *Rotulado* en *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas*.

SUEROS Y VACUNAS

APARTADO DE SUEROS Y VACUNAS

ÍNDICE

Métodos Generales de Análisis

- <335> - Ensayo de Micobacterias
- <336> - Ensayo de Micoplasmas
- <339> - Ensayo de Neurovirulencia para Vacunas a Virus Vivo
- <415> - Ensayo para Agentes Extraños en Vacunas Virales
- <745> - Vacunas de Uso Humano

Textos de Información General

- <1030> - Criaderos de pollos libres de patógenos especificados para la producción y control de calidad de las vacunas
- <1125> - Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano

Monografías

- Vacuna Antigripal, Antígenos de Superficie, Inactivada
- Vacuna Antigripal, Antígenos de Superficie, Inactivada, Virosoma
- Vacuna Antigripal Virus Fraccionados, Inactivada
- Vacuna BCG Liofilizada
- Vacuna contra la Difteria, Adsorbida
- Vacuna contra la Difteria, Adsorbida para adultos y adolescentes
- Vacuna contra el Haemophilus tipo B, Conjugada
- Vacuna contra la Hepatitis A Inactivada Adsorbida
- Vacuna contra la Hepatitis A Inactivada Virosomal
- Vacuna contra la Hepatitis B, ADN Recombinante
- Vacuna contra la Parotiditis, Viva
- Vacuna contra la Pertussis, Adsorbida
- Vacuna contra la Poliomieltis, Inactivada
- Vacuna contra la Poliomieltis Oral
- Vacuna contra la Rubéola, Viva
- Vacuna contra el Sarampión, Viva
- Vacuna contra el Tétanos, Adsorbida
- Vacuna contra la Difteria y el Tétanos, Adsorbida
- Vacuna contra la Difteria y el Tétanos, Adsorbida, para adultos y adolescentes
- Vacuna contra la Difteria, el Tétanos y la Pertussis, Adsorbida
- Vacuna contra el Sarampión, la Parotiditis y la Rubéola Viva

335. ENSAYO DE MICOBACTERIAS

Si la muestra en ensayo puede estar contaminada con otros microorganismos diferentes a micobacterias, tratar la muestra con una solución descontaminante apropiada, como solución de hidróxido de sodio -acetilcisteína o solución de laurilsulfato de sodio.

Inocular 0,2 ml de la muestra por triplicado en dos medios sólidos apropiados (Lôwenstein-Jensen y Middlebrook 7H10). Inocular 0,5 ml de la muestra por triplicado en un medio líquido apropiado. Incubar todos los medios a 37 °C durante 56 días.

Determinar la fertilidad de los medios en presencia de la preparación en ensayo inoculando una cepa adecuada de *Mycobacterium sp*, como BCG y, de ser necesario, usar una solución neutralizante.

Si se produce desarrollo de un microorganismo contaminante durante los primeros 8 días de incubación, repetir el ensayo y realizar al mismo tiempo un ensayo de esterilidad de la muestra.

La preparación cumple con los requisitos si al cabo del periodo de incubación no se desarrolla crecimiento de micobacterias.

336. ENSAYO DE MICOPLASMAS

Cuando se indica para un banco maestro de células, un banco de trabajo de células, un lote de semilla de virus o para controles de células, proceder según se indica en *Método de cultivo* y *Método del indicador en cultivos celulares*. Cuando se indica para cosechas virales, graneles de vacuna o lotes finales de producto proceder según se indica en *Método de cultivo*.

MÉTODO DE CULTIVO

Elección del método de cultivo

Realizar el ensayo usando un número suficiente de medios líquidos y sólidos que asegure el crecimiento en las condiciones de incubación elegidas de un pequeño número de micoplasmas que puede estar presente en el material a ser examinado. Los medios líquidos deben contener rojo fenol. Las propiedades nutritivas de cada nuevo lote de medio se deben verificar usando los siguientes organismos:

Acholeplasma laidlawii: para vacunas a las que se les ha agregado antibiótico durante su producción.

Mycoplasma gallisepticum: cuando se ha usado material de origen aviar durante la elaboración.

Mycoplasma orale: para vacunas de uso humano.

Mycoplasma pneumoniae: para vacunas de uso humano.

Mycoplasma synoviae: para vacunas de uso humano.

Condiciones de incubación

Dividir los medios inoculados en dos porciones iguales e incubar una en condiciones aeróbicas y la otra en condiciones de microaerofilia; para medios sólidos mantener una atmósfera de adecuada humedad para prevenir la evaporación de la superficie. Para medios sólidos en condiciones aeróbicas, incubar en una atmósfera de aire que contenga entre 5 y 10 % de dióxido de carbono. Para medios sólidos en condiciones de microaerofilia incubar en una atmósfera de nitrógeno que contenga entre 5 y 10 % de dióxido de carbono.

Propiedades nutritivas

Realizar la determinación de las propiedades nutritivas para cada nuevo lote de medio. Inocular el medio elegido con el organismo de ensayo correspondiente; usar no más de 100 ufc por placa de 60 mm conteniendo 9 ml de medio sólido y no más de 40 ufc por envase de medio líquido conteniendo 100 ml; usar placas separadas para cada organismo ensayado. Incubar los medios en las

condiciones que serán usadas para el ensayo sobre producto. El medio cumple con el ensayo para propiedades nutritivas si se verifica un apropiado crecimiento del organismo y un apropiado cambio de color del medio líquido.

Sustancias inhibitorias

Realizar el ensayo de propiedades nutritivas en presencia del producto en ensayo. Si el crecimiento del organismo elegido es menor que el encontrado en ausencia del producto, éste contiene sustancias inhibitorias que deben ser neutralizadas antes de realizar el ensayo para micoplasmas. La efectividad de la neutralización u otro proceso debe ser comprobada repitiendo el ensayo para sustancias inhibitorias después de la neutralización.

Ensayo para micoplasmas en el producto a ser examinado

Para medios sólidos usar placas de 60 mm de diámetro conteniendo 9 ml de medio. Inocular 0,2 ml del producto a ser examinado en cada una de por lo menos dos placas de medio sólido. Para medios líquidos inocular 10 ml de producto cada 100 ml de medio. Incubar entre 35 y 38 °C en condiciones de aerobiosis y de microaerofilia, durante 21 días; paralelamente incubar una porción de 100 ml de cada medio sin inocular para usar como control. Si durante el agregado del producto en ensayo se produce cualquier cambio de pH, restaurar el valor de pH del medio de cultivo mediante el agregado de una solución de hidróxido de sodio o de ácido clorhídrico.

Al primero, segundo y tercer día después de la inoculación subcultivar cada cultivo líquido por inoculación de 0,2 ml en cada una de dos placas de cada medio sólido utilizado e incubar entre 35 y 38 °C en aerobiosis y microaerofilia durante no menos de 21 días. Repetir este procedimiento al sexto, séptimo y octavo día y nuevamente a los trece o catorce días de iniciado el ensayo. Observar los medios líquidos cada dos o tres días y si se produce cualquier cambio de color subcultivar inmediatamente. Observar los medios sólidos una vez a la semana.

Si los medios líquidos evidencian contaminación fúngica o bacteriana repetir el ensayo. Si, no antes de los 7 días después de la inoculación, no más de una placa de cada paso del ensayo se contamina con hongos o bacterias o se rompe, esa placa debe ser ignorada si se comprueba por examinación inmediata que no presenta evidencia de crecimiento de micoplasmas. Si, en cualquier paso del ensayo más de una placa se

contamina accidentalmente con hongos o bacterias o se rompe, el ensayo no es válido y debe repetirse.

Incluir en el ensayo controles positivos preparados inoculando no más de 100 ufc de especies como *M. orale* o *M. pneumoniae*.

Al finalizar el periodo de incubación, examinar microscópicamente todos los medios sólidos inoculados para la presencia de micoplasmas. El producto cumple el ensayo si no se produce crecimiento de micoplasmas en todos los medios inoculados. Si se produce crecimiento de micoplasma, el ensayo debe ser repetido una vez usando el doble de la cantidad de inóculo, medios y placas, si no se produce crecimiento de micoplasmas el producto cumple el ensayo. El ensayo es no válido si no se produce crecimiento en los controles positivos.

MÉTODO DEL INDICADOR EN CULTIVO CELULAR

Los cultivos celulares se tiñen con un colorante que se une al ADN. Los micoplasmas se detectan por su patrón particulado o filamentoso de fluorescencia sobre la superficie de la célula y, en los casos de contaminación abundante también en las áreas circundantes.

Verificación del sustrato

Usando un cultivo de células Vero como sustrato, preensayar el procedimiento usando un inóculo de no más de 100 ufc de una cepa que crezca en medio sólido o líquido y desafiar su capacidad para detectar contaminación por micoplasmas tales como *Mycoplasma hyorhinae* y *Mycoplasma orale*. Puede utilizarse un sustrato celular diferente, por ejemplo la línea celular de producción, si se ha demostrado que provee la misma sensibilidad para la detección de potencial contaminación por micoplasmas.

Método

Emplear no más de 1 ml del producto en ensayo para inocular por duplicado un área no menor a 25 cm² del cultivo celular indicador creciendo confluyente. Incluir en el ensayo un control negativo (no infectado) y dos controles positivos de micoplasmas tales como *Mycoplasma hyorhinae* y *Mycoplasma orale*. Usar un inóculo de no más de 100 ufc para los controles positivos.

Si para suspensiones virales la interpretación de los resultados se ve afectada por el efecto

citopático, el virus puede ser neutralizado usando un antisuero específico que no tenga efecto inhibitorio sobre micoplasmas o el sustrato celular y que no permita el crecimiento de los virus. Para demostrar la ausencia de efectos inhibitorios en el suero, llevar a cabo controles positivos en presencia y en ausencia del antisuero.

Procedimiento

Sembrar el cultivo celular a una densidad regular (2×10^4 a 2×10^5 cel/ml o 4×10^3 a $2,5 \times 10^4$ cel/cm²) e incubar a 36 ± 1 °C durante por lo menos 2 días. Inocular el producto en ensayo e incubar durante por lo menos 2 días; realizar no menos de un subcultivo. Permitir el crecimiento del último subcultivo en una superficie apropiada para el procedimiento del ensayo. No permitir que el último subcultivo alcance a ser confluyente ya que esto podría inhibir la tinción e impedir la visualización de los micoplasmas. Descartar el medio. Enjuagar la monocapa con Solución reguladora fosfato salina pH 7,4 luego con una mezcla de iguales volúmenes del mismo solvente y una solución fijadora apropiada y por último con la solución fijadora. Agregar la solución fijadora y dejar reposar durante 10 minutos. Eliminar y descartar la solución fijadora. Si la monocapa va a ser teñida posteriormente, secar completamente y si la monocapa va a ser teñida directamente, eliminar la solución fijadora con dos lavados con agua destilada estéril y descartar el agua. Agregar bisbenzimidida diluida (SR) o cualquier otro colorante para ADN y dejar reposar durante 10 minutos. Eliminar el colorante y lavar la monocapa con agua.

Examinar por epifluorescencia (filtro de excitación a 300 nm/380 nm, filtro barrera LP 440 nm) con un aumento entre 100 y 400 × o mayor. Comparar la apariencia microscópica del cultivo de ensayo con los controles positivos y negativos, examinando la fluorescencia extranuclear. Los micoplasmas se visualizan como puntos o filamentos sobre el citoplasma celular y, en algunos casos en los espacios intercelulares.

El producto a ser examinado cumple con el ensayo si no se exhibe evidencia de la presencia de micoplasmas en los cultivos de ensayo inoculados con el producto. El ensayo sólo es válido si los controles positivos exhiben evidencia de la presencia de micoplasma.

339. ENSAYO DE NEUROVIRULENCIA PARA VACUNAS A VIRUS VIVO

Para cada ensayo, utilizar no menos de diez monos que sean seronegativos para el virus en ensayo. Para cada mono inyectar no más de 0,5 ml de la muestra en ensayo dentro de la región del tálamo de cada hemisferio salvo otro caso indicado. La cantidad total de virus inoculado en cada mono no debe ser menor de la cantidad contenida en la dosis humana simple recomendada de la vacuna. Para verificar la ausencia de virus neurovirulento salvaje, mantener un grupo de no menos de cuatro monos control. Observar los monos inoculados durante 17 a 21 días para síntomas de parálisis y otra evidencia de complicación neurológica, observar los monos control durante 10 días más del mismo período. Los animales que mueran durante las 48 horas después de la inyección son considerados muertos por causas no específicas y pueden ser reemplazados. El ensayo sólo es válido si no más de 20 % de los monos inoculados mueren por causas no específicas y muestras de suero de los monos control tomadas al momento de inoculación de los animales del ensayo y 10 días posteriores a la muerte no muestran signos de infección con virus salvajes del tipo de virus a en ensayo o por virus de sarampión. Al final del período de observación realizar una autopsia y un examen histopatológico de las áreas apropiadas del cerebro para evidencia de complicaciones del sistema nervioso central. La muestra en ensayo cumple con los requisitos si no hay evidencia clínica e histopatológica inesperadas de complicaciones del sistema nervioso central atribuibles al virus inoculado.

ENSAYO PARA LA VACUNA CONTRA LA POLIOMIELITIS ORAL

Los monos utilizados en el ensayo de neurovirulencia deben cumplir con los requisitos de *Vacuna contra la poliomieltis oral* y deben pesar no menos de 1,5 kg. La patogenicidad para monos *Macaca* o *Cercopithecus* es evaluada en comparación con la de la preparación del virus de referencia para neurovirulencia mediante inoculación en la región lumbar del sistema nervioso central luego de la sedación con una sustancia apropiada, por ejemplo hidrocloreuro de ketamina. Una muestra de suero tomada antes de la inyección debe demostrar no contener anticuerpos neutralizantes a una dilución de 1 en 5 cuando se evalúa contra no más de 1.000 CCID₅₀ de cada uno de los tres tipos de poliovirus.

Número de monos

Inocular igual número de animales con la vacuna en ensayo y la preparación de referencia. Distribuir los animales al azar entre los distintos grupos de tratamiento y codificar las cajas y su identidad para que el tratamiento recibido por cada animal sea conciliado por los evaluadores de cada sección. El número de monos inoculados debe ser tal que en la evaluación de la vacuna y de la preparación de referencia, se incluyan no menos de once monos positivos para el virus tipo 1 y tipo 2 y no menos de dieciocho monos positivos para el virus tipo 3 (monos positivos son aquellos que muestran lesiones neuronales específicas del poliovirus en el sistema nervioso central).

Puede ensayarse más de un lote de vacuna con la misma referencia homotípica. Siempre que sea posible deben utilizarse monos del mismo grupo de cuarentena. Si se utilizan monos provenientes de 2 grupos se deben tratar igual número de cada grupo con la vacuna y con la preparación de referencia. Si el ensayo se realiza en 2 días de trabajo, un mismo número de monos de cada grupo debe ser inoculado en cada día con la vacuna y la preparación de referencia homotípica.

Contenido de virus

Ajustar el contenido de virus de la vacuna y el de la preparación homotípica de referencia de manera de estar entre $10^{5.5}$ y $10^{6.5}$ CCID₅₀ por 0,1 ml.

Observaciones

Observar todos los monos durante 17 a 22 días para determinar la presencia de signos de poliomieltis u otras infecciones virales. Realizar una autopsia a aquellos monos que sobreviven las primeras 24 horas pero mueren antes del día 11 después de la inoculación para determinar si la poliomieltis fue la causa de muerte. Los animales que mueren por causas diferentes a la poliomieltis son excluidos para la evaluación. Sacrificar los animales moribundos o aquellos que están severamente paralizados y realizar una autopsia. El ensayo sólo es válido si no más de 20 % de los animales muestra infección recurrente durante el período de observación.

Número de secciones examinadas

Se sugiere la examinación histológica de por lo menos: médula lumbar, médula cervical, bulbo raquídeo inferior y superior, cerebro medio, tálamo y la corteza motora de cada mono.

Cortar las secciones de un espesor de 15 µm y teñidas con galocianina. El mínimo número de secciones examinadas es el siguiente:

1. 12 secciones representativas del engrosamiento lumbar en su totalidad,
2. 10 secciones representativas del engrosamiento cervical en su totalidad,
3. 2 secciones del bulbo raquídeo,
4. 1 sección del puente y cerebelo,
5. 1 sección del cerebro medio,
6. 1 sección del lado izquierdo y otra del lado derecho del tálamo,
7. 1 sección del lado izquierdo y otra del lado derecho de la corteza cerebral.

Puntaje de la actividad viral

Para la evaluación de la actividad del virus en las hemisecciones de la médula espinal y del tallo cerebral se utiliza un sistema de puntaje según la severidad de las lesiones, diferenciándose infiltración celular y destrucción de neuronas según se indica:

1. Solo infiltración celular (el mono no se cuenta como positivo)
2. Infiltración celular con daño neuronal mínimo
3. Infiltración celular con daño neuronal extensivo
4. Daño neuronal masivo con o sin infiltración celular

Los puntajes son registrados en una planilla. Un mono con lesiones neuronales en las secciones pero que no presente tracto de aguja es considerado como positivo. Un mono que presente tracto de aguja en las secciones pero no lesiones específicas del virus no es considerado positivo. Si en una sección se observa daño debido a trauma pero ninguna lesión específica por virus, dicha sección no será incluida en la valoración. La gravedad de las lesiones se basa en la observación de los cortes histológicos lumbar (L), cervical (C) y cerebral (B). El índice de lesión (IL) para cada mono positivo se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$IL = \frac{\left[\frac{\sum L}{N_{hemisecc}^o} \right] + \left[\frac{\sum C}{N_{hemisecc}^o} \right] + \left[\frac{\sum B}{N_{hemisecc}^o} \right]}{3}$$

Calcular el índice de lesión promedio para cada grupo de monos positivos.

Evaluación

La comparación de la actividad del virus en la vacuna y en la preparación de referencia se basa en la actividad existente en el engrosamiento lumbar de la médula y el grado de difusión de la actividad desde esta región hacia el engrosamiento cervical y el cerebro. La vacuna será aceptada o rechazada sobre la base de la valoración total de todos los animales

ensayados. Los animales que presenten individualmente una actividad inusualmente elevada, tanto en la región lumbar o como resultado de la difusión desde dicha región, también son tenidos en cuenta en la evaluación final. El producto a granel filtrado cumple el ensayo si el número de animales requerido es positivo y si en ninguno de los exámenes clínicos e histopatológicos se registra una diferencia significativa entre la patogenicidad del virus de la vacuna y el del material de referencia.

Criterio de aceptación

Realizar un mínimo de cuatro ensayos de neurovirulencia (considerados calificadorios) sobre cada vacuna de referencia (tipos 1, 2 y 3), para obtener datos sobre la actividad de tales vacunas para establecer criterios de aceptabilidad para las vacunas sometidas a ensayo. Calcular el valor medio general de las lesiones M para los ensayos repetidos con cada virus de referencia, junto con una estimación conjunta de la varianza intra-ensayo s^2 y la desviación intra-ensayo s .

Los criterios de validez para los resultados de un ensayo sobre una preparación de referencia se establecen sobre la base de los datos acumulados de los ensayos calificadorios por lo que no es posible dar ningún criterio aplicable de forma general. En laboratorios con experiencia limitada, puede resultar de ayuda el siguiente método empírico para establecer límites aceptables para la media de los índices de lesión para la preparación de referencia X_{ref} :

	Límite inferior	Límite superior
Tipo 1 y 2	$M - s$	$M + s$
Tipo 3	$M - s/2$	$M + s$

Si el valor medio de lesiones para la vacuna en ensayo es X_{test} y C_1 , C_2 y C_3 son constantes determinadas según se indica:

$$C_1 = 2,3 \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

$$C_2 = 2,6 \sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

$$C_3 = 1,6 \sqrt{\frac{2s^2}{N_2}}$$

Siendo N_1 el número de monos positivos por vacuna analizada, N_2 el número de monos positivos en los dos ensayos, 2,3 la desviación normal en el nivel de 1,0 %, 2,6 la desviación normal en el nivel de 0,5 % y 1,6 la desviación normal en el nivel de 5,0 %.

La vacuna no cumple con los requisitos si:

$$X_{test} - X_{ref} > C_1$$

La vacuna puede ser reanalizada una vez si:

$$C_1 < X_{test} - X_{ref} < C_2$$

Si la vacuna es reanalizada, calcular las medias de los puntajes de las lesiones de las vacunas en ensayo y la vacuna de referencia. La vacuna no cumple con los requisitos si:

$$\frac{X_{(test_1 + test_2)} - X_{(ref_1 + ref_2)}}{2} > C_3$$

Un ensayo de neurovirulencia en el cual el puntaje de la lesión media para la referencia X_{ref} no es compatible con la experiencia previa, no debe ser usado para evaluación de una vacuna en ensayo.

El ensayo sólo es válido si el puntaje de la lesión media para la vacuna en ensayo X_{test} es calculada y comparada con una vacuna de referencia homotípica.

415. ENSAYO PARA AGENTES EXTRAÑOS EN VACUNAS VIRALES

En aquellos ensayos que se requiere una neutralización previa del virus, utilizar anticuerpos específicos de origen no humano y no simio. Si el virus ha sido propagado en tejidos de aves los anticuerpos deben ser también de origen no aviar. Para preparar el antisuero utilizando un antígeno inmunizante producido en cultivo celular de una especie diferente de la utilizada para la producción de la vacuna y libre de agentes extraños. Cuando se indica el uso de huevos LPE, los huevos deben ser obtenidos de un criadero libre de patógenos específicos.

LOTE SEMILLA DEL VIRUS

Tomar muestras de los lotes semilla del virus en el momento de la cosecha, si no son utilizadas inmediatamente conservar a una temperatura menor de -40°C .

Ratones adultos

Inocular por lo menos diez ratones adultos entre 15 y 20 g de peso, intracerebralmente con 0,03 ml e intraperitonealmente con 0,5 ml del lote semilla del virus. Observar los ratones por lo menos durante 21 días. Realizar una autopsia a todos los ratones que murieron después de las primeras 24 horas del ensayo o que muestren signos de enfermedad y examinar para evidencia de infección viral, tanto por observación macroscópica directa como por subinoculación de una suspensión de tejido apropiada por rutas intracerebral e intraperitoneal en por lo menos cinco ratones adicionales que son observados durante 21 días. El lote semilla del virus cumple con el ensayo si ningún ratón muestra evidencia de infección atribuible al lote semilla. El ensayo sólo es válido si por lo menos el 80 % de los ratones inoculados originalmente sobreviven el período de observación.

Ratones lactantes

Inocular por lo menos veinte ratones lactantes de menos de 24 horas de edad, intracerebralmente con 0,01 ml e intraperitonealmente con no menos de 0,1 ml del lote semilla del virus. Observar los ratones diariamente por lo menos durante 14 días. Realizar una autopsia a todos los ratones que murieron después de las primeras 24 horas del ensayo o que muestren signos de enfermedad y examinar para evidencia de infección viral, tanto por observación macroscópica directa como por subinoculación de una suspensión de tejido apropiada por rutas intracerebral e intraperitoneal en por lo menos cinco ratones lactantes adicionales

que son observados diariamente por 14 días. El lote semilla del virus cumple con el ensayo si ningún ratón muestra evidencia de infección atribuible al lote semilla. El ensayo sólo es válido si por lo menos el 80 % de los ratones inoculados originalmente sobreviven el período de observación.

Cobayos

Inocular intraperitonealmente, a por lo menos cinco cobayos entre 350 a 450 g de peso, 5,0 ml del lote semilla del virus. Observar los animales por lo menos durante 42 días para ver signos de enfermedad. Realizar una autopsia a todos los cobayos que murieron después de las primeras 24 horas del ensayo o que muestren signos de enfermedad y examinar macroscópicamente y por cultivo para ver evidencia de infección. Matar los animales que sobrevivan al período de observación y examinar de manera similar. El lote semilla del virus cumple con el ensayo si ningún cobayo muestra evidencia de infección atribuible al lote semilla. El ensayo sólo es válido si por lo menos el 80 % de los cobayos sobreviven el período de observación.

LOTE SEMILLA DEL VIRUS Y COSECHAS DEL VIRUS

Tomar muestras en el momento de la cosecha y si no son utilizadas inmediatamente conservar a una temperatura menor de -40°C .

Esterilidad fúngica y bacteriana

Una muestra de 10 ml debe cumplir con los requisitos de 370. *Ensayo de esterilidad*.

Ensayo de micoplasmas <336>

Una muestra de 10 ml debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de micobacterias <335>

Emplear 5 ml de la muestra en ensayo para verificar la ausencia de *Mycobacterium ssp.* por métodos de cultivos que sean sensibles a la detección de estos organismos.

Cultivo celular para otros agentes extraños

Inocular muestras neutralizadas equivalentes a 500 dosis humanas de vacuna o 50 ml, en cultivos continuos de riñón de simio y células humanas. Si el virus crece en células diploides humanas, la cosecha viral neutralizada se debe inocular en un cultivo separado de células diploides. Si el virus de la vacuna es desarrollado en otro sistema celular diferente a simio o humano, debe también

inocularse células de esa especie. Las células son incubadas a 36 ± 1 °C y observadas durante 14 días. El lote de semilla viral o la cosecha cumplen con los requisitos si ninguno de los cultivos celulares muestra evidencia de algún agente extraño no atribuible a una contaminación accidental. El ensayo sólo es válido si por lo menos el 80 % de los cultivos celulares permanecen viables.

Virus aviares

[NOTA: realizar este ensayo solo en virus propagados en tejidos aviares].

Neutralizar una mezcla equivalente a 100 dosis humanas o 10 ml. Inocular 0,5 ml de la muestra en ensayo a sendos huevos de un primer grupo de huevos LPE fertilizados de 9 y 11 días de edad por vía alantoica y un segundo grupo de 5 a 7 días de edad dentro del saco de la yema. Incubar durante 7 días. El lote de semilla viral o la cosecha cumplen el ensayo si los fluidos alantoicos y el saco de la yema no muestran signos de presencia de cualquier agente hemaglutinante y si todos los embriones y las membranas coreoalantoicas examinadas son normales. El ensayo sólo es válido si por lo menos el 80 % de los huevos inoculados sobreviven durante 7 días.

CULTIVO CELULAR DE PRODUCCIÓN

Examinar microscópicamente las células control para verificar la ausencia de cualquier virus causante de efecto citopático a lo largo del tiempo de incubación de los cultivos celulares de producción inoculados o como mínimo 14 días después del momento de inoculación de los frascos de producción. El ensayo sólo es válido si por lo menos el 80 % de los cultivos celulares control sobreviven hasta el final del período de observación. A los 14 días o en el momento de la última cosecha del virus, si el tiempo es mayor, proceder según se indica en *Virus hemadsorbentes*.

Virus hemadsorbentes

Examinar no menos de 25 % de los cultivos control para detectar la presencia de virus hemadsorbentes por adición de glóbulos rojos de cobayo. Las células rojas sanguíneas de cobayo se deben almacenar a 5 ± 3 °C durante no más de 7 días. Examinar la mitad de los cultivos después de la incubación a 5 ± 3 °C durante 30 minutos y la otra mitad después de la incubación entre 20 y 25 °C durante 30 minutos. La muestra cumple con los requisitos si no se encuentra evidencia de la presencia de agentes hemadsorbentes.

Cultivo celular para otros agentes extraños

Mezclar los sobrenadantes fluidos de las células control y examinar para detectar la presencia de agentes extraños por inoculación de cultivos de

células de riñón de simio o humanas. Si el virus de la vacuna desarrolla en un sistema celular deferente al humano o simio, inocular células de esas especies pero de lotes diferentes. En cada sistema celular se deben ensayar al menos 5 ml. Incubar los cultivos inoculados a una temperatura de 36 ± 1 °C y observar por un período de 14 días. La muestra cumple el ensayo si no se encuentra evidencia de la presencia de agentes extraños.

Si la producción de cultivos celulares se mantiene a una temperatura diferente de 36 ± 1 °C realizar un ensayo suplementario para agentes extraños a la temperatura de producción utilizando el mismo tipo de células que la usada para el desarrollo del virus.

Virus de la leucosis aviar

[NOTA: realizar este ensayo solo en virus propagados en tejidos aviares].

Realizar un ensayo para leucosis aviar utilizando 5 ml del fluido sobrenadante de las células control.

HUEVOS CONTROL

Agentes hemaglutinantes

Examinar 0,25 ml del fluido alantoideos de cada huevo para agentes hemaglutinantes por mezcla directa con glóbulos rojos de pollo y después de un pasaje en huevos LPE, realizado por inoculación de una muestra de 5 ml de la mezcla de fluidos alantoideos de los huevos en volúmenes de 0,5ml dentro de la cavidad alantoidea y dentro de la cavidad amniótica de los huevos SPF. Los huevos control cumplen con el ensayo si no se encuentra evidencia de la presencia de agentes hemaglutinantes en ninguno de los ensayos.

Virus de la leucosis aviar

Utilizar una muestra de 10 ml de la mezcla de fluidos amnióticos de los huevos control. Realizar una amplificación mediante cinco pasajes en cultivos celulares de embriones de pollo libres de leucosis. Realizar el ensayo para leucosis aviar utilizando células del quinto pasaje. Los huevos control cumplen con el ensayo si no se encuentra evidencia de la presencia de virus de la leucosis aviar.

Otros agentes extraños

Inocular 5 ml de muestra de las mezclas de fluidos amnióticos de los huevos control en cultivos celulares humanos y de simios. Observar los cultivos celulares durante 14 días. Los huevos control cumplen con el ensayo si no se encuentra evidencia de agentes extraños. El ensayo sólo es válido si por lo menos el 80 % de los cultivos inoculados sobreviven durante 7 días.

745. VACUNAS DE USO HUMANO

Vaccina ad usum humanum

Definición - Las vacunas para uso humano son preparaciones que contienen sustancias antigénicas capaces de inducir en el hombre una inmunidad activa específica contra un agente infeccioso o toxina o antígeno elaborada por el mismo. Las vacunas deben poseer una actividad inmunogénica aceptable demostrada en el hombre para el esquema propuesto.

Las vacunas para uso humano pueden contener: organismos inactivados por medios químicos o físicos que mantengan las propiedades inmunogénicas adecuadas; organismos vivos que son naturalmente no virulentos o que han sido tratados para atenuar su virulencia conservando las propiedades inmunogénicas adecuadas; antígenos extraídos o secretados de organismos o producidos por ingeniería genética. Los antígenos pueden ser utilizados en su estado nativo o detoxificado por medios químicos o físicos y pueden ser agregados, polimerizados o conjugados a un portador para incrementar su inmunogenicidad.

GLOSARIO

Sistema de lote semilla - En un sistema de lote semilla los lotes sucesivos de un producto se derivan del mismo lote semilla maestro. Para la producción de rutina, puede prepararse un lote semilla de trabajo a partir del lote semilla maestro. Debe registrarse el origen y el listado histórico de los pasajes del lote semilla maestro y del de trabajo.

Lote semilla maestro - Cultivo de un microorganismo distribuido desde un único contenedor a envases que se procesan juntos en una misma operación, de tal manera que se asegure la uniformidad y la estabilidad y se evite la contaminación. Un lote semilla maestro normalmente se almacena en forma líquida a una temperatura igual o menor de -70°C o en forma liofilizada a la temperatura necesaria para garantizar su estabilidad.

Lote semilla de trabajo - Cultivo de un microorganismo derivado del lote semilla maestro y destinado a ser utilizado en la producción. Los lotes semilla de trabajo se distribuyen en envases y se conservan como se ha indicado para el lote semilla maestro.

Sistema de banco de células - En un sistema de banco de células, los lotes sucesivos de un producto se fabrican por cultivo en células derivadas de un mismo banco maestro de células. Se usa un número de envases del banco maestro de células para preparar un banco de trabajo de células. Debe validarse el

número mayor de pasajes permitido durante la producción de rutina para el sistema de banco de células.

Banco maestro de células - Cultivo de células distribuido en envases en una única operación, procesado y conservado de tal manera que se evite la contaminación y quede garantizada la uniformidad y la estabilidad. El banco maestro de células se almacena normalmente a una temperatura igual o menor de -70°C .

Banco de trabajo de células - Cultivo de células derivadas del banco maestro de células destinado a la preparación de cultivos celulares para producción. El banco de trabajo de células se distribuye en envases, se procesa y se almacena del modo descrito para el banco maestro de células.

Cultivo primario de células - Cultivo de células obtenido por tripsinación de un tejido u órgano adecuado. Las células son esencialmente idénticas a las del tejido animal de origen y se encuentran en una fase de producción menor a 5 pases *in vitro* desde la preparación inicial a partir del tejido animal.

Línea celular - Cultivo de células que tienen una elevada capacidad de multiplicación *in vitro*. En las líneas de células diploides, las células tienen esencialmente las mismas características que las del tejido animal de origen. En las líneas celulares continuas, las células pueden multiplicarse indefinidamente en cultivo y se pueden obtener de tejidos sanos o tumorales. Algunas líneas celulares continuas pueden presentar potencial actividad oncogénica en ciertas condiciones.

Cultivo celular de producción - Cultivo de células derivado de uno o varios envases del banco de trabajo de células o de células primarias, destinado al uso en la producción.

Células control - Una cantidad de células dejadas aparte, en el momento de la inoculación del virus, como control de células no infectadas. Estas células se someten a incubación en condiciones equivalentes a las usadas para los cultivos celulares de producción.

Cosecha única - Producto derivado en una o más ocasiones de un sólo cultivo celular de producción inoculado con el mismo lote semilla de trabajo o con una suspensión derivada de dicho lote, sometido a incubación y cosechado en una única operación de producción.

Mezcla de cosechas monovalente - Una mezcla de cosechas que contiene una sola cepa o tipo de microorganismo o de antígeno, derivada de huevos,

de cultivos celulares, etc., procesados al mismo tiempo.

Vacuna final a granel - Producto que ha experimentado todos los pasos de fabricación a excepción del envasado final. Consiste en una o más mezclas de cosechas monovalentes, procedentes de cultivos de una o de varias especies o tipos de microorganismos, después de la clarificación, dilución o adición de coadyuvantes o de otras sustancias auxiliares, o tras otras operaciones. Se somete a un tratamiento que asegure su homogeneidad y se utiliza para el llenado de los envases de uno o más lotes finales.

Vacunas bacterianas - Suspensiones de distinto grado de opacidad en líquidos incoloros o casi incoloros. Pueden presentarse también en forma liofilizada. La concentración de bacterias vivas o inactivadas se expresa en términos de unidades de opacidad o, cuando sea apropiado, se determina por conteo directo de células o por conteo de viables para bacterias vivas.

Toxoides bacterianos - Son preparados a partir de toxinas por disminución de su toxicidad a niveles no detectables o por eliminación completa de la misma por procedimientos químicos o físicos manteniendo las propiedades inmunogénicas. Las toxinas son obtenidas a partir de cepas específicas de microorganismos. El método de producción es tal que el toxoide no revierta a toxina. Los toxoides pueden ser líquidos o liofilizados. Pueden ser purificados y adsorbidos. Los toxoides adsorbidos son suspensiones de partículas blancas o grises dispersas en líquido incoloro o amarillo pálido y pueden formar un sedimento en el fondo del envase.

Vacunas virales - Son preparadas a partir de virus desarrollados en animales, en huevos fertilizados, en cultivos celulares adecuados o en tejidos adecuados o por cultivos de células obtenidas por ingeniería genética. Pueden presentarse en forma de líquido de variada opacidad o como liofilizado. Las preparaciones líquidas y liofilizadas luego de la reconstitución pueden ser coloreadas si se ha utilizado en el medio de cultivo un indicador de pH tal como rojo fenol.

Algunas vacunas o sus componentes pueden ser obtenidas a partir de técnicas de biotecnología y deben responder a lo establecido para los productos biotecnológicos.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

Los requisitos para la producción, incluyendo los controles en proceso están incluidos en las monografías individuales.

Salvo casos justificados y autorizados, las vacunas son preparadas utilizando un sistema de lote

semilla. Los métodos de preparación deben ser diseñados de forma de mantener las propiedades inmunogénicas y obtener una preparación inocua libre de contaminación con agentes extraños.

Salvo caso justificado y autorizado, en la producción de un lote final de vacuna el número de pasajes del virus o el número de subcultivos de la bacteria a partir del lote semilla maestro no debe ser mayor al utilizado para la producción de la vacuna usada en ensayos clínicos para demostrar seguridad y eficacia.

Las vacunas deben, hasta donde sea posible, estar libres de ingredientes conocidos que causen reacciones tóxicas, alérgicas u otras reacciones indeseables en el hombre. Pueden ser incorporados aditivos adecuados, incluyendo estabilizantes y adyuvantes. No puede utilizarse penicilina ni estreptomycinina en ninguna etapa de la producción ni pueden ser agregadas al producto final; sin embargo, los lotes semilla maestro preparados con medio conteniendo penicilina o estreptomycinina pueden ser utilizados para la producción cuando se encuentre justificado y autorizado.

Sustrato para la propagación

Las células usadas para la propagación deben cumplir con los requisitos de 1125. *Sustratos Celulares para la Producción de Vacunas de uso Humano*. El procesamiento de los bancos celulares o de subsecuentes cultivos celulares debe realizarse bajo condiciones de asepsia en un área donde no se manipulen otras células. El suero y la tripsina utilizadas en la preparación de suspensiones celulares deben demostrar estar libres de agentes extraños, incluyendo controles para prevenir transmisión de Enfermedades Espongiformes Bovinas.

Lotes semilla

La cepa de bacteria o virus utilizada en el lote semilla maestro debe ser identificada por registros históricos documentados que incluyan información del origen de las cepas y su subsecuente manipulación. Se deben tomar medidas apropiadas para asegurar que no se encuentra presente en el lote semilla otro microorganismo que la cepa semilla.

Medio de cultivo

Debe estar, hasta donde sea posible, libre de ingredientes que causen reacciones tóxicas, alérgicas u otras reacciones indeseables en el hombre; si fuera necesaria la inclusión de estos ingredientes se debe demostrar que la cantidad presente en el lote final es reducida a un nivel tal que resulte en un producto seguro. En el medio de crecimiento para cultivos celulares se puede emplear suero animal aprobado (pero no humano), pero no el medio utilizado para el mantenimiento del crecimiento celular

durante la multiplicación del virus que no debe contener suero, salvo caso indicado. El medio de cultivo celular puede contener un indicador de pH tal como rojo de fenol y antibióticos aprobados a la concentración efectiva más baja, aunque es preferible tener un medio libre de antibióticos durante la producción.

Multiplicación y cosecha

Los cultivos semilla se deben propagar y cosechar bajo condiciones definidas. La pureza de la cosecha se debe verificar por ensayos apropiados según se indica en la monografía individual.

Células control

Los controles celulares para vacunas producidas en cultivos celulares se deben mantener y controlar según se indica en la monografía individual. Para obtener un control válido las células deben ser mantenidas en condiciones que sean rigurosamente idénticas que las utilizadas para la producción de cultivos celulares, incluyendo el uso de los mismos lotes de medio y los cambios de medios.

Huevos control

Para vacunas vivas producidas en huevos, los huevos control deben ser incubados y analizados según se indica en la monografía individual.

Purificación

Donde sean pertinentes, se deben emplear procedimientos de purificación validados.

Inactivación

Las vacunas inactivadas deben ser producidas utilizando procesos de inactivación validados cuyas efectividades y consistencia hayan sido demostradas. Donde haya contaminantes potenciales reconocidos de una cosecha, por ejemplo en vacunas producidas en huevos provenientes de gallinas no libres de patógenos especificados (SPF), el proceso de inactivación también debe estar validado con respecto a potenciales contaminante. El ensayo para inactivación debe ser realizado tan pronto como sea posible después del proceso de inactivación, salvo caso justificado y autorizado.

Estabilidad de productos intermedios

Durante la producción de vacunas, los productos intermedios se obtienen en varias etapas y deben ser almacenados a veces por largos períodos. Algunos de estos productos intermedios incluyen:

- lotes semilla,
- cosechas vivas o inactivadas de cultivos bacterianos o virales,
- cosechas purificadas que pueden consistir en toxinas o toxoides, polisacáridos, suspensiones bacterianas o virales,
- antígenos purificados,

- antígenos adsorbidos,
- polisacáridos conjugados,
- vacuna final a granel,
- vacuna en el envase final cerrado almacenada a una temperatura inferior de la utilizada para los estudios de estabilidad y destinada a ser liberada sin re-análisis.

Excepto cuando se utilicen en un período corto de tiempo, se deben realizar estudios de estabilidad en productos intermedios en las condiciones de almacenamiento propuesta para establecer el grado de degradación.

Para la vacuna final a granel, se pueden realizar estudios de estabilidad en muestras representativas en condiciones equivalentes a las propuestas a ser utilizadas para el almacenamiento. Para cada producto intermedio (excepto para los lotes semilla) se aplica, cuando sea apropiado en base a los estudios de estabilidad, un período de validez para las condiciones propuestas de almacenamiento.

Granel final

El granel final se debe preparar por mezclado de los ingredientes de la vacuna en forma aséptica.

Ayudantes

Las vacunas pueden ser adsorbidas en soportes inertes tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de calcio u otro adyuvante que hayan demostrado ser adecuados para su uso en humanos. El adyuvante se debe preparar en condiciones especiales que le confieran apropiada forma física y propiedades adsorptivas. El desarrollo de nuevos adyuvantes requiere que se cuente con toda la información propia del adyuvante y su comportamiento con el antígeno que se unirá.

Conservantes antimicrobianos

Se utilizan conservantes antimicrobianos para prevenir el deterioro o efectos adversos causados por contaminación microbiana ocurrida durante el uso de la vacuna. Los conservantes antimicrobianos no se incluyen en los productos liofilizados. La inclusión de conservantes antimicrobianos no es aceptada en preparaciones líquidas monodosis. Para las preparaciones líquidas multidosis se evalúa la necesidad de un conservante antimicrobiano teniendo en cuenta la contaminación durante el uso y el período máximo recomendado antes de la apertura por primera vez del envase. Si se utiliza un conservante antimicrobiano se debe demostrar que éste no perjudica la seguridad o eficacia de la vacuna. No es normalmente aceptable el agregado de antibióticos como conservantes antimicrobianos.

Durante los estudios de desarrollo se debe demostrar la efectividad del conservante antimicrobiano seleccionado a lo largo del período de validez

que será autorizado por la Autoridad Sanitaria al momento del registro.

La eficacia del conservante antimicrobiano se evalúa como se indica en *Eficacia en 80. Conservantes*.

Lote final

Para vacunas de administración parenteral se debe preparar el lote final por distribución aséptica del granel final en envases estériles con cierre inviolable, los que luego de la liofilización deben ser cerrados de manera tal de evitar la contaminación.

Para vacunas de administración por una vía no parenteral los lotes finales deben ser preparados por distribución del granel final bajo condiciones apropiadas en envases estériles de cierre inviolable.

Grado de adsorción

Durante el desarrollo de la vacuna adsorbida se evalúa el grado de adsorción como parte del análisis de consistencia o de homogeneidad. Se establece una especificación para el grado de adsorción en base a los resultados encontrados para los lotes utilizados en los ensayos clínicos. A partir de los datos de estabilidad generados para la vacuna se debe demostrar que al final del período de validez el grado de adsorción no debe ser menor que el de los lotes empleados en ensayos clínicos.

Estabilidad

Durante los estudios de desarrollo, se debe demostrar que la potencia del lote final se mantiene a lo largo del período de validez. La pérdida de potencia en las condiciones de almacenamiento recomendadas es evaluada y la pérdida excesiva, incluso dentro de los límites de aceptación de la potencia, puede indicar que la vacuna no es aceptable.

Fecha de vencimiento

Salvo que se establezca, la fecha de vencimiento se calcula a partir del comienzo de la valoración o a partir del comienzo de la primera valoración para una vacuna combinada. Para las vacunas almacenadas a temperatura menor a la utilizada para los estudios de estabilidad y propuestas para la liberación sin re-análisis, la fecha de vencimiento se calcula a partir de la fecha que se retiran del almacenamiento en frío. Si para una vacuna dada, la valoración no se realiza, la fecha de vencimiento se calcula a partir de la fecha de aprobación del ensayo indicador de la estabilidad o, si este faltase, a partir de la fecha de liofilizado, o de la fecha de llenado en el envase final. Para vacunas combinadas, cuando los componentes son presentados en envases separados, la fecha de vencimiento será la del componente que expire primero.

La fecha de vencimiento es aplicada a vacunas almacenadas en las condiciones indicadas.

Ensayos en animales

Para la protección de animales vertebrados utilizados para experimentación y otros propósitos científicos, los ensayos deben ser realizados de manera de utilizar la mínima cantidad de animales y causar el menor sufrimiento, angustia o daño terminal. El criterio para juzgar ensayos en las monografías debe aplicarse en base a estas consideraciones. Por ejemplo, si se indica que un animal es el parámetro para demostrar positividad, infección etc, tan pronto cuando ocurran los signos clínicos típicos o la muerte y se obtiene la indicación suficiente de los resultados positivos, el animal en cuestión debe ser destruido humanamente o darle el tratamiento adecuado para prevenir el sufrimiento innecesario. Pueden utilizarse métodos de ensayos alternativos para demostrar cumplimiento con la monografía y el uso de dichos ensayos es particularmente estimulado cuando lleva al reemplazo o reducción de animales utilizados o la reducción del sufrimiento, a condición de que se halla realizado una validación de estos métodos.

CONSERVACIÓN

Proteger de la luz. Salvo otro caso indicado, la temperatura de almacenamiento debe ser de 5 ± 3 °C. Las vacunas adsorbidas líquidas no se deben congelar.

ENSAYOS

Las vacunas deben cumplir con los ensayos descritos en las monografías individuales. Incluir cuando sea necesario, los siguientes ensayos:

Determinación de agua <120>

No debe contener más de 3,0 % p/p para vacunas liofilizadas, salvo otro caso indicado.

Determinación de aluminio en vacunas adsorbidas

Transferir una porción de la muestra en ensayo, previamente homogeneizada, que contenga aproximadamente 5 a 6 mg de aluminio, a un recipiente de combustión de 50 ml. Agregar 1 ml de ácido sulfúrico, 0,1 ml de ácido nítrico y algunas perlas de vidrio y calentar hasta desprendimiento de vapores blancos densos. [NOTA: si la muestra en ensayo se carboniza, agregar algunas gotas de ácido nítrico y mantener la ebullición hasta decoloración]. Dejar enfriar algunos minutos, agregar con precaución 10 ml de agua y continuar la ebullición hasta obtener una solución límpida. Dejar enfriar, agregar 0,05 ml de naranja de metilo (SR) y neutralizar aproximadamente con 6,5 a 7 ml de una solución de 0,42 g de hidróxido de sodio por ml. Si forma precipitado, disolver el mismo mediante el agregado, gota a gota, de ácido sulfúrico diluido, preparado

disolviendo 5,5 ml de ácido sulfúrico en 100 ml de agua. Transferir la solución obtenida a un erlenmeyer de 250 ml y enjuagar el recipiente de combustión con 25 ml de agua. Agregar 25 ml de edetato disódico 0,02 M, 10 ml de una solución reguladora de acetato (SR1) y algunas perlas de vidrio. Mantener a ebullición suave durante 3 minutos. Agregar 0,1 ml de una solución de 1 mg de 1-(2-piridilazo)-2-naftol por ml de alcohol y titular con sulfato de cobre 0,02 M (SV) hasta viraje a color pardo púrpura. Realizar el ensayo con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada ml de edetato disódico 0,02 M (SV) equivale a 0,5396 mg de aluminio (Al). No debe contener más de 1,25 mg de aluminio (Al) por dosis humana, cuando un adsorbente de aluminio se haya utilizado en la vacuna, salvo otro caso indicado.

Determinación de calcio en vacunas adsorbidas

Homogeneizar una porción de la muestra en ensayo, transferir 1 ml a un recipiente apropiado, agregar 0,2 ml de ácido clorhídrico diluido y diluir a 3 ml con agua. Medir las absorbancias a 620 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (ver *Método I* en 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*) y calcular la cantidad de calcio presente. No debe contener más de 1,3 mg de calcio (Ca) por dosis humana, cuando un adsorbente cálcico se haya utilizado en la vacuna, salvo otro caso indicado.

Formaldehído libre

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, emplear el *Método I*. El *Método II* es conveniente para vacunas a las que se le ha agregado metabisulfito de sodio para neutralizar el exceso de formaldehído.

Método I

Realizar una dilución 1 en 10 de la vacuna en ensayo. Transferir 1 ml de la solución obtenida a un tubo de comparación, agregar 4 ml de agua y 5 ml de una solución de 0,2 ml de acetilacetona en 100 ml de acetato de amonio (SR1). Mantener en un baño de agua a 40 °C durante 40 minutos. Examinar la solución: no debe desarrollar coloración más intensa que la de un control preparado del mismo modo pero con 1 ml de una solución de formaldehído que contenga 20 µg de formaldehído (CH₂O) por ml.

Método II

Soluciones estándar - Preparar soluciones que contengan aproximadamente 0,25; 0,50; 1,00 y 2,00 mg de formaldehído por ml. Realizar una dilución 1 en 200 de cada solución, respectivamente.

Solución muestra - Realizar una dilución 1 en 200 de la vacuna en ensayo. Si la vacuna es una emulsión, realizar una dilución 1 en 20 empleando la fase acuosa obtenida por uno de los siguientes procedimientos: a) agregar 1 ml de la vacuna en ensayo a 1 ml de miristato de isopropilo y mezclar. Agregar 1,3 ml de ácido clorhídrico 1 N, 2 ml de cloroformo y 2,7 ml de una solución de 9 mg de cloruro de sodio por ml. Mezclar y centrifugar a 15.000 g durante 1 hora. Transferir la fase acuosa a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con agua. Si la separación no se logra, agregar una cantidad adecuada de una solución de 100 mg de polisorbato 20 por ml a la solución de cloruro de sodio empleada y repetir el procedimiento pero centrifugando a 22.500 g; b) agregar 1 ml de la vacuna en ensayo a 1 ml de una solución de 100 mg de cloruro de sodio por ml y mezclar. Centrifugar a 1.000 g durante 15 minutos. Transferir la fase acuosa a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con agua; c) agregar 1 ml de la vacuna en ensayo a 2 ml de una solución de 100 mg de cloruro de sodio por ml, agregar 3 ml de cloroformo y mezclar. Centrifugar a 1.000 g durante 5 minutos, transferir la fase acuosa a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con agua.

Procedimiento - Transferir 0,5 ml de la *Solución muestra* y 0,5 ml de cada una de las *Soluciones estándar* a sendos tubos de ensayo, agregar 5 ml de una solución recientemente preparada de 0,5 mg de cloruro de metilbenzotiazolona-hidrazona por ml. Tapar los tubos, agitar y dejar reposar durante 1 hora. Agregar 1 ml de cloruro férrico-ácido sulfámico (SR) y dejar reposar durante 15 minutos. Medir la absorbancia a 628 nm (ver 470. *Espectrofotometría ultravioleta y visible*), realizar la curva de calibración con las *Soluciones estándar* y calcular el contenido de formaldehído en la vacuna en ensayo. El ensayo sólo es válido si el coeficiente de correlación de la curva de calibración es mayor de 0,97.

La vacuna no debe contener más de 0,2 g por litro de formaldehído libre en el producto final, cuando se haya utilizado formaldehído en la preparación de la vacuna, salvo otro caso indicado.

Fenol

Soluciones estándar - Preparar una serie de soluciones de *Fenol* que contengan aproximadamente 5, 10, 15, 20 y 30 µg de fenol por ml.

Solución muestra - Homogeneizar una porción de la muestra en ensayo, preparar una solución que contenga aproximadamente 15 µg de fenol por ml.

Procedimiento - A 5 ml de la *Solución muestra* y a 5 ml de cada *Solución estándar*, agregar 5 ml de *Solución reguladora alcalina de borato pH 9,0* (ver

Soluciones reguladoras), 5 ml de aminopirazolona (SR) y 5 ml de una solución de ferricianuro de potasio al 5,3 %. Dejar reposar durante 10 minutos y medir la absorbancia a 546 nm. Realizar una curva de calibración y calcular el contenido de fenol en la porción en ensayo. La vacuna no debe contener más de 2,5 g por litro en el producto final, cuando se haya utilizado fenol en la preparación de la vacuna, salvo otro caso indicado.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el nombre de la preparación; una referencia identificando el lote final; la dosis humana recomendada y la ruta de administración; las condiciones de almacenamiento; la fecha de vencimiento; el nombre y la cantidad de cualquier conservante antimicrobiano utilizado; el nombre de cualquier antibiótico, adyuvante, saborizante o estabilizador presente en la vacuna; el nombre de cualquier constituyente que pueda causar reacciones adversas y cualquier contraindicación para el uso de la vacuna.

Para vacunas liofilizadas, indicar el nombre o composición y el volumen del líquido reconstituyente a ser agregado; indicar el tiempo dentro del cual la vacuna puede ser utilizada luego de la reconstitución.

1030. CRIADEROS DE POLLOS LIBRES DE PATOGENOS ESPECIFICADOS PARA LA PRODUCCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LAS VACUNAS

Cuando se especifica en una monografía, los pollos, embriones o cultivos de células utilizados para la producción o control de calidad de vacunas se deben obtener a partir de huevos producidos por criaderos de pollos libres de patógenos especificados (LPE).

PRINCIPIOS GENERALES Y MÉTODOS

Un grupo de pollos LPE se define como aquel conjunto de aves de un mismo criadero y que por tanto comparten el mismo ambiente y son atendidos por las mismas personas, las cuales no tienen contacto con ningún otro grupo de pollos que no sea LPE.

Para los criaderos LPE establecidos sobre una base de rotación, la eclosión y la cría de todos los reemplazos se deben realizar siempre en el gallinero de ambiente controlado.

El criadero debe mantenerse en condiciones que reduzcan al mínimo el riesgo de contaminación. No puede estar situado en la proximidad de criaderos de aves no-LPE, debiendo disponer de instalación de aislamiento provista de aire filtrado con presión positiva. Se deben tomar las medidas oportunas para impedir el acceso de roedores, aves silvestres, insectos y personas no autorizadas.

El personal cuya entrada esté autorizada no debe tener ningún contacto con otras aves o con agentes que pudieran infectar al criadero. Se recomienda al personal al cuidado del criadero ducharse y cambiarse de ropa o vestir ropa de protección antes de entrar en la instalación de cría de los pollos.

Los objetos que se introducen en el gallinero deben estar esterilizados. El alimento debe someterse a un tratamiento adecuado a fin de evitar la introducción de microorganismos indeseables, y el agua debe ser clorada. No se debe administrar medicación que pueda interferir con la detección de enfermedades en el criadero.

Debe llevarse un registro permanente del estado de salud general del criadero, investigándose cualquier anomalía que surja. Los factores objeto de seguimiento incluyen la morbilidad, la mortalidad, el estado físico general, el consumo de alimento, la producción diaria de huevos y la calidad, fertilidad y capacidad de eclosión de los mismos. Los huevos sucios deben descartarse; puede desinfectarse la superficie de los huevos limpios mientras están todavía calientes.

El criadero se inicia con animales, para los que se haya demostrado que están libres de agentes infecciosos de transmisión vertical.

1125. SUSTRATOS CELULARES PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE USO HUMANO

El presente texto establece los requisitos generales para líneas celulares diploides y líneas celulares continuas usadas en la producción de vacunas.

Línea celular diploide

Una línea celular diploide debe tener una alta pero finita capacidad de multiplicación *in vitro*.

Línea celular continua

Una línea celular continua debe tener la capacidad de multiplicarse indefinidamente *in vitro*, las células a menudo presentan diferencias en el cariotipo respecto a las células originales. Para vacunas inyectables producidas en líneas celulares continuas, debe validarse el proceso de purificación para demostrarse la remoción del DNA del sustrato celular a un nivel equivalente de 10 ng por dosis humana.

Sistema de banco de células

La producción de vacunas en líneas celulares diploides y en líneas celulares continuas se basa en el sistema de banco de células. La edad *in Vitro* de las células debe contarse a partir del banco maestro de células. Debe documentarse el uso, identidad y control de inventario de cada envase del banco maestro de células.

Medios de cultivo y sustancias de origen animal

Debe registrarse detalladamente la composición de los medios usados para el aislamiento y cultivo de células. En caso de utilizar sustancias de origen animal, las mismas deben ser libres de agentes extraños. Si se utiliza albúmina humana debe cumplir los requisitos de *Solución de Albúmina Humana*. El suero bovino usado para la preparación y mantenimiento de cultivos celulares debe ser estéril y libre de virus bovinos. La tripsina usada en la preparación de cultivos celulares debe ser estéril y libre de micoplasmas y virus.

Semilla celular

Los datos necesarios para evaluar la adecuabilidad de la semilla celular comprenden fuente, historia y caracterización de la misma.

Fuente de la semilla celular - Para líneas celulares de origen humano debe registrarse la siguiente información sobre el donante: origen geográfico y étnico, edad, sexo, condición fisiológica general, tejido u órgano usado, resultado de todos los ensayos para patógenos. Para líneas celulares de origen animal debe registrarse la siguiente información sobre la fuente de células:

especie, cepa, origen geográfico, edad, sexo, condición fisiológica general, tejido u órgano usado, resultado de todos los ensayos para patógenos. No pueden utilizarse para la producción de vacunas células de origen neural ya que las mismas pueden contener agentes transmisores de encefalopatías espongiiformes.

Historia de la semilla celular - Debe registrarse el método usado para aislar la semilla, métodos de cultivo y otros procedimientos usados para establecer el banco maestro de células.

Caracterización de la semilla celular -

- identidad de las células (por ejemplo mediante estudio de isoenzimas, serología o estudio de ADN)
- características de crecimiento y propiedades morfológicas
- cariotipo para líneas celulares diploides
- velocidad de duplicación para líneas celulares diploides.

Estabilidad del sustrato celular

Debe demostrarse la adecuada viabilidad de la línea celular en las condiciones de almacenamiento establecidas.

Agentes infecciosos extraños

Las líneas celulares usadas en la producción de vacunas deben estar libres de agentes infecciosos extraños. Dependiendo del origen y la historia del cultivo puede ser necesario llevar a cabo ensayos para contaminantes potenciales específicos., particularmente aquellos que pueden estar presentes en la especie de origen.

Tumorigenicidad

Las líneas celulares usadas para la producción de vacunas vivas no deben ser tumorigénicas. Cuando se utilice una línea celular tumorigénica para la producción de otros tipos de vacuna, debe validarse el proceso de purificación para demostrar que el DNA residual del sustrato celular se reduce a menos de 10 ng por dosis.

Caracterización cromosómica

Para el caso que no se haya validado la remoción de células intactas durante el procesamiento posterior a la cosecha se debe llevar a cabo la caracterización de la línea celular diploide mediante análisis del cariotipo.

ENSAYOS

Identificación

Analizar el patrón de ácidos nucleicos y una selección cuidadosa de los siguientes ensayos:

- características bioquímicas (análisis de isoenzimas)
- características inmunológicas (antígenos de histocompatibilidad)
- marcadores citogenéticas.

Células contaminantes

El análisis del patrón de ácidos nucleicos llevado a cabo para la identificación también puede servir para demostrar la ausencia de células contaminantes.

Contaminación bacteriana y fúngica

El banco maestro de células y cada banco de trabajo de células deben cumplir con los requisitos de 370. *Ensayos de esterilidad* usando para cada medio 10 ml del sobrenadante fluido de los cultivos celulares. Realizar el ensayo sobre el 1 % de los envases con un mínimo de dos envases.

Micoplasmas

El banco maestro de células y cada banco de trabajo de células deben cumplir con los requisitos de 336. *Ensayo de Micoplasmas*.

Agentes extraños en cultivos celulares

Las células deben cumplir con los requisitos de *Virus hemadsorbentes* y *Agentes extraños en cultivos celulares en Cultivo celular de producción* en 415. *Ensayos para agentes extraños en vacunas virales de uso humano*.

Co-cultivo

Co-cultivar las células con otros sistemas celulares, incluyendo células humanas y células de simio. Examinar para detectar posibles cambios morfológicos y realizar los ensayos para determinar virus hemaglutinantes. Las células deben cumplir con los requisitos si no se encuentra evidencia de presencia de agentes extraños.

Retrovirus

Investigar la presencia de retrovirus usando ensayos de infectividad y microscopía electrónica. En caso de que ambos ensayos den resultados negativos, llevar a cabo la investigación de transcriptasa reversa (en presencia de magnesio y manganeso) sobre el pellet obtenido por centrifugación a alta velocidad.

Ensayos en animales

Inyectar por vía intramuscular (en el caso de ratones lactantes, por vía subcutánea profunda), al menos 10^7 células viables a cada uno de los siguientes grupos de animales repartidas por igual entre los animales de cada grupo:

- (a) dos camadas de ratones lactantes de menos de 24 h de edad, incluyendo al menos 10,
- (b) 10 ratones adultos,

Inyectar por vía intracerebral 10^6 células viables en cada uno de diez ratones adultos para detectar la presencia posible de virus de la coriomeningitis linfocítica. Observar los animales durante al menos 4 semanas. Estudiar los animales que enferman o manifiestan cualquier anomalía para establecer la causa de estos trastornos. Las células cumplen con los requisitos si no se encuentran indicios de la presencia de cualquier agente extraño. El ensayo sólo es válido si al menos el 80 por ciento de los animales de cada grupo permanece sano y sobrevive durante todo el período de observación.

Ensayos en huevos

Inyectar al menos 10^6 células viables en la cavidad alantoica de cada uno de diez huevos embrionados de gallina LPE de 9 a 11 días y en la yema de cada uno de diez huevos embrionados de gallina LPE de 5 a 6 días. Incubar durante no menos de 5 días. Analizar los fluidos alantoicos en busca de la presencia de hemaglutininas utilizando eritrocitos de ave, realizar el ensayo a 5 ± 3 °C y a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C y leer los resultados después de 30 y 60 minutos. Las células cumplen el ensayo si no se encuentran indicios de la presencia de cualquier agente extraño. El ensayo sólo es válido si al menos un 80 por ciento de los embriones permanecen sanos y sobreviven durante todo el período de observación.

Ensayo para tumorigenicidad *in vitro*

Realizar alguno de los sistemas de ensayos siguientes:

- Formación de colonias en gel de agar blando
- Producción de crecimiento celular invasivo luego de la inoculación en órganos
- Estudio de la actividad de transformación usando, por ejemplo, el sistema de ensayo 3T3 para oncogenes activos.

VACUNA ANTIGRI PAL ANTÍGENOS DE SUPERFICIE, INACTIVADA

Vaccinum influenzae inactivatum ex corticis antigeniis praeparatum

Definición - La Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada es una suspensión estéril de una o varias cepas del virus de la gripe de los tipos A o B, o una mezcla de ambos, cultivadas individualmente en huevos embrionados de pollo, inactivadas y tratadas de forma que se obtenga una preparación consistente fundamentalmente en los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa, sin disminuir las propiedades antigénicas de los mismos. Debe contener 15 µg de antígeno hemaglutinina por dosis para cada cepa presente, a no ser que las evidencias clínicas sugieran el empleo de una cantidad diferente; y puede contener un adyuvante. La Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple con 360. *Ensayo de toxicidad anormal* y 745. *Vacunas de uso humano*.

Elección de la cepa vacunal

[NOTA: la Organización Mundial de la Salud, con los resultados de laboratorios de los países revisa anualmente la situación epidemiológica en el mundo recomendando sobre la base de la evidencia epidemiológica prevalente, si es necesario, las nuevas cepas que integraran la vacuna para la estación.]

Las cepas deben provenir de centros de referencia reconocidas internacionalmente y deben contar con la aprobación para la producción de las autoridades sanitarias competentes. Actualmente, es una práctica común el empleo de cepas *reasociadas* (con intercambio de segmentos genéticos) que producen rendimientos elevados de los antígenos de superficie adecuados. La autoridad competente debe aprobar el origen y la sucesión de pases de cada cepa de virus utilizada para la vacuna.

Sustrato para la multiplicación del virus

La semilla del virus utilizado para la producción de vacuna, se debe preparar cultivando en huevos embrionados, procedentes de criaderos exentos de patógenos específicos (ver 1030. *Criaderos de pollos libres de patógenos especificados para la producción y control de calidad de las vacunas*) o en cultivos celulares apropiados (ver 1125.

Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano) tales como fibroblastos de embrión de pollo o células renales de pollo obtenidos de criaderos exentos de patógenos específicos. Para la producción, cada cepa de virus se cultiva en la cavidad alantoidea de huevos embrionados procedentes de criaderos sanos.

Lote semilla del virus

La producción de la vacuna se debe basar en un sistema de lotes semilla. Los lotes semilla de trabajo se deben corresponder a no más de quince pasajes del virus *reasociado* aprobado o del aislamiento del virus aprobado. La vacuna final debe corresponder a un solo pasaje del lote semilla de trabajo. Los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa de cada lote semilla son identificados para cepa del virus de la gripe mediante métodos apropiados.

Para la preparación de la mezcla de cosechas monovalentes solamente se pueden emplear lotes semilla de trabajo que cumplan los siguientes requisitos.

Contaminación bacteriana y fúngica

Debe cumplir con 370. *Ensayo de esterilidad*, sembrando 10 ml en cada medio.

Ensayo de micoplasmas <336>

Debe cumplir con los requisitos; sembrando 10 ml.

Multiplicación y cosecha del virus

Se puede agregar un agente antimicrobiano al inóculo. Después de la incubación a temperatura controlada, se deben cosechar los fluidos alantoideos y combinar para obtener una cosecha monovalente (mezcla). Se puede agregar un agente antimicrobiano en el momento de la cosecha. No se puede utilizar penicilina ni estreptomycinina en ninguna etapa de la producción.

Cosecha monovalente (mezcla)

A los fines de limitar el riesgo de contaminación la inactivación, iniciar lo antes posible después de la preparación. El método de inactivación viral debe estar validado por el fabricante y haber demostrado en tres lotes consecutivos ser capaz de inactivar el virus en forma uniforme. Se deberá demostrar que el método inactiva al virus de la gripe sin destruir su antigenicidad y causar mínima alteración de los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa. Además se deberá demostrar también que el proceso es efectivo para la inactivación de virus de leucosis aviares y de micoplasmas. Si esta preparación a granel se almacena después de la inactivación, se deberá conservar a temperatura de 5 ± 3 °C.

Si se emplea solución de formaldehído, la concentración no debe ser mayor de 0,2 g de CH₂O

por litro en cualquier momento de la inactivación; en caso de utilizar betapropiolactona, la concentración no debe ser mayor de 0,1 % v/v, en cualquier momento de la inactivación. Antes o después de realizar el proceso de inactivación, la cosecha monovalente (mezcla) se debe concentrar y purificar por centrifugación de alta velocidad o por otro método apropiado. Se deben fraccionar las partículas virales en sus subunidades integrantes, mediante procedimientos apropiados y luego son purificados de tal manera que la preparación monovalente a granel consiste fundamentalmente en los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa.

Para la preparación de lotes finales de vacuna a granel sólo se pueden utilizar cosecha monovalente (mezcla) que cumpla con los siguientes requisitos.

Antígeno hemaglutinina

Determinar el contenido de antígeno hemaglutinina mediante un ensayo de inmunodifusión (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) por comparación con una preparación de antígeno hemaglutinina de referencia o con una preparación de antígeno calibrada frente a la misma. Realizar el ensayo a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C.

Antígeno neuraminidasa

Confirmar la presencia y el tipo de antígeno neuraminidasa mediante métodos enzimáticos o inmunológicos apropiados en los tres primeros lotes de cosecha monovalente (mezcla), obtenidos con cada lote de siembra de trabajo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Inactivación vírica

Proceder según se indica en *Inactivación vírica* en *Ensayos*.

Pureza

Analizar la pureza de la cosecha monovalente (mezcla) por electroforesis en gel de poliacrilamida o por otro método apropiado. Se deben detectar principalmente los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa.

Productos químicos

Determinar los productos químicos utilizados para la desorganización de partículas víricas y purificación, en la cosecha monovalente (mezcla), siendo los límites de los mismos los aprobados por la Autoridad competente.

Vacuna final a granel

Preparar la vacuna final a granel mezclando cantidades adecuadas de cosecha monovalente (mezcla). Para la preparación del lote final, sólo se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla los siguientes requisitos.

Conservantes <80>

Cuando se haya utilizado, determinar el contenido de conservante antimicrobiano por un método químico apropiado. No debe contener menos de 85 por ciento y no más de 115 por ciento de la cantidad declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Lote final

La vacuna final a granel se debe distribuir asépticamente en envases estériles, para inyectables, con cierre inviolable. Los envases deben estar cerrados de tal manera de evitar la contaminación. Siempre que el ensayo inactivación viral se haya realizado en cada cosecha monovalente (mezcla), y el ensayo de *Formaldehído libre*, *Ovoalbúmina* y *Proteínas totales* se hayan realizado en la vacuna final a granel con resultados satisfactorios, estos ensayos pueden ser omitidos en el control del lote final.

Si el contenido de ovoalbúmina y formaldehído libre no pueden ser determinados en el lote final debido a interferencias con el adyuvante, los mismos deben ser realizados en *Cosecha Monovalente (mezcla)*, los límites de aceptación establecidos deberán asegurar que los límites en el lote final no serán excedidos.

Si la vacuna contiene un adyuvante, ensayos apropiados para la identidad y otros criterios relevantes de calidad deben ser llevados a cabo en el lote final. Estos ensayos pueden incluir análisis físicos y químicos, determinación del tamaño de partícula y determinación del número de partículas por unidad de volumen.

ENSAYOS

Identificación

Confirmar la especificidad antigénica de la vacuna según se indica en *Valoración*.

Inactivación vírica

Inocular 0,2 ml de Vacuna Antigripal virus fraccionados, inactivada en la cavidad alantoidea de diez huevos embrionados e incubar a una temperatura comprendida entre 33 y 37 °C durante 3 días. El ensayo sólo es válido si sobreviven, como mínimo, 8 de los 10 embriones. Recolectar 0,5 ml de fluidos alantoideo de cada embrión sobreviviente y mezclar. Inocular 0,2 ml de la mezcla de líquidos a otros diez huevos embrionados e incubar a una temperatura comprendida entre 33 y 37 °C durante 3 días. El ensayo sólo es válido si sobreviven, como mínimo, 8 de los 10 embriones. Recolectar 0,1 ml de líquido alantoideo de cada embrión sobreviviente y analizar la presencia de

virus vivo por el ensayo de hemoaglutinación en cada cosecha individual. Si se produce hemoaglutinación en alguno de los fluidos, realizar un nuevo pase del mismo en huevos y un nuevo ensayo de hemoaglutinación: no se debe producir hemoaglutinación.

Proteína total

No debe contener más de 40 µg de proteína distinta de la hemaglutinina por cepa de virus y por dosis humana y, en ningún caso, debe ser mayor de 120 µg de proteína total distinta de la hemaglutinina, por dosis humana.

Ovoalbúmina

No más de 1 µg de ovoalbúmina por dosis humana, determinada por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Método inmunoquímico*) y utilizando una preparación de referencia de ovoalbúmina apropiada.

Formaldehído libre

Proceder según se indica *Formaldehído libre* en *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Cuando se haya utilizado, determinar el contenido de conservante antimicrobiano por un método químico apropiado. El contenido no debe ser menor que la cantidad mínima establecida como efectiva y no mayor de 115 por ciento de la cantidad indicada en el rótulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

No más de 100 U.I. por dosis humana.

VALORACIÓN

Determinar el contenido de antígeno hemaglutinina por un ensayo de inmunodifusión (ver 635. *Métodos Inmunoquímicos*) en comparación con una preparación de referencia de antígeno hemaglutinina, o con una preparación antigénica que haya sido calibrada frente a ella. Realizar el ensayo a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C. El intervalo de confianza del ensayo ($P = 0,95$) debe estar comprendido entre el 80 por ciento y el 125 por ciento del contenido estimado. El límite de confianza inferior ($P = 0,95$) no debe ser menor de 80 por ciento de la cantidad indicada en el rótulo.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la Vacuna Antigripal antígenos de superficie, inactivada ha sido preparada en huevos, la cepa o cepas del virus de la gripe utilizados en su preparación, el nombre y la cantidad de adyuvante utilizado, el método de

inactivación y el contenido de hemaglutinina en µg por cepa del virus por dosis. Indicar en el rótulo la estación del año durante la cual la vacuna protege.

VACUNA ANTIGRI PAL ANTÍGENOS DE SUPERFICIE, INACTIVADA, VIROSOMA

Vaccinum influenzae inactivatum ex corticis antigeniis praeparatum virosomale

Definición - La Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada, virosoma es una suspensión estéril de una o varias cepas del virus de la gripe de los tipos A o B, o una mezcla de ambos, cultivadas individualmente en huevos embrionados de pollo, inactivadas y tratadas de forma que se obtenga una preparación consistente fundamentalmente en los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa reconstituidas en virosomas con fosfolípidos, sin disminuir las propiedades antigénicas de los mismos. Debe contener 15 µg de antígeno hemaglutinina por dosis para cada cepa presente, a no ser que las evidencias clínicas sugieran el empleo de una cantidad diferente. La Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada, virosoma debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

El método de producción ha demostrado ser uniforme en la obtención de vacunas que cumplen con los requisitos de eficacia, e inocuidad en humanos.

El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple con 360. *Ensayo de toxicidad anormal* y 745. *Vacunas de uso humano*.

Elección de la cepa vacunal

Proceder según se indica en *Elección de la cepa vacunal* en *Vacuna Antigripal antígeno de superficie inactivada*.

Sustrato para la multiplicación del virus

Proceder según se indica en *Sustrato para la multiplicación del virus* en *Vacuna Antigripal antígeno de superficie inactivada*.

Lote semilla del virus

Proceder según se indica en *Lote semilla del virus* en *Vacuna Antigripal antígeno de superficie inactivada*.

Multiplicación y cosecha del virus

Proceder según se indica en *Multiplicación y cosecha del virus* en *Vacuna Antigripal antígeno de superficie inactivada*.

Cosecha monovalente (mezcla)

A los fines de limitar el riesgo de contaminación la inactivación, iniciar lo antes posible después de la preparación. El método de inactivación viral debe estar validado por el fabricante y haber demostrado en tres lotes consecutivos ser capaz de inactivar el virus en forma uniforme. Se deberá demostrar que el método inactiva al virus de la gripe sin destruir su antigenicidad y causar mínima alteración de los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa. Además se deberá demostrar también que el proceso es efectivo para la inactivación de virus de leucosis aviares y de micoplasmas. Si esta preparación a granel se almacena después de la inactivación, se deberá conservar a temperatura de 5 ± 3 °C.

Si se emplea solución de formaldehído, la concentración no debe ser mayor de 0,2 g de CH₂O por litro en cualquier momento de la inactivación; en caso de utilizar betapropiolactona, la concentración no debe ser mayor de 0,1 % v/v, en cualquier momento de la inactivación. Antes o después de realizar el proceso de inactivación, la cosecha monovalente (mezcla) se debe concentrar y purificar por centrifugación de alta velocidad o por otro método apropiado.

Para la preparación de virosomas sólo se pueden utilizar cosecha monovalente (mezcla) que cumpla con los siguientes requisitos.

Antígeno hemaglutinina

Determinar el contenido de antígeno hemaglutinina mediante un ensayo de inmunodifusión (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) por comparación con una preparación de antígeno hemaglutinina de referencia o con una preparación de antígeno calibrada frente a la misma. Realizar el ensayo a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C.

Antígeno neuraminidasa

Confirmar la presencia y el tipo de antígeno neuraminidasa mediante métodos enzimáticos o inmunológicos apropiados en los tres primeros lotes de cosecha monovalente (mezcla), obtenidos con cada lote de siembra de trabajo.

Inactivación vírica

Proceder según se indica en *Inactivación vírica* en *Ensayos*.

Preparación de los virosomas monovalentes

Se deben fraccionar las partículas virales en sus subunidades integrantes, mediante un detergente apropiado y purificado tal manera que la preparación monovalente a granel consiste fundamentalmente en los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa.

Los virosomas se forman luego de la adición de los fosfolípidos apropiados, solubilización por ultrasonificación, filtración estéril y remoción del detergente por cromatografía de absorción o por otra técnica aceptable. Se pueden mezclar varios virosomas monovalentes

Para la producción del lote final de vacuna a granel solo se puede utilizar virosomas monovalentes que cumplan con los siguientes requisitos.

Contenido de Antígeno Hemaglutinina

La determinación del contenido de antígeno hemaglutinina se efectúa por un método de inmunodifusión por comparación con el antígeno hemaglutinina de referencia o contra el antígeno calibrado contra este. Realizar el ensayo a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C.

Antígeno neuraminidasa

Confirmar la presencia y el tipo de antígeno de neuraminidasa mediante métodos enzimáticos o inmunológicos apropiados en los tres primeros lotes de la cosecha monovalente mezcla obtenidos con cada lote de siembra de trabajo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Pureza

Examinar la pureza de las preparaciones virosomales en gel de poliacrilamida o en otras técnicas aprobadas. Deben estar presentes mayoritariamente antígenos hemaglutininas y neuraminidasas.

Residuos químicos

Los ensayos para los químicos usados deben realizarse durante el proceso y deben estar dentro de los límites aprobados para cada producto particular.

Fosfolípidos

Determinar el contenido de identidad de los fosfolípidos por métodos inmunoquímicos o fisicoquímicos.

Relación fosfolípidos/hemaglutininas

La relación del contenido de fosfolípidos y el contenido de hemaglutininas debe estar dentro de los límites de cada producto en particular

Distribución del tamaño del virosoma

Determinar la distribución del tamaño del virosoma por un método apropiado tal como difracción de la luz láser. No debe ser menor de 100 nm y no mayor de 500 nm.

Vacuna final a granel

Se mezclan cantidades apropiadas de las preparaciones virosomales para obtener el granel final de vacuna

Para la preparación del lote final, sólo se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla los siguientes requisitos.

Conservante antimicrobiano <80>

Cuando se haya utilizado, determinar el contenido de conservante antimicrobiano por un método químico apropiado. No debe contener menos de 85 por ciento y no más de 115 por ciento de la cantidad declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Lote final

La vacuna final a granel se debe distribuir asepticamente en envases estériles, para inyectables, con cierre inviolable. Los envases deben estar cerrados de tal manera de evitar la contaminación. Solo el lote final que cumple con los requisitos en *Ensayos* y *Valoración* pueden ser liberados para su uso. Siempre que el ensayo *Inactivación vírica* se haya realizado en cada cosecha monovalente (mezcla), y los ensayos de *Formaldehído libre*, *Ovoalbúmina* y *Proteínas totales* se hayan realizado en la vacuna final a granel con resultados satisfactorios, estos ensayos pueden ser omitidos en el control del lote final.

ENSAYOS

Identificación

Confirmar la especificidad antigénica de la vacuna según se indica en *Valoración*.

Inactivación vírica

Proceder según se indica en *Inactivación vírica* en *Vacuna Antigripal antígenos de superficie, inactivada*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,5 y 7,8.

Proteína total

No debe contener más de 40 µg de proteína distinta de la hemaglutinina por cepa de virus y por dosis humana y, en ningún caso, más de 120 µg de proteína total distinta de la hemaglutinina, por dosis humana.

Fosfolípidos

Determinar el contenido de identidad de los fosfolípidos por métodos inmunoquímicos (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) o fisicoquímicos.

Relación fosfolípidos/hemaglutininas

La relación del contenido de fosfolípidos y el contenido de hemaglutininas debe estar dentro de los límites de cada producto en particular.

Formaldehído libre

Proceder según se indica *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Cuando se haya utilizado, determinar el contenido de conservante antimicrobiano por un método químico apropiado. El contenido no debe ser menor que la cantidad mínima establecida como efectiva y no mayor de 115 por ciento de la cantidad declarada en el rótulo.

Ovoalbúmina

No más de 50 ng de ovoalbúmina por dosis humana, determinada por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) y utilizando una preparación de referencia de ovoalbúmina apropiada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Distribución del tamaño del virosoma

Determinar la distribución del tamaño del virosoma por un método apropiado como tal como difracción de luz láser. Debe estar comprendido entre de 100 nm y 500 nm.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 100 U.I. por dosis humana.

VALORACIÓN

Determinar el contenido de antígeno hemaglutinina por un ensayo de inmunodifusión (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*), mediante comparación con una preparación de referencia de antígeno hemaglutinina, o con una preparación antigénica que haya sido calibrada frente a ella. Realizar el ensayo a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C. El intervalo de confianza del ensayo ($P = 0,95$) debe estar comprendido entre el 80 por ciento y el 125 por ciento del contenido estimado. El límite de confianza inferior ($P = 0,95$) no debe ser menor de 80 por ciento de la cantidad indicada en el rótulo para cada cepa.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la Vacuna Antigripal antígenos de superficie, inactivada, virosoma ha sido preparada en huevos, la cepa o cepas del virus de la gripe utilizados en su preparación, el nombre y la cantidad de adyuvante utilizado, el método de inactivación y el contenido de hemaglutinina en μg por cepa del virus por dosis. Indicar en el rótulo la estación del año durante la cual la vacuna protege.

VACUNA ANTIGRI PAL VIRUS FRACCIONADOS, INACTIVADA

*Vaccinum influenzae inactivatum ex virorum
fragmentis praeparatum*

Definición - La Vacuna Antigripal virus fraccionados, inactivada es una suspensión acuosa estéril de una o varias cepas del virus de la gripe de los tipos A o B o una mezcla de ambos, cultivadas individualmente en huevos embrionados de pollo, inactivadas y tratadas de tal forma que se rompa la integridad de las partículas virales, sin disminuir las propiedades antigénicas de los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa. Debe contener 15 µg de antígeno hemaglutinina por dosis para cada cepa presente, a no ser que las evidencias clínicas sugieran el empleo de una cantidad diferente. La Vacuna Antigripal virus fraccionados, inactivada debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple con 360. *Ensayo de toxicidad anormal y 745. Vacunas de uso humano.*

Elección de la cepa vacunal

Proceder según se indica en *Elección de la cepa vacunal en Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada.*

Sustrato para la multiplicación del virus

Proceder según se indica en *Sustrato para la multiplicación del virus en Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada.*

Lote semilla del virus

Proceder según se indica en *Lote semilla del virus en Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada.*

Multiplicación y cosecha del virus

Proceder según se indica en *Multiplicación y cosecha del virus en Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada.*

Cosecha monovalente (mezcla)

A los fines de limitar el riesgo de contaminación, iniciar la inactivación lo antes posible después de la preparación. El método de inactivación viral debe estar validado por el fabricante, debe haber demostrado en tres lotes consecutivos ser capaz de inactivar el virus en forma uniforme. Se deberá demostrar que el

método inactiva al virus de la gripe sin destruir su antigenicidad y con la mínima alteración de los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa. Además el proceso debe ser efectivo para la inactivación de virus de leucosis aviares y de micoplasmas. Si la mezcla covalente es almacenada después de la inactivación, se deberá conservar a una temperatura de 5 ± 3 °C.

Si se emplea solución de formaldehído, la concentración no debe ser mayor de 0,2 g de CH₂O por litro en cualquier momento de la inactivación; en caso de utilizar betapropiolactona, la concentración no debe ser mayor de 0,1 % v/v, en cualquier momento de la inactivación. Antes o después de realizar el proceso de inactivación, la cosecha monovalente (mezcla) se debe concentrar y purificar por centrifugación de alta velocidad o por otro método apropiado. Se deben fraccionar las partículas virales en sus subunidades integrantes, mediante procedimientos apropiados. Para cada nueva cepa se debe realizar un ensayo de validación, para demostrar que la monovalente a granel consiste fundamentalmente en partículas virales fraccionadas.

Para la preparación de lotes finales de vacuna a granel sólo se pueden utilizar cosecha monovalente (mezcla) que cumplan con los siguientes requisitos.

Antígeno hemaglutinina

Determinar el contenido de antígeno hemaglutinina mediante un ensayo de inmunodifusión (ver 635. *Métodos Inmunoquímicos*) por comparación con una preparación de antígeno hemaglutinina de referencia o con una preparación de antígeno calibrada frente a la misma. Realizar el ensayo a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C.

Si la forma física de las partículas de hemaglutinina impide el empleo de la inmunodifusión para la determinación cuantitativa del antígeno después de la inactivación del virus, realizar la determinación de antígeno en la cosecha mezcla monovalente antes de la inactivación. El proceso de producción debe estar validado para demostrar la apropiada conservación del antígeno hemaglutinina y como indicador apropiado para la formulación, por ejemplo del contenido en proteína.

Antígeno neuraminidasa

Confirmar la presencia y el tipo de antígeno neuraminidasa mediante métodos enzimáticos o inmunológicos apropiados en los tres primeros lotes de la cosecha monovalente (mezcla) obtenidos con cada lote de siembra de trabajo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Inactivación vírica

Proceder según se indica en *Inactivación vírica* en *Ensayos*.

Productos químicos

Determinar los productos químicos utilizados para el fraccionamiento de las partículas virales en la cosecha monovalente (mezcla) siendo los límites de los mismos los aprobados por la autoridad competente.

Vacuna final a granel

Proceder según se indica en *Vacuna final a granel* en *Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada*.

Lote final

La vacuna final a granel se debe distribuir asépticamente en envases estériles, para inyectables, con cierre inviolable. Los envases deben estar cerrados de tal manera de evitar la contaminación.

Solamente los lotes finales que cumplan con los requisitos indicados en *Ensayos* y *Valoración* pueden ser autorizados para su uso.

ENSAYOS

Identificación

Confirmar la especificidad antigénica de la vacuna según se indica en *Valoración*.

Inactivación vírica

Proceder según se indica en *Inactivación vírica* en *Vacuna Antigripal, antígenos de superficie, inactivada*.

Proteína total

No debe contener más de seis veces la cantidad total de hemaglutinina determinada según se indica en *Valoración*, pero en ningún caso, no más de 100 µg de proteína por cepa de virus por dosis humana, y no más de 300 µg de proteína total por dosis humana.

Ovoalbúmina

No más de 1 µg de ovoalbúmina por dosis humana, determinada por método apropiado y utilizando una preparación de referencia de ovoalbúmina apropiada.

Formaldehído libre

Proceder según se indica *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Cuando se haya utilizado, determinar el contenido de conservante antimicrobiano por un método químico apropiado. No debe contener menos de la cantidad mínima establecida como efectiva y no más de 115 por ciento de la cantidad declarada en el rotulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

No más de 100 U.I. por dosis humana.

VALORACIÓN

Determinar el contenido de antígeno hemaglutinina por un ensayo de inmunodifusión (ver 635. *Métodos Inmunoquímicos*) en comparación con una preparación de referencia de antígeno hemaglutinina, o con una preparación antigénica que haya sido calibrada frente a ella. Realizar el ensayo a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C. El intervalo de confianza del ensayo ($P = 0,95$) debe estar comprendido entre el 80 por ciento y el 125 por ciento del contenido estimado. El límite de confianza inferior ($P = 0,95$) no debe ser menor de 80 por ciento de la cantidad indicada en el rótulo.

Si no es posible realizar la determinación cuantitativa de antígeno hemaglutinina por comparación con una preparación de referencia, realizar una identificación inmunológica del antígeno hemaglutinina y una determinación semicuantitativa de su contenido por métodos apropiados.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la Vacuna Antigripal virus fraccionados, inactivada ha sido preparada en huevos, la cepa o cepas del virus de la gripe utilizados en su preparación, el método de inactivación y el contenido de hemaglutinina en µg por cepa del virus por dosis. Indicar en el rótulo la estación del año durante la cual la vacuna protege.

VACUNA BCG LIOFILIZADA

Vaccinum tuberculosis (BCG) cryodesiccatum

Definición - La Vacuna BCG Liofilizada es una preparación de bacterias vivas liofilizadas, de virulencia atenuada que provienen de un cultivo del bacilo de Calmette y Guérin (*Mycobacterium bovis* BCG), sobre la que se ha demostrado su capacidad para proteger al hombre contra la infección tuberculosa. La Vacuna BCG Liofilizada debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

La vacuna BCG liofilizada debe ser producida por un equipo de personas saludables que no trabajen con otros agentes infecciosos, en particular no deben trabajar con cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* ni estar expuestas a un riesgo conocido de infección tuberculosa. El personal deberá ser controlado periódicamente para tuberculosis. La vacuna BCG liofilizada es sensible a la luz solar; tanto los cultivos como las vacunas se deben proteger de la luz solar directa y de la luz ultravioleta en todas las etapas de producción, control y almacenamiento. La vacuna se debe preparar a partir de un sistema de lote semilla. Se debe demostrar que el método de producción produce vacuna BCG en forma consistente y que la misma induce una adecuada sensibilidad para la tuberculina en el hombre, es segura y tiene una potencia protectora aceptable en animales. La vacuna se debe preparar a partir de cultivos derivados de la semilla maestra con el menor número de subcultivos posibles y en ningún caso debe superar a ocho subcultivos. En el curso de estos subcultivos, la preparación solo puede ser liofilizada una vez.

Si en lugar del recuento de viables se utiliza la bioluminiscencia o cualquier otro método bioquímico, el método usado debe estar validado contra el método de recuento de viables para cada etapa del proceso en la que se utilice.

Lotes semilla bacteriana

La cepa utilizada para establecer el lote semilla maestra se debe seleccionar y mantener de manera que estén preservadas sus características, su capacidad de sensibilizar al hombre a la tuberculina, de proteger a los animales de la tuberculosis, y la ausencia relativa de patogenicidad para el hombre y para los animales de laboratorio. La cepa utilizada debe ser identificada mediante registros históricos documentados, que incluyan información sobre su origen y posterior manipulación.

Se debe preparar un lote de vacuna, a partir del primer lote semilla de trabajo que se reserva para ser utilizado como vacuna de comparación. Cuando se establece un nuevo lote semilla de trabajo, se debe realizar un ensayo de hipersensibilidad retardada en cobayos, sobre un lote de vacuna obtenido del nuevo lote semilla de trabajo; la vacuna debe demostrar que no es significativamente diferente en actividad a la vacuna de comparación.

Para la multiplicación de la cepa se debe utilizar un lote semilla que cumpla con los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar las bacterias del lote semilla de trabajo como *Mycobacterium bovis* BCG empleando técnicas microbiológicas que pueden ser complementadas con técnicas de biología molecular.

Contaminación bacteriana y fúngica

Proceder según se indica en 370. *Ensayos de esterilidad*, empleando 10 ml para cada medio. El lote semilla de trabajo debe cumplir el ensayo de esterilidad excepto por la presencia de micobacterias.

Micobacterias virulentas

Examinar el lote de semilla de trabajo según se indica en el ensayo de *micobacterias virulentas* descripto para el lote final, utilizando diez cobayos.

Multiplicación y cosecha

Las bacterias se deben cultivar en un medio apropiado, durante no más de 21 días, por cultivo en superficie o en profundidad.

Los medios de cultivo no deben contener sustancias que provoquen reacciones alérgicas o tóxicas en el hombre o que den lugar a que las bacterias adquieran virulencia para los cobayos. El cultivo se debe cosechar y suspender en un medio líquido estéril que proteja la viabilidad de la vacuna determinada mediante un método apropiado para el recuento de bacterias viables.

Vacuna final a granel

La vacuna final a granel se prepara a partir de una cosecha única o por mezcla de varias cosechas individuales. Se puede agregar un estabilizador. Si el estabilizador interfiere con la determinación de la concentración bacteriana en el granel, la determinación de esta concentración debe ser realizada antes de la adición del mismo.

Para la preparación del lote final, sólo se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla los siguientes requisitos.

Contaminación bacteriana y fúngica

Proceder según se indica en 370. *Ensayos de esterilidad*, empleando 10 ml para cada medio. La vacuna final a granel debe cumplir el ensayo de

esterilidad excepto por la presencia de micobacterias.

Recuento de unidades viables

Determinar el número de unidades viables por ml, por recuento de las colonias sobre un medio sólido utilizando un método adecuado para la vacuna o por un adecuado método bioquímico. Realizar el ensayo en paralelo en una preparación de referencia de la misma cepa.

Concentración bacteriana

Determinar la concentración bacteriana total por un método apropiado, directamente por determinación de la masa de microorganismos o indirectamente por un método de opacidad calibrado en relación a la masa de microorganismos; si la concentración se mide antes de la adición del estabilizador, la concentración en la vacuna final a granel se establece por cálculo. La concentración bacteriana total debe estar comprendida entre los límites aprobados para cada producto específico. La relación entre el número de unidades viables y la concentración bacteriana total no debe ser menor de la aprobada para cada producto específico.

Lote final

La vacuna final a granel se debe distribuir en envases estériles y liofilizar hasta alcanzar un contenido en humedad residual favorable a la estabilidad de la vacuna; los envases se deben cerrar al vacío o bajo un gas inerte que no altere la vacuna. Cuando los envases llenos y cerrados, se conserven a una temperatura igual o menor de -20 °C, la fecha de caducidad no debe ser mayor de 4 años a partir de la fecha de cosecha.

Solamente se puede utilizar un lote final que satisfaga el recuento de unidades viables y cada uno de los requisitos especificados en *Ensayos y Valoración*. Si el ensayo de micobacterias virulentas, se ha realizado en la vacuna final a granel y resulta satisfactorio, se puede omitir su realización en el lote final.

El ensayo de *Reactividad dérmica excesiva* se puede omitir en el lote final si se ha realizado sobre el lote semilla de trabajo y sobre cinco lotes finales consecutivos derivados de dicho lote semilla con resultado satisfactorio.

Recuento de unidades viables

Determinar el número de unidades viables por ml en la vacuna BCG liofilizada reconstituida, por recuento de colonias en medio sólido, utilizando un método adecuado para la vacuna en ensayo.

ENSAYOS

Identificación

Realizar la identificación de la vacuna BCG liofilizada mediante observación microscópica, por

tinción de los bacilos, para demostrar su propiedad de resistencia al ácido y por el aspecto característico de las colonias en cultivos en medio sólido. Alternativamente se pueden utilizar técnicas de biología molecular.

Micobacterias virulentas

Inyectar una cantidad de vacuna equivalente a no menos de 50 dosis humanas por vía subcutánea o intramuscular, a seis cobayos de 250 a 400 g de peso que no hayan recibido ningún tratamiento que pudiera interferir con el ensayo. Observar los animales durante no menos de 42 días. Después de este tiempo, sacrificar los animales e investigar por autopsia signos de infección tuberculosa, ignorando cualquier reacción leve que pueda aparecer en el punto de la inoculación. Los animales que mueren durante el período de observación también deben ser examinados para signos de tuberculosis. La vacuna cumple con el ensayo si ninguno de los cobayos presenta signos de tuberculosis y si no muere más de un animal durante el período de observación. Si dos animales mueren durante este período y la autopsia no revela ningún signo de tuberculosis, repetir el ensayo en seis cobayos nuevos. La vacuna cumple con el ensayo si no muere más de un animal del segundo grupo durante los 42 días siguientes a la inyección y la autopsia no revela signos de tuberculosis.

Contaminación bacteriana y fúngica

La Vacuna BCG Liofilizada reconstituida debe cumplir con *370. Ensayos de esterilidad*, excepto por la presencia de micobacterias.

Reactividad dérmica excesiva

Utilizar seis cobayos sanos, blancos o pálidamente coloreados, de no menos de 250 g de peso cada uno y que no hayan recibido ningún tratamiento que pueda interferir en el ensayo. Inyectar, por vía intradérmica, de acuerdo a un plan de randomización, 0,1 ml de la vacuna reconstituida y de diluciones seriadas (1 en 10 sucesivas) de la vacuna en ensayo e idénticas dosis de la vacuna de referencia. Observar las lesiones formadas en los puntos de inyección durante cuatro semanas. La vacuna cumple con el ensayo si la reacción que produce no es marcadamente diferente de la obtenida con la vacuna de referencia.

Estabilidad térmica

Mantener muestras de vacuna liofilizada a 37 °C durante cuatro semanas. Determinar el número de unidades viables en la vacuna sometida a calor y en la no tratada por calor, según se indica en *Valoración*. El número de unidades viables

contenido en la vacuna después del calentamiento no debe ser menor de 20 % del contenido en la vacuna no calentada.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 % p/p.

VALORACIÓN

Determinar el número de unidades viables en la vacuna reconstituida, por recuento de colonias en medio sólido, utilizando un método adecuado para la vacuna a examinar. El resultado obtenido debe estar comprendido entre el máximo y el mínimo de la cantidad declarada en el rótulo. Determinar en paralelo el número de unidades viables contenido en la vacuna de comparación.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el número máximo y mínimo de unidades viables por ml en la vacuna reconstituida. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: “*Conservar entre 2 y 8°C*”, “*Proteger de la luz solar directa*”.

VACUNA CONTRA LA DIFTERIA, ADSORBIDA

Vaccinum diphtheriae adsorbatum

Definición - La Vacuna contra la Difteria, Adsorbida es una preparación de toxoide diftérico formolizado, adsorbido sobre un soporte mineral. El toxoide formolizado se debe preparar a partir de la toxina producida por cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* y debe cumplir con los siguientes requisitos.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple con el siguiente requisito.

Toxicidad específica

Seleccionar un grupo de cinco cobayos sanos, de 250 a 350 g de peso, sin tratamiento previo con alguna sustancia que pueda interferir con el ensayo. Inyectar a cada animal por vía subcutánea cinco veces la dosis humana indicada en el rótulo. Si dentro de los 42 días siguientes a la inyección, ninguno de los animales muere o muestra síntomas de toxemia diftérica, la vacuna cumple con el ensayo. Si muere más de un animal por causas inespecíficas, repetir el ensayo una vez; si muere más de un animal esta segunda vez, la vacuna no cumple con el ensayo.

Toxoide diftérico purificado a granel

En la producción de la toxina diftérica a partir de la cual se obtiene el toxoide, debe utilizarse un sistema definido de cultivo con lotes semilla que conserve la toxigenicidad del microorganismo; en caso de ser necesaria, esta toxigenicidad, debe ser restaurada por una reelección deliberada a partir de los lotes semillas. Los cultivos deben realizarse en un medio líquido apropiado y con una cepa altamente toxigénica de *Corynebacterium diphtheriae*, de procedencia e historia documentadas. Al final del periodo de incubación debe comprobarse la pureza de cada cultivo y se deben descartar los cultivos contaminados. El medio conteniendo la toxina se debe cosechar asépticamente y separar de la masa bacteriana tan pronto como sea posible. Se debe determinar el contenido en toxina (Lf por ml) para monitorear la consistencia de la producción. Para la preparación del granel del toxoide purificado se pueden mezclar cosechas individuales de toxina tetánica. La toxina debe purificarse con el objeto de eliminar sustancias que pudieran causar efectos adversos en humanos. La toxina purificada se debe detoxificar por tratamiento con formaldehído por un método que

evite la destrucción de la potencia inmunogénica del toxoide así como su reversión a toxina, particularmente si se expone al calor. También es posible llevar a cabo la purificación después de la detoxificación.

Para la producción de la preparación final de vacuna a granel sólo pueden utilizarse preparaciones de toxoide purificado que cumplan con los siguientes requisitos:

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Ausencia de toxina e irreversibilidad del toxoide

Preparar una solución del toxoide purificado a granel de aproximadamente 100 Lf por ml., usando la misma solución reguladora de la vacuna sin adsorbente. Dividir la solución en dos porciones iguales. Conservar una de ellas a 5 ± 3 °C y la otra a 37 °C durante 6 semanas. Realizar el ensayo para la determinación de toxina diftérica activa en células Vero utilizando 50 µl por pocillo de ambas porciones. La muestra no debe contener conservantes antimicrobianos y los agentes detoxificantes deben estar presentes en una concentración menor a la concentración tóxica para células Vero. La toxicidad no específica puede ser eliminada por diálisis.

Utilizar células Vero recientemente tripsinizadas a una concentración adecuada, por ejemplo $2,5 \times 10^5$ cels por ml y toxina diftérica de referencia diluida en el toxoide diftérico 100 Lf por ml. Una toxina diftérica de referencia adecuada debe contener no menos de 100 LD₅₀ por ml o 67 a 133 lr por 100 en 1 Lf y 25.000 a 50.000 dosis mínimas reactivas para piel de cobayos en 1 Lf. Diluir la toxina en toxoide diftérico 100 Lf por ml a una concentración adecuada, por ejemplo 2×10^{-4} Lf por ml. Preparar diluciones seriadas al medio de la toxina diftérica de referencia diluida y usar las muestra a ensayar sin diluir (50 µl por pocillo). Distribuir las en los pocillos de una placa estéril para cultivo celular conteniendo el medio adecuado para células Vero. Para asegurar si cualquier efecto citotóxico encontrado es específico de la toxina diftérica, preparar diluciones en paralelo donde la toxina es neutralizada con una concentración adecuada de antitoxina diftérica, por ejemplo 100 UI por ml. Para verificar el crecimiento normal de las células Vero, incluir en cada placa pocillos de control que no contengan toxoide ni toxina y que contengan un toxoide no tóxico a 100 Lf por ml. Agregar la suspensión celular en cada pocillo, tapar las placas e incubar a 37 °C durante 5 a 6 días. El efecto citotóxico es evidenciado cuando hay una inhibición completa del metabolismo de las células

Vero indicado por el indicador de pH del medio. Confirmar el efecto citotóxico por examen al microscopio o con una tinción adecuada (colorante MTT). El ensayo es no válido si la toxina diftérica de referencia diluida a 5×10^{-5} Lf por ml en toxoide 100 Lf por ml no presenta efecto citotóxico en células Vero o si el efecto citotóxico de esa cantidad de toxina no es neutralizada en los pocillos conteniendo antitoxina diftérica.

El toxoide purificado a granel cumple con el ensayo si no se evidencia toxicidad neutralizable por antitoxina en ambas muestras.

Pureza antigénica

El contenido no debe ser menor de 1.500 Lf por mg de nitrógeno proteico.

Vacuna final a granel

La preparación final de vacuna a granel se obtiene mediante adsorción, de una cantidad apropiada de toxoide purificado a granel (no mayor a 30 Lf), en un soporte mineral como fosfato de aluminio hidratado o hidróxido de aluminio; la mezcla resultante debe ser aproximadamente isotónica con la sangre. Se puede agregar conservantes antimicrobianos adecuados. No se deben emplear algunos conservantes, como los fenólicos porque afectan la actividad antigénica. Para la preparación del lote final sólo pueden utilizarse graneles de vacuna que cumplen con los siguientes requisitos.

Conservantes <80>

Debe contener no menos de 85 % y no más de 115 % de la cantidad declarada.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Lote final

La vacuna final a granel debe ser distribuida asépticamente en envases estériles con cierre inviolable. Los envases deben ser cerrados de tal manera de evitar la contaminación.

Solo los lotes finales que cumplan todos los requisitos pueden ser liberados para su uso. El ensayo para conservantes antimicrobianos (ver 80. *Conservantes*), así como la determinación de la potencia, pueden omitirse en el producto terminado, siempre que se hayan llevado a cabo en la correspondiente preparación final de vacuna a granel con resultados satisfactorios.

El ensayo de *Formaldehído libre* puede omitirse en el producto terminado cuando los ensayos realizados en el toxoide purificado a granel o en la vacuna final a granel cumpla con los requisitos.

ENSAYOS

Identificación

El toxoide diftérico debe ser identificado por un método inmunoquímico apropiado (635. *Métodos inmunoquímicos*) previa desadsorción del soporte mineral utilizado como adyuvante. El siguiente método de desadsorción, aplicable a ciertas vacunas, es dado como ejemplo: disolver, en la vacuna sometida a examen una cantidad suficiente de citrato de sodio para obtener una solución de aproximadamente 100 g por litro. Mantener a 37 °C durante 16 horas y centrifugar hasta obtener un sobrenadante líquido claro que reacciona con una antitoxina diftérica, produciendo un precipitado.

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio en vacunas adsorbidas* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Debe contener no menos de la mínima cantidad que haya mostrado ser efectiva y no más de 115 % de la cantidad indicada en el rótulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Determinar la potencia de la Vacuna contra la Difteria, adsorbida por comparación de la dosis de vacuna requerida para proteger cobayos de los efectos de una dosis eritrogénica de la toxina diftérica administrada intradérmicamente o de la dosis letal de la toxina diftérica administrada subcutáneamente con la dosis de una preparación de referencia, calibrada en Unidades Internacionales, necesaria para dar la misma protección. La Unidad Internacional es la actividad contenida en una cantidad establecida del Estándar Internacional que consiste en una cantidad de toxoide diftérico adsorbido en hidróxido de aluminio. La equivalencia en Unidades Internacionales del Estándar Internacional es establecida por la Organización Mundial de la Salud.

El diseño del ensayo descrito más adelante sigue un modelo de líneas paralelas con tres diluciones para la preparación a ser ensayada y la preparación de referencia. [NOTA: una vez que se posea suficiente experiencia con este método para una vacuna dada, es posible aplicar un modelo simplificado utilizando una única dilución para ambas preparaciones. Este modelo permite

determinar si la potencia de la muestra es significativamente mayor del mínimo requerido pero no da información sobre la linealidad, paralelismo y curva dosis respuesta.]

Método de desafío intradérmico

Selección y distribución de animales para el ensayo - Utilizar en el ensayo cobayos blancos sanos provenientes del mismo stock y de un tamaño adecuado para el número de sitios de desafío. La diferencia de masa corporal entre el animal más pesado y el más liviano no debe ser mayor de 100 g. Distribuir los cobayos en no menos de seis grupos iguales; utilizar grupos conteniendo un número de animales suficiente para obtener resultados que cumplan los requerimientos para un ensayo válido descriptos más adelante. Si la toxina de desafío a ser utilizada no ha mostrado ser estable o no ha sido adecuadamente estandarizada incluir 5 cobayos como control no vacunados. Utilizar cobayos del mismo sexo o machos y hembras igualmente distribuidos entre los grupos.

Selección de la toxina de desafío - Seleccionar una preparación de toxina diftérica conteniendo 67 a 133 lr/100 en 1 Lf y 25.000 a 50.000 dosis mínimas reactivas para la piel de los cobayos en 1 Lf. Si la preparación de la toxina de desafío ha demostrado ser estable no es necesario verificar la actividad en todos los ensayos.

Preparación de la solución de la toxina de desafío - Diluir inmediatamente antes de utilizar la toxina de desafío con un diluyente adecuado para obtener una solución conteniendo 0,0512 Lf en 0,2 ml. Preparar a partir de esta una serie de cinco diluciones seriadas al cuarto conteniendo alrededor de 0,0128; 0,0032; 0,0008; 0,0002 y 0,00005 Lf en 0,2ml.

Determinación de la potencia de la vacuna - Utilizando una solución de 9 g de cloruro de sodio por litro preparar diluciones de la vacuna en ensayo y de la preparación de referencia, de forma tal que para cada una, las diluciones formen una serie difiriendo por no más de 2,5 veces y en la cual las diluciones intermedias, cuando son inyectadas subcutáneamente a una dosis de 1,0 ml por cobayo, resulten en un puntaje intradérmico de aproximadamente 3 cuando los animales son desafiados. Asignar 1 dilución a cada grupo de cobayos e inyectar subcutáneamente 1,0 ml de cada dilución en cada cobayo. Después de 28 días, afeitar ambos flancos de cada cobayo e inyectar intradérmicamente 0,2 ml de cada una de las 6 diluciones de toxina en seis sitios separados en cada uno de los cobayos vacunados de manera de minimizar interferencias entre los sitios adyacentes.

Determinación de la actividad de la toxina de desafío - Si es necesario, inyectar los animales control no vacunados con diluciones conteniendo 80, 40, 20, 10 y 5 millones de un Lf de la toxina de desafío.

Lectura e interpretación de los resultados - Examinar todos los sitios de inyección 48 horas después de la inyección de la toxina de desafío y registrar la incidencia de eritema específico de difteria. Registrar también el número de sitios libres de esas reacciones como el puntaje intradérmico de desafío. Tabular conjuntamente los puntajes de desafío intradérmico para todos los animales que recibieron la misma dilución de vacuna y utilizar esos datos con una transformación adecuada, tal como $(\text{puntaje})^2$ o $\arcseno((\text{puntaje}/6)^2)$ para obtener un estimado de la potencia relativa para cada una de las preparaciones por análisis cuantitativo de líneas paralelas.

El ensayo sólo es válido si para la vacuna en ensayo y la preparación de referencia, el puntaje medio obtenido al menor nivel de dosis es menor de 3 y el puntaje medio al mayor nivel de dosis es mayor de 3; cuando corresponda, la dilución de la toxina que contiene 40 millones de un Lf da un eritema positivo en al menos 80 % de los cobayos control y la dilución conteniendo 20 millones de un Lf que da un eritema positivo en no menos de 80 % de los cobayos (si este criterio no es alcanzado se debe seleccionar una toxina diferente); los límites de confianza ($P=0.95$) son no menos de 50 % y no más de 200 % de la potencia estimada; el análisis estadístico no debe mostrar desviación de la linealidad y del paralelismo.

El ensayo puede ser repetido pero cuando se realiza más de 1 ensayo los resultados de todos los ensayos válidos deben ser combinados para la estimación de la potencia.

Método de desafío letal

Selección y distribución de los animales para el ensayo - Utilizar en el ensayo cobayos sanos provenientes del mismo stock, de 250 g a 350 g de peso. Distribuir los cobayos en no menos de 6 grupos iguales; utilizar grupos conteniendo un número de animales suficiente para obtener resultados que cumplan los requisitos para un ensayo válido descriptos más adelante. Si la toxina de desafío a ser utilizada no ha mostrado ser estable o no ha sido adecuadamente estandarizada, incluir 4 grupos más de 5 cobayos como control no vacunados. Utilizar cobayos del mismo sexo o machos y hembras igualmente distribuidos entre los grupos.

Selección de la toxina de desafío - Seleccionar una preparación de toxina diftérica conteniendo no

menos de 100 LD₅₀ por ml. Si la preparación de la toxina de desafío ha demostrado ser estable no es necesario verificar la dosis letal para cada ensayo.

Preparación de la solución de la toxina de desafío - Diluir inmediatamente antes de utilizar la toxina de desafío con un diluyente adecuado para obtener una solución conteniendo aproximadamente 100 LD₅₀ por ml. Cuando sea necesario, diluir porciones de la solución de la toxina de desafío 1 en 32, 1 en 100 y 1 en 320 con el mismo diluyente.

Determinación de la potencia de la vacuna - Utilizando una solución de 9 g de cloruro de sodio por litro, preparar diluciones de la vacuna en ensayo y de la preparación de referencia, de forma tal que para cada una, las diluciones formen una serie difiriendo por no más de 2,5 veces y en la cual las diluciones intermedias, cuando son inyectadas subcutáneamente a una dosis de 1,0 ml por cobayo protejan aproximadamente el 50 % de los animales de los efectos letales de la inyección subcutánea de la cantidad de toxina diftérica indicada para ensayo. Asignar 1 dilución a cada grupo de cobayos e inyectar subcutáneamente 1,0 ml de cada dilución en cada cobayo. Después de 28 días inyectar subcutáneamente en cada animal 1,0 ml de la solución de toxina de desafío (100 LD₅₀).

Determinación de la actividad de la toxina de desafío - Si es necesario, asignar la solución de la toxina de desafío y 3 diluciones realizadas a partir de esta, 1 a cada uno de los cuatro grupos de 5 cobayos e inyectar subcutáneamente 1,0 ml de cada solución en cada cobayo en el grupo en la cual esa solución fue asignada.

Lectura e interpretación de los resultados - Contar el número de cobayo sobrevivientes a 4 días después de la inyección de la toxina de desafío. Calcular la potencia relativa de la vacuna a ser examinada con respecto a la preparación de referencia en base a la proporción de animales sobrevivientes en cada uno de los grupos de cobayos vacunados, utilizando los métodos estadísticos usuales.

El ensayo sólo es válido si para la vacuna en ensayo y la preparación de referencia, la dosis protectora del 50 % cae entre la mayor y la menor dosis de las preparaciones dadas a los cobayos; cuando corresponda, el número de animales que muere en los cuatro grupos de 5 inyectados con la solución de la toxina de desafío y sus diluciones indican que la dosis de desafío es aproximadamente 100 LD₅₀; los límites de confianza (P=0.95) no deben ser menos de 50 % y no más de 200 % de la potencia estimada; el análisis estadístico no debe mostrar desviación de la linealidad y del paralelismo. El ensayo puede ser repetido pero cuando se realiza más de 1 ensayo los resultados de

todos los ensayos válidos deben ser combinados para la estimación de la potencia.

El límite de confianza inferior (P = 0,95) de la potencia estimada debe ser no menor de 30 UI por dosis humana.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el número mínimo de U.I. por dosis humana, el nombre y la cantidad del adyuvante. Indicar en el rótulo que la vacuna es destinada para inmunización primaria de niños o para adultos. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: “*Agitar antes de su uso*”; “*No congelar*”.

VACUNA CONTRA LA DIFTERIA, ADSORBIDA PARA ADULTOS Y ADOLESCENTES

Vaccinum diphtheriae adulti et adulescentis adsorbatum

Definición - La Vacuna Adsorbida contra la Difteria, para adultos y adolescentes, es una preparación de toxoide diftérico formolizado, adsorbido sobre un soporte mineral. El toxoide formolizado se debe preparar a partir de la toxina, producida por cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* y debe cumplir con los siguientes requisitos.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple con el siguiente requisito.

Toxicidad específica

Proceder según se indica en *Toxicidad específica* en *Vacuna contra la Difteria, Adsorbida*.

Toxoide diftérico purificado a granel

Proceder según se indica en *Toxoide difterico purificado a granel* en *Vacuna contra la Difteria, Adsorbida*.

Vacuna final a granel

La preparación final de vacuna a granel se obtiene mediante adsorción de una cantidad apropiada de preparación de toxoide purificado a granel en fosfato de aluminio hidratado o hidróxido de aluminio; la mezcla resultante debe ser aproximadamente isotónica con la sangre. Se pueden agregar conservantes antimicrobianos apropiados. Algunos conservantes como los fenólicos no se deben emplear porque afectan la actividad antigénica. Para la preparación del lote final sólo se pueden utilizar una vacuna final a granel que cumpla con los siguientes requisitos:

Conservantes <80>

Debe contener no menos de 85 % y no más de 115 % de la cantidad declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Lote final

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Lote final* en *Vacuna contra la Difteria Adsorbida*.

ENSAYOS

Identificación

El toxoide diftérico debe ser identificado por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) previa desadsorción del soporte mineral utilizado como adyuvante. El siguiente método de desadsorción, aplicable a ciertas vacunas, es dado como ejemplo: disolver, en la vacuna en ensayo una cantidad suficiente de citrato de sodio para obtener una solución de aproximadamente 100 g por litro. Mantener a 37 °C durante 16 horas y centrifugar hasta obtener un sobrenadante líquido claro que reacciona con una antitoxina diftérico, produciendo un precipitado.

En caso de no obtener precipitado; proceder del siguiente modo: centrifugar 15 ml de la vacuna en ensayo; resuspender el residuo en 5 ml de una mezcla recientemente preparada de 1 volumen de una solución de 56 g por litro de edetato disódico y 49 volúmenes de una solución de 90 g por litro de fosfato dibásico de sodio. Mantener a 37 °C por un período no menor a 6 horas y centrifugar hasta obtener un sobrenadante líquido claro que reacciona con una antitoxina diftérico, produciendo un precipitado.

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio en vacunas adsorbidas* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Debe contener no menos que la mínima cantidad que haya mostrado ser efectiva y no más de 115 % de la cantidad declarada en el rótulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Vacuna contra la Difteria, adsorbida*.

El límite de confianza inferior ($P = 0,95$) en la potencia estimada no debe ser menor de 2 U.I. por dosis humana única.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el número mínimo de Unidades Internacionales por dosis humana, el nombre y la cantidad del adyuvante. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: "Agitar antes de su uso"; "No congelar".

VACUNA CONTRA HAEMOPHILUS TIPO B, CONJUGADA

Vaccinum haemophili stirpe b coniugatum

Definición - La Vacuna contra Haemophilus tipo B, conjugada es una preparación líquida o liofilizada de un polisacárido obtenido de una cepa apropiada de *Haemophilus influenzae* tipo b, unido por enlace covalente a una proteína transportadora. El polisacárido, fosfato poliribosilribitol, es denominado PRP y es un copolímero lineal compuesto de unidades repetidas de 3-β-D-ribofuranosil-(1→1)-ribitol-5-fosfato [(C₁₀H₁₉O₁₂P)_n] con un tamaño molecular definido. La proteína transportadora cuando se conjuga al PRP tiene capacidad de inducir una respuesta inmune T dependiente a los polisacáridos. La Vacuna contra Haemophilus tipo B, conjugada debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

El método de producción debe demostrar que proporciona de forma homogénea vacunas conjugadas contra el *Haemophilus tipo b*, de adecuada inocuidad e inmunogenicidad para el hombre. La producción de PRP y de la proteína transportadora se debe basar en sistemas de lote semilla. El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, cuando se analiza, cumple con los requisitos de 360. *Ensayo de toxicidad anormal* y 745. *Vacunas de uso humano*.

Durante los estudios de desarrollo y cuando sean necesarios la revalidación de los procesos de elaboración, se debe demostrar mediante ensayos en animales que la vacuna induce en forma consistente una respuesta inmune T dependiente. La estabilidad del lote final y de los intermediarios se debe evaluar mediante uno o más ensayos indicadores. Tales ensayos pueden incluir determinación del tamaño molecular, la determinación del PRP libre en el conjugado y el ensayo de inmunogenicidad en ratón. Las especificaciones de liberación de los lotes se establecen teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de estabilidad, con el fin de asegurar que la vacuna será satisfactoria al final del período de validez.

Lotes semilla bacteriana

Los lotes semilla de *H. Influenzae* tipo b deben demostrar que están exentos de contaminación mediante métodos de sensibilidad adecuada. Estos

pueden incluir inoculación en medios apropiados, examinación de la morfología de las colonias, examinación microscópica de los frotis teñidos por coloración de Gram y aglutinación de los cultivos utilizando antisueros específicos adecuados. No debe incluirse ningún producto complejo de origen animal en el medio utilizado para la preservación de la viabilidad de la cepa ni para el almacenamiento del liofilizado o congelado. Es recomendable que el PRP producido por los lotes semilla sean caracterizados utilizando espectrometría de resonancia magnética nuclear.

Polisacárido de *H. Influenzae* tipo b (PRP)

El *H. Influenzae* tipo b se debe cultivar en un medio líquido que no contenga polisacáridos de alto peso molecular; si algún ingrediente del medio contiene sustancias derivadas de sangre, el proceso de fabricación debe ser validado para demostrar que, después de la etapa de purificación, tales sustancias no son detectables. La pureza bacteriológica del cultivo se debe verificar por métodos de sensibilidad apropiados. Estos pueden incluir inoculación en medios apropiados, examinación de la morfología de las colonias, examinación microscópica de los frotis teñidos por coloración de Gram y aglutinación de los cultivos utilizando antisueros específicos adecuados. Se puede inactivar el cultivo. El PRP se debe separar del medio de cultivo y se debe purificar por un método adecuado. Se determina en el polisacárido purificado la materia volátil, incluida el agua, por un método adecuado, tal como por termogravimetría (ver 20. *Análisis térmico*). El resultado se utiliza para calcular los resultados obtenidos de otros ensayos con referencia a la sustancia seca. Para la preparación del conjugado sólo se puede utilizar PRP que cumpla con los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar el PRP mediante un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) u otro método adecuado, por ejemplo, ¹H espectrometría de resonancia magnética nuclear.

Distribución del tamaño molecular

Determinar por cromatografía de exclusión (ver 100. *Cromatografía*) el porcentaje de PRP eluido con anterioridad a un valor de K_0 determinado o dentro de un intervalo de valores de K_0 ; se establece un valor aceptable para un producto en particular y cada lote de PRP debe cumplir con este límite. Los límites aplicables usualmente a los productos aprobados, utilizando las fases estacionarias indicadas, se muestran a título de información en la *Tabla 1*. Cuando corresponda, la distribución de

pesos moleculares se determina también después de la modificación química del polisacárido.

La cromatografía líquida con detección de dispersión de luz láser de múltiple ángulo puede ser también utilizada para la determinación de la distribución de peso molecular. Se puede utilizar

una determinación validada del grado de polimerización o del peso promedio del peso molecular y de la dispersión de masas moleculares en lugar de la determinación de la distribución del peso molecular.

Tabla 1 - Características del producto y especificaciones del PRP y del proteína transportadora para los productos actualmente aprobados.

Vector			Polisacáridol de <i>Haemophilus</i>		Conjugación	
Tipo	Pureza	Cantidad nominal por dosis	Tipo de PRP	Cantidad nominal por dosis	Método de acoplamiento	Procedimiento
Toxoide diftérico	> 1.500 Lf/mg de nitrógeno	18 µg	PRP tamaño reducido k_D : 0,6-0,7 utilizando agarosa reticulada para cromatografía	25 µg	Activación del PRP con bromuro de cianógeno	Toxoide de la difteria activada (D-AH ⁺), PRP activado con bromuro de cianógeno, vacuna conjugada
Toxoide tetánico	> 1.500 Lf/mg de nitrógeno	20 µg	PRP $\geq 50\%$ $\leq k_D$: 0,3 utilizando agarosa reticulada para cromatografía	10 µg	Mediado por carbodiimida	PRP activado por ADH (PRP cov-AH) + Toxoide tetánico + EDAC-vacuna conjugada
Proteína diftérica CRM 197	> 90 % de proteína diftérica	25 µg	PRP tamaño reducido $D_p = 15-35$ o $10-35$	10 µg	Aminación reductiva (método de un paso) o activación de N-hidroxisuccinimida	Acoplamiento directo del PRP al CRM 197 (cianoborohidruro o activado)
OMP (Complejo proteico de membrana externa Meningococo grupo B)	Vesículas de la membrana proteica externa; $\leq 8\%$ de polisacárido	125µg o 250 µg	PRP tamaño reducido $k_D < 0,6$ utilizando agarosa reticulada para cromatografía $M_w > 50 \times 10^3$	7,5 µg o 15 µg	Enlace tioéter	Activación PRP por CDI PRP-IM + BuA2 + BrAc = PRP-BuA2-BrAc + OMP tioactivado-

ADH = dihidrazida del ácido adípico

BrAc = cloruro de bromoacetilo

BuA2 = butano-1,4-diamida

CDI = carbonildiimidazol

D_p = grado de polimerización

EDAC = 1- etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

IM = imidazol

M_w = masa media del peso molecular

Ribosa

No menos de 32 %, calculado en base a la sustancia seca. Proceder del siguiente modo:

Solución estándar - Disolver 25 mg de ribosa en agua y diluir a 100 ml con el mismo solvente. Inmediatamente antes de su uso, diluir 1 ml de esta solución a 10 ml con agua. Transferir 0,10 ml; 0,20 ml; 0,40 ml; 0,60 ml; 0,80 ml y 1,0 ml de la solución obtenida a sendos tubos.

Solución muestra - Preparar una solución en un matraz apropiado que contenga 5 mg de polisacárido seco por ml. Transferir cuantitativamente el contenido de un envase de la vacuna a esta solución y diluir a volumen con agua. Diluir la solución tal que el volumen usado en el ensayo contenga 2,5 µg a 25 µg de ribosa. Transferir 0,20 ml y 0,40 ml de la solución obtenida a sendos tubos por triplicado.

Procedimiento - Completar el volumen de cada tubo hasta obtener 2 ml con agua y mezclar. Agregar 2 ml de una solución de 0,5 g de cloruro férrico por litro en ácido clorhídrico a cada tubo y mezclar. Agregar 0,2 ml de una solución de orcinol en alcohol. Colocar los tubos en un baño de agua durante 20 minutos. Colocar en agua congelada. Medir la absorbancia de cada solución a 670 nm usando un blanco preparado con 2 ml agua. Realizar una curva de calibración a partir de las absorbancia medidas para las *Soluciones estándar* en función del correspondiente contenido de ribosa en las mismas y leer a partir de la curva la cantidad de ribosa presente en la muestra de cada volumen ensayado. Calcular el promedio de los tres valores.

Fósforo

Entre 6,8 % y 9,0 %, calculado en base a la sustancia seca. Proceder del siguiente modo.

Solución estándar - Disolver 0,2194 g de fosfato dihidrógeno de potasio en 500 ml en agua hasta obtener una solución conteniendo un equivalente de 0,1 mg de fósforo por ml. Diluir 5,0 ml de la solución a 100 ml con agua. Transferir 0,5 ml; 1,0 ml y 2,0 ml de la solución diluida a 3 tubos de ignición.

Solución muestra - Preparar una solución que contenga 5 mg por ml de polisacárido seco. Transferir cuantitativamente el contenido de un envase de la vacuna al matraz y diluir a volumen con agua. Diluir la solución tal que el volumen usado en el ensayo (1 ml) contenga aproximadamente 6 µg de fósforo. Transferir 1 ml de esta solución a un tubo de ignición de 10 ml.

Procedimiento - Agregar a todos los tubos 0,2 ml de ácido sulfúrico y calentar en un baño de aceite a 120 °C durante 1 hora y luego a 160 °C hasta la aparición de humos blancos

(aproximadamente 1 hora). Enfriar y agregar 0,1 ml de una ácido perclórico y calentar a 160 °C hasta que la solución se decolore (aproximadamente 90 minutos). Enfriar y agregar a cada tubo 4 ml de agua y 4 ml de reactivo de molibdato de amonio. Calentar en baño de agua a 37 °C durante 90 minutos y enfriar. Ajustar el volumen a 10 ml con agua. El color azul desarrollado es estable por algunas horas. Medir la absorbancia de cada solución a 820 nm usando un blanco para compensación de líquido. Realizar una curva de calibración a partir de las absorbancia medidas para las tres *Soluciones estándar* en función de la cantidad de fósforo en dichas soluciones y leer a partir de la curva la cantidad de fósforo presente en la muestra.

Proteínas

No más de 1,0 %, calculado con respecto a la sustancia en base seca. Emplear una cantidad suficiente de PRP que permita la detección de proteínas de una concentración de 1 % o mayor. Proceder del siguiente modo:

Solución estándar - Disolver 0,100 g de albúmina bovina en 100 ml de una solución 0,1 M de hidrogeno de sodio. Diluir 1,0 ml de esta solución en 20 ml de hidrogeno de sodio 0,1 M (solución madre). Diluir 1 ml de esta solución en 4 ml de hidrogeno de sodio 0,1 M (solución diluida). Transferir a seis tubos de vidrio 0,10 ml; 0,20 ml, y 0,40 ml de la solución madre y 0,15 ml, 0,20 ml y 0,25 ml de solución diluida. Completar el volumen de cada tubo hasta 0,40 ml utilizando hidrogeno de sodio 0,1 M.

Solución muestra - Preparar una solución que contenga 5 mg por ml de polisacárido seco. Transferir cuantitativamente el contenido de un envase de la vacuna al matraz y diluir a volumen con agua. Transferir 1 ml de la solución a un tubo de vidrio y agregar 0,15 ml de una solución de 400 g por litro de ácido tricloroacético. Mezclar, dejar en reposo por 15 minutos, centrifugar durante 10 minutos a 5.000 rpm y descartar el sobrenadante. Agregar al precipitado de centrifugación 0,4 ml de hidrogeno de sodio 0,1 M.

Procedimiento - Agregar a todos los tubo 2 ml de solución de tartárico-cúprico, mezclar y dejar en reposo durante 10 minutos. Agregar a cada tubo 0,2 ml de una mezcla de volúmenes iguales de reactivo de fosfomolibdeno-tungstico y agua, preparada inmediatamente antes de su uso. Tapar los tubos y agitar por inversión y mantener en la oscuridad durante 30 minutos. El color azul desarrollado debe ser estable por 60 minutos. Si es necesario centrifugar para obtener una solución más clara. Medir la absorbancia de cada solución a

760 nm usando un blanco preparado empleando 0,4 ml de hidróxido de sodio 0,1 M. Dibujar una curva de calibración a partir de las absorbancia medidas de las 6 soluciones de referencia en función del correspondiente contenido de proteína de dichas soluciones y leer a partir de la curva el contenido de proteína presente en la muestra.

Ácido nucleico

No más de 1,0 %, calculado con respecto a la sustancia seca. Proceder del siguiente modo:

Solución muestra - Preparar una solución que contenga 5 mg por ml de polisacárido seco. Transferir cuantitativamente el contenido de un envase de la vacuna al matraz y diluir a volumen con agua. Diluir la solución muestra si es necesario para obtener un valor de absorbancia adecuado. Medir la absorbancia a 260 nm usando agua como blanco. La absorbancia de una solución de 1 g de ácido nucleico por litro a 260 nm es 20.

Ensayos de endotoxinas bacterianas <330>

No más de 25 U.I. de endotoxina por µg de PRP.

Residuos de reactivos

Cuando se requiera, se efectúan ensayos para determinar residuos de los reactivos utilizados durante la inactivación y purificación. Se establece un valor aceptable para cada reactivo de un producto particular y cada lote de PRP debe cumplir con dichos límites. Si los estudios de validación han demostrado la remoción de un reactivo residual, se puede omitir el ensayo en el PRP.

Proteína transportadora

La proteína transportadora se elige de modo que, una vez conjugada al PRP, sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria T dependiente. Las proteínas transportadoras y los métodos de acoplamiento actualmente aprobados se indican, a título de información, en la *Tabla 2*. Las proteínas transportadoras se obtienen por cultivo de microorganismos adecuados. Se debe verificar la pureza bacteriológica del cultivo; éste se puede inactivar; la proteína transportadora debe ser purificada mediante un método apropiado.

Tabla 2 . Requerimientos del conjugado a granel para los productos actualmente aprobados.

Ensayo	Vector proteico			
	Toxoide diftérico	Toxoide tetánico	CRM 197	OMP
PRP libre	< 37%	< 20 %	< 25%	< 15%
Proteína libre	< 4 %	< 1 %; cuando proceda	< 1% o < 2% según el método de acoplamiento	no aplicable
Relación PRP: proteína	1,25 – 1,8	0,30-0,55	0,3 – 0,7	0,05 – 0,1
<i>agarosa reticulada para cromatografía R</i>	95 % < 0,75	60% < 0,2	50% 0,3 – 0,6	85% < 0,3
<i>agarosa reticulada para cromatografía RI</i>	0,6 – 0,7	85% < 0,5		

En la preparación del conjugado sólo se puede utilizar una proteína transportadora que cumpla con los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar la proteína transportadora mediante un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*)

Ensayos de esterilidad <370>

Realizar el ensayo utilizando para cada medio 10 ml o el equivalente a 100 dosis, eligiendo la cantidad que sea menor.

Toxoide diftérico

Proceder según se indica en *Toxoide diftérico purificado a granel en Vacuna contra la Difteria, Adsorbida*.

Toxoide tetánico

Proceder según se indica en *Toxoide tetánico purificado a granel en Vacuna contra el Tétanos*,

Adsorbida. La pureza antigénica no debe ser menor de 1.500 Lf por mg de nitrógeno proteico.

Proteína diftérica CRM 197

Debe contener no menos de 90 % de proteína diftérica CRM 197, determinada mediante un método adecuado. Realizar ensayos adecuados, para la validación o rutina, para demostrar que el producto no es tóxico.

OMP (Complejo proteico de la membrana externa de Neisseria meningococica grupo B)

Debe contener no más de 8 % de lipopolisacárido, determinado por un método apropiado. Debe cumplir con los requisitos de 340. *Ensayo de piretógenos*, inyectando a cada conejo 0,25 µg de OMP por kg de masa corporal.

Conjugado a granel

Para poder ser conjugado, el PRP se modifica químicamente; generalmente se realiza una despolimerización parcial antes o durante la conjugación. Los grupos funcionales reactivos o espaciadores se pueden introducir en la proteína transportadora o en el PRP previamente a la conjugación. Como una medida de consistencia se monitorea el alcance de la derivatización. El conjugado se obtiene por la unión covalente el PRP y la proteína vector. Si se requiere, los grupos funcionales no reactivos pero potencialmente reactogénicos se neutralizan mediante agentes enmascarantes y el conjugado es purificado para eliminar los residuos químicos. Para la preparación de la vacuna final a granel, sólo se puede utilizar un conjugado a granel que cumpla con los siguientes requerimientos. Para cada ensayo de un producto particular se establecen límites de aceptación, y cada lote de conjugado debe cumplir estos límites. Para algunos de estos ensayos, los límites aplicables a los productos aprobados en la actualidad se muestran a título de información en la *Tabla 2*. En el caso de la vacuna liofilizada, algunos de los ensayos se pueden realizar en el lote final antes que en el conjugado a granel, ya que el proceso de liofilización puede afectar el componente a ser ensayado.

PRP

Determinar el contenido de PRP según se indica en *Fósforo, Ribosa* o por un método inmunoquímico (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*)

Proteína

Realizar el método descrito anteriormente.

Relación entre PRP y proteínas

Determinar esta relación por cálculos.

Distribución de tamaño molecular

Proceder según se indica en *Cromatografía por exclusión en 100. Cromatografía*.

PRP libre

El PRP libre es determinado luego de remoción del conjugado, por ejemplo mediante cromatografía de: intercambio aniónico, de exclusión o hidrófoba, por ultrafiltración u otros métodos validados.

Proteína transportadora libre

Determinar el contenido por un método apropiado ya sea por cálculos directos o bien a partir de los resultados de otros ensayos. El contenido debe estar comprendido entre los límites aprobados para el producto particular.

Grupos funcionales no reactivos

El conjugado a granel no debe contener ningún grupo funcional que no haya reaccionado, a menos que en la validación del proceso se demuestre que

los grupos funcionales no reactivos detectados en esta etapa se eliminan en los procesos de fabricación posteriores (por ejemplo, debido a su corto tiempo de vida medio).

Residuos Químicos

La remoción de los reactivos químicos residuales, tales como cianuro, EDAC (etil dimetilaminopropilcarboxi-imida) y fenol, se confirma mediante ensayos adecuados o por validación del proceso.

Ensayos de esterilidad <370>

Realizar el ensayo utilizando para cada medio 10 ml o el equivalente a 100 dosis, eligiendo la cantidad que sea menor.

Vacuna final a granel

Se puede añadir al conjugado a granel, antes de la dilución de la concentración final con un diluyente adecuado, un adyuvante, un conservante antimicrobiano y un estabilizador. En la preparación del lote de vacuna final sólo se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla con los siguientes requisitos.

Conservante antimicrobiano <80>

Cuando se haya utilizado, se debe determinar la cantidad de conservante antimicrobiano por un método químico o fisicoquímico adecuado. El contenido no debe ser menor de 85 por ciento ni mayor de 115 por ciento de la cantidad declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml para cada medio.

Lote final

Sólo se libera para su utilización un lote final de vacuna que cumpla con los requisitos según se indica en *Ensayos*. Si en la vacuna final a granel se ha realizado el ensayo de conservantes antimicrobianos, se pueden omitir estos ensayos en el lote final.

Determinación del pH <250>

Debe encontrarse en el intervalo aprobado para el producto particular.

PRP libre

El PRP libre es determinado luego de remoción del conjugado, por ejemplo mediante cromatografía de: intercambio aniónico, de exclusión o hidrófoba, por ultrafiltración u otros métodos validados. El contenido de PRP libre no es mayor que el aprobado por el producto particular.

ENSAYOS

Identificación

Emplear un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) para identificar

Contenido de PRP

No menos de 80 % de la cantidad de PRP indicada en el rótulo. Determinar el PRP según se indica en *Ribosa*, *Fósforo* o por cromatografía líquida de intercambio aniónico con detección por amperímetro de pulso.

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Cuando se haya utilizado, se debe determinar la cantidad de conservante antimicrobiano por un método químico o fisicoquímico adecuado. El contenido no debe ser menor a la cantidad mínima que demuestre ser eficaz y no debe ser mayor de 115 % de la cantidad declarada en el rótulo.

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. Para vacunas liofilizadas, no más de 3,0 %.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayos de pirogénos <340>

Inyectar, por kilogramos de masa corporal de conejo, una cantidad de vacuna equivalente a 1 µg de PRP en el caso de vacunas con toxoide diftérico o proteína diftérica CRM 197 utilizada como vector; 0,1 µg de PRP en el caso de vacunas con toxoide tetánico como vector; 0,025 µg de PRP en el caso de vacunas con OMP como vector.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cantidad en µg de PRP por dosis humana, el tipo y cantidad nominal de proteína transportadora por dosis humana.

VACUNA CONTRA LA HEPATITIS A INACTIVADA ADSORBIDA

Vaccinum hepatitis A inactivatum adsorbatum.

Definición - La Vacuna contra la Hepatitis A inactivada adsorbida es una suspensión de la cepa apropiada de virus de hepatitis A, crecida en cultivo celular, inactivada por un método validado y adsorbida en un transportador mineral. La Vacuna contra la Hepatitis A inactivada adsorbida debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

La vacuna debe ser preparada a partir de un sistema de lotes semilla y, de un sistema de banco de células. El método de producción debe ser uniforme en la obtención de vacunas que cumplen con los requisitos de inmunogenicidad, inocuidad y estabilidad.

El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple con 360. *Ensayo de toxicidad anormal y 745. Vacunas de uso humano.*

A no ser que esté debidamente justificado y autorizado, el virus de la vacuna final no deberá tener un número de pasajes, desde el lote de semilla maestra, mayor al que se empleó para preparar la vacuna que demostró en estudios clínicos ser segura y eficaz.

Preparación de referencia - Debe ser una parte de un lote representativo de la producción, que haya demostrado ser al menos tan inmunogénico en animales como el lote utilizado en ensayo clínicos en jóvenes y adultos sanos, donde haya producido una seroconversión de no menos de 95 %, correspondiente a un nivel de anticuerpo neutralizante reconocido como protector después de un esquema completo de inmunización primaria. Se considera como protector un nivel de anticuerpos circulantes no menor de 20 mUI/ml determinado por ensayo de inmunoanálisis de enzima conjugado (ELISA).

Sustrato para multiplicación del virus

El virus se debe multiplicar en células diploides humanas (ver 1125. *Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano*) o en cultivos continuos de células aprobadas por la Autoridad Sanitaria competente.

Lote semilla

La cepa del virus de hepatitis A utilizada debe estar identificada por registros históricos que

incluyan información sobre el origen de la cepa y su posterior manipulación.

Para la multiplicación del virus, solamente se puede utilizar un lote semilla de virus que cumpla los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar el virus de hepatitis A en los lotes semilla maestros y lotes de semilla de trabajo, utilizando anticuerpos específicos.

Concentración del virus

Controlar la concentración del virus en los lotes semilla y de lote semilla de trabajo para verificar la uniformidad de la producción.

Ensayo para agentes extraños en vacunas virales <415>

El lote de semilla de trabajo debe cumplir con los requisitos para los lotes semilla maestros. Adicionalmente, si se han utilizado cultivos primarios de células de mono para el aislamiento de la cepa, se deberán tomar medidas que aseguren que la cepa no está contaminada por virus de simio tales como inmunodeficiencia de simios o por filovirus.

Multiplicación del virus y cosecha

Todos los procesos del banco celular y posteriores cultivos celulares se deben realizar bajo condiciones de asepsia, en una zona donde no se manejan otros tipos de células. En el medio de crecimiento celular se puede utilizar suero animal adecuado (pero no suero humano). El suero y la tripsina utilizados en la preparación de suspensiones celulares y de medios de cultivo deben estar exentos de agentes extraños. El medio de cultivo celular puede contener un indicador de pH, tal como rojo fenol, así como antibióticos apropiados, en la concentración efectiva más baja. Durante la producción es preferible disponer de un sustrato exento de antibióticos. No menos de 500 ml de la producción de cultivo celular se debe reservar como control de células no infectadas (células control).

Se pueden mezclar varias cosechas del mismo cultivo celular y considerar la mezcla como una cosecha individual. Para la preparación de la vacuna final a granel, solamente se puede utilizar una cosecha viral que cumpla los siguientes requisitos. [NOTA: cuando la determinación de la relación, entre la concentración de virus con el contenido de antígenos, se ha llevado a cabo de manera repetida y uniforme puede subsecuentemente ser omitida en los ensayos de rutina.]

Identificación

Los ensayos utilizados para la identificación del contenido de antígeno también sirven para la identificación en cada cosecha.

Contaminación bacteriana y fúngica

Cada cosecha debe cumplir con 370. *Ensayos de esterilidad*, empleando 10 ml para cada medio.

Ensayo de micoplasmas <336>

Cada cosecha debe cumplir con los requisitos empleando 1 ml de cada medio.

Control de células

Los controles de células de los cultivos células de producción deben cumplir con los ensayos de identificación y requisitos de agentes extraños.

Contenido de antígeno

Monitorear la uniformidad de producción por determinación de contenido de antígeno de hepatitis A por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*); el contenido debe estar dentro de los límites aprobados para cada producto en particular.

Relación entre la concentración de virus y el contenido de antígeno

La uniformidad de la relación entre la concentración de virus, determinada por un método de cultivo celular apropiado, y el contenido de antígeno se debe establecer por validación en un número apropiado de cosechas individuales.

Purificación y cosecha purificada

La cosecha, la cual puede ser obtenida de la mezcla de varias cosechas diferentes, debe ser purificada por métodos validados. Si utilizan líneas de cultivos de células continuas para la producción, los procesos de purificación deben haber demostrado reducir de manera importante los niveles de ADN de las células huésped. En la preparación de la cosecha final inactivada a granel, solamente se puede utilizar una cosecha purificada que cumpla con los siguientes requisitos.

Concentración viral

Determinar la concentración en virus en la cosecha purificada, por un método de cultivo celular adecuado, para monitorear la uniformidad de la producción y como punto de partida para monitorear la curva de inactivación.

Relación antígeno y proteína total

Determinar el contenido de antígeno de hepatitis A por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Determinar el contenido de proteína total por un método validado. La relación entre el contenido de antígeno de hepatitis A y la proteína debe estar comprendido dentro de los límites establecidos para cada producto.

Albumina sérica bovina

No más de 50 ng por dosis humana, determinada mediante un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Para demostrar una purificación efectiva, cuando sea posible de acuerdo a los procesos de manufactura, otros marcadores de proteína apropiados pueden ser usados en forma efectiva.

ADN residual de la célula huésped

Si la vacuna se produce a partir de cultivos de células continuas, el contenido de ADN residual de la célula huésped, determinado por un método adecuado, no debe ser mayor de 100 pg de ADN en la cantidad de antígeno equivalente a una dosis humana de vacuna.

Residuos químicos

Si se han utilizado sustancias químicas durante el proceso de purificación, los controles deben efectuarse en la cosecha del purificado (o en la cosecha del inactivado) salvo que se haya validado que el proceso los ha removido. La concentración de estos residuos no debe ser mayor que la cantidad establecida para cada tipo de producto.

Inactivación y cosecha inactivada

Antes de la inactivación se pueden mezclar varias cosechas purificadas. A los fines de evitar interferencia en el proceso de inactivación deben evitarse la formación de agregados virales, o removerlos inmediatamente antes o durante el proceso de inactivación. El método para la inactivación viral debe estar validado, debe demostrar que en forma uniforme es capaz de inactivar el virus de hepatitis sin destruir la actividad antigénica e inmunogénica; para cada proceso de inactivación se debe trazar una curva de inactivación que represente la concentración del virus residual vivo medida con no menos de tres puntos en el tiempo (ejemplo 0, 1 y 2 días de la inactivación). Cuando se utiliza formaldehído para la inactivación, se debe verificar la presencia en exceso de formaldehído libre al finalizar el proceso de inactivación. En la preparación de la vacuna final a granel, solamente se puede utilizar una cosecha purificada inactivada que satisfaga los siguientes requisitos.

Eficacia de inactivación

Realizar un ensayo de amplificación para la detección de infección residual de virus de hepatitis A por inoculación de una cantidad de la cosecha inactivada equivalente al 5 % del lote o, caso de que la cosecha contenga el equivalente a 30.000 dosis o más, no menos de 1.500 dosis de vacuna, en cultivos de células del mismo tipo de las usadas en la producción. Incubar durante 70 días efectuando no menos que un pasaje dentro

de ese período. Al finalizar el período de incubación, realizar un ensayo de sensibilidad apropiado para infección residual viral. En las muestras tomadas al final de la inactivación no debe haber evidencia de multiplicación viral. Emplear como control, virus no infecciosos para demostrar la ausencia de interferencia y la susceptibilidad. Incubar no menos de 70 días, efectuando no menos que un pasaje de células durante este período.

Ensayos de esterilidad <370>

La cosecha de antígeno inactivado debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

No debe contener menos de 2 U.I. equivalente a la dosis humana.

Contenido de antígeno

Emplear un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*).

Residuos químicos

Proceder según se indica en *Purificación y cosecha purificada*.

Vacuna final a granel

La vacuna final a granel se debe preparar a partir de una o más cosechas inactivadas. Se pueden agregar adyuvantes, estabilizadores y conservantes antimicrobianos. En la preparación del lote final, solamente se puede utilizar vacuna final a granel que cumpla con los siguientes requisitos.

Ensayo de esterilidad <370>

Realizar el ensayo de esterilidad sembrando 10 ml en cada medio.

Conservantes <80>

No debe contener menos de 85 por ciento ni más de 115 por ciento de la cantidad declarada.

Lote final

La vacuna final a granel se debe distribuir asépticamente en envases estériles, para inyectables, con cierre inviolable. Los envases deben estar cerrados de tal manera de evitar la contaminación.

El lote final de vacuna debe cumplir con los requisitos indicados en *Ensayos y Valoración* para ser liberado para su uso. Si los ensayos de *Formaldehído libre* y *80. Conservantes* fueron realizados sobre la vacuna final a granel y dieron resultados satisfactorios, los mismos pueden omitirse en el lote final. Si la *Valoración* se realiza en ratones u otros animales en la vacuna final a granel y cuenta con resultados satisfactorios estos pueden ser omitidos en el lote final.

ENSAYOS

Identificación

Identificar el antígeno de hepatitis A por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) usando anticuerpos específicos o por ensayos en vivo (valoración).

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio en vacunas adsorbidas* en 745. *Vacunas para uso humano*.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas para uso humano*.

Conservantes <80>

Si es aplicable, determinar la cantidad de conservante mediante un método químico o fisicoquímico adecuado. No debe contener menos de la cantidad mínima que demostró ser efectiva ni más de 115 por ciento de la cantidad declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Comparar la capacidad de inducir anticuerpos específicos en ratones con una preparación de referencia in vivo o in vitro, mediante la determinación inmunoquímica del contenido de antígeno.

Ensayo in vivo

El ensayo en ratones es dado como un ejemplo de un método que ha sido encontrado adecuado para una vacuna dada, otros métodos validados pueden también ser usados.

Selección y distribución de los animales en el ensayo - Utilizar en el ensayo ratones sanos del mismo stock, de aproximadamente 5 semanas de edad y de una cepa que ha sido demostrada ser adecuada. Usar animales del mismo sexo. Distribuir los animales en al menos 7 grupos de un número adecuado para cumplir los requerimientos del ensayo.

Determinación de la potencia de - Usando una solución de 9 g/l de cloruro de sodio conteniendo aluminio usado como adyuvante en la vacuna, preparar al menos tres diluciones de la vacuna en ensayo e idénticas diluciones para la preparación de referencia. Asignar las diluciones una para cada uno de los grupos de animales e inyectar subcutáneamente no más de 1,0 ml de cada dilución en cada animal de cada grupo para las cuales ha sido asignada. Mantener un grupo de controles no vacunados, inyectados subcutáneamente con el mismo volumen de diluyente. Después de 28 a 32 días, anestesiarse y

sangrar los animales, manteniendo por separado los sueros individuales. Analizar el suero individual para anticuerpos específicos contra virus Hepatitis A por un método inmunoquímico apropiado.

Cálculos - Realizar los cálculos por un método estadístico usual para el ensayo de respuestas cuantales. A partir de la distribución de niveles de reacciones medidas en todos los sueros de los controles no vacunados, determinar el máximo de nivel reacción que puede esperarse ocurrir en un animal no vacunado para el ensayo en particular. Cualquier respuesta en animales vacunados que excede este nivel es por definición una seroconversión. Hacer una adecuada transformación del porcentaje de animales mostrando seroconversión en cada grupo (por ejemplo por método Probit) y analizar los datos siguiendo un modelo de líneas paralelas de curvas de respuesta vs log de dosis. Determinar la potencia de la preparación a ser examinada relativa a la preparación de referencia.

El ensayo sólo es válido si para la vacuna de referencia y muestra, la ED₅₀ cae entre las dosis más altas y más bajas dadas a los animales; el análisis estadístico no debe mostrar desviación significativa con respecto a la linealidad ni al paralelismo; los límites de confianza ($P=0.95$) no deben ser menos de 33 % y no más de 300 % de la potencia estimada.

Ensayo in vitro

Realizar una determinación inmunoquímica del contenido del antígeno con criterios de aceptación validados contra un ensayo in vivo. Los criterios de aceptación dados para preparación de referencia serán aprobados por la autoridad competente a la luz de los datos de validación

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cantidad de antígeno de Hepatitis por dosis y el tipo de células utilizado para la preparación de la vacuna.

VACUNA CONTRA LA HEPATITIS A, INACTIVADA VIROSOMAL

Vaccinum hepatitis A inactivatum virosomale

Definición - La Vacuna contra la Hepatitis A inactivada virosomal es una suspensión de la cepa de virus apropiado de hepatitis A, crecida en cultivo celular e inactivada por método validado. Los virosomas son compuestos por proteínas de virus de la influenza de una cepa aprobada para un producto particular y con fosfolípidos que son usados como adyuvantes. La Vacuna contra la Hepatitis A inactivada virosomal debe cumplir con los siguientes requisitos.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

El método de producción debe demostrar ser uniforme en la obtención de vacunas que cumplan con los requisitos de eficacia, e inocuidad en humanos. El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple los requisitos de 360. *Ensayo de toxicidad anormal*.

Preparación de referencia - La preparación de referencia debe ser una vacuna inactivada de antígeno de hepatitis A calibrada contra un lote de hepatitis A (inactivado virosomal) que en ensayo clínicos en jóvenes y adultos sanos, donde haya producido una seroconversión de no menos de 95 %, correspondiente a un nivel de anticuerpo neutralizante reconocido como protector después de un esquema completo de inmunización primaria. Se considera como protector un nivel de anticuerpos circulantes no menor de 20 mUI/ml determinado por ensayo inmunoanálisis de enzima conjugado (ELISA).

Preparación de antígeno de virus de Hepatitis A

La producción de la vacuna se debe basar en un sistema de lotes semilla y, en un sistema de banco de células. El método de producción debe demostrar la obtención de vacunas uniformes que cumplan con los requisitos de inmunogenicidad, inocuidad y estabilidad.

A no ser que esté debidamente justificado y autorizado, el virus de la vacuna final no deberá tener un número de pasajes, desde el lote de semilla maestro, superior al que se empleó para preparar la vacuna utilizada en estudios clínicos satisfactorios de inocuidad y eficacia.

Sustrato para multiplicación del virus

El virus se debe multiplicar en células diploides humanas (ver 1125. *Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano*).

Lote semilla

Proceder según se indica en *Lote semilla* en *Vacuna contra la Hepatitis A, inactivada adsorbida*.

Multiplicación del virus y cosecha

Proceder según se indica en *Multiplicación del virus y cosecha* en *Vacuna contra la Hepatitis A, Inactivada Adsorbida*.

Purificación y cosecha purificada

Proceder según se indica en *Purificación y cosecha purificada* en *Vacuna contra la Hepatitis A, Inactivada Adsorbida*.

Inactivación e inactivación de la cosecha

Proceder según se indica en *Inactivación e inactivación de la cosecha* en *Vacuna contra la Hepatitis A, Inactivada Adsorbida*.

Vacuna final a granel

La vacuna final a granel se debe preparar a partir del agregado de virosomas a antígenos de virus de Hepatitis A inactivados en una proporción aprobada de antígeno/virosoma. Se pueden mezclar varios graneles y agregar estabilizadores y conservantes antimicrobianos autorizados. En la preparación del lote final, solamente se puede utilizar vacuna final a granel que cumpla con los siguientes requisitos.

Contenido de proteínas

Determinar mediante un método químico apropiado.

Fosfolípidos

Determinar el contenido de identidad de los fosfolípidos por un métodos inmunoquímicos (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) o fisicoquímicos. Los límites deben cumplir con las especificaciones aprobadas para el producto.

Contenido de Antígeno de Hemoaglutinina

Determinar el contenido de antígeno de hemoaglutinina por un método de inmunodifusión. El contenido de hemoaglutinina no debe ser mayor de los límites aprobados para el producto.

Contenido de Antígenos de Hepatitis A

Determinar el contenido de antígeno de hepatitis A por un método de inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). El contenido de antígeno no debe ser mayor de los límites aprobados para el producto.

Relación de antígeno de hepatitis A a hemoaglutininas

La relación del contenido de hepatitis A y del contenido de hemaglutinina debe estar dentro de los límites aprobados para cada producto.

Ovoalbumina

No debe contener más de 1 µg de ovalabúmina en el equivalente de una dosis humana por el método y referencias apropiadas (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*).

Tamaño del virosoma

La distribución de la mezcla de virosoma-hepatitis A debe estar dentro de los límites aprobados para cada producto.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Conservante <80>

No debe contener menos de 85 % ni más de 115 % de la cantidad declarada.

Residuos químicos

Si se utilizan químicos durante la formulación se deben analizar los residuos los que deben estar dentro de los límites aprobados para cada producto particular.

Lote final

Proceder según se indica en *Lote final* en *Vacuna contra la Hepatitis A, Inactivada Adsorbida*.

ENSAYOS

Identificación

Identificar el antígeno de hepatitis A por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) usando anticuerpos específicos o por ensayos en vivo.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

No debe contener menos de 85 ni más de 115 % de la cantidad declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Deben contener menos de 2 UI de endotoxinas del equivalente de dosis humana.

VALORACIÓN

Proceder según se indica en *Valoración* en *Vacuna contra la Hepatitis A, Inactivada Adsorbida*.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cantidad de antígeno de Hepatitis por dosis, el tipo de células utilizado para la preparación de la vacuna.

VACUNA CONTRA LA HEPATITIS B, ADN RECOMBINANTE

Vaccinum hepatitis B (ADN recombinante).

Definición - La Vacuna contra la Hepatitis B (ADNr) es una preparación del antígeno de superficie de hepatitis B, un componente proteico del virus de la hepatitis B. El antígeno puede ser adsorbido sobre un soporte mineral, como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio hidratado. El antígeno es obtenido por tecnología de ADN recombinante. La Vacuna contra la Hepatitis B, ADN recombinante debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

La vacuna debe inducir en el hombre anticuerpos específicos protectores. El método de producción debe demostrar obtener vacunas uniformes contra la hepatitis B que cumplan con los requisitos de inmunogenicidad e inocuidad. El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple los requisitos de 360. *Ensayo de toxicidad anormal.*

La vacuna de la hepatitis B (ADNr) se debe obtener por expresión del gen viral que codifica el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) en células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) o en células de mamíferos [células de ovarios de hámster chino (CHO) u otras líneas celulares adecuadas], purificación del HBsAg resultante y para lograr de este antígeno una preparación inmunogénica. La idoneidad y seguridad de otras células utilizadas deben ser aprobadas por la Autoridad Sanitaria competente y haber demostrado ser seguras y efectivas. La vacuna puede contener el producto del gen S (proteína principal), una combinación de los productos del gen S y del gen pre-S2 (proteína intermedia) o una combinación de los productos del gen S, del gen pre-S2 y del gen pre-S1 (proteína grande).

Preparación de referencia - La preparación de referencia debe ser una parte de un lote representativo de la producción, que haya demostrado ser al menos tan inmunogénico en animales como el lote utilizado en ensayo clínicos en jóvenes y adultos sanos, donde haya producido una seroconversión de no menos de 95 %, correspondiente a un nivel de anticuerpo neutralizante de HbsAg reconocido como protector después de un esquema completo de inmunización primaria. Se considera como protector un nivel de anticuerpos circulantes no menos de 10 mUI por ml.

Caracterización del antígeno

El antígeno debe estar caracterizado en cuanto a su estructura completa proteica, lipídica y de carbohidratos. Las características morfológicas de las partículas antigénicas deben ser establecidas por microscopio electrónica. La densidad boyante media de las partículas de antígeno se determina por un método fisicoquímico tal como el de centrifugación en gradiente. Los epitopes antigénicos deben ser caracterizados. La fracción proteica del antígeno debe ser caracterizada en términos de estructura primaria (por ejemplo, determinando la composición en aminoácidos, análisis parcial de la secuencia de aminoácidos o por medio del mapeo peptídico).

Cultivo y cosecha

Se debe determinar la identidad, pureza microbiana, retención del plásmido y la uniformidad del rendimiento en determinadas etapas de la producción. Si se emplean células de mamíferos, se deben realizar los ensayos de 415. *Ensayo para Agentes extraños en vacunas virales* y 336. *Ensayo de micoplasmas.*

Antígeno purificado

En la preparación de la vacuna final a granel, solamente se puede utilizar un antígeno purificado que cumpla con los siguientes requisitos.

Proteína total

Determinar el contenido de proteína total por un método validado. Debe estar dentro de los límites aprobados para el producto específico.

Contenido antigénico e identificación

Determinar la cantidad y la especificidad del HBsAg por comparación con el Estándar Internacional del HbsAg subtipo *ad* o con una referencia interno, por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Los métodos apropiados pueden ser radioinmunoanálisis (RIA), ensayo de inmunoanálisis de enzima conjugado (ELISA), inmunotransferencia o inmunodotblot (preferiblemente utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítopo protector) o por difusión radial simple.

El cociente antígeno/proteína debe estar dentro de los límites aprobados para el producto específico. El peso molecular de la banda principal que se revela luego del análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, debe corresponderse con el valor esperado de acuerdo a la secuencia nucleotídica y peptídicas conocidas y la posible glicosilación.

Pureza antigénica

Determinar la pureza del antígeno por comparación con la preparación de referencia, usando cro-

matografía líquida o por otro método adecuado como SDS-PAGE con coloración de Coomassie o plata. El método elegido debe tener la sensibilidad suficiente como para detectar un posible contaminante con una concentración de 1 % de las proteínas totales. El HBsAg no debe representar menos de 95 % de la proteína total.

Composición

Determinar el contenido de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos.

ADN residual de la célula huésped y del vector

Si la vacuna es producida a partir de células de mamíferos, no debe contener más de 10 pg de ADN en la cantidad de antígeno equivalente a una dosis humana de vacuna.

Cesio

Si durante el proceso de producción se utiliza una sal de cesio, realizar un ensayo de cesio residual en el antígeno purificado. El contenido debe encontrarse entre los límites aprobados para el producto específico.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Dependiendo del método de producción utilizado, se podrán requerir otros análisis adicionales sobre el antígeno purificado: por ejemplo un ensayo para determinar el contenido de suero animal residual, si el sustrato corresponde a células de mamífero; o pruebas para sustancias químicas usadas durante la extracción y la purificación

Vacuna final a granel

La vacuna puede contener un conservante antimicrobiano y un adyuvante. Para la preparación del lote final solamente se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla los siguientes requisitos.

Conservantes <80>

No debe contener menos de 85 % ni más de 115 % de la cantidad declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Lote final

El lote final de vacuna debe cumplir con los requisitos indicados en *Ensayos y Valoración* para poder ser liberado para su uso. Si los ensayos de *Formaldehído libre* y *80. Conservantes*, fueron hechas sobre la vacuna final a granel, y dieron resultados satisfactorios, las mismas pueden omitirse en el lote final. Si la *Valoración* es realizada in vivo en el lote final a granel, con resultados satisfactorios, esta puede omitirse en el lote final.

ENSAYOS

Identificación

La prueba de valoración, o el perfil electroforético (donde se pueda realizar), pueden servir para identificar la vacuna.

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

No debe contener menos que la cantidad que demostró ser efectiva ni más de 115 por ciento de la cantidad declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

Ensayo de piretógenos <340>

Inyectar el equivalente a una dosis humana a cada conejo.

VALORACIÓN

El ensayo de valoración de la vacuna de Hepatitis B puede ser realizado in vivo, por comparación en condiciones dadas de su capacidad de inducir anticuerpos específicos contra antígeno de superficie de Hepatitis B en ratones o cobayos con la misma capacidad que la preparación de referencia, o in vitro, mediante la determinación inmunológica del contenido de antígeno.

Ensayo in vivo

Selección y distribución de los animales en el ensayo - Utilizar en el ensayo ratones sanos provenientes del mismo stock, de aproximadamente 5 semanas de edad. La cepa de ratón usada para este ensayo debe dar una pendiente significativa en las curvas de dosis-respuesta para el antígeno, son adecuadas ratones con haplotipo H-2^q o H-2^d. También son adecuados, cobayos sanos, de aproximadamente 7 semanas de edad, pesando entre 300 a 350 g provenientes del mismo stock. Usar animales del mismo sexo. Distribuir los animales en al menos 7 grupos de un número adecuado para cumplir los requerimientos del ensayo.

Determinación de la potencia - Usando una solución de 9 g de cloruro de sodio por litro conteniendo aluminio usado como adyuvante en la vacuna u otro diluyente, preparar al menos tres diluciones de la vacuna en ensayo e idénticas diluciones para la preparación de referencia. Asignar las diluciones una para cada uno de los grupos de animales e inyectar intraperitonealmente no más de 1,0 ml de cada dilución en cada animal de cada grupo para las

cuales ha sido asignada. Mantener un grupo de control de animales no vacunados, inyectados intraperitonealmente con el mismo volumen de diluyente. Después de un intervalo apropiado de tiempo (por ejemplo 4 a 6 semanas), anestesiar y sangrar los animales, manteniendo separado los sueros individuales. Analizar cada suero individual para anticuerpos específicos contra el antígeno de superficie del virus Hepatitis B por un método inmunológico adecuado.

Cálculos - Realizar los cálculos por un método estadístico usual para el ensayo de respuestas cuantales. A partir de la distribución de niveles de reacciones medidas en todos los sueros de los controles no vacunados, determinar el máximo nivel de reacción que puede esperarse ocurrir en un animal no vacunado para el ensayo en particular. Cualquier respuesta en animales vacunados que excede este nivel, es por definición una seroconversión. Hacer una adecuada transformación del porcentaje de animales que muestran seroconversión en cada grupo (por ejemplo por método Probit) y analizar los datos siguiendo un modelo de líneas paralelas de curvas de respuesta vs log de dosis. Determinar la potencia de la preparación a ser examinada relativa a la preparación de referencia.

El ensayo sólo es válido si para la vacuna de referencia y muestra, la ED_{50} cae entre las dosis más altas y más bajas dadas a los animales; el análisis estadístico no muestra desviación significativa con respecto a la linealidad ni al paralelismo, los límites de confianza ($P=0.95$) son no menos de 33 por ciento y no más de 300 por ciento de la potencia estimada.

El límite del intervalo de confianza superior ($P=0.95$) de la potencia relativa estimada no debe ser menor de 1,0.

Ensayo in vitro

Realizar una determinación inmunológica del contenido del antígeno con criterios de aceptación validados contra un ensayo in vivo. Se ha demostrado ser adecuados Enzima-inmunoanálisis (ELISA) y radio-inmunoensayo (RIA) usando anticuerpos monoclonales contra anticuerpos específicos para la protección-inducción de epítopes de HBsAg. Son usados para el análisis de los datos, número adecuados de diluciones de la vacuna a ser examinada y la preparación de referencia y modelos de líneas paralelas, los cuales pueden ser adecuadamente transformados. Son comercialmente disponibles kits para la medida del contenido HBsAg in Vitro y es posible adaptar sus procedimientos para ser usados en la valoración de la potencia in vitro.

Los criterios de aceptación asignados a la preparación de referencia son aprobados por la autoridad sanitaria a la luz de los datos de validación.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cantidad de HbsAg por envase, el tipo de células utilizado para la preparación de la vacuna, el nombre y cantidad del adsorbente utilizado. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: “*Agitar antes de su uso*”; “*No congelar*”.

VACUNA CONTRA LA PAROTIDITIS, VIVA

Vaccinum parotiditis vivum

Definición - La Vacuna contra la Parotiditis, viva es una preparación liofilizada obtenida a partir de una cepa adecuada y atenuada de virus de la parotiditis. La vacuna reconstituida inmediatamente antes de su uso según se indica en el rótulo, tiene la apariencia de un líquido claro que puede ser coloreado por la presencia de un indicador de pH. La Vacuna contra la Parotiditis, viva debe cumplir con los siguientes requisitos.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

La preparación de esta vacuna se basa en un sistema de virus de lotes semilla y un sistema de banco de células. El método de producción debe demostrar obtiene, de manera uniforme, vacunas vivas contra la parotiditis de adecuada inmunogenicidad e inocuidad para el hombre. A no ser que esté debidamente justificado y autorizado, el virus de la vacuna final no debe tener un número de pasajes, desde el lote de semilla maestro, superior al que se empleó para preparar la vacuna que demostró en estudios clínicos ser segura y eficaz.

El método de producción se debe validar para demostrar que el producto, si es analizado, cumple con 360. *Ensayo de toxicidad anormal y 745. Vacunas de uso humano.*

Sustrato para la multiplicación del virus

El virus se multiplica en células diploides humanas (ver 1125. *Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano*) o en cultivos de células de embrión de pollo de líquido amniótico de embriones de pollo obtenidos de criaderos libres de patógenos especificados (ver 1030. *Criaderos de pollos libres de patógenos especificados para la producción y control de calidad de las vacunas*).

Lote de siembra

La cepa del virus de la parotiditis utilizada debe ser identificada por registros históricos que incluyan información sobre el origen de la cepa y su posterior manipulación. Para evitar la utilización innecesaria de monos en *Neurovirulencia*, los lotes semilla del virus se deben preparar en cantidades importantes y conservar a una temperatura menor de -20°C si están liofilizados, o por debajo de -60°C si no están liofilizados. Para la multiplicación del virus solamente se puede utilizar un lote semilla de virus que cumpla con los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar los lotes semilla y de trabajo como virus de la parotiditis por un ensayo de seroneutralización en cultivo celular, utilizando anticuerpos específicos.

Concentración del virus

Controlar la concentración del virus en los lotes semilla y en el lote semilla de trabajo para verificar la uniformidad de la producción.

Ensayo para Agentes extraños en vacunas virales <415>

El lote semilla de trabajo debe cumplir con los requisitos para los lotes semillas maestra.

Ensayo de neurovirulencia para vacunas a virus vivo <339>

Debe cumplir con los requisitos. Los monos Macaca y Cercopithecus son apropiados para este ensayo.

Multiplicación del virus y cosecha

Todos los procesos del banco celular y posteriores cultivos celulares se deben realizar bajo condiciones de asepsia, en una zona donde no se manipulan otros tipos de células. En el medio de crecimiento celular se puede utilizar suero animal apropiado (pero no suero humano); sin embargo, el medio final, destinado al mantenimiento del crecimiento celular durante la multiplicación viral, no debe contener suero animal. Se debe demostrar que el suero y la tripsina utilizados en la preparación de suspensiones celulares y de medios de cultivo están libres de agentes extraños. El medio de cultivo celular puede contener un indicador de pH tal como rojo de fenol así como antibióticos apropiados en la concentración efectiva más baja. Durante la producción es preferible disponer de un sustrato libre de antibióticos. Se debe reservar no menos de 500 ml de la producción de cultivo celular como control de células no infectadas (células control). Si los virus se multiplican en células de embrión de pollo, el 2 por ciento pero no menos de veinte huevos, se deben dejar sin infectar como control de huevos no infectados. La suspensión de los cultivos de virus deben ser recolectados según el tiempo específico de las cepas virales utilizadas.

Para la preparación de la vacuna final a granel, solamente se puede utilizar una cosecha individual que cumpla los con los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar los virus contenidos en cada cosecha obtenida como virus de la parotiditis por seroneutralización en cultivo celular, empleando anticuerpos específicos.

Concentración del virus

Determinar la concentración del virus en la cosecha obtenida, según se indica en *Valoración* con

el fin de monitorear la uniformidad de la producción y determinar la dilución a utilizar en la vacuna final a granel.

Ensayo para agentes extraños en vacunas virales <415>

Debe cumplir con los requisitos.

Células de control y control de huevos

Las células control y los controles de huevos de la producción del cultivo celular deben cumplir con los requisitos de *Identificación* y 415. *Ensayo para Agentes extraños en Vacunas virales.*

Vacuna final a granel

Las cosechas de virus que cumplen los ensayos indicados anteriormente se deben mezclar y clarificar para remover células. Se puede agregar un estabilizante adecuado y diluir las mezclas de cosechas de un modo apropiado.

Para la preparación del lote final solamente se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla los siguientes requisitos.

Contaminación bacteriana y fúngica

La vacuna final a granel debe cumplir con 370. *Ensayos de esterilidad*, empleando 10 ml para cada medio.

Lote final

Para la liberación del producto se debe establecer la mínima concentración de virus para asegurar que, basados en datos de estabilidad, la concentración indicada en el rótulo se encontrará presente al final del período de validez.

Sólo se puede liberar para su uso un lote final que cumpla los requisitos para la concentración mínima de virus, estabilidad térmica y cada uno de los requisitos especificados en *Ensayos*. Si en la vacuna final a granel se ha realizado el ensayo para albúmina sérica bovina con resultados satisfactorios, se puede omitir su determinación en el lote final.

Estabilidad térmica

Mantener las muestras de la vacuna liofilizada sin reconstituir a 37 ° C durante 7 días. Determinar la concentración del virus según se indica en *Valoración*, en paralelo entre la vacuna sometida a exposición al calor y la vacuna sin exposición al calor incubada a 5 ± 3 °C. La concentración de virus de la vacuna tratada térmicamente no debe ser mayor de 1,0 log 10 inferior que la concentración de la vacuna sin tratamiento térmico.

ENSAYOS

Identificación

Reconstituir según se indica en el rótulo y mezclar con anticuerpos específicos contra el virus de la parotiditis. Debe perder la capacidad de infectar cultivos celulares susceptibles a este virus.

Contaminación bacteriana y fúngica

La vacuna reconstituida debe cumplir con 370. *Ensayos de esterilidad.*

Albúmina sérica bovina

No más de 50 ng por dosis humana, determinada mediante un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*).

Ovoalbúmina

Si la vacuna se produce en embrión de pollo, no debe contener más de 1 µg de ovoalbúmina por dosis humana, determinada por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*).

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 %.

VALORACIÓN

Determinar el título de virus infectivo, al menos por triplicado, utilizando como mínimo cinco cultivos celulares para cada dilución (factor de dilución 0,5 log₁₀) o por otro método de igual precisión. Utilizar una preparación de referencia de virus adecuada para validar cada titulación.

La concentración estimada del virus no debe ser menor a la indicada en el rótulo; la concentración de virus mínima no debe ser menor de 5 × 10³ CCID₅₀ por dosis humana. El ensayo sólo es válido si el intervalo de confianza (P = 0,95) del logaritmo de la concentración vírica es menor de ± 0.3.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cepa de virus utilizada para la preparación de la vacuna, el tipo y origen de las células empleadas en la preparación de la vacuna. Indicar en el rótulo el título mínimo del virus expresado en CCID₅₀, que se debe evitar el contacto con desinfectantes y el período de tiempo en el que la vacuna se puede utilizar una vez reconstituida.

VACUNA CONTRA LA PERTUSSIS, ADSORBIDA

Vaccinum pertussis adsorbatum

Sinonimia - Vacuna contra la Tos Ferina, Adsorbida.

Definición - La Vacuna Adsorbida contra la Pertussis es una suspensión salina, estéril, de células enteras inactivadas de una o varias cepas de *Bordetella pertussis*, adsorbidos sobre un soporte mineral como fosfato de aluminio hidratado o hidróxido de aluminio y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Suspensión de *B. pertussis* inactivada

La producción de la vacuna debe ser basada en un sistema de lotes semilla. Se pueden utilizar una o varias cepas de *B. pertussis* de procedencia e historia documentadas. La elección de las cepas, el medio y las condiciones de cultivo debe ser tal que en la vacuna final estén presentes los aglutinógenos 1, 2 y 3. Cada cepa se debe cultivar durante 24 a 72 horas en medio líquido o sólido, el cual carece en la etapa final de sangre o productos hemoderivados. Los medios empleados en cualquier etapa no pueden contener sangre humana o productos derivados de la misma. Las bacterias del cultivo, deben ser lavadas para eliminar sustancias del medio y suspendidas en una solución de 9 mg de cloruro de sodio por ml u otra solución isotónica apropiada. La turbidez de la suspensión se debe determinar, como máximo al cabo de 2 semanas de las cosecha de bacterias, por comparación con una Preparación Patrón Internacional de Turbidez; el resultado se utiliza como base para el cálculo a efectuar en las etapas sucesivas de la preparación de la vacuna. La Organización mundial de la Salud establece la equivalencia en Unidades Internacionales de la Preparación de Referencia Internacional.

Cada lote de células cosechadas del cultivo sólo se puede utilizar, para la preparación de la vacuna final a granel, si se demuestra que contiene células de *B. pertussis* de las mismas características que la cepa madre, en cuanto a crecimiento y aglutinógenos, y que está libre de contaminantes bacterianos y fúngicos. Las bacterias se deben inactivar y detoxificar en condiciones controladas, mediante tratamiento químico adecuado, o por calor, o por una combinación de ambos métodos. Debe demostrarse la ausencia de células vivas de *B. pertussis* sembrando en medio adecuado. La suspensión se debe mantener a 5 ± 3 °C durante un período apropiado para reducir la toxicidad.

Vacuna final a granel

Se deben mezclar cantidades apropiadas de lotes de células cosechados e inactivados y se debe agregar un soporte mineral como fosfato de aluminio hidratado o hidróxido de aluminio a la suspensión celular. Se pueden agregar conservantes antimicrobianos apropiados. La concentración bacteriana de la preparación final a granel, no debe ser mayor de la correspondiente a una turbidez de 20 U.I. por dosis humana. Si se utilizan dos o más cepas de *B. pertussis*, la composición de los lotes consecutivos debe ser consistente, de acuerdo con el porcentaje de cada una de las cepas medidas en unidades de turbidez. Para la preparación del lote final de vacuna sólo se puede utilizar una preparación final de vacuna a granel que cumpla con los siguientes requisitos.

Conservantes <80>

Debe contener no menos de 85 % y no más de 115 % de la cantidad declarada.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio ensayo.

Lote final

La vacuna final a granel se debe distribuir asépticamente en envases estériles, para inyectables, con cierre inviolable. Los envases deben ser cerrados de tal manera de evitar la contaminación. Solamente los lotes finales que cumplan los requisitos indicados en *Ensayos y Valoración* pueden ser autorizados para su uso. Los ensayos de *Toxicidad específica, Formaldehído libre* y *80. Conservantes*, así como la *Valoración*, podrían omitirse en lotes finales de vacuna, siempre que hayan sido satisfactorios en la correspondiente preparación final de vacuna a granel.

ENSAYOS

Identificación

Disolver en la vacuna en ensayo, cantidad suficiente citrato de sodio para obtener una solución de aproximadamente 100 g por litro. Mantener a 37 °C durante 16 horas y centrifugar para obtener un sedimento bacteriano. Se pueden también emplear otros procedimientos apropiados para la separación de bacterias del adsorbente. Identificar mediante aglutinación de las bacterias del sedimento resuspendido, con antisueros específicos de *B. pertussis* o mediante el ensayo según se indica en *Valoración*.

Toxicidad específica

Seleccionar un grupo de cinco ratones sanos, de 14 a 16 g como grupo de ensayo de la vacuna y otros tantos para el grupo control. Usar ratones sanos del mismo sexo o distribuir machos y

hembras de manera homogénea entre ambos grupos. Los animales deben tener libre acceso al agua y alimento durante al menos 2 horas antes de la inyección y durante el ensayo. Inyectar a cada animal del grupo de vacuna, por vía intraperitoneal, un volumen de 0,5 ml de una cantidad de vacuna equivalente a no menos de media dosis humana. Inyectar los ratones del grupo control con 0,5 ml de una solución de 9 mg de cloruro de sodio estéril por ml, preferiblemente conteniendo la misma cantidad de conservante antimicrobiano presente en la vacuna inyectada. Pesar a ambos grupos de ratones inmediatamente antes de la inyección y dentro de las 72 horas y 7 días después de la misma. La vacuna cumple con el ensayo si al cabo de 72 horas la masa total de los ratones no es menor que antes de la inyección; si transcurridos los 7 días, el promedio de incremento de masa por ratón vacunado no es menor de 60 % del de los ratones control; y no mueren más de 5 % de los ratones vacunados durante el ensayo. El ensayo puede ser repetido y los resultados de ambos ensayos pueden ser combinados.

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio en vacunas adsorbidas* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Debe contener no menos de la mínima cantidad que haya mostrado ser efectiva y no más de 115 % de la cantidad declarada en el rótulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Determinar la potencia de la vacuna contra pertussis por comparación de la dosis de vacuna requerida para proteger ratones de los efectos de una dosis letal de *Bordetella pertussis* administrada intracerebralmente con una cantidad de una preparación de referencia necesaria para dar la misma protección, calibrada en Unidades Internacionales. [NOTA: la Unidad Internacional es la actividad contenida en una cantidad establecida del Estándar Internacional que consiste en una cantidad de vacuna contra pertussis liofilizada. La equivalencia en Unidades Internacionales del Estándar Internacional es establecida por la Organización Mundial de la Salud].

Selección y distribución de animales para el ensayo - Utilizar en el ensayo ratones sanos de una cepa adecuada, de menos de 5 semanas de edad y provenientes del mismo stock. La diferencia de masa corporal entre el animal más pesado y el más liviano no debe ser mayor de 5 g. Distribuir los ratones en seis grupos de no menos de 16 y cuatro grupos de 10. Los ratones deben ser del mismo sexo o machos y hembras igualmente distribuidos entre los grupos.

Selección de la cepa de desafío y preparación de la suspensión de desafío - Seleccionar una cepa adecuada de *B. pertussis* capaz de causar la muerte de los ratones dentro de los 14 días de la inyección intracerebral. Si más de 20 % de los ratones muere dentro de las 48 horas de la inyección la cepa no es apropiada. Realizar un subcultivo de la cepa y suspender la cosecha de *B. pertussis* en una solución de pH comprendido entre 7,0 y 7,2 conteniendo 10 g de hidrolizado de caseína por litro y 6 g de cloruro de sodio por litro o en otra solución adecuada. Determinar la opacidad de la suspensión. Preparar una serie de diluciones a partir de la misma solución y asignar cada dilución a un grupo de diez ratones. Inyectar intracerebralmente a cada ratón una dosis (0,02 ml ó 0,03 ml) de la dilución asignada a cada grupo. Después de 14 días contar el número de ratones sobrevivientes en cada grupo. A partir de los resultados calcular la opacidad esperada de la suspensión conteniendo 100 LD50 en cada dosis de desafío. Para el ensayo de la vacuna a ser examinada realizar subcultivo fresco de la misma cepa de *B. pertussis* y preparar una suspensión de los organismos cosechados con una opacidad correspondiente alrededor de 100 LD50 en cada dosis de desafío. Preparar tres diluciones de la suspensión de desafío.

Determinación de la potencia - Preparar tres diluciones seriadas de la vacuna en ensayo y tres diluciones similares de la preparación de referencia de manera que en cada dilución intermedia proteja el 50 % de los ratones de los efectos letales de la dosis de desafío de *B. pertussis*. Las dosis sugeridas son 1/8, 1/40 y 1/200 de la dosis humana de la vacuna en ensayo y 0,5 UI, 0,1 UI y 0,02 UI de la preparación de referencia, cada dosis es contenida en un volumen no mayor de 0,5 ml. Asignar seis diluciones, una a cada uno de los grupos, de no menos de 16 ratones e inyectar intraperitonealmente en cada ratón una dosis de la dilución asignada al grupo. Después de 14 a 17 días inyectar intracerebralmente en cada animal de los grupos de no menos de 16 ratones una dosis de la suspensión de desafío. Asignar la suspensión de desafío y las tres diluciones realizadas a partir de esta, una a cada

grupo de 10 ratones e inyectar intracerebralmente una dosis de cada suspensión en cada ratón en el grupo en la cual la suspensión fue asignada.

Ignorar cualquier ratón que muera dentro de las 48 horas del desafío. Contar el número de ratones sobrevivientes en cada grupo después de 14 días. Calcular la potencia de la vacuna en ensayo relativa a la potencia de la preparación de referencia en base al número de animales sobrevivientes en cada uno de los grupos de no menos de 16 animales.

La potencia estimada no debe ser menor de 4 U.I. por dosis humana individual y el límite inferior de confianza ($P = 0,95$) en la potencia estimada no debe ser menor de 2 U.I. por dosis humana individual.

El ensayo sólo es válido si para la vacuna en ensayo y la preparación de referencia, la dosis protectiva del 50 % cae entre la mayor y la menor dosis de las preparaciones dadas a los ratones, el número de animales que mueren en los cuatro grupos de los 10 inyectados con la suspensión de desafío y sus diluciones indican que la dosis de desafío fue aproximadamente de 100 LD50, el análisis estadístico no muestra desviación de la linealidad y del paralelismo. El ensayo puede ser repetido pero cuando se realiza más de 1 ensayo los resultados de todos los ensayos válidos deben ser combinados para la estimación de la potencia.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el número mínimo de U.I. por dosis humana, el nombre y la cantidad de adsorbente. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: “*Agitar antes de su uso*”; “*No congelar*”.

VACUNA CONTRA LA POLIOMIELITIS INACTIVADA

Vaccinum poliomyelitidis inactivatum

Definición - La Vacuna contra la Poliomieltis, Inactivada es una preparación líquida obtenida a partir de cepas de poliovirus vivo atenuado de los tipos 1, 2 o 3, provenientes de cultivos adecuados e inactivados por un método validado. La vacuna es un líquido coloreado debido a la presencia de un indicador de pH. La Vacuna contra la Poliomieltis, Inactivada debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

El método de producción debe haber demostrado ser uniforme en la obtención de vacunas inmunogénicas e inocuas para el hombre.

La producción de la vacuna se basa en un sistema de lotes semillas virales. Las líneas celulares se utilizan según un sistema de banco celular. Si se utilizan cultivos primarios, secundarios o terciarios de células renales de mono, la producción debe cumplir con los requerimientos indicados más adelante. A no ser que esté debidamente justificado y autorizado, el virus presente en la vacuna final no debe haber sido sometido a más pasajes del lote de semilla maestro, de los que tuvo en los lotes preparados para los ensayos clínicos en humanos para demostrar la inmonogenicidad e inocuidad.

El método de producción debe estar validado para que el producto, si es analizado, cumpla 360. *Ensayo de toxicidad anormal* y 745. *Vacunas de uso humano*.

Sustrato para la multiplicación del virus

El virus se debe multiplicar en células diploides humanas en líneas celulares continuas o en cultivos primarios, secundarios y terciarios de células renales de mono (ver 1125. *Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano*).

Cultivos primarios, secundarios o terciarios de células renales de mono

Para los sustratos donde se hace la multiplicación del virus que utilizan cultivos primarios, secundarios y terciarios de células renales de mono proceder del siguiente modo:

Monos empleados para la preparación de los cultivos de células renales de mono y para el ensayo de control de vacuna - Los animales de especies aprobadas por la autoridad competente, deben estar en buen estado de salud. A no ser que esté debidamente justificado y autorizado no deben

haber sido utilizados previamente con fines experimentales. Los riñones usados para la producción y control de vacunas se obtienen de una colonia cerrada de monos criados en cautiverio monitoreados, y no de animales capturados en la naturaleza. Los lotes previamente autorizados para preparar lote semilla de virus pasados por células de riñón de animales salvajes si tiene como justificación los datos de seguridad históricos de la producción, se pueden utilizar sujetos a la aprobación de la autoridad competente.

Monitoreo de colonias cerradas de monos

Los monos deben mantenerse en grupos en las jaulas. Los animales mantenidos en colonias son sometidos a un control veterinario sistemático y continuo con monitoreo de agentes infecciosos que corrobora la ausencia de agentes extraños. La provisión de animales esta certificada por una autoridad sanitaria competente. A cada mono se le efectúan estudios serológicos a intervalos regulares durante el periodo de cuarentena de no menos de 6 semanas impuestas para el ingreso a la colonia y durante el tiempo que permanece en la misma. Los monos que se utilizan deben tener los estudios de tuberculina negativos, deben estar libres de anticuerpos de virus de simio (SV40) y de virus de la inmunodeficiencia de simio. La muestra de sangre usada en los ensayos para la determinación de anticuerpos SV40 debe ser tomada lo más cercana posible al tiempo de extirpación de los riñones. Si se utilizan monos *Macaca spp* para la producción, se debe verificar asimismo que estén exentos de anticuerpos del herpesvirus B (Cercopithecine herpesvirus I 1). El herpesvirus humano es utilizado como indicador de la ausencia de anticuerpos contra el virus B, debido al peligro que entraña la manipulación del Cercopithecine herpesvirus I (virus B).

Los monos de cuales se obtendrán los riñones son cuidadosamente examinados particularmente par la detección de infección por tuberculosis y de herpes virus B (Cercopithecine herpesvirus I)

Si un mono muestra lesiones patológicas de importancia para la utilización de sus riñones en la preparación de un lote semilla o de una vacuna no debe ser utilizado; tampoco se deben utilizar el resto de los monos de ese grupo de cuarentena, al menos que sea evidente que su utilización no afectará a la inocuidad del producto.

Todas las operaciones descriptas en la presente sección se deben efectuar fuera de los locales de producción de la vacuna.

Cultivos de células de riñón de mono para la producción de la vacuna

Los riñones utilizados para la preparación de cultivos celulares no deben presentar ningún signo patológico. Cada grupo de células que deriva de cada mono individualmente conforma una producción separada y por lo tanto una cosecha separada. Los cultivos primarios de células de riñón de mono en suspensión deben cumplir con 335. *Ensayo de micobacteria* y para el cual deben efectuarse la destrucción de las células previa a su realización. Si se utilizan células secundarias y terciarias debe demostrarse por un método adecuado y validado que de cuenta que el número de pasajes que se usara en producción esta libre de tumorigenicidad.

Lotes semilla del virus

Cada una de las 3 cepas del poliovirus utilizadas en producción deben estar identificadas por registros históricos que incluyan información sobre el origen de la cepa y su posterior manipulación. Para la multiplicación del virus sólo se puede utilizar un lote semilla que cumpla los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar cada lote semilla de trabajo como poliovirus humano tipos 1, 2, y 3 por neutralización en cultivos celulares utilizando anticuerpos específicos.

Concentración de virus

Determinar según se indica en *Valoración*. La concentración de virus se utiliza para establecer la cantidad de virus utilizada en la inoculación de los cultivos de producción.

Ensayo para agentes extraños en vacunas virales <415>

El lote de semilla de trabajo debe cumplir los requisitos para los lotes semillas de las vacunas virales. Además, si el aislamiento del lote semilla de trabajo se produce en cultivos primarios, secundarios o terciarios se deben confirmar que las cepas no están contaminadas con virus de simios tales como la inmunodeficiencia de los simios, virus 40 filovirus, y herpesvirus B (Cercopithecine herpesvirus I). Las semillas de trabajo de virus producidos en cultivos primarios, secundarios y terciarios deben cumplir con los requisitos en *Multiplicación y cosecha del virus monovalente en esas células*.

Multiplicación y cosecha

Todos los procesamientos de los bancos celulares y de los posteriores cultivos celulares se realizan bajo condiciones de asepsia, en un área donde no se manipulen otros tipos de células. En el medio de crecimiento celular se puede utilizar suero

animal apropiado (pero no suero humano); sin embargo, el medio final, destinado al mantenimiento del crecimiento celular a lo largo de la multiplicación viral, no contiene suero animal. El suero y la tripsina utilizados en la preparación de suspensiones celulares y de medios de cultivo deben estar exentos de agentes extraños. El medio de cultivo celular puede contener un indicador de pH, como el rojo de fenol, y antibióticos autorizados en la concentración efectiva más baja. Se separan no menos de 500 ml de los cultivos celulares empleados en la producción de la vacuna, como muestra de cultivos celulares no infectado (control celular); cuando se utilizan cultivos celulares continuos en fermentadores la muestra control debe tener 200×10^6 células, cuando se utilizan cultivos secundarios y terciarios de células renales de mono las muestras son equivalentes al menos 500 ml de células en suspensión a la concentración usada en la producción.

Para la preparación de la vacuna sólo se pueden utilizar cosecha de virus individuales que cumplan los siguientes requisitos. Los ensayos de identificación de bacterias y de contaminación de hongos pueden ser realizados como alternativa en la mezcla de cosechas monovalentes purificada. Una vez que se haya demostrado la uniformidad de la producción se puede llevara cabo el ensayo de concentración de virus en la mezcla de cosechas monovalentes, purificada.

Células control

Las células control del cultivo celular de producción a partir del cual se obtiene la cosecha viral deben cumplir con los requisitos de *Identificación y 415. Ensayo para agentes extraños en vacunas virales* o, si se utilizan cultivos de células primarias, secundarias o terciarias de riñón mono cumplen los siguientes:

Ensayo en células de cultivo de riñón de conejo - Inocular en células de cultivo de riñón de conejo al menos 10 ml de las mezclas de sobrenadante líquidos en los cuales se ha controlado ausencia de herpes B (Cercopithecine herpesvirus 1) y otros virus. La dilución de la siembra en el medio de crecimiento no debe ser mayor de 0,25 y el área de la capa celular de $3 \text{ cm}^3 / \text{ml}$ de inóculo. Separar uno o más envases de cada lote de células con el mismo medio como control de células no inoculadas. Incubar los cultivos a 37°C durante 2 semanas. Los ensayos no son válidos si más de 20 % de los frascos de cultivo fueron descartados por razones accidentales no específicas.

Ensayo en células de riñón de monos cercopitecos - Inocular 10 ml de las mezclas de sobrenadante líquidos en los cuales se ha controlado

ausencia virus SV40 y otros agentes extraños en células de riñón de cercopitecos o en células que han demostrado ser sensibles al SV40 en células como las usadas en el ensayo en células de cultivo de riñón de conejo. El ensayo sólo es válido si menos de 20 % de los frascos de cultivo fueron descartados por razones accidentales no específicas.

Identificación

Identificar en cada cosecha individual poliovirus humano tipos 1,2, y 3 por neutralización en cultivos celulares utilizando anticuerpos específicos.

Concentración de virus

Establecer la concentración de virus de cada cosecha por medio de la titulación de virus infeccioso en los cultivos celulares en *Valoración*.

Contaminación bacteriana y fúngica

Cada cosecha debe cumplir con 370. *Ensayos de esterilidad*, llevado a cabo en 10 ml de cada medio.

Ensayo de micoplasmas <336>

Cada cosecha debe cumplir con los requisitos, empleando 10 ml.

Ensayo en células de cultivo de riñón de conejo

Cuando se utilizan en producción células de cultivo primario, secundario o terciario para la producción, inocular al menos 10 ml de la cosecha individual en la cual se ha controlado ausencia de herpes B (*Cercopithecine herpesvirus 1*) y otros virus en células de cultivo de riñón de conejo y continuar según se indica en *Control de células*.

Ensayo en células de riñón de mono cercopitecos

Cuando se utilizan en producción células de cultivo primario, secundario o terciario para la producción, inocular 10 ml de la cosecha individual en la cual se ha controlado ausencia virus SV40 y otros agentes extraños en células de riñón de cercopitecos; las muestras se neutralizan con un antisero de título alto contra cada poliovirus específico. Las muestras del ensayo deben previamente haber demostrado en los cultivos de células primarias de cercopitecos o de células ser susceptibles al SV40. Los cultivos se incuban a 37°C y se observan por 14 días. Al finalizar este periodo se efectúan al menos un subcultivo de los sobrenadantes en los mismos sistemas de células y se observa tanto el cultivo primario como los subcultivos por un periodo adicional de 14 días.

Purificación y cosecha mprnovalente purificada

Las cosechas monovalentes se pueden preparar mezclando y concentrando varias cosechas individuales. Las cosechas monovalentes o las mezclas de cosechas monovalentes son purificadas por un método validado y autorizado. Si se utilizan células de cultivo continuas en la producción debe

demostrarse la purificación en forma uniforme reduce los contenidos de ADN en el sustrato celular a no mas de 100 pg por contenido de dosis humano. Para la preparación de la cosecha monovalente inactivada sólo se puede utilizar una cosecha monovalente purificada que cumpla los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar el virus por neutralización en cultivos celulares utilizando anticuerpos específicos o por determinación del antígeno D.

Concentración de virus

La concentración de virus de cada cosecha se establece por medio de la titulación de virus infeccioso.

Actividad específica

La relación entre la concentración del virus o antígeno D, determinada por un método inmunoquímico adecuado, (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) y el contenido total de proteína de la cosecha monovalente purificada debe estar comprendida entre los límites aprobados para cada producto en particular.

Inactivación y cosecha inactivada monovalente

Antes de la inactivación se pueden mezclar varias cosechas purificadas monovalentes del mismo tipo. A los fines de evitar interferencia en el proceso de inactivación deben evitarse la formación de agregados virales, o removerlos inmediatamente antes o durante el proceso de inactivación, efectuándose para ello la filtración antes y durante la inactivación. La inactivación debe efectuarse a un tiempo adecuado, preferiblemente luego de las 24 hs y en cada caso no más allá de las 72 hs, de la filtración previa. El método para la inactivación viral debe estar validado; debe haber demostrado que en forma uniforme que es capaz de inactivar el poliovirus sin destruir la actividad antigénica e inmunogénica. Durante los estudios de validación se traza una curva de inactivación que representa la reducción de la concentración del virus residual vivo con no menos de 4 puntos en el tiempo (ejemplo 0, 24, 48, y 96 horas) Cuando se utiliza formaldehído para la inactivación, se debe verificar la presencia en exceso de formaldehído libre al finalizar el proceso de inactivación.

En la preparación de la mezcla trivalente con las cosechas inactivadas monovalentes por tipo de virus o para la preparación final del granel de vacuna solamente se puede utilizar una cosecha purificada inactivada que cumpla con los siguientes requisitos

Ensayo de eficacia de inactivación

Neutralización del formaldehído utilizado en la inactivación, con bisulfito de sodio (en el caso de

que este sea el utilizado) y verificar la ausencia de poliovirus inoculando a cultivos adecuados con 2 muestras de cada cosecha monovalente inactivada, correspondiente a no menos de 1.500 dosis humanas. Tomar las muestras no más allá de que hayan transcurrido tres cuartas partes del proceso de inactivación y al final del mismo. La dilución de la siembra en el medio de crecimiento no debe ser mayor de 0,25 y el área de la capa celular debe ser aproximadamente 3 cm³/ml de inoculum. Separar uno o más envases de cada lote de células con el mismo medio como control de células no inoculadas. Observar los cultivos durante 3 semanas. Hacer no menos de 2 pasajes para cada envase, uno al final de del periodo de observación y otro una semana antes de, para los pasajes se debe usar sobrenadante de células y se inocula de la misma manera que en las siembras iniciales. Observar los subcultivos durante 2 semanas: no se debe observar ningún signo de multiplicación de poliovirus. Al final del periodo de observación, ensayar que las células utilizadas mantienen la susceptibilidad al virus por inoculación de los poliovirus de los mismos tipos que la cosecha monovalente inactivada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, realizado utilizando 10 ml en cada medio

Contenido de Antígeno D

Determinar el contenido de antígeno D por medio de una técnica inmunoquímica apropiada (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Debe cumplir con límites autorizados para el producto.

Vacuna final a granel

La vacuna final a granel se prepara a partir de cosechas monovalentes inactivadas de los poliovirus 1, 2, y 3° a partir de mezclas trivalentes de las cosechas inactivadas. Si se usa mezclas trivalentes de las cosechas inactivadas, se puede efectuar un ensayo de eficacia de la inactivación en esta mezcla en lugar de la vacuna final granel. Se pueden agregar sustancias estabilizadoras y conservadores antimicrobianos adecuados. Para la preparación del lote final sólo se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla los siguientes requisitos.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, realizado utilizando 10 ml en cada medio

Conservantes <80>

De haberse utilizado, determinar la cantidad por un método químico o fisicoquímico apropiado. No debe contener menos de 85 % y no más de 115 % de la cantidad declarada.

Inactivación

Una muestra de 1.500 ml de la formulación, o de la vacuna purificada y concentrada el equivalente a 1.500 dosis se reservan antes del agregado del conservador antimicrobiano para ensayadas en cultivos celulares con el fin de verificar si han quedado poliovirus residuales según el ensayo descrito anteriormente para la cosecha monovalente inactivada. Cuando la vacuna final es esta preparada por una mezcla de monovalentes inactivada, este ensayo debe ser realizado en ese nivel antes que en la vacuna final a granel.

Lote final

Debe cumplir con los requisitos de *Ensayos y Valoración*. Si el ensayo de *Formaldehído libre* (de haberse utilizado) y 80. Conservantes (de haberse utilizado), fueron hechas sobre la vacuna final a granel, dieron resultados satisfactorios, las mismas pueden omitirse en el lote final. Si cumple con los requisitos de *Seroalbumina bovina* en la mezcla trivalente de cosechas inactivadas o en las cosechas inactivadas monovalentes se puede omitir su realización en el lote final de vacuna.

ENSAYOS

Identificación

La vacuna debe demostrar que contiene poliovirus de cada tipo 1, 2 y 3 por un método inmunoquímico adecuado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) tal como *Contenido de antígeno D* efectuado por inmunoanálisis de enzima conjugado (ELISA).

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

De contenerlo determinar la cantidad de conservante antimicrobiano por un método químico o fisicoquímico adecuado. No debe contener menos de 85 % y no más de 115 % de la cantidad declarada.

Contenido de nitrógeno proteico

Método de Lowry. No debe contener más de 10 µg de la dosis humana.

Seroalbumina bovina

No debe contener más de 50 ng por dosis humana, determinada por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*).

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 5 UI por dosis humana.

VALORACION

Contenido de antígeno D - Como una medida de la uniformidad de la producción determinar el contenido de poliovirus 1, 2, y 3 por un método inmunoquímico adecuado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) usando como referencia una preparación calibrada en Unidades Antígeno D apropiada. Para cada tipo de virus el contenido, expresado en relación con la cantidad establecida en el rotulo, esta dentro de los límites autorizados para el producto.

Ensayo en vivo

Debe cumplirse con el ensayo de in vivo para la vacuna poliomiélfica inactivada. La capacidad de la vacuna para inducir la formación de anticuerpos neutralizantes es determinada in vivo por uno de los siguientes métodos:

Ensayo en pollos o cobayos

Preparar una serie adecuada de no menos de tres diluciones de la vacuna a ser examinada usando una solución salina bufferada adecuada. Distribuir cobayos que pesen entre 250 y 350 g o pollos de 3 semanas de edad en grupos de diez animales, y asignar a cada grupo cada una de las diluciones de las vacunas. Inyectar intramuscularmente en cada animal 0,5 ml de la dilución asignada a cada grupo. Después de 5 a 6 días, sangrar los animales y separar los sueros individuales. Examinar los sueros para la presencia de anticuerpos neutralizantes en una dilución 1/4 para cada uno de los tipos de poliovirus humanos 1,2 y 3.

Mezclar 100 CCID₅₀ de virus con la dilución de suero e incubar a 37 °C durante 4,5 y 6 horas. Si es necesario para la consistencia de los resultados, mantener a 5 ± 3 °C durante 12 y 18 horas. Inocular las mezclas en cultivos celulares para la detección de virus no neutralizados y leer los resultados hasta los 7 días posteriores a la inoculación. Para cada grupo de animales, anotar el número de suero que tiene anticuerpos neutralizantes y calcular la dilución de la vacuna que de una respuesta de anticuerpo en el 50 por ciento de los animales. Llevar a cabo en paralelo los ensayos control usando una adecuada preparación de referencia. La vacuna cumple con el ensayo si a una dilución de 1/100 o más produce una respuesta de anticuerpo para cada uno de los tres tipos de virus en el 50 por ciento de los animales.

Ensayo en ratas

Un método apropiado de ensayo in vivo consiste en la inyección intramuscular en la pata trasera de no menos de tres diluciones de vacuna a ser examinada y de referencia, usando para cada dilución un grupo de 10 ratas de una cepa adecuada

libres de patógenos específicos. Es a menudo necesario el uso de 4 diluciones para obtener resultados validados para los 3 tres serotipos. El número de animales en cada grupo deberá ser suficiente para obtener resultados que cumplan con los criterios de validez; grupos de 10 ratas son usualmente suficientes aunque resultados validos pueden resultar con menos animales por grupo. Si son utilizados animales de diferente sexo, machos y hembras deberán ser distribuidos equitativamente en todos los grupos. Un peso de 175 y 250 g puede ser adecuado. Es utilizada una inoculación de 0,5 ml por rata. El rango de dosis es elegido tal que se obtenga una respuesta de dosis para los 3 tipos de poliovirus. Después de 20 y 22 días se sangran los animales. Se miden separadamente los anticuerpos neutralizantes contra los 3 tipos de poliovirus usando 100 CCID₅₀ de cepa Sabín como desafío de virus, Vero o Hep2 como indicador de células y una condición de neutralización de 3 horas entre 35 y 37 °C, si es necesario para la consistencia de los resultados seguido de 18 horas entre 2 y 8 °C. Los resultados son leídos después de la fijación y tñido de las placas después de 7 días de incubación a 35 °C. Para un ensayo valido de anticuerpos, el título de cada virus de desafío debe mostrar estar dentro del rango de 10 CCID₅₀ a 1.000 CCID₅₀ y el título de anticuerpo neutralizantes del suero control debe estar dentro del doble de la dilución de la media geométrica del título de suero. La potencia es calculada por comparación de la proporción de respondedores de la vacuna a ser examinada y la vacuna de referencia por el método de probit o después de la validación, usando un modelo de líneas paralelas. En el caso de método de probit es necesario establecer un título de anticuerpos neutralizantes de corte para cada tipo de poliovirus para definir un respondedor. Debido a la variación interlaboratorio, no es posible definir valores de corte que puedan ser aplicados a todos los laboratorios. Preferentemente, los valores de corte son determinados por cada laboratorio sobre la base de una serie mínima de 3 ensayos con una vacuna de referencia. El punto medio de la escala logarítmica en base 2 de la media geométrica del título mínimo y máximo de una serie de 3 o más ensayos, es usado como valor de corte. Para cada uno de los tres tipos de poliovirus, la potencia de la vacuna no es significativamente menor que la de la preparación e referencia.

El ensayo es no valido a menos que para la vacuna a ser examinada y la de referencia la ED₅₀ se encuentre entre las dosis más bajas y más altas dadas a los animales, el análisis estadístico no muestre desviación significativa con respecto a la linealidad ni al paralelismo y los límites de

confianza ($P=0,95$) no sean menos de 25 % y no más de 400 % de la potencia estimada.

ROTULADO

Indicar en el rótulo los tipos de virus de la poliomielitis contenidos en la vacuna, cantidad nominal de cada tipo de virus contenido por dosis humana expresado como Unidades de antígeno D, el sustrato celular utilizado para la preparación de la vacuna.

VACUNA CONTRA LA POLIOMIELITIS ORAL

Vaccinum poliomyelitidis perorale

Definición - La Vacuna contra la Poliomieltis Oral consiste en una preparación obtenida a partir de cepas de poliovirus vivo atenuado de los tipos 1, 2 o 3, provenientes de cultivos in vitro en células aprobadas, que contiene cualquiera de los 3 tipos de las cepas Sabín o cualquier combinación de ellas preparada en una forma adecuada para la administración oral. La vacuna es un líquido claro que puede ser coloreado por la presencia de un indicador de pH. Debe cumplir con los siguientes requisitos.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

Se debe demostrar que las cepas vacunales y el método de producción hayan resultado ser uniformes en la obtención de vacunas inmunogénicas y seguras para el hombre. La producción de la vacuna se basa en un sistema de lotes de semilla virales. Las líneas celulares se utilizan según un sistema de banco celular. Si se utilizan cultivos primarios de células renales de mono, la producción debe cumplir con los requisitos. A no ser que esté debidamente justificado y autorizado, el virus presente en la vacuna final no debe haber sido sometido a más de dos pasajes a partir del lote de semilla maestro.

Sustrato para la multiplicación del virus

El virus se debe multiplicar en células diploides humanas (ver 1125. *Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano*), en líneas celulares continuas o en cultivos primarios de células renales de mono (incluyendo pasajes celulares seriados a partir de células primarias de riñón de mono).

Cultivos primarios de células renales de mono

Para los sustratos donde se realiza la multiplicación del virus que utilizan los cultivos primarios de células renales de mono se deben aplicar los siguientes requisitos especiales.

Monos empleados para la preparación de los cultivos primarios de células renales de mono y para el ensayo del virus

Si la vacuna se prepara en cultivos primarios de células renales de mono se deben utilizar animales de especies aprobadas por la autoridad competente, en buen estado de salud, mantenidos en colonias cerradas o intensivamente monitoreadas y que no

hayan sido utilizados previamente con fines experimentales.

Los monos deben alojarse en jaulas tan distantes entre si como sea posible, en bioterios bien construidos y adecuadamente ventilados. Se deben tomar las precauciones necesarias para evitar las infecciones cruzadas entre las jaulas. No se deben colocar más de dos monos por jaula e intercambiar compañeros de jaula. Los monos se deben mantener en grupos sometidos a cuarentena, en el país de fabricación de la vacuna, durante un período no menor de 6 semanas antes de ser utilizados. [NOTA: un grupo de cuarentena es una colonia de monos seleccionados, en buen estado de salud, alojados en una sala con instalaciones separadas para alimentación y limpieza, privados de todo tipo de contacto con otros monos durante el período de cuarentena]. Si en algún momento de dicho período la tasa global de mortalidad de un envío compuesto por uno o varios grupos supera el 5% (con exclusión de las muertes debidas a accidentes o cuando la causa fue determinada no ser de origen infeccioso), los monos del envío entero deben continuar en cuarentena como mínimo 6 semanas contadas a partir del momento en que se ha detectado el 5 % de muertes.

Los grupos deben mantenerse en aislamiento continuo como en la cuarentena, incluso después de finalizar este período y hasta ser utilizados. Cuando se haya desalojado el último mono de un grupo, se debe limpiar rigurosamente la habitación y descontaminar para poder emplearla y alojar a un nuevo grupo. Si se utilizan riñones de monos nacidos antes de término la madre se debe someter a cuarentena hasta el final de la gestación.

Los monos que van a ser sometidos a extirpación de los riñones deben ser anestesiados y examinados minuciosamente para evidenciar particularmente signos de infección tuberculosa o de una infección de herpesvirus B (*Cercopithecine herpesvirus 1*). Si un mono presenta alguna lesión patológica relevante para la utilización de sus riñones en la preparación de un lote semilla o de una vacuna, no debe ser utilizado. Tampoco se deben utilizar el resto de los monos de ese grupo de cuarentena, a menos que sea evidente que su utilización no afectará a la inocuidad del producto.

Todas las operaciones descriptas en la presente sección se deben efectuar fuera de los locales de producción de la vacuna.

En los monos empleados se debe demostrar que no presentan anticuerpos contra el virus de Simio 40 (SV40) ni contra el virus de la inmunodeficiencia de simios y el Espuma virus. La muestra de sangre empleada en los ensayos para la determinación de anticuerpos SV40 debe ser

tomada lo más cercana posible del tiempo de extirpación de los riñones. Si se utilizan monos *Macaca spp* para la producción, se debe verificar asimismo que estén exentos de anticuerpos del herpesvirus B (*Cercopithecine herpesvirus 1*). El herpesvirus humano se ha empleado como indicador de la ausencia de anticuerpos contra el virus B, debido al peligro que entraña la manipulación del herpesvirus B (*Cercopithecine herpesvirus 1*).

Cultivos primarios de células de riñón de mono para la producción de la vacuna

Los riñones utilizados para la preparación de cultivos celulares no deben presentar ningún signo patológico. Solo si los monos proceden de una colonia mantenida para la producción de la vacuna se pueden utilizar, para la multiplicación del virus, pasajes seriados de los cultivos de células renales de mono a partir de las células renales primarias; en cualquier otro caso las células de riñón de mono no deben ser propagadas en serie. El virus utilizado para la preparación de la vacuna se propaga en estos cultivos por métodos asépticos. Si se utiliza suero animal en la multiplicación de las células, el medio de mantenimiento que se utiliza luego de la inoculación de los virus no debe contener agregado de suero.

Cada grupo de cultivo celular derivado de un único mono o de fetos proveniente de no más de 10 monos pretérmino se prepara y se controla como un grupo individual.

Lotes semilla del virus

Las cepas del poliovirus empleadas deben estar identificadas por registros históricos documentados que incluyan información sobre el origen de la cepa y su posterior manipulación. Los lotes semilla de trabajo son preparados por un único pasaje a partir del lote semilla maestro y con un número de pasajes aprobado a partir del virus Sabin original. Los lotes semilla virales se preparan en grandes cantidades y se deben conservar a una temperatura menor de -60°C .

Para la multiplicación del virus sólo se puede utilizar un lote semilla que cumple con los siguientes requisitos.

Identificación

Cada lote semilla de trabajo se identifica como poliovirus de un tipo dado utilizando anticuerpos específicos.

Concentración de virus

Proceder según se indica en *Valoración*. La concentración de virus se utiliza para establecer la cantidad de virus empleada en el ensayo de *Neurovirulencia*.

Ensayo para agentes extraños en vacunas virales <415>

Si el lote de siembra de trabajo se produce en células diploides humanas o en líneas celulares continuas, éste debe cumplir los requisitos para los lotes semillas de las vacunas virales. Si el lote semilla de trabajo se produce en cultivos primarios de células renales de mono, debe cumplir con los requisitos especificados en *Multiplicación del virus y cosecha*, y en *Cosecha Monovalentes (Mezcla)*. Debe cumplir con los ensayos en ratones adultos, ratones lactantes y cobayos. Los lotes de siembra de trabajo deben estar libres de secuencias de ADN detectables provenientes del virus 40 de simios (SV40).

Neurovirulencia

Cada lote semilla maestro y lote semilla de trabajo debe cumplir con los requisitos en *Ensayo para la vacuna contra la Poliomieltis oral en 415. Ensayo de neurovirulencia para vacunas a virus vivo*. El lote de siembra no debe emplearse para la producción de la vacuna si la frecuencia de resultados no satisfactorios, para las mezclas de cosechas monovalentes producidas a partir del mismo, es mayor al valor predicho estadísticamente. Esta predicción estadística se calcula luego de cada ensayo, sobre la totalidad de las mezclas de cosechas monovalentes en ensayo. Esta es igual a la probabilidad de un falso rechazo al realizar un primer ensayo (es decir 1 por ciento), siendo la probabilidad de un falso rechazo al repetir el ensayo despreciable.

Marcadores genéticos

Cada lote de semilla de trabajo es analizado para establecer su capacidad de multiplicación a temperaturas comprendidas entre 36 y 40°C según se indica en *Cosechas monovalentes (Mezcla)*.

Multiplicación del virus y cosecha

Todos los procesamientos de los bancos celulares y de los posteriores cultivos celulares se deben realizar bajo condiciones de asepsia, en un área donde no se manipulen otros tipos de células. En el medio de crecimiento celular se puede emplear suero animal apropiado (pero no suero humano); sin embargo, el medio final, destinado al mantenimiento del crecimiento celular a lo largo de la multiplicación viral, no contiene suero animal. El suero y la tripsina empleados en la preparación de suspensiones celulares y de medios de cultivo deben estar exentos de agentes extraños. El medio de cultivo celular puede contener un indicador de pH, como el rojo de fenol (SR), y antibióticos autorizados en la concentración efectiva más baja. Durante la producción es preferible utilizar un sustrato exento de antibióticos. El día de la

inoculación con el lote semilla de trabajo del virus, se debe separar un mínimo de 5 % o 1.000 ml, la cantidad que sea menor, de los cultivos celulares empleados en la producción de la vacuna, como muestra de cultivos celulares no infectado (control celular). Cuando la vacuna se produce en cultivos primarios de células renales de mono, se aplican a las células control requisitos especiales especificados a continuación. La suspensión viral se cosecha como máximo 4 días después de la inoculación del virus. Luego de la inoculación del cultivo celular de producción con el lote semilla de trabajo del virus, los cultivos celulares infectados se mantienen a una temperatura constante entre 33 y 35 °C; con una precisión de $\pm 0,5$ °C. Los cultivos celulares control se deben mantener entre 33 y 35 °C durante los períodos de incubación pertinentes.

Para la preparación de las mezclas de cosechas monovalentes, sólo se pueden emplear cosechas de virus individuales que cumplan los siguientes requisitos:

Concentración de virus

Controlar la concentración de la cosecha de virus según se indica en *Valoración* para asegurar la uniformidad de la producción y para determinar la dilución a utilizar en la vacuna final a granel.

Ensayo para agentes extraños en vacunas virales <415>

Debe cumplir con los requisitos.

Células control

Las células control del cultivo celular de producción a partir del cual se obtiene la cosecha viral deben cumplir con el ensayo de *Identificación* y con los requisitos de 415. *Ensayo para agentes extraños en vacunas virales*. Si se emplean cultivos de células primarias de mono deben cumplir con los siguientes requisitos.

Cultivo de células primarias de mono

Se deben aplicar los siguientes requerimientos especiales a la multiplicación y cosecha viral en cultivos de células primarias de riñón de mono.

Cultivos celulares

El día de inoculación con el virus del lote semilla de trabajo, se debe examinar cada cultivo celular con el fin de comprobar que no presenta degeneraciones causadas por un agente infeccioso. Si se detecta la presencia de algún agente extraño en un cultivo celular, se rechaza la totalidad del grupo de cultivos relacionados con el mismo.

El día de la inoculación con el virus del lote semilla de trabajo, una muestra de al menos 30 ml de la mezcla de líquidos procedentes de cultivos celulares de los riñones de cada mono, o de fetos de un máximo de 10 monos pretérmino se divide en dos alícuotas iguales. Una de éstas se ensaya en cultivos de células renales de mono procedentes de

la misma especie que el animal utilizado para la producción de la vacuna, pero no del mismo animal. La otra alícuota se ensaya, si fuera necesario, en cultivos de células renales de mono de otra especie, de modo que los ensayos se realicen sobre cultivos celulares procedentes de al menos una especie que sea de sensibilidad conocida frente al virus SV40. La mezcla de líquidos se debe inocular en los frascos que contienen estos cultivos celulares de modo que la dilución de la mezcla en el medio nutritivo no exceda la proporción 1 en 4. El área de la capa celular debe ser al menos de 3 cm² por ml de mezcla de fluidos. Al menos un frasco de cada tipo de cultivo celular no se debe inocular para emplear como control. Si la especie de mono utilizada para la producción de la vacuna es sensible a SV40 no es necesario repetir la prueba en una segunda especie. Se puede utilizar suero animal en la propagación de las células, con la condición de que no contenga anticuerpos SV40. Luego de la inoculación de la preparación en ensayo, el medio de mantenimiento no debe contener suero añadido salvo en las condiciones anteriormente descriptas.

Los cultivos se deben incubar a una temperatura entre 35 y 37 °C y se deben observar durante un período no menor de 4 semanas. Durante este período de observación, no antes de las 2 semanas de incubación, se efectúa como mínimo un subcultivo del fluido de cada uno de los cultivos en el mismo sistema de cultivo celular. Los subcultivos también se deben mantener en observación durante al menos 2 semanas. Se puede agregar suero al cultivo original en el momento del subcultivo, con la condición de que no contenga anticuerpos SV40.

Las técnicas de inmunofluorescencia pueden resultar útiles para la detección del virus SV40 o de otros virus en las células. Se debe verificar la ausencia del herpesvirus B (*Cercopithecine herpesvirus 1*) y de otros virus en cultivos celulares de riñón de conejo en otra muestra de al menos 10 ml de mezcla líquida.

Se debe demostrar que el suero empleado en el medio nutritivo de los cultivos está libre de inhibidores del virus B. El herpesvirus humano se debe emplear como indicador de la ausencia de los inhibidores del virus B, debido al peligro que implica la manipulación del herpesvirus B (*Cercopithecine herpesvirus 1*). La muestra se debe inocular en los frascos que contienen los cultivos celulares, de modo que la dilución de la mezcla en el medio nutritivo no sea mayor de la proporción 1 en 4. El área de la capa celular debe ser al menos 3 cm² / ml de mezcla líquida. Al menos un frasco de cada tipo de cultivo celular no se debe inocular para ser empleada como control.

Los cultivos se deben incubar a una temperatura entre 35 y 37 °C y observar durante un período de al menos 2 semanas.

La ausencia de agentes contaminantes se verifica sobre otra muestra de 10 ml de la mezcla de líquidos separados de los cultivos celulares el día de la inoculación con el lote semilla de virus en cultivos de células humanas sensibles al virus del sarampión. Los ensayos no son válidos si más de 20 por ciento de los frascos de cultivo fueron descartados por razones accidentales no específicas al final de los períodos de tiempo respectivos de los ensayos.

Si estos ensayos revelan la presencia de un agente extraño, la cosecha individual procedente del conjunto de cultivos celulares se descarta.

Si se demuestra la presencia de herpesvirus B (*Cercopithecine herpesvirus 1*), la fabricación de la vacuna antipoliomielítica oral se interrumpe y se informa a la Autoridad competente. La fabricación no se debe reanudar hasta que no se finalice una investigación rigurosa y se tomen precauciones frente a cualquier reaparición de la infección con la aprobación de la Autoridad competente.

Si los ensayos anteriores no se realizan inmediatamente, las muestras de mezclas de líquidos de cultivos celulares, deben mantenerse a una temperatura de -60 °C o menor, con excepción de la muestra empleada para el análisis del virus B que se puede mantener a una temperatura de 4 °C, siempre y cuando el ensayo se realice dentro de los 7 días posteriores a la obtención de la muestra.

Cultivos de células control

El día de la inoculación con el virus del lote semilla de trabajo, se toma el 25 % (pero no más de 2,5 litros) de la suspensión celular procedente de los riñones de cada mono, o de fetos de no más de diez monos pretermino para la preparación de células control no inoculadas. Estos cultivos control se incuban en las mismas condiciones que los cultivos inoculados durante al menos 2 semanas y se examinan durante este período para evidenciar posibles cambios citopáticos.

Los ensayos no son válidos si más de 20 % de los cultivos celulares control han sido rechazados por razones accidentales no específicas. Al final del período de observación, se examinan los cultivos celulares control para verificar que no presentan signos de degeneración debidos a un agente infeccioso. Si este examen, o cualquiera de los ensayos requeridos en la presente sección, revelan la presencia de un agente extraño en un cultivo control, el virus de la poliomielitis proveniente de los cultivos inoculados procedentes del mismo grupo debe ser rechazado.

Ensayo de virus hemoabsorbente

Tomar una muestra de 4 por ciento de los cultivos de células control en el momento de la cosecha o dentro de los 4 días luego de la inoculación de los cultivos de producción con el virus del lote semilla de trabajo y realizar el ensayo para poner de manifiesto la posible presencia de virus hemoabsorbentes según se indica en 415. *Ensayo de agentes extraños en vacunas vírales.* Al final del período de observación se debe realizar el mismo ensayo en las restantes células control.

Ensayos para otros agentes extraños

Tomar una muestra de al menos 20 ml de la mezcla de líquidos obtenida de cada grupo de cultivos control en el momento de la cosecha o dentro de los 7 días siguientes a la inoculación de los cultivos de producción con el virus del lote semilla de trabajo y realizar el ensayo en dos tipos de cultivos de células renales de mono, como se describió anteriormente para las mismas células en el punto Multiplicación del virus y cosecha. Tomar muestras similares de la mezcla de líquidos al final del período de observación de los cultivos celulares control original, y repetir los ensayos sobre los dos tipos de cultivos de células renales de mono, así como sobre los cultivos celulares de conejo, según se indica en *Cultivos celulares en Multiplicación del virus y cosecha*. Si se demuestra la presencia de herpesvirus B (*Cercopithecine herpesvirus 1*), no se deben emplear los cultivos celulares destinados a la producción y se deben aplicar las medidas concernientes a la producción de la vacuna.

Los líquidos obtenidos a partir de los cultivos celulares control en el momento de la cosecha del virus y al final del período de observación se pueden mezclar antes de los ensayos para agentes extraños. Se debe examinar una muestra de 2 % de la mezcla en cada uno de los sistemas de cultivos celulares indicados.

Cosecha individual

Ensayos para cosechas individuales neutralizadas en cultivos primarios de células renales de mono

Neutralizar una muestra de al menos 10 ml de cada cosecha individual, con un antisuero específico del tipo de poliovirus preparado en animales diferentes al mono. En la preparación del antisuero para este propósito, los antígenos inmunizantes deben ser preparados en células no simias.

La mitad de la suspensión neutralizada (correspondiente al menos a 5 ml de cosecha individual) se debe analizar en cultivos de células renales procedentes de un mono de la misma especie que el animal empleado para la producción de la vacuna, pero no del mismo animal. La otra

mitad debe ser analizada, si fuera necesario, en cultivos de células renales de otra especie de mono, de tal modo que las pruebas sean practicadas en cultivos celulares procedentes de al menos una especie de sensibilidad conocida frente al virus SV40.

Inocular las suspensiones neutralizadas en frascos de estos cultivos celulares, de modo que la dilución de la suspensión en el medio nutritivo no exceda una proporción 1 en 4. El área de la capa celular debe ser al menos $3 \text{ cm}^2 / \text{ml}$ de suspensión neutralizada. Al menos un frasco de cada tipo de cultivo celular no se debe inocular para emplear como control. Mantener este frasco con medio nutritivo que contenga la misma concentración de antisuero específico utilizado para la neutralización. Se puede emplear suero animal en la multiplicación de las células, con la condición de que no contenga anticuerpos SV40, pero después de la inoculación de la preparación en el material de ensayo, el medio de mantenimiento no debe contener otro suero que el antisuero neutralizante del poliovirus, salvo en las condiciones descriptas más adelante.

Los cultivos se deben incubar a una temperatura entre 35 y 37 °C y observar durante un período de al menos 4 semanas. Durante este período de observación, y después de 2 semanas de incubación como mínimo, se efectúa al menos 1 subcultivo de cada uno de los cultivos sobre el mismo sistema de cultivo celular. Los subcultivos también se deben mantener en observación durante al menos 2 semanas. Se puede agregar suero al cultivo inicial en el momento del subcultivo, con la condición de que no contenga anticuerpos SV40.

Realizar ensayos adicionales para determinar la ausencia de agentes extraños en otra muestra de cosechas individuales neutralizadas, por inoculación de 10 ml de muestra en cultivos de células humanas sensibles al virus del sarampión.

Las técnicas de inmunofluorescencia resultan útiles para la detección del virus SV40 o de otros virus en las células.

Los ensayos no son válidos si más de 20 por ciento de los frascos del cultivo fueron rechazados por razones accidentales no específicas al final de los períodos de tiempo respectivos de los ensayos.

Si se produce algún cambio citopático en alguno de los cultivos, se deben investigar las causas del mismo. Si se demuestra que los cambios citopáticos se deben a poliovirus no neutralizados, se debe repetir el ensayo. Si se evidencia la presencia de SV40 o de otros agentes extraños atribuibles a la cosecha individual, ésta debe ser descartada.

Cosechas monovalentes (mezcla)

Las cosechas monovalentes (mezcla) se deben preparar mezclando un número de cosechas individuales satisfactorias del mismo tipo viral. Las cosechas monovalentes (mezcla) producidas en una línea celular continua pueden ser purificadas. Filtrar cada cosecha monovalente (mezcla) a través de un filtro que retenga las bacterias.

Para la preparación de la vacuna final a granel sólo se puede utilizar una cosecha monovalente (mezcla) que cumpla con los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar poliovirus de un tipo dado en cada cosecha monovalente (mezcla) empleando anticuerpos específicos.

Concentración de virus

Determinar la concentración del virus según se indica en *Valoración* como base para el cálculo de las diluciones para la preparación de la vacuna final a granel, para tener la cantidad de virus empleado en 339. *Ensayo de neurovirulencia para vacunas a virus vivo* y para establecer y monitorear la uniformidad de la producción.

Marcadores genéticos

Determinar la relación entre la capacidad de multiplicación del virus en la mezcla monovalente cosechado en un rango de temperaturas comprendidas entre 36 y 40 °C en comparación con el lote semilla o con una preparación de referencia destinada a ensayos de marcador y con cepas rct/40- y rct/40+ adecuadas del poliovirus del mismo tipo. Controlar las temperaturas de incubación empleadas en el ensayo, con una precisión de $\pm 0,1$ °C. La cosecha monovalente (mezcla) cumple con el ensayo si el título del virus determinado a 36 °C, cuando tanto en la cosecha como en la preparación de referencia, el título es al menos 5,0 log mayor que el determinado a 40 °C. Si el crecimiento a 40 °C es tan bajo que no se puede establecer una comparación válida, se emplea una temperatura comprendida entre 39,0 y 39,5 °C; a esta temperatura la reducción del título de virus en el material de referencia debe ser tal que se encuentre entre 3,0 log y 5,0 log de su valor a 36 °C; la reducción mínima aceptable, para cada cepa de virus, se debe determinar a una temperatura dada. Si los títulos obtenidos para 1 o más de los virus de referencia no son concordantes con los valores esperados se debe repetir el ensayo.

Ensayo de Neurovirulencia para vacunas a virus vivo <339>

Proceder según se indica en *Ensayo para la vacuna contra la poliomiélitis oral*.

Cultivos primarios de células renales de mono

Los siguientes requisitos especiales se aplican a cosecha monovalente (mezcla) obtenidas de cultivos primarios de células de mono.

Retrovirus

La cosecha monovalente (mezcla) debe ser examinada empleando un ensayo de transcriptasa reversa. No se debe encontrar indicación de presencia de retrovirus.

Ensayo en conejos

Una muestra de no menos de 100 ml de cosecha monovalente (mezcla) debe ser analizada para herpesvirus B (*Cercopithecine herpesvirus 1*) y otros virus por inoculación en al menos 10 conejos sanos y de un peso entre 1,5 y 2,5 kg. Cada conejo debe recibir una cantidad no menor de 10 ml y no mayor de 20 ml; de los cuales 1 ml es administrado por vía intradérmica en múltiples puntos y el resto por vía subcutánea. Observar los conejos durante al menos 3 semanas y registrar las muertes y los síntomas de enfermedad. Realizar la autopsia de todos los conejos que mueran en las primeras 24 horas o que presenten síntomas de enfermedad y examinar detalladamente el cerebro y otros órganos removidos para establecer la causa de la muerte.

El ensayo sólo es válido si no más de 20 % de los conejos inoculados muestran síntomas de infección intercurrente durante el período de observación. La cosecha monovalente (mezcla) de cumple con el ensayo si ninguno de los conejos muestra signos de infección con el virus B o con otros agentes extraños o lesiones de cualquier tipo atribuibles a la suspensión a granel. Si se demuestra la presencia del virus B se toman las medidas concernientes a la producción de vacunas especificadas en *Cultivos celulares*.

Ensayos en cobayos

Si los cultivos primarios de células renales de mono no derivan de monos mantenidos en una colonia cerrada, la mezcla de cosecha monovalente debe cumplir con el siguiente ensayo.

Administrar al menos a 5 cobayos, de peso comprendido entre 350 y 450 g, 0,1 ml de la cosecha monovalente (mezcla) por vía intracerebral y 0,5 ml por inyección intraperitoneal. Medir la temperatura rectal de cada animal, cada día de trabajo durante 6 semanas. Al final del período de observación, realizar la autopsia de cada animal. Por otro lado, administrar al menos a otros 5 cobayos 0,5 ml por inyección intraperitoneal y observar como se describió anteriormente, durante 2 a 3 semanas. Al final del período de observación, realizar un pasaje a partir de estos animales al menos a otros 5 cobayos, utilizando sangre y una suspensión de tejido de hígado o bazo. Medir la temperatura rectal de estos últimos cobayos durante

2 a 3 semanas. Examinar por autopsia todos los animales que, después del primer día de ensayo, mueren o se sacrifican porque muestran signos de enfermedad o porque presentan durante 3 días consecutivos temperaturas mayores a 40,1 ° C; realizar un examen histológico para detectar infección con filovirus; además, inyectar una suspensión de tejido de hígado o bazo o de sangre, intraperitonealmente, en al menos 3 cobayos. Si se observa algún síntoma de infección con filovirus realizar en la sangre de los animales afectados ensayos de confirmación serológica.

La cosecha monovalente (mezcla) cumple el ensayo si como mínimo el 80 por ciento de los cobayos sobreviven al final del período de observación, permaneciendo en buen estado de salud y ninguno de los animales muestra signos de infección con filovirus.

Vacuna final a granel

La vacuna final a granel se prepara a partir de una o más cosechas monovalentes (mezcla) satisfactorias y puede contener más de un tipo de virus. Se pueden añadir sustancias saborizantes y estabilizadoras adecuadas. Para la preparación del lote final sólo se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla con los siguientes requisitos.

Contaminación bacteriana y fúngica

Proceder según se indica en 370. *Ensayos de esterilidad*, empleando 10 ml para cada medio.

Lote final

Para liberar la vacuna para su uso, el lote final debe cumplir con los siguientes requerimientos de estabilidad térmica y satisfacer los requisitos especificados en *Identificación*, *Ensayos* y en *Valoración* y debe cumplir con el siguiente requisito.

Estabilidad térmica

Mantener muestras del lote final a 37 °C durante 48 horas. Determinar la concentración total de virus según se indica en *Valoración*, en paralelo para la vacuna tratada térmicamente y no tratada. La diferencia estimada entre la concentración de virus total de la vacuna sin tratamiento térmico y la sometida a tratamiento térmico no debe ser mayor de 0,5 log₁₀ unidades de virus infeccioso (DICC50) por dosis humana.

ENSAYOS

Identificación

Demostrar que la vacuna contiene poliovirus de cada tipo declarado en el rótulo, empleando anticuerpos específicos.

Contaminación bacteriana y fúngica

Debe cumplir con 370. *Ensayos de esterilidad*.

VALORACIÓN

Utilizar una preparación de referencia de virus adecuada para validar cada ensayo. Si la vacuna contiene más de un tipo de poliovirus, titular por triplicado cada tipo por separado empleando un antisuero tipo-específico adecuado (o preferiblemente un anticuerpo monoclonal) para neutralizar cada uno de los otros tipos presentes.

Para una vacuna trivalente, el título promedio de virus estimado no debe ser menor de $1 \times 10^{6,0}$ unidades virales infecciosas (DICC50) para el tipo 1 para una dosis humana, de $1 \times 10^{5,0}$ unidades virales infecciosas (DICC50) para el tipo 2, y de $1 \times 10^{5,5}$ unidades virales infecciosas (DICC50) para el tipo 3.

En el caso de una vacuna monovalente o divalente, los títulos mínimos de virus son decididos por la Autoridad competente.

Procedimiento - Inocular grupos de 8 a 12 pocillos de fondo plano de una placa de microtitulación, con 0,1 ml de cada una de las diluciones de virus seleccionadas, seguidas de un volumen adecuado de una suspensión celular de la línea Hep-2 (*Cincinnati*). Incubar las placas a una temperatura apropiada. Observar los cultivos entre los días 7 y 9. El ensayo no es válido si el intervalo de confianza ($P = 0,95$) del logaritmo de la concentración de virus es mayor de $\pm 0,3$.

ROTULADO

Indicar en el rótulo indica los tipos de virus de la poliomiелitis contenidos en la vacuna, la cantidad mínima de cada tipo de virus contenido en una dosis humana, expresados en DICC50 y el sustrato celular empleado para la preparación de la vacuna. Indicar que la vacuna no debe ser inyectada.

VACUNA CONTRA LA RUBEOLA, VIVA

Vaccinum rubellae vivum

Definición - La Vacuna contra la Rubéola, viva es una preparación liofilizada obtenida a partir de una cepa adecuada atenuada de virus de la rubéola. La vacuna, reconstituida inmediatamente antes de su uso según se indica en el rótulo, se presenta bajo la forma de un líquido claro que puede ser coloreado por la presencia de un indicador de pH. La Vacuna contra la Rubéola, viva debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

La preparación de esta vacuna se basa en un sistema de lotes semilla y un sistema de banco de células. El método de producción debe demostrar que obtiene, de un modo consistente, vacunas vivas contra la rubéola de adecuada inmunogenicidad e inocuidad para el hombre. A no ser que esté debidamente justificado y autorizado, el virus de la vacuna final no deberá tener un número de pasajes, desde el lote de semilla maestra, superior al que se empleó para preparar la vacuna que demostró en estudios clínicos ser segura y eficaz. El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, si es analizado, cumple con los requisitos cuando se ensaya según se indica en 360. *Ensayo de toxicidad anormal y 745. Vacunas de uso humano.*

Sustrato para la multiplicación del virus

El virus se multiplica en células diploides humanas (ver 1125. *Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano*)

Lote de siembra

La cepa del virus de la rubéola utilizada deberá ser identificada por registros históricos que incluyan información sobre el origen de la cepa y su posterior manipulación. Para evitar la utilización innecesaria de monos en el ensayo de neurovirulencia, los lotes semillas del virus se preparan en cantidades importantes y se conservan a temperatura inferior a -20°C si están liofilizados, o por debajo de -60°C , si no están liofilizados. Para la multiplicación del virus, solamente se puede utilizar un lote semilla de virus que cumpla los siguientes requisitos.

Identificación

Se identifican los lotes semilla y de trabajo como de virus de la rubéola por un ensayo de seroneutralización en cultivo celular, utilizando anticuerpos específicos.

Concentración del virus

La concentración del virus en los lotes semilla y de lote semilla de trabajo, se controla para verificar la consistencia de la producción.

Ensayo para agentes extraños en vacunas virales <415>

El lote semilla de trabajo debe cumplir con los requisitos para los lotes semillas maestra.

Ensayo de neurovirulencia para vacunas a virus vivo <339>

Debe cumplir con los requisitos. Los monos *Macaca* y *Cercopithecus*, son apropiados para este ensayo.

Multiplicación del virus y cosecha

Todos los procesos del banco celular y posteriores cultivos celulares se realizan bajo condiciones de asepsia, en una zona donde no se manipulan otros tipos de células. En el medio de crecimiento celular se puede utilizar suero animal adecuado (pero no suero humano); sin embargo, el medio final, destinado al mantenimiento del crecimiento celular durante la multiplicación viral, no contiene suero animal. Se debe demostrar que el suero y la tripsina utilizados en la preparación de suspensiones celulares y de medios de cultivo están libres de agentes extraños. El medio de cultivo celular puede contener un indicador de pH tal como rojo fenol así como antibióticos adecuados en la concentración efectiva más baja. Durante la producción es preferible disponer de un sustrato libre de antibióticos. Se reserva aparte no menos de 500 ml de la producción de cultivo celular como control de células no infectadas (células control) La temperatura de incubación es controlada durante el crecimiento de los virus. Las suspensiones virales se cosechan, en una o más ocasiones, dentro de los 28 días posteriores a la inoculación. Se pueden mezclar varias cosechas del mismo cultivo celular y considerar la mezcla como una cosecha individual. Para la preparación de la vacuna final a granel, solamente se puede utilizar una cosecha que cumpla los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar los virus contenidos en la cosecha obtenida como virus de la rubéola por seroneutralización en cultivo celular, utilizando anticuerpos específicos.

Concentración en virus

Determinar la concentración en virus en la cosecha obtenida, para monitorear la consistencia de la producción y determinar la dilución a utilizar en la vacuna final a granel, según se indica en *Valoración*.

Ensayo para Agentes extraños en Vacunas virales <415>

Debe cumplir con los requisitos.

Células control

Las células control de la producción del cultivo celular deben cumplir el ensayo de *Identificación* y 415. *Ensayo para agentes extraños en vacunas virales.*

Vacuna final a granel

Las cosechas de virus que cumplen los ensayos indicados anteriormente se mezclan y se clarifican para remover células. Se puede añadir un estabilizante adecuado y diluir las recolecciones mezcladas de un modo apropiado. Para la preparación del lote final, solamente se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla los siguientes requisitos.

Contaminación bacteriana y fúngica

La vacuna final a granel debe cumplir con los requisitos cuando se ensaya según se indica en 370. *Ensayo de esterilidad*, realizado utilizando 10 ml para cada medio.

Lote final

Para la liberación del producto se establece la mínima concentración de virus para asegurar que, basados en datos de estabilidad, la concentración indicada en la etiqueta se encontrará presente al final del período de validez.

Sólo se puede liberar para su uso un lote final que cumple los requisitos para la concentración mínima de virus, estabilidad térmica y cada uno de los requisitos según se indica en *Ensayos*. Si en la vacuna final a granel se ha realizado el ensayo para albúmina sérica bovina con resultados satisfactorios, se puede omitir su determinación en el lote final.

Estabilidad térmica

Mantener las muestras de la vacuna liofilizada sin reconstituir a 37 ° C durante 7 días. Determinar la concentración del virus según se indica en *Valoración* en paralelo entre la vacuna sometida a exposición al calor y la vacuna sin exposición al calor incubada a 5 ± 3 °C. La concentración de virus de la vacuna tratada térmicamente no debe ser mayor de 1,0 log₁₀ inferior que la concentración de la vacuna sin tratamiento térmico.

ENSAYOS

Identificación

Cuando la vacuna se reconstituye como se indica en la etiqueta y se mezcla con anticuerpos específicos contra el virus de la rubéola, pierde la capacidad de infectar cultivos celulares susceptibles a este virus.

Contaminación bacteriana y fúngica

Debe cumplir con de 370. *Ensayo de esterilidad.*

Albúmina sérica bovina

No más de 50 ng por dosis humana, determinada mediante un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*).

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 %.

VALORACIÓN

Determinar el título de virus infectivos, al menos por triplicado, utilizando como mínimo cinco cultivos celulares para cada dilución (factor de dilución 0,5 log₁₀) o por otro método de igual precisión. Utilizar una preparación de referencia de virus adecuada para validar cada titulación. La concentración estimada del virus no es inferior a la indicada en la etiqueta; la concentración de virus mínima indicada en el rotulo, no debe ser menor de 1 × 10³ CCID₅₀ por dosis humana. El ensayo sólo es válido si el intervalo de confianza (*P* = 0,95) del logaritmo de la concentración vírica es menor de ± 0,3.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cepa de virus utilizada para la preparación de la vacuna, el tipo y el origen de las células utilizadas en la preparación de la vacuna, el título mínimo del virus expresado en CCID₅₀, que se debe evitar el contacto con desinfectantes, el período de tiempo en el que la vacuna se puede utilizar, una vez reconstituida, que la vacuna no debe ser administrada a mujeres embarazadas y que la mujer no puede quedar embarazada dentro de los dos meses posteriores a la administración de vacuna.

VACUNA CONTRA EL SARAMPION, VIVA

Vaccinum morbillorum vivum

Definición - La Vacuna contra el Sarampión, viva es en una preparación liofilizada obtenida a partir de una cepa viva atenuada del virus del sarampión. La vacuna, reconstituida inmediatamente antes de su uso según lo indicado en el rótulo, debe tener la apariencia de un líquido transparente, que puede ser coloreado por la presencia de un indicador de pH. La Vacuna contra el Sarampión, viva debe cumplir con los siguientes requisitos.

PRODUCCIÓN

La producción de la vacuna se basa en un sistema de lotes de semilla de virus, en el caso de virus que se propagan en células diploides humanas se utiliza un sistema de banco de células. El método de producción debe demostrar que obtiene en forma uniforme, vacunas vivas contra el sarampión de adecuada inmunogenicidad e inocuidad para el hombre. A no ser que esté debidamente justificado y autorizado, el virus de la vacuna final no deberá tener un número de pasajes, desde el lote de semilla maestro, superior al que se empleó para preparar la vacuna que demostró en los estudios clínicos ser segura y eficaz. Incluso en las excepciones autorizadas, el número de pasajes, más allá del utilizado para estudios clínicos, no deberá ser mayor de cinco.

El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, si es analizado, cumple con los requisitos de 360. *Ensayo de toxicidad anormal* y 745. *Vacunas de uso humano*.

Sustrato para multiplicación del virus

El virus se multiplica en células diploides humanas o en cultivos de células de embrión de pollo obtenidos de criaderos libres de patógenos específicos (ver 1125. *Sustratos Celulares para la producción de Vacunas de uso humano*).

Lote semilla

La cepa del virus de sarampión utilizada debe estar identificada por registros históricos que incluyan información sobre el origen de la cepa y su posterior manipulación. Para evitar la utilización innecesaria de monos en el ensayo de neurovirulencia, los lotes de siembra se deben preparar en cantidades importantes y se deben conservar a una temperatura menor de -20°C si están liofilizados, o menor de -60°C , si no están liofilizados.

Para la multiplicación del virus, solamente se puede utilizar un lote semilla de virus que cumpla los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar los lotes semilla maestra y de trabajo como de virus del sarampión, por un ensayo de seroneutralización en el cultivo celular, utilizando anticuerpos específicos.

Concentración del virus

Controlar la concentración del virus en los lotes semilla y de lote semilla de trabajo para asegurar la uniformidad de la producción.

Ensayo para agentes extraños en vacunas virales <415>

El lote de semilla de trabajo debe cumplir con los requisitos para los lotes semilla maestros.

Ensayo de neurovirulencia para vacunas a virus vivo <339>

Debe cumplir con los requisitos. Los monos *Macaca* y *Cercopithecus*, sensibles al virus del sarampión, son apropiados para este ensayo.

Multiplicación del virus y cosecha

Todos los procesos del banco celular y posteriores cultivos celulares se deben realizar bajo condiciones de asepsia, en una zona donde no se manipulan otros tipos de células. En el medio de crecimiento celular se puede utilizar suero animal apropiado, pero no suero humano; sin embargo, el medio final, destinado al mantenimiento del crecimiento celular a lo largo de la multiplicación viral, no contiene suero animal. El suero y la tripsina utilizados en la preparación de suspensiones celulares y de medios de cultivo deben estar libres de agentes extraños. El medio de cultivo celular puede contener un indicador de pH, tal como rojo fenol, así como antibióticos apropiados en la concentración efectiva más baja. Durante la producción es preferible disponer de un sustrato exento de antibióticos. Se debe reservar aparte como células control no infectadas (células control) no menos de 500 ml de la producción de cultivo celular. Las suspensiones vírales se cosechan al tiempo apropiado para la cepa viral utilizada.

Para la preparación de la vacuna final a granel, solamente se puede utilizar una cosecha individual que cumpla los siguientes requisitos.

Identificación

Identificar los virus contenidos en la cosecha individual como virus del sarampión, por un ensayo de seroneutralización en cultivo celular, utilizando anticuerpos específicos.

Concentración de virus

Determinar la concentración de virus en la cosecha individual según se indica en *Valoración*, para monitorear la uniformidad de la producción y

determinar la dilución a utilizar en la vacuna final a granel.

Ensayo para agentes extraños en vacunas virales <415>

La cosecha individual debe cumplir con los requisitos.

Células control

Si se utilizan células diploides humanas para la producción, las células control deben cumplir con los requisitos de *Identificación y 415. Ensayo para agentes extraños en vacunas virales.*

Vacuna final a granel

Las cosechas de virus que cumplen con los ensayos indicados anteriormente se mezclan y se clarifican para remover las células. Se puede agregar un estabilizante apropiado y diluir las cosechas mezcladas de un modo apropiado. Para la preparación del lote final, solamente se puede utilizar una vacuna final a granel que cumpla el siguiente requisito.

Contaminación bacteriana y fúngica

La vacuna final a granel debe cumplir con *370. Ensayos de esterilidad* realizado utilizando 10 ml para cada medio.

Lote final

Para la liberación del producto se establece la mínima concentración de virus para asegurar que, basados en datos de estabilidad, la concentración indicada en el rótulo se encontrará presente al final del período de validez. Sólo se puede liberar para su uso un lote final que cumpla los requisitos de la concentración mínima de virus, *Estabilidad térmica* y con cada uno de los requisitos indicados en *Ensayos*. Si en la vacuna final a granel se ha realizado el ensayo para albúmina sérica bovina con resultados satisfactorios, se puede omitir su determinación en el lote final.

Estabilidad térmica

Mantener las muestras del lote final de la vacuna liofilizada en condiciones sin reconstituir a 37 °C durante 7 días. Determinar la concentración de virus según se indica en *Valoración* en paralelo entre la vacuna tratada térmicamente y la vacuna sin exposición al calor conservada a 5 ± 3 °C. La concentración de virus para la vacuna tratada térmicamente no debe ser mayor de $1,0 \log_{10}$ inferior que para la vacuna sin tratamiento térmico.

ENSAYOS

Identificación

Reconstituir la Vacuna contra el Sarampión, viva según se indica en el rótulo, mezclar con anticuerpos específicos del virus del sarampión: debe perder la capacidad de infectar cultivos celulares susceptibles a este virus.

Contaminación bacteriana y fúngica

Reconstituir la vacuna según se indica en el rótulo. Debe cumplir con *370. Ensayos de esterilidad.*

Albúmina sérica bovina

No más de 50 ng por dosis humana, determinada mediante un método inmunoquímico apropiado (ver *635. Métodos inmunoquímicos*).

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 % p/p.

VALORACIÓN

Determinar el título de virus infectivos, al menos por triplicado, utilizando como mínimo cinco cultivos celulares para cada dilución (factor de dilución $0,5 \log_{10}$) o por otro método de similar precisión. Utilizar una preparación de referencia de virus adecuada para validar cada titulación. La concentración de virus estimada no debe ser menor a la indicada en el rótulo; la concentración de virus mínima indicada en el rótulo no debe ser menor de 1×10^3 CCID₅₀ por dosis humana. El ensayo sólo es válido si el intervalo de confianza ($P = 0,95$) del logaritmo de la concentración vírica es menor de $\pm 0,3$.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cepa de virus utilizada para la preparación de la vacuna, el tipo y el origen de las células utilizadas, la mínima concentración de virus expresada en dosis infectiva en cultivos de células (CCID₅₀), que se debe evitar el contacto con desinfectantes, y el periodo de tiempo en el que la vacuna se puede utilizar, una vez reconstituida.

VACUNA CONTRA EL TÉTANOS, ADSORBIDA

Vaccinum tetani adsorbatum

Definición - La Vacuna contra el Tétanos, Adsorbida es una preparación de toxoide tetánico formolizado, adsorbido sobre un soporte mineral. El toxoide formolizado se prepara a partir de la toxina producida por cultivo de *Clostridium tetani*. La Vacuna contra el Tétanos, Adsorbida debe cumplir con los siguientes requisitos.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto al ser analizado, cumple el siguiente requisito.

Toxicidad específica

Seleccionar un grupo de cinco cobayos sanos, de 250 a 350 g de peso, sin tratamientos previos con alguna sustancia que pueda interferir con el ensayo e inyectar a cada animal, por vía subcutánea, cinco veces la dosis humana indicada en el rótulo. Si dentro de los 21 días siguientes a la inyección, ninguno de los animales muere o muestra síntomas de tétanos, la vacuna cumple con el ensayo. Si muere más de un animal por causas inespecíficas, repetir el ensayo una vez. Si muere más de un animal esta segunda vez, la vacuna no cumple con el ensayo.

Toxoide tetánico purificado a granel

En la producción de la toxina tetánica, a partir de la cual se obtiene el toxoide, se debe utilizar un sistema de cultivo de lote semilla que conserve la toxigenicidad del microorganismo. En caso de ser necesario restaurar por reelección deliberada a partir de los lotes semilla. Los cultivos se deben realizar en un medio líquido apropiado y con una cepa altamente toxigénica de *Clostridium tetani*, de procedencia e historia documentadas. Al final del período de incubación, debe comprobarse la pureza de cada cultivo y descartar los contaminados. El medio conteniendo la toxina se debe cosechar asépticamente y se debe determinar el contenido en toxina (Lf por ml) para monitorear la consistencia de la producción. Para la preparación del granel del toxoide purificado se pueden mezclar cosechas individuales de toxina tetánica. La toxina se debe purificar con el objeto de eliminar sustancias que pudieran causar efectos adversos en humanos. La toxina purificada es detoxificada por tratamiento con formaldehído por un método que evite la destrucción de la potencia inmunogénica del toxoide así como su reversión a toxina, particularmente si se expuso al calor. También es

posible realizar la purificación después de la detoxificación.

Para la producción de la preparación final de vacuna a granel sólo pueden utilizarse preparaciones de toxoide purificado que cumplan con los siguientes requisitos.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml por cada medio.

Ausencia de toxina tetánica e irreversibilidad del toxoide

Preparar una solución de toxoide purificado a granel empleando la misma solución reguladora de la vacuna final sin adsorbente, a la misma concentración final que en la vacuna. Dividir la dilución en dos partes iguales. Mantener una a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ y la otra a 37°C durante 6 semanas. Utilizar quince cobayos, de 250 a 350 g de peso, sin tratamientos previos con alguna sustancia que pueda interferir con el ensayo y dividirlos en tres grupos de cinco animales cada uno. Inyectar a cada animal del primer grupo, por vía subcutánea, 5 ml de la dilución incubada a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Inyectar, a cada animal del segundo grupo, por vía subcutánea, 5 ml de la dilución incubada a 37°C . Inyectar, a cada animal del tercer grupo por vía subcutánea, no menos de 500 Lf de toxoide purificado no incubado, en un volumen de 1 ml. El toxoide purificado a granel cumple con el ensayo si dentro de los 21 días siguientes a la inyección, ninguno de los animales muere o muestra síntomas de toxemia tetánica. Si muere más de un animal por causas inespecíficas, se repite el ensayo una vez. Si muere más de un animal esta segunda vez, el toxoide no cumple con el ensayo.

Pureza antigénica

El contenido no debe ser menor de 1.000 Lf por mg de nitrógeno proteico.

Vacuna final a granel

La preparación final de vacuna a granel se obtiene mediante adsorción, de una cantidad apropiada de toxoide purificado a granel (no mayor de 25 Lf), en un soporte mineral como el fosfato de aluminio hidratado o hidróxido de aluminio; la mezcla resultante es aproximadamente isotónica con la sangre. Se pueden agregar conservantes antimicrobianos apropiados. Algunos conservantes, como los fenólicos no se deben emplear porque afectan la actividad antigénica. Para la preparación del lote final sólo pueden utilizarse graneles de vacuna que cumplen los siguientes requisitos.

Conservantes <80>

La cantidad no debe ser menos de 85 % y no más de 115 % de la cantidad declarada.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Lote final

La vacuna final a granel se debe distribuir asépticamente en envases estériles, para inyectables, con cierre inviolable. Los envases deben ser cerrados de tal manera de evitar la contaminación. Solo los lotes finales que cumplan los requisitos indicados en *Ensayos y Valoración*, pueden ser liberados para su uso. Los ensayos de *Formaldehído libre*, 80. *Conservantes* y la *Valoración* pueden omitirse en los lotes finales de vacuna, siempre que se demuestre que se han llevado a cabo en la vacuna final a granel con resultados satisfactorios.

ENSAYOS

Identificación

Identificar el toxoide tetánico por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) previa desadsorción del soporte mineral utilizado como adyuvante. El siguiente método de desadsorción, aplicable a ciertas vacunas, es dado como ejemplo: disolver, en la vacuna en ensayo suficiente cantidad de citrato de sodio para obtener una solución de aproximadamente 100 g por litro. Mantener a 37 °C durante 16 horas y centrifugar hasta obtener un sobrenadante líquido claro. Dicho sobrenadante reacciona con una antitoxina tetánica, produciendo un precipitado.

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio en vacunas adsorbidas* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

El contenido no debe ser menor que la mínima cantidad que haya mostrado ser efectiva y no más de 115 % de la cantidad declarada en el rótulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Determinar la potencia de la Vacuna contra el Tétanos, Adsorbida por administración de la vacuna a animales (cobayos o ratones) seguida por el desafío con toxina tetánica (método A o B) o por la determinación del título de anticuerpos contra el toxoide tetánico en el suero de los cobayos (método C). En ambos casos la potencia de la vacuna se

calcula por comparación con la vacuna de referencia calibrada en Unidades Internacionales. Para los métodos A y B puede usarse el método de DL₅₀. Para el método de DL₅₀, el número de animales y el procedimiento son idénticos a los descritos para el método de parálisis pero el punto final es la muerte de los animales en lugar de la parálisis. [La Unidad Internacional es la actividad contenida en una cantidad establecida del Estándar Internacional para el toxoide tetánico adsorbido. La equivalencia en Unidades Internacionales del Estándar Internacional es establecida por la Organización Mundial de la Salud.]

El método elegido para la valoración de la vacuna contra el tétanos adsorbida depende del propósito propuesto. Los métodos A o B se utilizan durante el desarrollo de la vacuna, para valoración de lotes producidos para validar la producción; o cuando se necesita validación después de un cambio significativo en el proceso de manufactura. Pueden ser utilizados para valoración de rutina de lotes de vacunas pero teniendo en cuenta criterios de protección animal, siempre que sea posible se utiliza el método C.

El método C puede ser utilizado, excepto en los puntos 1 y 2 mencionados anteriormente, después de la verificación de la adecuabilidad del mismo para el producto a ser examinado. Para verificar su adecuabilidad, un número adecuado de lotes (usualmente 3) deben ser valorados por el método C y por el método A o B.

Cuando se preparan diferentes vacunas (monovalentes o combinadas) a partir de toxoide tetánico del mismo origen, la adecuabilidad demostrada para la combinación con el mayor número de componentes puede asumirse como válida para las combinaciones con menor número de componentes y para la vacuna monovalente. Para combinaciones con componente pertussis celular se debe realizar una demostración separada de la equivalencia para la mayor combinación.

El diseño de los ensayos sigue un modelo de diluciones múltiples para la preparación a ser ensayada y la de referencia.

En base a datos de potencia obtenida en los ensayos de diluciones múltiples es posible disminuir el número de animales necesario para obtener un resultado estadísticamente significativo por aplicación de un modelo simplificado utilizando una única dilución para ambas preparaciones. Este modelo permite al analista determinar si la potencia de la preparación a ser ensayada es significativamente mayor que el mínimo requerido pero no da información sobre la curva dosis respuesta, su pendiente, linealidad y paralelismo.

Cuando se utiliza un ensayo de una única dilución, debe monitorearse a lo largo del tiempo la consistencia del ensayo y de la producción usando indicadores adecuados y realizando un ensayo completo de diluciones múltiples periódicamente, por ejemplo cada 2 años. Para valoraciones serológicas, los indicadores adecuados para monitorear la consistencia del ensayo son valor promedio y desviación estándar de los títulos relativos de antitoxina o scores de las muestras de suero obtenido después de la administración de una dosis fija de la preparación de referencia, títulos de antitoxinas de los controles ensayados (muestras de sueros positivos y negativos), relación de los títulos de antitoxina del suero control positivo y las muestras de suero correspondientes a la vacuna de referencia.

Método A. Ensayo de desafío en cobayos.

Selección y distribución de los animales para el ensayo - Emplear en el ensayo cobayos sanos provenientes del mismo stock, de 250 a 350 gr. de peso. Distribuir los cobayos en no menos de 6 grupos iguales; utilizar grupos conteniendo un número de animales suficiente para obtener resultados que cumplan los requerimientos de validez del ensayo. Si es necesario determinar la actividad de la toxina de desafío a ser utilizada, incluir 3 grupos más de 5 cobayos como controles no vacunados. Emplear cobayos del mismo sexo o machos y hembras igualmente distribuidos entre los grupos.

Selección de la toxina de desafío - Seleccionar una preparación de toxina tetánica conteniendo no menos de 50 veces la dosis parálítica 50 % por mililitro. Si la preparación de la toxina de desafío ha demostrado ser estable no es necesario verificar la dosis parálítica para cada ensayo.

Preparación de la solución de la toxina de desafío - Diluir, inmediatamente antes de emplear, la toxina de desafío con un diluyente adecuado (por ejemplo, solución salina peptonada regulada pH 7,4) para obtener una solución de toxina de desafío estable conteniendo aproximadamente 50 veces la dosis parálítica 50 % por ml. Cuando sea necesario, utilizar porciones de la solución de toxina de desafío diluida 1/16, 1/50 y 1/160 con el mismo diluyente para determinar la actividad de la toxina.

Dilución de la muestra y de la preparación de referencia - Preparar diluciones de la vacuna a ser examinada y de la preparación de referencia empleando una solución de cloruro de sodio 9 g/l de forma tal que las diluciones formen una serie difiriendo por no más de 2,5 veces y que las diluciones intermedias, cuando son inyectadas subcutáneamente a una dosis de 1.0 ml por cobayo

protejan aproximadamente el 50 por ciento de los animales de los efectos parálíticos de la inyección subcutánea de la cantidad de toxina tetánica indicada para ese ensayo.

Inmunización y desafío - Asignar 1 dilución a cada grupo de cobayos e inyectar subcutáneamente 1,0 ml de cada dilución en cada cobayo del grupo al cual la dilución fue asignada. Después de 28 días, inyectar subcutáneamente en cada animal 1,0 ml de la solución de toxina de desafío (conteniendo 50 veces la dosis parálítica 50 %).

Determinación de la actividad de la toxina de desafío - Si es necesario, asignar las 3 diluciones realizadas a partir de la solución de toxina de desafío, una a cada uno de los 3 grupos de 5 cobayos e inyectar subcutáneamente 1.0 ml de cada solución en cada cobayo del grupo en el cual esa solución fue asignada.

La actividad y la estabilidad de la toxina de desafío se determinan realizando un número adecuado de determinaciones de la dosis parálítica 50 %, por lo tanto no es necesario repetir la determinación para cada ensayo.

Lectura e interpretación de los resultados - Examinar los cobayos dos veces al día. Remover y sacrificar todos los animales que muestren signos definidos de parálisis tetánica. Contar el número de cobayos sin parálisis 5 días después de la inyección de la toxina de desafío. Calcular la potencia de la vacuna a ser examinada relacionada a la potencia de la preparación de referencia en base a la proporción de animales desafiados sin parálisis en cada uno de los grupos de los cobayos vacunados, empleando métodos estadísticos usuales.

El ensayo sólo es válido si tanto para la vacuna a ser analizada como para la preparación de referencia la dosis protectora 50 % se encuentra entre la mayor y la menor dosis administradas a los cobayos; cuando corresponda, el número de animales paralizados en los tres grupos de los cinco inyectados con las diluciones de la solución de la toxina de desafío indican que el desafío fue aproximadamente 50 veces la dosis parálítica 50 %; los límites de confianza ($P=0.95$) son no menores que 50 por ciento y no mayores que 200 por ciento de la potencia estimada; - el análisis estadístico muestra pendiente significativa y no muestra desviación de la linealidad y del paralelismo de las curvas dosis respuesta. El ensayo puede ser repetido, pero si se realiza más de 1 ensayo, los resultados de todos los ensayos válidos deben ser combinados para la estimación de la potencia.

Método B. Ensayo de desafío en ratones

Selección y distribución de los animales para el ensayo - Emplear ratones sanos provenientes del

mismo stock, de alrededor de 5 semanas de edad, de una cepa que haya mostrado ser adecuada. Distribuir los ratones en no menos de 6 grupos iguales, utilizar grupos conteniendo un número de animales suficiente para obtener resultados que cumplan los requerimientos de validez del ensayo. Si la toxina de desafío a ser utilizada no ha mostrado ser estable o no ha sido adecuadamente estandarizada, incluir 3 grupos de no menos de 5 ratones como controles no vacunados. Utilizar ratones del mismo sexo o machos y hembras igualmente distribuidos entre los grupos.

Selección de la toxina de desafío - Seleccionar una preparación de toxina tetánica conteniendo no menos de 100 veces la dosis parálítica 50 % por mililitro. Si la preparación de la toxina de desafío ha demostrado ser estable, no es necesario verificar la dosis parálítica para cada ensayo.

Preparación de la solución de la toxina de desafío - Diluir inmediatamente antes de emplear, la toxina con un diluyente adecuado (por ejemplo, solución salina peptonada regulada pH 7.4) para obtener una solución de toxina de desafío estable conteniendo aproximadamente 50 veces la dosis parálítica 50 % en 0.5 ml. Cuando sea necesario, diluir porciones de la solución de la toxina de desafío 1/16, 1/50 y 1/160 con el mismo diluyente para determinar la actividad de la toxina.

Dilución de la muestra y de la preparación de referencia - Preparar diluciones de la vacuna a ser examinada y de la preparación de referencia usando una solución de 9 g de cloruro de sodio por litro, de forma tal que, las diluciones formen una serie difiriendo por no más de 2, 5 veces y que las diluciones intermedias, cuando son inyectadas subcutáneamente a una dosis de 0,5 ml por ratón proteja aproximadamente el 50 por ciento de los animales de los efectos parálíticos de la inyección subcutánea de la cantidad de toxina tetánica indicada para ese ensayo.

Inmunización y desafío - Asignar una dilución a cada grupo de ratones e inyectar subcutáneamente 0,5 ml de cada dilución en cada ratón del grupo al cual la dilución fue asignada. Después de 28 días, inyectar subcutáneamente en cada animal 0,5 ml de la solución de toxina de desafío (conteniendo 50 veces la dosis parálítica 50 %).

Determinación de la actividad de la toxina de desafío - Si es necesario, asignar tres diluciones realizadas a partir de la solución de toxina de desafío, a cada uno de los tres grupos de no menos de 5 ratones e inyectar subcutáneamente 0,5 ml en cada ratón en el grupo en la cual esa dilución fue asignada.

Lectura e interpretación de los resultados - Examinar los ratones 2 veces al día. Remover y

sacrificar todos los animales que muestren signos definidos de parálisis tetánica. Contar el número de ratones sin parálisis cuatro días después de la inyección de la toxina de desafío. Calcular la potencia de la vacuna a ser examinada relacionada a la potencia de la preparación de referencia en base a la proporción de animales desafiados sin parálisis en cada uno de los grupos de los ratones vacunados, utilizando los métodos estadísticos usuales.

El ensayo sólo es válido si para la vacuna a ser examinada y la preparación de referencia, la dosis protectora 50 % cae entre la mayor y la menor dosis de las preparaciones dadas a los ratones; cuando corresponda, el número de animales paralizados en los tres grupos de no menos de 5 animales inyectados con las diluciones de la solución de la toxina de desafío indican que el desafío fue aproximadamente 50 veces la dosis parálítica 50 %; los límites de confianza ($p=0.95$) son no menor que el 50 por ciento y no mayor que el 200 por ciento de la potencia estimada; el análisis estadístico muestra pendiente significativa y no muestra desviación de la linealidad y del paralelismo de las curvas dosis-respuesta. El ensayo puede ser repetido pero cuando se realiza más de un ensayo, los resultados de todos los ensayos válidos deben ser combinados para la estimación de la potencia.

Método C. Determinación de anticuerpos en cobayos.

Selección y distribución de los animales para el ensayo - Emplear en el ensayo, cobayos sanos provenientes del mismo stock, de 250-350 gr. de peso. Utilizar cobayos del mismo sexo o machos y hembras igualmente distribuidos entre los grupos. Distribuir los cobayos en no menos de 6 grupos iguales, utilizar grupos conteniendo un número de animales suficiente para obtener resultados que cumplan los requerimientos de validez del ensayo. Emplear un grupo de cobayos no vacunados del mismo origen como control de suero negativo. Si la consistencia del ensayo fue demostrada se puede utilizar un control de suero negativo de referencia.

Preparación de referencia - Emplear una preparación de referencia adecuada o un lote de vacuna que haya demostrado ser efectiva en estudios clínicos, o un lote representativo de éste que hayan sido calibradas en Unidades Internacionales con una vacuna adsorbida contra tétanos de referencia o con un estándar Internacional para el toxoide tetánico adsorbido.

Dilución de la muestra y de la preparación de referencia - Preparar diluciones seriadas de la vacuna a ser examinada y de la preparación de referencia empleando una solución de cloruro de sodio 9 g por litro (pueden ser adecuadas series

difiriendo por 2, 5 a 5 veces). Utilizar no menos de tres diluciones en un rango de por ejemplo 0,5 a 16 UI por ml para cada una de las series. Utilizar las diluciones para inmunización preferiblemente antes de una hora de su preparación. Asignar una dilución a cada grupo de cobayos.

Inmunización - Inyectar subcutáneamente en la nuca de cada cobayo 1,0 ml de la dilución asignada a cada grupo.

Extracción de sangre - Luego de 35 a 42 días de la inmunización, extraer una muestra de sangre a cada cobayo vacunado y control utilizando un método apropiado.

Preparación de muestras de suero - Evitar el congelamiento y descongelamiento frecuente de las muestras de suero. Para evitar contaminación bacteriana es preferible realizar las manipulaciones en un gabinete de flujo laminar.

Determinación del título de anticuerpos - Determinar el título de anticuerpos relativo o score de cada muestra de suero por un método inmunoquímico adecuado. Métodos tales como ELISA e Inhibición de la unión de toxina (IUTO) se consideran adecuados y son descriptos más adelante.

Cálculo de la potencia - Calcular la potencia de la vacuna a ser examinada en Unidades Internacionales relacionada a la preparación de referencia, utilizando los métodos estadísticos usuales. [NOTA: Unidades Internacionales de potencia refiere a la vacuna de referencia y no a las Unidades Internacionales de la antitoxina del suero de cobayo de referencia.]

El ensayo sólo es válido si los límites de confianza ($p=0.95$) son no menor que 50 por ciento y no mayor que 200 por ciento de la potencia estimada; el análisis estadístico muestra pendiente significativa y no muestra desviación de la linealidad y del paralelismo de la curva dosis-respuesta. El ensayo puede ser repetido pero cuando se realiza más de un ensayo los resultados de todos los ensayos válidos deben combinarse para la estimación de la potencia.

El límite de confianza inferior ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 40 U.I por dosis humana.

CONSIDERACIONES

Método A. Ensayo de desafío en cobayos

Lectura e interpretación de los resultados - Con el fin de minimizar el sufrimiento de los animales de prueba se recomienda registrar el grado de parálisis en una escala. La escala da signos típicos cuando la inyección de la toxina de desafío se realiza en la región media-ventral, directamente detrás del esternón con una aguja apropiada a través

del cuello del cobayo. El grado T3 es dado como punto final, pero con experiencia el grado T2 puede ser utilizado en su lugar. La toxina tetánica produce por lo menos parálisis de 1 de los miembros delanteros que puede ser reconocido en un estadio temprano. El grado de tetania en cobayos se caracteriza por los siguientes signos:

-T1: leve rigidez de un miembro delantero, pero difícil de observar;

-T2: paresia de un miembro delantero que puede todavía funcionar.

-T3: parálisis de 1 miembro delantero. El animal se mueve de mala gana, el cuerpo está ligeramente con forma de banana debido a la escoliosis.

-T4: el miembro delantero está completamente rígido y los dedos inmóviles. La contracción muscular de los miembros delanteros es muy pronunciada y usualmente se observa escoliosis.

-T5: ataque tetánico, espasmo tónico continuo de los músculos,

-D: muerte

Método B. Ensayo de desafío en ratones.

Lectura e interpretación de los resultados - Con el fin de minimizar el sufrimiento de los animales de prueba se recomienda registrar el grado de parálisis en una escala como se muestra más adelante. La escala da signos típicos cuando la inyección de la toxina de desafío se realiza en la región dorsal, cerca de una de las patas traseras. El grado T3 es dado como punto final, pero con experiencia el grado T2 puede ser utilizado en su lugar. La toxina tetánica produce en la pata trasera inyectada con la toxina paresia seguida de parálisis que puede ser reconocido en un estadio temprano. El grado de tetania en ratones se caracteriza por los siguientes signos:

-T1: leve rigidez de la pata trasera inyectada con la toxina, solo cuando el ratón es levantado por la cola;

-T2: paresia de la pata trasera inyectada con toxina, la cual puede funcionar para caminar;

-T3: parálisis de la pata posterior inyectada con toxina; la cual no funciona para caminar;

-T4: la pata posterior inyectada con toxina está completamente rígida con los dedos inmóviles;

-T5: ataque tetánico, espasmo tónico continuo de los músculos,

-D: muerte

Método C. Determinación de anticuerpos en cobayos.

Preparación de muestras de suero - Invertir los tubos conteniendo muestras de sangre 6 veces e incubar en posición vertical a 37 °C por 2 horas, luego a 4°C por 2 horas. Centrifugar a temperatura ambiente a 800 g por 20 minutos. Transferir el

suelo a tubos estériles y conservar a temperatura inferior a -20°C , Al menos una producción de 40% de suero es obtenido por este procedimiento.

Determinación del título de anticuerpos - Los ensayos de ELISA e IUTo son algunos ejemplos de métodos inmunoquímicos que han sido encontrados adecuados para la determinación del título de anticuerpos.

Determinación del título de anticuerpos en suero de cobayos por ensayo de ELISA - Se realizan diluciones de la muestra y del suero de referencia en placas de ELISA adsorbidos con toxoide tetánico. Se incluyen en cada placa un control de suero de cobayo positivo y un control de suero de cobayo negativo para monitorear la performance del ensayo. Se agrega anticuerpos de conejo o cabra anti-IgG de cobayo conjugado a peroxidasa seguido por el agregado de un sustrato de peroxidasa. Se mide la absorbancia y se calcula el título relativo de anticuerpos utilizando métodos estadísticos usuales.

Reactivos y equipamiento:

- placas de ELISA de 96 pocillos, 1-12 columnas, filas A-H

- antisuero de cobayo contra *Clostridium tetani*

- conjugado de peroxidasa: anticuerpos de conejo o cabra contra IgG de cobayo conjugados a peroxidasa.

- toxoide tetánico

- Solución reguladora de carbonato para cobertura pH 9,6: Disolver 1,59 g de carbonato de sodio anhidro y 2,93 g de carbonato ácido de sodio en 1.000 ml de agua. Distribuir en botellas de 150 ml y esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos.

- Solución reguladora salina fosfatada pH 7.4 (PBS): Disolver con agitación 80 g de cloruro de sodio, 2,0 g de fosfato diácido de potasio, 14,3 g de fosfato monoácido disódico dihidratado y 2,0 g de cloruro de potasio en 1.000 ml de agua. Conservar a temperatura ambiente para prevenir la cristalización. Diluir 10 veces su volumen con agua antes de usar.

- Solución de ácido cítrico: Disolver 10,51 g de ácido cítrico en 1.000 ml de agua y ajustar la solución a pH 4.0 con una solución de hidróxido de sodio 400 g por litro

- Solución reguladora de lavado: PBS conteniendo 0,5 g por litro de polisorbato 20

- Solución diluyente bloqueante: PBS conteniendo 0,5 g por litro de polisorbato 20 y 25 g por litro de leche descremada deshidratada.

- Sustrato de la peroxidasa: Poco antes de su uso, disolver 10 mg de 2,2 azino-bis(3etil-benzotiazolina-6-sulfonato)de diamonio en 20 ml de solución de ácido cítrico. Inmediatamente antes

de su uso agregar 5 μl de solución de peróxido de hidrogeno fuerte.

Método:

La siguiente descripción es dada como ejemplo de un posible diseño de la placa pero pueden ser utilizados otros diseños. Los pocillos 1 A-H son para el suero control negativo y los pocillos 2 A-H y 3 A-H son para el suero control positivo para monitoreo del ensayo. Los pocillos 4-12 A-H son para muestras. Cubrir cada pocillo de las placas de ELISA con 100 μl de solución de toxoide tetánico (0,5 Lf por ml en solución reguladora de carbonato para cobertura).

Incubar toda la noche a 4°C en una atmósfera húmeda. Para evitar interferencia por el gradiente de temperatura no apilar más de 4 placas. Al día siguiente, lavar las placas completamente con solución reguladora de lavado. Bloquear las placas por agregado de 100 μl de solución diluyente bloqueante en cada pocillo.

Incubar en atmósfera húmeda a 37°C por una hora. Lavar las placas completamente con solución reguladora de lavado. Colocar 100 μl solución diluyente bloqueante en cada pocillo de las placas, excepto aquellas de la fila A. Preparar diluciones adecuadas de suero control negativo, suero control positivo (a partir de 0,01 UI por ml) y del suero a ensayar. Asignar el suero control negativo a la columna 1, suero control positivo a las columnas 2 y 3, el suero a ensayar a las columnas 4-12 y agregar 100 μl de cada suero a los primeros 2 pocillos de la columna a la cual fue asignado. Utilizando una micropipeta multicanal, realizar diluciones seriadas al medio a partir de la fila B hacia abajo de la placa hasta la fila H por transferencia de 100 μl hacia el siguiente pocillo. Descartar 100 μl de la última fila de manera que todos los pocillos contengan 100 μl . Incubar a 37°C por 2 horas. Lavar minuciosamente con solución reguladora de lavado. Preparar diluciones adecuadas (p.ej. una dilución 1/2000) del conjugado de peroxidasa en solución diluyente bloqueante y agregar 100 μl a cada pocillo. Incubar a 37°C en atmósfera húmeda por 1 hora. Lavar las placas con solución reguladora de lavado. Agregar 100 μl de sustrato de peroxidasa a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente, protegido de la luz, por 30 minutos. Leer las placas a 405 nm en el mismo orden en que el sustrato fue agregado.

Determinación del título de anticuerpos en suero de cobayos por inhibición de la unión del toxoide o de la toxina (IUTo).

Se agrega la toxina o el toxoide tetánico a diluciones seriadas del suero muestra y de referencia; la mezcla suero/ antígeno se incuban toda la noche. Para determinar el toxoide o la toxina

no unida, las mezclas son transferidas a una placa de ELISA cubierta con antitoxina tetánica. Se agrega IgG antitetánica equina conjugada a peroxidasa seguida por el sustrato de peroxidasa. Se mide la absorbancia y el título de anticuerpos se calcula utilizando métodos estadísticos usuales. Un suero control positivo y un suero control negativo son incluidos en cada placa para monitorear la performance del ensayo.

Reactivos y equipamiento:

- placas de microtitulación de poliestireno rígidas de fondo redondeado.
- placas de ELISA de fondo plano
- toxina tetánica o toxoide tetánico
- antisuero de cobayo anti *Clostridium tetani*
- IgG equina antitetánica
- IgG equina antitetánica conjugada con peroxidasa
- Solución reguladora carbonato pH 9,6: Disolver 1,5 g de carbonato de sodio anhidro, 2,39 g de carbonato ácido de sodio y 0,2 g de azida sódica en 1.000ml de agua, ajustar a pH 9,6 y autoclavar a 121 °C por 20 minutos.
- Solución reguladora acetato de sodio pH 5,5: Disolver 90,2 g de acetato de sodio anhidro en 900 ml de agua. Ajustar a pH 5,5 usando una solución saturada de ácido cítrico monohidratado y diluir a 1.000 ml con agua.
- Solución reguladora salina fosfatada pH 7,2 (PBS). Disolver 135 g de cloruro de sodio, 20,55 g de fosfato monoácido disódico dihidratado y 4,8 g de fosfato diácido monosódico monohidratado en agua y diluir a 15 litros con el mismo solvente. Autoclavar a 100 °C durante 1 hora.
- Solución reguladora diluyente: PBS conteniendo albúmina bovina 5 g por litro y 0,5 g por litro de polisorbato 80.
- Solución reguladora bloqueante: PBS conteniendo albúmina bovina 5 g por litro.
- Solución de tetrametilbencidina: Solución de tetrametilbencidina 6 g por litro en alcohol. La sustancia se disuelve dentro de los 30-40 minutos a temperatura ambiente.
- Sustrato de peroxidasa. Mezclar 90 ml de agua, 10 ml de solución reguladora de acetato de sodio pH 5,5; 1,67 ml de solución de tetrametilbencidina y 20 µl de solución de peróxido de hidrogeno fuerte.
- Solución de lavado: agua de red conteniendo 0,5 g por litro de polisorbato 80.

Método:

Bloquear las placas de microtitulación de fondo redondeado colocando en cada pocillo 150 µl de solución reguladora bloqueante. Cubrir las placas

con un film o sellador. Incubar en atmósfera húmeda a 37 °C durante 1 hora. Lavar las placas completamente con solución de lavado. Colocar 100 µl de PBS en cada pocillo. Colocar 100 µl de la antitoxina tetánica de cobayo de referencia en el primer pocillo de cada una de las filas asignadas. Colocar 100 µl del suero muestra no diluida en el primer pocillo de cada una de las filas asignadas utilizando una pipeta multicanal realizar diluciones seriadas al medio a lo largo de la placa (hasta la columna 10) por transferencia de 100 µl de contenido al siguiente pocillo. Descartar 100 µl de la última columna de manera que todos los pocillos contengan 100 µl. Preparar una solución de toxina o toxoide tetánico 0,1 Lf por ml empleando PBS como diluyente. Agregar 40 µl de esta solución a todos los pocillos excepto a los de la columna 12. Los pocillos de la fila 11 son control positivo. Agregar 40 µl de PBS a los pocillos de la columna 12 (control negativo). Agitar las placas suavemente y cubrir las con tapas.

Cobertura de las placas de ELISA:

Inmediatamente antes del uso realizar una dilución adecuada de IgG antitetánica equina en solución reguladora carbonato pH 9,6 y agregar 100 µl a todos los pocillos. Incubar las dos series de placas toda la noche en una atmósfera húmeda a 37°C. Cubrir las placas con las tapas. Para evitar los efectos del gradiente de temperatura no apilar más de cuatro placas. Al día siguiente lavar las placas de ELISA con solución de lavado. Bloquear las placas colocando en cada pocillo 125 µl de solución reguladora bloqueante. Incubar a 37° C en atmósfera húmeda por 1 hora. Lavar las placas completamente con solución de lavado. Transferir 100 µl de la mezcla de preincubación de las placas de poliestireno a los pocillos correspondientes de las placas de ELISA, comenzando con la columna 12 y luego de la 1 a la 11. Cubrir las placas con tapas. Incubar a 37°C en atmósfera húmeda por 2 hs. Lavar las placas de ELISA con solución de lavado. Realizar una dilución adecuada (una dilución 1 en 4.000 puede ser adecuada) de la IgG anti tetánica equina conjugada con peroxidasa en solución reguladora diluyente. Agregar 100 µl de esta solución en cada pocillo y tapar las placas. Incubar a 37 °C en atmósfera húmeda por 1,5 horas. Lavar la placa de ELISA completamente con solución de lavado. Agregar 100 µl de sustrato de peroxidasa a cada pocillo. Se desarrolla un color azul. Incubar las placas a temperatura ambiente. Detener la reacción a un tiempo dado (dentro de los 10 minutos) por el agregado de 100 µl de ácido sulfúrico 2 M a cada pocillo en el mismo orden de la adición de sustrato. El color cambia de azul a amarillo. Medir la absorbancia a 450 nm

inmediatamente después del agregado de ácido sulfúrico o mantener las placas en un lugar oscuro hasta su lectura.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el número mínimo de U.I. por dosis humana, el nombre y la cantidad del adyuvante. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: “*Agitar antes de su uso*”; “*No congelar*”.

VACUNA CONTRA LA DIFTERIA Y EL TETANOS, ADSORBIDA

Vaccinum diphtheriae et tetani adsorbatum

Definición - La Vacuna contra la Difteria y el Tétanos, Adsorbida es en una preparación de toxoide diftérico y toxoide tetánico formolizados adsorbidos sobre un soporte mineral. Los toxoides formolizados se debe preparar a partir de las toxinas, producidas por cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* y *Clostridium tetani*, respectivamente. La Vacuna contra la Difteria y el Tétanos, Adsorbida debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

El método de producción debe estar validado para demostrar que el análisis del producto cumple con los siguientes requisitos.

Toxicidad específica - Seleccionar un grupo de cinco cobayos sanos, de 250 a 350 g de peso, sin tratamientos previos con alguna sustancia que pueda interferir con el ensayo; Inyectar a cada animal por vía subcutánea cinco veces la dosis humana indicada en el rótulo. Si dentro de los 42 días siguientes a la inyección, ninguno de los animales muere o muestra síntomas de toxemia diftérica o tetánica, la vacuna cumple con el ensayo. Si muere más de 1 animal por causas inespecíficas, repetir el ensayo una vez. Si muere más de 1 animal esta segunda vez, la vacuna no cumple con el ensayo.

Toxoide diftérico y tetánico purificado a granel

Proceder según se indica en *Toxoide difterico purificado a granel* en *Vacuna contra la Difteria, Adsorbida* y *Toxoide tetánico purificado a granel* en *Vacuna contra la Difteria, Adsorbida* y *Vacuna contra el Tétanos, Adsorbida*, respectivamente.

Vacuna final a granel

La preparación final de vacuna a granel se debe obtener mediante adsorción de una cantidad adecuada de las preparaciones de toxoides diftérico y tetánico purificados a granel en un soporte mineral como fosfato de aluminio hidratado o hidróxido de aluminio; la mezcla resultante es aproximadamente isotónica con la sangre. Se pueden agregar conservantes antimicrobianos apropiados. Algunos conservantes, como los fenólicos no se deben emplear porque afectan la actividad antigénica. Para la preparación del lote

final sólo pueden utilizarse graneles de vacuna que cumplen los siguientes requisitos:

Conservantes <80>

Debe contener no menos de 85 por ciento y no más de 115 por ciento de la cantidad declarada.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Lote final

La vacuna final a granel debe ser distribuida asépticamente en envases estériles, para inyectables, con cierre inviolable. Los envases deben ser cerrados de tal manera de evitar la contaminación.

Solo los lotes finales que cumplan los requisitos indicados en *Ensayos* y *Valoración*, pueden ser liberados para su uso. Los ensayos de conservantes antimicrobianos (ver 80. *Conservantes*), así como la determinación de la potencia, pueden omitirse en los lotes finales de vacuna, siempre que se hayan llevado a cabo en la correspondiente preparación final de vacuna a granel con resultados satisfactorios. El ensayo de *Formaldehído libre* puede omitirse en el lote final cuando los ensayos realizados en el toxoide purificado a granel o en la vacuna final a granel demuestren que el contenido no será mayor de 0,2 g por litro en el lote final.

ENSAYOS

Identificación

La identificación de los toxoides diftérico y tetánico requiere la desadsorción previa del soporte mineral utilizado como adyuvante. El siguiente método de desadsorción, aplicable a ciertas vacunas, es dado como ejemplo:

A - El toxoide diftérico es identificado por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Disolver, en la vacuna sometida a examen una cantidad suficiente de citrato de sodio para obtener una solución de aproximadamente 100 g por litro. Mantener a 37 °C durante 16 horas y centrifugar hasta obtener un sobrenadante líquido claro que debe reaccionar con una antitoxina diftérico, produciendo un precipitado. Reservar parte del sobrenadante para el ensayo B.

B - El toxoide tetánico es identificado por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). El sobrenadante claro obtenido en el ensayo A debe reaccionar con una antitoxina tetánica apropiada, produciendo un precipitado.

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio en vacunas adsorbidas* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Debe contener no menos de la mínima cantidad que se haya mostrado ser efectiva y no más de 115 % de la cantidad indicada en el rótulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACION

Componente diftérico - Proceder según se indica en *Valoración en Vacuna contra la Difteria, Adsorbida*. El límite de confianza inferior ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 30 U.I. por dosis humana.

Componente tetánico - Proceder según se indica en *Valoración en Vacuna contra el Tétanos, Adsorbida*. Si el ensayo se realiza en cobayos, el límite de confianza inferior ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 40 U.I. por dosis humana única.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el número mínimo de U.I. de cada componente por dosis humana, el nombre y la cantidad de adyuvante. Indicar en el rótulo que la vacuna es destinada a la inmunización de niños y no es necesariamente adecuada para dosis de refuerzo ni para la administración en adultos. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: “*Agitar antes de su uso*”; “*No congelar*”.

VACUNA CONTRA LA DIFTERIA Y EL TETANOS, ADSORBIDA, PARA ADULTOS Y ADOLESCENTES

Vaccinum diphtheriae et tetani adulti et adolescentis adsorbatum

Definición - La Vacuna contra Difteria y Tétanos, Adsorbida es en una preparación de toxoide diftérico y toxoide tetánico formolizados adsorbidos sobre un soporte mineral. Los toxoides formolizados se debe preparar a partir de las toxinas, producidas por cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* y *Clostridium tetani*, respectivamente. La Vacuna contra Difteria y Tétanos, Adsorbida debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Consideraciones generales

El método de producción debe estar validado para demostrar que el análisis del producto cumple con los siguientes requisitos.

Toxicidad específica

Proceder según se indica en *Toxicidad específica* en *Vacuna contra la Difteria y el Tétanos, Adsorbida*.

Toxoide diftérico y tetánico purificado a granel

Proceder según se indica en *Toxoide diftérico y tetánico purificado a granel* en *Vacuna contra la Difteria y el Tetanos, Adsorbida*.

Vacuna final a granel

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Vacuna final a granel* en *Vacuna contra la Difteria y el Tétanos, Adsorbida*.

Lote final

La vacuna final a granel se debe distribuir asépticamente en envases estériles, para inyectables, con cierre inviolable. Los envases deben ser cerrados de tal manera de evitar la contaminación.

Solo los lotes finales que cumplan los requisitos indicados en *Ensayos y Valoración* pueden ser liberados para su uso. Los ensayos de conservante antimicrobiano, así como la determinación de la potencia, pueden omitirse en los lotes finales de vacuna, siempre que se hayan llevado a cabo en la correspondiente preparación final de vacuna a granel con resultados satisfactorios. El ensayo de *Formaldehído libre* puede omitirse en el lote final cuando los ensayos realizados en el toxoide purificado a granel o en la vacuna final a granel demues-

tren que el contenido no será mayor de 0,2 g por litro en el lote final.

ENSAYOS

Identificación

La identificación de los toxoides diftérico y tetánico requiere la desadsorción previa del soporte mineral utilizado como adyuvante. Los siguientes métodos de desadsorción, aplicable a ciertas vacunas, se dan como ejemplo.

A - El toxoide diftérico es identificado por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Disolver, en la vacuna sometida a examen cantidad suficiente de citrato de sodio para obtener una solución de aproximadamente 100 mg por ml. Mantener a 37 ° C durante 16 horas y centrifugar hasta obtener un sobrenadante líquido claro que debe reaccionar con una antitoxina diftérica, produciendo un precipitado.

En caso de no obtenerse el precipitado se utiliza el siguiente método: centrifugar 15 ml de la vacuna en ensayo; resuspender el residuo obtenido en 5 ml de una mezcla recientemente preparada de 1 volumen de una solución de 56 mg por ml de edetato de sodio y 49 volúmenes de una solución de 90 mg por ml de fosfato disódico. Mantener a 37 ° C durante no menos de 6 horas y centrifugar hasta obtener un sobrenadante líquido claro que debe reaccionar con una antitoxina diftérica, produciendo un precipitado. Reservar parte de los sobrenadantes para el ensayo B.

B - El toxoide tetánico es identificado por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*) en el sobrenadante claro obtenido en el ensayo A el que debe reaccionar con una antitoxina tetánica adecuada, produciendo un precipitado.

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio en vacunas adsorbidas* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Debe contener no menos de la mínima cantidad que se haya mostrado ser efectiva y no más de 115 % de la cantidad declarada en el rótulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACION

Componente diftérico - Proceder según se indica en *Valoración* en *Vacuna contra la Difteria*,

Adsorbida. El límite de confianza inferior ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 2 U.I. por dosis humana.

Componente tetánico - Proceder según se indica en *Valoración en Vacuna contra el Tétanos, Adsorbida.* El límite de confianza inferior ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 20 U.I. por dosis humana única.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el número mínimo de U.I. de cada componente por dosis humana, el nombre y la cantidad del adyuvante. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: “*Agitar antes de su uso*”, “*No congelar*”.

VACUNA CONTRA DIFTERIA, TÉTANOS Y PERTUSSIS, ADSORBIDA

Vaccinum diphtheriae, tetani et pertussis adsorbatum

Definición - La Vacuna Adsorbida contra Difteria, Tétanos y Pertussis es una preparación de toxoide diftérico y toxoide tetánico formolizados adsorbidos sobre un soporte mineral y una suspensión de *Bordetella pertussis* inactivada. Los toxoides formolizados se deben preparar a partir de las toxinas, producidas por cultivo de *Corynebacterium diphtheriae* y *Clostridium tetani*, respectivamente. La Vacuna Adsorbida contra Difteria, Tétanos y Pertussis debe cumplir con los siguientes requisitos.

PRODUCCION

Condiciones generales

El método de producción debe estar validado para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple con los siguientes requisitos.

Toxicidad específica - Proceder según se indica en *Toxicidad específica* en *Vacuna contra la Difteria y el Tétanos*.

Toxoides diftérico y tetánico purificado a granel y suspensión de B. Pertussis inactivada a granel

Proceder según se indica en *Toxoide diftérico y tetánico purificado a granel* en *Vacuna contra la Difteria y el Tétanos, Adsorbida* y en *Suspensión de B. Pertussis inactivada* en *Vacuna contra la Pertussis, Adsorbida*.

Vacuna final a granel

La preparación final de vacuna a granel se debe obtener mediante adsorción de una cantidad apropiada de las preparaciones de toxoides diftérico y tetánico purificados a granel en un soporte mineral como fosfato de aluminio hidratado o hidróxido de aluminio, mezclada con una cantidad apropiada de suspensión de *B. Pertussis* inactivada; la mezcla resultante debe ser aproximadamente isotónica con la sangre. La concentración de *B. Pertussis* en la vacuna final a granel no debe ser mayor de la opacidad correspondiente a 20 U.I por dosis humana. Si se utilizan dos o más cepas de *B. Pertussis*, la composición de los lotes consecutivos de la vacuna final a granel deberá ser homogéneo respecto a la proporción de cada cepa cuando se mide en unidades de opacidad. Algunos conservantes, como los fenólicos no deben ser empleados porque afectan la actividad antigénica. Para la preparación del lote final sólo pueden utilizarse graneles de vacuna que cumplen los siguientes requisitos.

Conservantes <80>

Debe contener no menos de 85 % y no más de 115 % de la cantidad declarada.

Ensayo de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos, sembrando 10 ml en cada medio.

Lote final

La vacuna final a granel se debe distribuir asépticamente en envases estériles, para inyectables, con cierre inviolable. Los envases deben ser cerrados de modo tal de evitar la contaminación.

Solamente los lotes finales que cumplan los requisitos indicados en *Ensayos* y *Valoración*, pueden ser liberados para su uso. Los ensayos de *Toxicidad específica* para el componente pertussis, de conservantes antimicrobianos (ver 80. *Conservantes*), así como la determinación de la potencia, pueden omitirse en los lotes finales de vacuna, siempre que se hayan llevado a cabo en la correspondiente preparación final de vacuna a granel con resultados satisfactorios.

El ensayo de *Formaldehído libre* puede omitirse en el lote final cuando los ensayos realizados en el toxoide purificado a granel o en la vacuna final a granel demuestran que el contenido no será mayor de 0,2 g por litro en el lote final.

ENSAYOS

Identificación

La identificación de los toxoides diftérico y tetánico y del componente pertussis requiere la desadsorción previa del soporte mineral utilizado como adyuvante. El siguiente método de desadsorción, aplicable a ciertas vacunas, es dado como ejemplo.

A - El toxoide diftérico es identificado por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). Disolver en la vacuna en ensayo cantidad suficiente de citrato de sodio para obtener una solución de aproximadamente 100 g por litro. Mantener a 37 °C durante 16 horas y centrifugar hasta obtener un sobrenadante líquido claro que debe reaccionar con una antitoxina diftérica produciendo un precipitado. Reservar parte del sobrenadante para el ensayo B y el precipitado para el ensayo C.

B - El toxoide tetánico es identificado por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*). El sobrenadante claro obtenido en el ensayo A debe reaccionar con una antitoxina tetánica adecuada produciendo un precipitado.

C - El componente pertussis es identificado sobre el precipitado resuspendido de bacterias obtenidos en el ensayo A por el método de aglutinación

con el antisuero específico de *B. pertussis* o por la valoración del componente pertussis.

Toxicidad específica

Componente pertussis - Utilizar no menos de cinco ratones de 14 a 16 g para el grupo de la vacuna en ensayo y otros tantos para el grupo control. Utilizar ratones del mismo sexo o distribuir machos y hembras de manera homogénea entre ambos grupos. Los animales deben tener libre acceso al agua y alimento hasta 2 horas antes de la inyección y durante el ensayo. Inyectar a cada animal del grupo de vacuna, por vía intraperitoneal, 0,5 ml conteniendo una cantidad de vacuna equivalente a no menos de media dosis humana. Inyectar 0,5 ml de disolución de 9 mg de cloruro de sodio estéril por ml, preferiblemente conteniendo la misma cantidad de conservante antimicrobiano presente en la vacuna en ensayo a los ratones del grupo control. Pesar a ambos grupos de ratones inmediatamente antes de la inyección dentro de las 72 horas y a los 7 días después de la misma. La vacuna cumple con el ensayo si al cabo de 72 horas la masa total del grupo de los ratones vacunados no es menor que antes de la inyección; transcurridos los 7 días el incremento promedio de masa por ratón vacunado no es menor de 60 % del de los ratones control; y no mueren más de 5 % de los ratones vacunados durante el ensayo. El ensayo puede ser repetido y los resultados de los ensayos pueden ser combinados.

Aluminio

Proceder según se indica en *Determinación de aluminio en vacunas adsorbidas* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Formaldehído libre

Proceder según se indica en *Formaldehído libre* en 745. *Vacunas de uso humano*.

Conservantes <80>

Debe contener no menos de la mínima cantidad que se haya mostrado ser efectiva y no más de 115 % de la cantidad indicada en el rótulo.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACION

Componente diftérico - Proceder según se indica en *Valoración en Vacuna contra la Difteria, adsorbida*. El límite de confianza inferior ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 30 U.I. por dosis humana.

Componente tetánico - Proceder según se indica en *Valoración en Vacuna contra el Tétanos, Adsorbida*. Si el ensayo se realiza en cobayos, el límite de confianza inferior ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 40 U.I. por dosis huma-

na única; si el ensayo se realiza en ratones, el límite de confianza inferior ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 60 U.I. por dosis humana.

Componente pertussis - Proceder según se indica en *Valoración en Vacuna contra la Pertussis, adsorbida*. La potencia estimada no debe ser menor de 4 U.I. por dosis humana individual y el límite de confianza inferior ($P = 0,95$) de la potencia estimada no debe ser menor de 2 U.I. por dosis humana individual.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el número mínimo de U.I. de cada componente por dosis humana, el nombre y la cantidad del adyuvante. Indicar en el rótulo que la vacuna es destinada a la inmunización de niños y no es necesariamente adecuada para dosis de refuerzo ni para la administración en adultos. En el rótulo deben figurar las siguientes leyendas: “*Agitar antes de su uso*”; “*No congelar*”.

VACUNA CONTRA EL SARAMPION, LA PAROTIDITIS Y LA RUBEOLA, VIVA

Vaccinum morbillorum, parotitidis et rubellae vivum

Definición - La Vacuna contra el Sarampión, la Parotiditis y la Rubéola viva es en una preparación liofilizada obtenida a partir de cepas atenuadas de virus del sarampión, la parotiditis y la rubéola. La vacuna es reconstituida inmediatamente antes de su utilización, según las indicaciones del prospecto, tiene la apariencia de un líquido claro, que puede ser coloreado por la presencia de un indicador de pH. La Vacuna contra el Sarampión, la Parotiditis y la Rubéola viva debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Preparar los componentes según se indica en *Producción en Vacuna contra el sarampión, viva, Vacuna contra la parotiditis, viva y Vacuna contra la rubéola, viva.*

El método de producción se debe validar para demostrar que el producto, al ser analizado, cumple con 360. *Ensayo de toxicidad anormal y 745. Vacunas de uso humano.*

Vacuna final a granel

Las cosechas de virus de cada componente se deben mezclar y clarificar para remover las células. Se puede agregar un estabilizante apropiado y diluir las recolecciones mezcladas de un modo apropiado. Las cantidades apropiadas de las cosechas, de cada componente, se deben mezclar para la obtención de la vacuna final.

Para la preparación del lote final sólo pueden utilizarse graneles de vacuna que cumplan con los siguientes requisitos.

Contaminación bacteriana y fúngica

Debe cumplir con los requisitos de 370. *Ensayos de esterilidad*, sembrando 10 ml en cada medio.

Lote final

Para cada componente, se debe establecer una concentración mínima de virus para la liberación del producto para asegurar que basados en datos de estabilidad, la concentración mínima indicada en el rótulo esté presente al final del período de validez.

Sólo se puede liberar para su uso un lote final que cumpla con los requisitos de concentración mínima de virus para cada componente, la *Estabilidad térmica* y con cada uno de los requisitos indicados *Ensayos*. Si en la vacuna final a granel se

ha realizado el ensayo para seroalbúmina bovina y, cuando así corresponda, el ensayo de ovoalbúmina con resultados satisfactorios, se puede omitir su determinación en el lote final.

Estabilidad térmica

Mantener las muestras de la vacuna liofilizada no resuspendida a 37 °C durante 7 días. Determinar la concentración del virus según se indica en *Valoración* en paralelo para la vacuna sometida exposición al calor y para la vacuna sin exposición al calor incubada a 5 ± 3 °C. Para cada componente la concentración de virus de la vacuna sometida al calor no debe ser mayor de $1,0 \log_{10}$ inferior al título de la vacuna sin exposición al calor. En ningún caso, debe contener menos de 5×10^3 CCID₅₀ por dosis.

ENSAYOS

Identificación

Reconstituir la Vacuna contra el Sarampión, la Parotiditis y la Rubéola viva según se indica en el rótulo, mezclar con anticuerpos específicos del virus del sarampión, del virus de la parotiditis y del virus de la rubéola: debe perder la capacidad de infectar cultivos celulares susceptibles a estos virus. Reconstituir la Vacuna contra el Sarampión, la Parotiditis y la Rubéola viva según se indica en el rótulo y mezclar con cantidades suficientes de anticuerpos específicos como para neutralizar dos de los tres componentes: el tercer componente debe tener capacidad de infectar cultivos celulares susceptibles.

Contaminación bacteriana y fúngica

Reconstituir la vacuna según se indica en el rótulo. Debe cumplir con 370. *Ensayos de esterilidad.*

Albúmina sérica bovina

No más de 50 ng por dosis humana unitaria, determinada mediante un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*).

Ovoalbúmina

Si el componente parotidítico se obtiene en embriones de pollo, la vacuna no debe contener más de 1 µg de ovoalbúmina por dosis humana unitaria, determinada por un método inmunoquímico apropiado (ver 635. *Métodos inmunoquímicos*).

Determinación de agua <120>

Titulación volumétrica directa. No más de 3,0 %.

VALORACION

A - Mezclar la vacuna con una cantidad suficiente de anticuerpos específicos para el virus de la parotiditis. Titular para virus infectivo del sarampión, al menos por triplicado, utilizando como

mínimo cinco cultivos celulares para cada dilución (factor de dilución de $0,5 \log_{10}$) o por otro método de igual precisión. Utilizar una preparación de referencia de virus adecuada para validar cada titulación.

La concentración estimada de virus del sarampión no debe ser menor a la indicada en el rotulo; la concentración mínima de virus del sarampión, indicada en este no debe ser menor de 1×10^3 CCID₅₀ por dosis humana. El ensayo sólo es válido si el intervalo de confianza ($P = 0,95$) del logaritmo de la concentración vírica es menor de $\pm 0,3$.

B - Mezclar la vacuna con una cantidad suficiente de anticuerpos específicos para el virus del sarampión. Titular para virus infectivo de la parotiditis, al menos por triplicado, utilizando como mínimo cinco cultivos celulares para cada dilución (factor de dilución de $0,5 \log_{10}$) o por otro método de igual precisión. Utilizar una preparación de referencia de virus adecuada para validar cada titulación.

La concentración estimada de virus de la parotiditis no debe ser menor a la indicada en el rotulo, la concentración mínima de virus de la parotiditis, indicada en este, no debe ser menor de 5×10^3 CCID₅₀ por dosis humana. El ensayo sólo es válido si el intervalo de confianza ($P = 0,95$) del logaritmo de la concentración vírica es menor de $\pm 0,3$.

C - Mezclar la vacuna con una cantidad suficiente de anticuerpos específicos para el virus de la parotiditis. Titular para el virus infectivo de la rubéola, al menos por triplicado, utilizando como mínimo cinco cultivos celulares para cada dilución (factor de dilución $0,5 \log_{10}$) o por otro método de igual precisión. Utilizar una preparación de referencia de virus adecuada para validar cada valoración.

La concentración estimada de virus de la rubéola no debe ser menor a la indicada en el rótulo; la concentración mínima de virus de la rubéola, indicada en este, no debe ser menor de 1×10^3 CCID₅₀ por dosis humana. El ensayo sólo es válido si el intervalo de confianza ($P = 0,95$) del logaritmo de la concentración vírica es menor a $\pm 0,3$.

ROTULADO

Indicar en el rótulo la cepa de virus utilizada para la preparación de la vacuna, el tipo y origen de las células empleadas en la preparación de la vacuna. Indicar en el rótulo el título mínimo del virus expresado en CCID₅₀, que se debe evitar el contacto con desinfectantes y el período de tiempo

en el que la vacuna se puede utilizar una vez reconstituida.

MEDICAMENTOS OFICINALES

APARTADO DE MEDICAMENTOS OFICINALES

ÍNDICE

Textos de Información General

<1013> - Buenas Prácticas de Dispensación en la Farmacia Oficial Comunitaria y Hospitalaria.

<1027> - Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.

Monografías

Agua de Cal

Agua Oxigenada 10 Volúmenes

Alcohol Alcanforado

Cinc, Óxido de, Pomada Compuesta

Citrato de Magnesio, Limonada de

Cuprocínica alcanforada, Solución

Estearato de Amonio, Pomada

Glicerolado de Almidón

Iodo Débil, Solución de

Iodo Fuerte, Solución de

Iodoiodurada, Solución

Óleo Calcáreo, Linimento

Vaselina Boricada

Vaselina Fenicada

Vaselina Líquida

Vaselina Sólida

1013. BUENAS PRÁCTICAS DE DISPENSACIÓN EN LA FARMACIA OFICINAL COMUNITARIA Y HOSPITALARIA

Consideraciones Generales

Los medicamentos deben ser dispensados solamente por establecimientos habilitados por la autoridad sanitaria competente y cuyas actividades serán inspeccionadas regularmente por la autoridad jurisdiccional

En el ámbito comunitario y hospitalario, los servicios Farmacéuticos comprenden toda gestión que garantice la adquisición, preparación, conservación y dispensación de los medicamentos, ayudando a la sociedad a emplearlos adecuadamente para el uso previsto y en cumplimiento de la legislación vigente.

Este capítulo introduce términos y definiciones que son normas indispensables en el cumplimiento de las condiciones exigidas por las Buenas Prácticas de Dispensación, lo cual constituye una herramienta que permite establecer criterios que abarcan diversos aspectos para la adquisición, preparación, conservación y dispensación de los medicamentos.

Las Buenas Prácticas de Dispensación no son un elemento estático, todo lo contrario, son metodologías de trabajo susceptibles de una actualización continua.

Glosario

Las definiciones dadas a continuación se aplican a los términos empleados en esta norma. Es posible que tengan significados diferentes en otros contextos.

Servicios Farmacéuticos: resultado tangible o intangible de un proceso en el cual se participa en la investigación, preparación, distribución, dispensación, control y utilización de los medicamentos y otros productos para la salud, ofreciendo información y asesoramiento a quienes los prescriben, indican o usan.

Habilitación de la Farmacia: documento legal emitido por la autoridad sanitaria, que establece la autorización del establecimiento y su director técnico.

Dispensación: es el servicio Farmacéutico que consiste en la entrega del medicamento y la información sobre su buen uso y que incluye la interpretación de una receta en los casos que correspondiere.

Persona autorizada: es del Director Técnico Farmacéutico o el Farmacéutico Auxiliar que él

designa a los efectos de realizar y/o autorizar la dispensación.

Procedimiento operativo para la dispensación: es el procedimiento escrito que contiene las instrucciones para realizar aquellas operaciones que no necesariamente son específicas de la dispensación.

Farmacovigilancia: es la ciencia y actividades relacionadas con la prevención, conocimiento, detección y evaluación de reacciones adversas y otros posibles problemas relacionados con medicamentos.

Problema relacionado con medicamentos: es cualquier evento indeseable que presenta el paciente en el cual está involucrado el tratamiento farmacológico o se sospecha que lo está y que interfiere de manera real o puede interferir en la evolución deseada del paciente.

Intervención farmacéutica: es la estrategia que incluye procedimientos educativos y/o informativos abordados por el Farmacéutico para intentar resolver un problema relacionado con medicamentos, tendiente a mejorar el resultado clínico del tratamiento farmacológico.

Promoción de la Salud: es el proceso que capacita a las personas para controlar y mejorar su salud.

Educación Sanitaria: es un instrumento que posibilita la promoción de la salud. Es el aprendizaje que supone no sólo la transmisión de información, sino también el fomento de la motivación de las habilidades personales y la autoestima, necesarias para adoptar medidas destinadas a mejorar la salud.

Información: es el asesoramiento brindado para prevenir incompatibilidades o interacciones frente a otros medicamentos y/o alimentos, para lograr el cumplimiento de los objetivos terapéuticos buscados, así como también incluye la consulta o derivación del paciente al profesional que corresponda según su incumbencia.

Servicios orientados al medicamento, materias primas, y productos sanitarios, previos a la dispensación en donde el Farmacéutico garantiza la calidad de los productos que dispensa dando cumplimiento a las siguientes actividades:

Evaluación de la procedencia y adquisición: el Farmacéutico es el responsable de garantizar la calidad y legitimidad de los productos que dispense

siendo éstos adquiridos a través de proveedores debidamente habilitados por la autoridad sanitaria.

El Farmacéutico debe además cooperar en la detección y denuncia de medicamentos ilegítimos y de medicamentos con problemas de calidad o efectividad.

Custodia, almacenamiento y conservación: el Farmacéutico asegurará que las condiciones de almacenamiento y conservación sean las adecuadas en cada caso e instrumentará los mecanismos para detectar las fechas de vencimiento previas a la dispensación. Asimismo el Farmacéutico tendrá bajo su custodia todos los productos acorde a las normativas vigentes.

Descarte, devolución, destrucción: el Farmacéutico evitará la adquisición y dispensación de medicamentos y productos para la salud que presenten modificaciones no indicadas expresamente en sus rótulos y/ o prospectos. Se considera que la detección de cambios en el aspecto físico de los medicamentos o sus envases podría ser evidencia de una posible inestabilidad o alteración en su composición, por lo que se debe observar:

- cambios en caracteres físicos como modificaciones de color u olor, coberturas deterioradas, cápsulas rotas, aparición de precipitados, separación de emulsiones, polvos que no se reconstituyen adecuadamente, entre otros;
- modificaciones en el envase primario como pérdida del contenido del envase, deterioro de su aspecto, adulteraciones de fecha de vencimiento, lote, partida o rótulos.
- modificaciones en el envase secundario, como toda evidencia que permita suponer una mala conservación, fallas de impresión, adulteraciones de fecha de vencimiento, lote o partida, ó rótulos.

Comprobadas estas irregularidades, el Farmacéutico deberá abstenerse de dispensar estos medicamentos y notificar a la autoridad sanitaria competente sobre las anomalías observadas o sospechadas.

Deberá cumplir con los retiros del mercado indicados por la autoridad sanitaria pertinentes e instrumentará los mecanismos necesarios para la devolución de los medicamentos, materias primas y productos sanitarios, así como la eliminación de los residuos peligrosos, acorde a la legislación vigente.

Preparación de medicamentos magistrales y oficinales: el Farmacéutico es responsable de la preparación de medicamentos magistrales y oficinales, dando cumplimiento a las Normas de Buenas Prácticas de Preparación.

1027. BUENAS PRÁCTICAS DE PREPARACIÓN DE MEDICAMENTOS MAGISTRALES

ALCANCE Y DEFINICIONES

Buenas Prácticas de Preparación de medicamentos magistrales: es el conjunto de normas y procedimientos que contribuyen a asegurar la calidad de los medicamentos magistrales.

Medicamento magistral: es todo medicamento prescripto en una receta magistral para un paciente individualizado, posteriormente preparado, envasado y rotulado por un Farmacéutico en el laboratorio de su Farmacia y dispensado en la misma.

Receta magistral: la receta magistral debe indicar claramente la composición cuali-cuantitativa de los principios activos, utilizando los nombres establecidos en la Farmacopea Argentina o la Denominación Común Internacional (DCI) de la OMS. Sólo se aceptan sinonimias contempladas en la Farmacopea Argentina. Debe respetar las dosis habituales y máximas, indicadas en la Farmacopea o, en su ausencia en bibliografía internacional de referencia.

Debe indicar la vía e indicaciones de administración, los datos completos del profesional prescriptor, los datos del paciente y la fecha de emisión.

CAPÍTULO 1°

PERSONAL

La preparación de medicamentos magistrales puede ser efectuada por el Farmacéutico Director Técnico o por los Farmacéuticos Auxiliares. La Farmacia debe estar debidamente habilitada a tal efecto por la Autoridad Sanitaria jurisdiccional competente.

El Director Técnico es el responsable de la calidad y seguridad de los preparados magistrales, siendo por ello responsable del origen, la calidad y la pureza de los principios activos, excipientes, envases y otros materiales que utilice, del diseño galénico, de la preparación de los productos y del aseguramiento de su calidad.

El Director Técnico debe organizar las tareas relacionadas con la preparación de medicamentos magistrales, debiendo precisar por escrito las funciones de los Farmacéuticos Auxiliares y del resto del personal, y supervisar su cumplimiento.

El Director Técnico debe asegurar la aptitud de todo el personal involucrado en la preparación de medicamentos magistrales y el cumplimiento por

parte de éste de las Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.

CAPÍTULO 2°

LOS PREPARADOS MAGISTRALES

Para la preparación de cada medicamento magistral es necesario contar con la receta correspondiente, la cual deberá estar completa en todas sus partes y contener toda la información necesaria para llevar a cabo la preparación y rotular adecuadamente la misma, correspondiendo al Director Técnico completar la fórmula con los excipientes adecuados, debiendo respetar las dosis habituales y máximas recomendadas para los principios activos.

La preparación del medicamento magistral debe registrarse en el libro recetario.

Por la propia naturaleza de estos medicamentos y el conocimiento específico que dispone el Farmacéutico que lo prepara, es de su competencia proveer al paciente la información necesaria para su correcta utilización y conservación.

CAPÍTULO 3°

LABORATORIOS

3-1 Consideraciones generales

La preparación y el control de los preparados magistrales deben efectuarse en laboratorios que forman parte de la estructura edilicia de la Farmacia y estar emplazados en salas totalmente independientes del lugar de atención al público, separados del depósito y aislados de otras dependencias de la Farmacia.

Todas las áreas de la Farmacia destinadas a las preparaciones magistrales deben contar con espacios adecuados para la disposición ordenada de los equipos y materiales, y deben poseer condiciones de temperatura y humedad apropiadas.

3-2 Instalaciones

Para la preparación de medicamentos magistrales la Farmacia debe disponer de un laboratorio general, destinado a la preparación de formas farmacéuticas no estériles, al fraccionamiento de materias primas y excipientes y al aseguramiento de la calidad, pudiendo contar con otros laboratorios especiales.

3-3 Características

El laboratorio debe contar con buena iluminación, adecuada renovación de aire y mallas metálicas en todas las aberturas de ventilación e instrumentos para medir la temperatura y humedad del ambiente de trabajo. Sus pisos, paredes y

techos deben ser lisos con bordes sanitarios y las mesas de trabajo deben ser lisas, impermeables y resistentes a agentes químicos.

Los laboratorios especiales deben cumplir con requisitos adicionales que los hagan aptos para la actividad a desarrollar.

3-4 Materiales y Equipos

Deben ser acordes con el tipo de medicamentos a preparar, suficientes en cantidad y calidad y apropiadamente acondicionados e instalados. En los equipos que requieren calibración, ésta debe realizarse con la periodicidad adecuada y su calibración debe verificarse y documentarse regularmente.

3-5 Higiene y Seguridad

La Farmacia debe contar con directrices escritas sobre higiene y seguridad, las cuales deben ser acordes con el tipo de medicamento a preparar y exhibirse en lugar visible del laboratorio. El Director Técnico es responsable de generar, documentar, hacer cumplir y llevar un registro del cumplimiento de dichas directrices.

3-6 Limpieza

La Farmacia debe contar con procedimientos de limpieza del área de preparación de medicamentos magistrales acordes con el tipo de preparaciones que se realicen. El Director Técnico es el responsable de generar y documentar dichos procedimientos y de asegurar y documentar debidamente su cumplimiento.

3-7 Residuos

La Farmacia deberá contar con mecanismos para el manejo interno y la disposición de residuos considerados peligrosos. El Director Técnico es responsable de generar e implementar los procedimientos apropiados y necesarios para tal fin y de asegurar y documentar debidamente su cumplimiento.

CAPÍTULO 4°

DOCUMENTACIÓN

4-1 General

La documentación constituye una parte fundamental del sistema de aseguramiento de la calidad. Son aceptables los registros computarizados y los producidos mediante microfilmación.

Toda la documentación referida a materias primas y excipientes debe utilizar los nombres oficiales de la FA o la Denominación Común Internacional (DCI) para sustancias no codificadas.

4-2 Manuales, procedimientos y registros

La Farmacia debe contar con un manual operativo general y manuales de uso, mantenimiento y calificación de sus equipos.

La Farmacia debe poseer procedimientos operativos estandarizados para el uso de cada uno de sus equipos, para la preparación de medicamentos magistrales de uso corriente y para las actividades de limpieza, disposición de residuos, higiene y seguridad.

La Farmacia debe contar con registros individuales de entrenamiento y calificación del personal.

En la Farmacia se deben almacenar los registros de mantenimiento y calificación de equipos, y los registros que permitan verificar el cumplimiento de las actividades de limpieza, disposición de residuos, higiene y seguridad.

En la Farmacia se debe llevar todo libro oficial que asegure y avale el debido cumplimiento de las regulaciones vigentes.

4-3 Materias primas, envases y materiales de acondicionamiento

Todos los materiales que ingresan a la Farmacia para ser empleados en la preparación, envasado y acondicionamiento de medicamentos deben contar con una ficha individual de registro que incluya la fecha de ingreso.

Toda materia prima y excipiente que ingresa a la Farmacia debe contar con su correspondiente certificado de análisis del proveedor firmado por su Director Técnico; caso contrario, el Director Técnico de la Farmacia deberá realizar los controles pertinentes.

La documentación correspondiente a todos los materiales utilizados en la preparación de los medicamentos magistrales debe ser debidamente archivada.

CAPÍTULO 5°

MATERIAS PRIMAS, ENVASES Y MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO

La calidad de las materias primas, envases y materiales de acondicionamiento inciden en la calidad del producto final, por lo que el Farmacéutico debe tener especial cuidado en todos los aspectos del manejo de los mismos.

5-1 Materias primas

Sólo pueden ser empleadas aquellas materias primas, principios activos y excipientes, codificadas en el Código ANMAT o descritas en textos de reconocida jerarquía.

Todas las materias primas que ingresan a la Farmacia deben ser puestas en cuarentena, debidamente rotuladas y en una ubicación especial, hasta tanto se haya verificado su identidad con la documentación que respalda su calidad. El Director Técnico es responsable de la realización de todo esfuerzo razonable en procura de la identificación

de toda materia prima que ingresa a la Farmacia. El período de cuarentena finaliza con la aceptación o rechazo de la materia prima.

Las materias primas rechazadas deben ser almacenadas separadamente, hasta su disposición como residuo o devolución al proveedor.

Toda materia prima que haya superado la fecha de reválida o reanálisis, (ver 1040. *Estudios de Estabilidad*) debe ser puesta en cuarentena hasta tanto se determine analíticamente su aptitud y una nueva fecha de reanálisis; en caso de no ser apta debe almacenarse separadamente para su disposición como residuo.

La utilización, en casos debidamente justificados, de una especialidad medicinal como materia prima, para la preparación de un medicamento magistral, quedará a criterio del Director Técnico.

5-2 Rotulado

Todo envase de materia prima o excipiente debe contener todos los datos que permitan su correcta identificación, debiendo consignarse de manera obligatoria su nombre, proveedor, número de lote o partida, fecha de reanálisis y número de registro.

5-3 Almacenamiento

Las materias primas deben ser almacenadas bajo condiciones apropiadas, que aseguren su estabilidad durante su período de vida útil. (ver *Consideraciones Generales*)

5-4 Envases

El medicamento magistral debe ser envasado en envase apto (ver *Consideraciones Generales*, 420. *Envases primarios de plástico* y 430. *Envases de vidrio*), de acuerdo a las propiedades físicas y químicas del preparado farmacéutico, de modo de evitar se alteren la calidad, la concentración o la pureza de la preparación. Se debe considerar la posible interacción de los productos activos con el envase.

CAPÍTULO 6°

PREPARACIÓN

6-1 Diseño de la fórmula

La correcta preparación de una fórmula magistral comienza con el diseño de la misma, tras la recepción de la receta magistral.

La fórmula debe evaluarse para determinar la factibilidad de su preparación y debe emplearse un diseño galénico que tenga en cuenta el comportamiento fisicoquímico de sus componentes, sus posibles incompatibilidades y las eventuales interacciones con el envase.

Para el ajuste de la fórmula cuantitativa se debe tener en cuenta la expresión correcta de la dosis

establecida en el presente Código o en la bibliografía internacional de referencia.

6-2 Preparación del medicamento magistral

Debe hacerse en una zona de trabajo limpia y libre de cualquier producto, material o documento ajeno a la preparación, debiendo estar asegurada previamente la provisión de todos los elementos y documentación necesarios como así la limpieza y el adecuado funcionamiento de los equipos a utilizar.

6-3 Vencimiento del medicamento magistral

Los preparados magistrales se realizan para una administración a plazo definido y corto, por lo que deben poseer fechas de vencimiento asignadas acordes al período de tratamiento.

6-4 Rotulado

Los medicamentos magistrales deben estar debidamente rotulados (ver *Consideraciones Generales*) para asegurar su correcta identificación, haciendo constar en el rótulo la composición cuali-cuantitativa de sus principios activos, la composición cualitativa de sus excipientes, su forma farmacéutica y su vía de administración, posología y condiciones de conservación, fecha de preparación y vencimiento, y su número de registro en el libro recetario, como así datos del paciente, del médico que lo prescribió, la Farmacia donde se preparó y su Director Técnico.

CAPÍTULO 7°

ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Se debe poner especial énfasis en asegurar la calidad de todos los pasos de la preparación, documentando apropiadamente cada uno.

Para las diferentes formas farmacéuticas, se exigen los siguientes ensayos:

7-1 Cápsulas y comprimidos

Aspecto

Control de peso

Prueba de desintegración

7-2 Polvos

Aspecto

Control de peso

Reconstitución: en el caso que sea aplicable.

7-3 Inyectables en ampollas y viales

Aspecto y examen de partículas por observación visual.

pH del inyectable.

Control de cierre de las ampollas.

Control de contenido.

Control de esterilidad, para inyectables obtenidos por llenado aséptico.

Validación de procesos de esterilización para inyectables obtenidos por esterilización final.

Control de endotoxinas bacterianas. Se debe realizar para aquellos preparados que por la naturaleza de sus componentes, por el volumen de administración, o por las particularidades del tratamiento, así lo justifiquen.

7-4 Cremas, geles, ungüentos y pastas

Aspecto

pH

Control de contenido.

7-5 Supositorios y óvulos

Aspecto y homogeneidad por examen visual

Control de peso

Tiempo de fusión o Prueba de Disgregación

7-6 Soluciones, suspensiones y emulsiones (orales y tópicos)

Aspecto

pH

Hermeticidad del cierre

Control de contenido

7-7 Observaciones

Los preparados no inyectables estériles deben cumplir con el ensayo de esterilidad o la validación del proceso de esterilización según corresponda. Los colirios deben cumplir las condiciones de inyectables con excepción de endotoxinas bacterianas.

CAPÍTULO 8º

FUENTES DE INFORMACIÓN

La Farmacia debe disponer de la última edición de la FA, recomendándose además otros códigos y textos actualizados de reconocida jerarquía, que provean una razonable cobertura de información específica.

Deberá contemplar disponer de los medios apropiados para acceder a bases de datos y centros de información sobre medicamentos que provean información farmacéutica y farmacoterapéutica actualizada y pertinente que contribuyan a garantizar la calidad y seguridad de los medicamentos.

CAPÍTULO 9º

Las Farmacias que preparan medicamentos magistrales, además de cumplir las Buenas Prácticas de Preparación de medicamentos magistrales establecidas en este Código, deberán cumplimentar los requerimientos legales establecidos por la Autoridad Sanitaria jurisdiccional competente para este tipo de actividades.

AGUA DE CAL

MEDICAMENTO OFICINAL

Sinonimia - Solución de hidróxido de calcio.

Definición - Agua de Cal es una solución acuosa de hidróxido de calcio. Debe contener no menos de 0,15 por ciento peso en volumen de Ca(OH)_2 , pudiendo variar su contenido con la temperatura y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Óxido de calcio5 g

Aguac.s.

Transferir la porción de óxido de calcio a un recipiente apropiado, agregar, poco a poco, 25 ml de agua, mezclar y agregar aproximadamente 200 ml de agua previamente calentada entre 60 y 70 °C. Agitar varias veces durante 15 minutos y filtrar. Lavar el residuo con agua previamente calentada entre 60 y 70 °C hasta que 2 ml del filtrado, acidulados con dos gotas de ácido nítrico, permanezcan límpidos por el agregado de 5 gotas de nitrato de plata (SR). Transferir el residuo a un recipiente apropiado con la ayuda de 1 litro de agua previamente hervida y enfriada. Tapar, agitar varias veces durante 30 minutos y dejar reposar. Antes de usar, decantar la solución clara o filtrar, teniendo la precaución de transferir nuevamente al recipiente los primeros 100 ml del filtrado.

Caracteres generales - Líquido diáfano, incoloro.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto y en presencia de un exceso de hidróxido de calcio.

[NOTA: cuando Agua de Cal es preparado en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Identificación

Una porción de Agua de Cal:

A - Debe virar al azul el papel tornasol y debe enrojecer a la fenolftaleína (SR).

B - Debe responder a los ensayos para *Calcio* <410>.

C - Debe formar en la superficie una débil película blanquecina por absorción de anhídrido carbónico del aire.

D - Debe producir turbidez por calentamiento que desaparece al enfriar.

Álcalis y carbonatos alcalinos

Saturar con anhídrido carbónico una porción de Agua de Cal y hervir inmediatamente. Debe desaparecer completamente la alcalinidad de la solución.

VALORACIÓN

Transferir exactamente 25 ml de Agua de Cal, agregar unas gotas de fenolftaleína (SR) y titular con ácido sulfúrico 0,1 N (SV). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de ácido sulfúrico 0,1 N equivale a 3,7 mg de Ca(OH)_2 .

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de Agua de Cal es seis meses a partir de su preparación.

AGUA OXIGENADA 10 VOLÚMENES

MEDICAMENTO OFICINAL

H₂O₂ PM: 34,0 7722-84-1

Sinonimia - Solución de Peróxido de Hidrógeno al 3 %.

Definición - Agua Oxigenada es una solución acuosa que contiene no menos de 2,55 por ciento y no más de 3,45 por ciento peso en volumen de H₂O₂, correspondiendo a no menos de 8,5 y no más de 11,5 veces su volumen de oxígeno activo. Debe contener un conservante apropiado y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Líquido límpido, incoloro, inodoro o con un débil olor similar al ozono. Se altera fácilmente en contacto con sustancias oxidables, algunos metales y calor.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto, en un sitio fresco.

[NOTA: cuando Agua Oxigenada es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Identificación

A - Debe desarrollar reacción ligeramente ácida frente al tornasol. Calentar una porción de Agua Oxigenada: debe descomponerse con efervescencia, desprendiendo oxígeno.

B - A 1 ml de Agua Oxigenada agregar 10 ml de agua con 1 gota de ácido sulfúrico diluido, agregar 2 ml de éter y una gota de dicromato de potasio (SR): se debe desarrollar color azul fugaz en la fase acuosa.

Agitar y dejar reposar: se debe desarrollar color azul intenso en la fase etérea.

Acidez

A 10 ml de Agua Oxigenada, agregar 20 ml de agua, 3 gotas de fenolftaleína (SR) y titular con hidróxido de sodio 0,1 N (SV): no debe consumir más de 1 ml de hidróxido de sodio.

Residuo no volátil

Evaporar hasta sequedad una porción de Agua Oxigenada exactamente medida, en un baño de agua y luego secar el residuo a 105 °C durante 1 hora. El peso del residuo no debe ser mayor de 0,15 %.

Límite de metales pesados <590>

Método I. A 4 ml de Agua Oxigenada, agregar 20 ml de agua, 2 ml de hidróxido de amonio 6 N y calentar suavemente a ebullición hasta que el volumen se reduzca a 5 ml. Diluir con agua a 25 ml: el límite es 5 ppm.

Límite de arsénico <540>

Método II. No más de 2 ppm.

Bario

A 10 ml de Agua Oxigenada, agregar 2 ó 3 gotas de ácido sulfúrico diluido. No debe producirse turbidez ni precipitado dentro de los 10 minutos.

Límite de ácido oxálico

A 5 ml de Agua Oxigenada, agregar 2 gotas de ácido acético, 0,5 ml de acetato de sodio (SR) y 1 ml de cloruro de calcio (SR). No debe producirse turbidez ni precipitado.

Límite de conservantes

Transferir 100 ml de Agua Oxigenada a una ampolla de decantación y realizar una extracción con una porción de 50 ml y dos de 25 ml de una mezcla de cloroformo y éter (3:2). Reunir los extractos, dejar evaporar y secar sobre sílica durante 2 horas: el peso del residuo no debe ser mayor de 0,05 %.

VALORACIÓN

Transferir 2 ml de Agua Oxigenada a un erlenmeyer, agregar 20 ml de agua, 10 ml de ácido sulfúrico diluido y titular con permanganato de potasio 0,1 N (SV). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de permanganato de potasio 0,1 N equivale a 1,70 mg de H₂O₂.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de Agua Oxigenada es seis meses a partir de su preparación.

ALCOHOL ALCANFORADO

MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Alcoholado de alcanfor.

Definición - Alcohol Alcanforado es una solución alcohólica de alcanfor. Debe contener no menos de 9,5 por ciento y no más de 10,5 por ciento, peso en volumen, de alcanfor y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Alcanfor10 g.

Alcohol 90 % c.s.p.100 ml...

Transferir la porción de alcanfor a un recipiente apropiado, disolver en alcohol 90 % y completar a volumen con el mismo solvente.

Caracteres generales - Líquido límpido, incoloro, con olor y sabor característico al alcanfor. Se volatiliza sin dejar residuo apreciable.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

[NOTA: cuando Alcohol Alcanforado es preparado en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Determinación de la densidad relativa <160>

Entre 0,841 y 0,844.

Determinación de alcohol <130>

Debe contener entre 80 y 85 % v/v de C_2H_5OH .

VALORACIÓN

Transferir exactamente 2,0 ml de Alcohol Alcanforado a un recipiente apropiado resistente a la presión, conteniendo 50 ml de solución de 2,4-dinitrofenilhidracina recientemente preparada disolviendo 2 g de 2,4-dinitrofenilhidracina en una mezcla de 10 ml de agua y 10 ml de ácido sulfúrico y diluir con 35 ml de agua. Filtrar. Cerrar el recipiente, sumergirlo en un baño de agua y mantenerlo aproximadamente a 75 °C durante 16 horas. Dejar enfriar a temperatura ambiente y transferir el contenido a un vaso de precipitados con ayuda de 100 ml de ácido sulfúrico 3 N. Dejar reposar durante al menos 12 horas, transferir el precipitado a un crisol filtrante previamente secado y pesado, lavar con ácido sulfúrico 3 N y luego con 75 ml de agua fría en porciones divididas. Eliminar el agua mediante vacío y secar a

80 °C durante 2 horas, dejar enfriar y pesar. El peso del precipitado obtenido, multiplicado por 0,458 corresponde al peso de alcanfor en la porción de Alcohol Alcanforado en ensayo.

CINC, ÓXIDO DE POMADA COMPUESTA MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Pasta Lassar.

Definición - La Pomada de Óxido de Cinc Compuesta debe contener no menos de 24,0 por ciento y no más de 26,0 por ciento de ZnO y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Óxido de cinc	250 g
Almidón	250 g
Vaselina sólida.....	500 g

Transferir las porciones de óxido de cinc y almidón a un recipiente apropiado, mezclar con una porción de vaselina y agregar el resto de vaselina hasta obtener una pomada perfectamente homogénea.

[NOTA: cuando se prescriba Pomada de Óxido de Cinc Compuesta Esterilizada, reemplazar el almidón por talco].

Caracteres generales - Masa untuosa de color blanquecino.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados y evitar la exposición prolongada a temperaturas mayores a 30 °C.

[NOTA: cuando Pomada de Óxido de Cinc Compuesta es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Identificación

El residuo obtenido en *Valoración* debe ser amarillo cuando está caliente y blanco cuando está frío.

Determinación del contenido neto del envase
<220>

Debe cumplir con los requisitos.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Asignación de límites.*

VALORACIÓN

Pesar exactamente alrededor de 600 mg de Pomada de Óxido de Cinc Compuesta, transferir a un crisol de porcelana y calentar suavemente hasta fundir. Continuar el calentamiento, aumentando la temperatu-

ra gradualmente hasta que la masa se carbonice completamente. Someter a ignición hasta que el residuo obtenido sea amarillo y enfriar. Disolver el residuo en 10 ml de ácido sulfúrico 2 N, calentar si fuera necesario para completar la disolución, transferir la solución a un vaso de precipitados y enjuagar el crisol con porciones pequeñas de agua hasta obtener 50 ml entre la solución y los enjuagues. Agregar 15 ml de solución reguladora de amoníaco-cloruro de amonio (SR) y 1 ml de negro de eriocromo (SR) y titular con edetato disódico 0,05 M (SV) hasta que la solución desarrolle color azul. Cada ml de edetato disódico 0,05 M equivale a 4,07 mg de ZnO.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de Pomada de Óxido de Cinc Compuesta es seis meses a partir de su preparación.

CITRATO DE MAGNESIO LIMONADA

MEDICAMENTO OFICINAL

Sinonimia - Limonada de Rogé. Limonada purgante.

Definición - Limonada de Citrato de Magnesio es una bebida extemporánea efervescente preparada a partir de ácido cítrico y carbonato de magnesio, y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Ácido cítrico	30 g
Carbonato de magnesio	18 g
Jarabe de limón	50 ml
Agua c.s.p.	250 ml

Transferir las porciones de ácido cítrico y carbonato de magnesio a un recipiente adecuado, agregar 170 ml de agua, fría o caliente, y una vez terminada la efervescencia, agregar el jarabe de limón, completar 250ml con agua y filtrar.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

[NOTA: Cuando Limonada de Citrato de Magnesio es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir únicamente con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de Limonada de Citrato de Magnesio es siete días a partir de su preparación.

CUPROCÍNCICA ALCANFORADA, SOLUCIÓN

MEDICAMENTO OFICINAL

Sinonimia - Agua de Dalibour.

Definición - Solución Cuprocíncica Alcanforada debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Cobre, sulfato de (pentahidrato).....	10 g
Cinc, sulfato de (monohidrato).....	40 g
Alcanfor	1,5 g
Agua c.s.p.	1.000 ml

Transferir las porciones de sulfato de cobre y sulfato de cinc a un recipiente apropiado, disolver con 900 ml de agua, agregar la porción de alcanfor, previamente disuelto en 5 ml de alcohol y agitar fuertemente varias veces durante 24 horas. Filtrar y lavar el filtro con agua hasta completar 1 litro.

[NOTA: cuando se prescriba Solución Cuprocíncica Alcanforada Diluida se debe preparar una solución diez veces más diluida que la *Solución Cuprocíncica Alcanforada*.]

Caracteres generales - Líquido límpido, de color azulado, con olor alcanforado. Presenta reacción ácida frente al tornasol.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

[NOTA: cuando la Solución Cuprocíncica Alcanforada es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales*.]

ENSAYOS

Identificación

Debe responder a los ensayos para *Sulfato, Cobre* y *Cinc* <410>.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de la Solución Cuprocíncica Alcanforada es seis meses a partir de su preparación.

ESTEARATO DE AMONIO, POMADA

MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Diadermina.

Definición - Pomada de Estearato de amonio es un glicerolado y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Ácido esteárico	17 g
Glicerina	70 g
Amoníaco	3,5 g
Agua c.s.p.	100 g

Transferir las porciones de ácido esteárico, glicerina y 9,5 ml de agua a un recipiente adecuado, calentar en un baño de agua hasta fundir completamente el ácido esteárico. Agitar, agregar cuantitativamente la porción de amoníaco, manteniendo el calentamiento y la agitación hasta obtener una masa neutra frente a fenoltaleína. Retirar el recipiente del baño de agua y homogeneizar hasta enfriamiento y obtención de una masa blanca. Agregar, si fuera necesario, cantidad suficiente de agua hasta obtener 100 g y mezclar.

Caracteres generales - Pomada de color blanco, inodora o casi inodora, de aspecto esponjoso. Soluble en agua y alcohol caliente.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos de cierre perfecto, en un sitio fresco.

[NOTA: cuando Pomada de Estearato de Amonio es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Identificación

A - Calentar suavemente una porción de Pomada de Estearato de Amonio: debe fundir dando un líquido transparente, incoloro o ligeramente amarillento. A mayor temperatura debe desprender vapores inflamables, de olor característico de ácido esteárico. Calcinar una porción de Pomada de Estearato de Amonio: el residuo obtenido no debe ser apreciable.

B - Calentar a ebullición 1 g de Pomada de Estearato de Amonio con 25 ml de agua y 5 ml de ácido clorhídrico, filtrar y lavar con agua caliente hasta que el ensayo para cloruros (ver 410. *Cloruro*) de negati-

vo. El ácido graso separado no debe fundir a una temperatura menor de 54 °C.

C - Concentrar el filtrado obtenido en el ensayo de *Identificación B* hasta consistencia de jarabe y calentar enérgicamente una porción pequeña con bisulfato de potasio: deben desprenderse vapores de acroleína que pueden reconocerse por su olor característico.

D - Calentar aproximadamente 0,5 g de Pomada de Estearato de Amonio con 5 ml de hidróxido de sodio (SR): deben desprenderse vapores amoniacales.

Alcalinidad

Disolver en caliente 2 g de Pomada de Estearato de Amonio en 60 ml de alcohol neutralizado, agregar 10 ml de agua caliente, enfriar y agregar 3 gotas de fenoltaleína (SR). Si se desarrolla color, titular con ácido clorhídrico 0,1 N: no debe consumirse más de 1 ml de ácido clorhídrico.

Sustancias insolubles en alcohol

Calentar a reflujo 1 g de Pomada de Estearato de Amonio con 30 ml de alcohol: debe disolverse completamente y la solución debe ser límpida o ligeramente opalescente.

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Asignación de límites.*

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de Pomada de Estearato de Amonio es seis meses a partir de su preparación.

GLICEROLADO DE ALMIDÓN

MEDICAMENTO OFICINAL

Definición - Glicerolado de Almidón es un semi-sólido y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Almidón10 g

Agua158 ml

Glicerina80 g

Transferir la porción de almidón a una cápsula apropiada, agregar la porción de agua y mezclar evitando la formación de grumos. Agregar la porción de glicerina, previamente calentada aproximadamente a 140 °C y agitar constantemente. Calentar hasta obtener una jalea homogénea y traslúcida que debe pesar aproximadamente 100 g.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

[NOTA: cuando Glicerolado de Almidón es preparado en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Control higiénico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en *Asignación de límites.*

iodo Débil, Solución de

MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Solución de iodo para uso quirúrgico. Tintura de iodo. Tintura de iodo débil.

Definición - Solución de Iodo Débil debe contener no menos de 1,8 por ciento y no más de 2,2 por ciento de iodo (I) y no menos de 2,2 por ciento y no más de 2,6 por ciento de ioduro de potasio (KI), en alcohol 50 , y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Iodo	20 g
Potasio, ioduro de	24 g
Alcohol 50° c.s.p.	1.000 ml

Transferir las porciones de iodo y ioduro de potasio a un matraz aforado de 1 litro, disolver y completar a volumen con alcohol 50°.

Caracteres generales - Líquido de color pardo rojizo, transparente.

CONSERVACIÓN

En envases de vidrio inactínicos, de cierre perfecto, en un sitio fresco.

[NOTA: cuando la Solución de Iodo Débil es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Identificación

A - Agregar 1 ó 2 gotas de Solución de Iodo Débil a una mezcla de 1 ml de almidón (SR) y 9 ml de agua: se debe desarrollar color azul intenso.

B - Evaporar una porción de Solución de Iodo Débil en un baño de vapor hasta sequedad: el residuo obtenido debe responder a los ensayos para *Potasio* y para *Ioduro* <410>.

Determinación de alcohol <130>

Debe contener entre 44 y 50 % v/v de C₂H₅OH.

VALORACIÓN

Iodo - Transferir 10 ml de Solución de Iodo Débil a un erlenmeyer, agregar 10 ml de agua y titular con tiosulfato de sodio 0,1 N (SV) agregando 3 ml de almidón (SR) antes del punto final. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones

necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de tiosulfato de sodio 0,1 N equivale a 12,69 mg de I.

Ioduro de potasio - Transferir 10 ml de Solución de Iodo Débil a un erlenmeyer, agregar 30 ml de agua y 50 ml de ácido clorhídrico, enfriar a temperatura ambiente y titular con iodato de potasio 0,05 M (SV) hasta que la solución color marrón oscuro que se produce cambie a marrón claro. Agregar 1 ml de amaranto (SR) y continuar lentamente la titulación hasta que la solución color rojo cambie a amarillo. La diferencia entre el volumen en ml de iodato de potasio 0,05 M consumido y la mitad del volumen en ml de tiosulfato de sodio 0,1 N empleado en la *Valoración de iodo*, multiplicada por 16,60 representa la cantidad de mg de KI en la porción de Solución de Iodo Débil en ensayo.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de Solución de Iodo Débil es seis meses a partir de su preparación.

IODO FUERTE, SOLUCIÓN DE

MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Tintura de Iodo Fuerte.

Definición - Solución de Iodo Fuerte debe contener no menos de 6,8 por ciento y no más de 7,5 por ciento de iodo (I) y no menos de 4,7 por ciento y no más de 5,5 por ciento de ioduro de potasio (KI). Solución de Iodo Fuerte debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Iodo	70 g
Potasio, Ioduro de	50 g
Agua	50 ml
Alcohol c.s.p.	1.000 ml

Transferir la porción de ioduro de potasio a un matraz aforado de 1 litro y disolver en agua. Agregar la porción de iodo, agitar hasta disolución y completar a volumen con alcohol.

Caracteres generales - Líquido de color pardo rojizo, transparente.

CONSERVACIÓN

En envases de vidrio inactínico de cierre perfecto, en un sitio fresco.

[NOTA: cuando la Solución de Iodo Fuerte es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Identificación

A - Agregar 1 gota de Solución de Iodo Fuerte a una mezcla de 1 ml de almidón (SR) y 9 ml de agua: se debe desarrollar color azul intenso.

B - Evaporar una porción de Solución de Iodo Fuerte en un baño de vapor hasta sequedad: el residuo obtenido debe responder a los ensayos para *Potasio* y para *Ioduro* <410>.

Determinación de alcohol <130>

Debe contener entre 82,5 y 88,5 % de C₂H₅OH.

VALORACIÓN

Iodo - Transferir 10 ml de Solución de Iodo Fuerte a un erlenmeyer, agregar 10 ml de agua y titular con tiosulfato de sodio 0,1 N (SV) agregando 3 ml de almidón (SR) antes del punto final. Realizar una

determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de tiosulfato de sodio 0,1 N equivale a 12,69 mg de I.

Ioduro de potasio - Transferir 10 ml de Solución de Iodo Fuerte a un erlenmeyer, agregar 30 ml de agua y 50 ml de ácido clorhídrico, enfriar a temperatura ambiente y titular con iodato de potasio 0,05 M (SV) hasta que la solución color marrón oscuro que se produce cambie a marrón claro. Agregar 1 ml de amaranto (SR) y continuar lentamente la titulación hasta que la solución color rojo cambie a amarillo. La diferencia entre el volumen en ml de iodato de potasio 0,05 M consumidos y la mitad del volumen en ml de tiosulfato de sodio 0,1 N empleado en la *Valoración de Iodo*, multiplicada por 16,60, representa la cantidad de mg de KI en la porción de Solución de Iodo Fuerte en ensayo.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de Solución de Iodo Fuerte es seis meses a partir de su preparación.

IODOIODURADA, SOLUCIÓN

MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Solución de Iodo Compuesta. Solución de Lugol.

Definición - Solución Iodoiodurada es una solución acuosa, debe contener no menos de 4,5 por ciento y no más de 5,5 por ciento de iodo (I) y no menos de 9,5 por ciento y no más de 10,5 por ciento de ioduro de potasio (KI), y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Iodo..... 5 g
Ioduro de potasio..... 10 g
Agua c.s.p. 100 ml

Transferir las porciones de iodo y de ioduro de potasio a un matraz aforado de 100 ml, disolver en 15 ml de agua y completar a volumen con el mismo solvente.

Caracteres generales - Líquido límpido, color pardo rojizo intenso y olor característico de iodo.

CONSERVACIÓN

En envases de vidrio inactínicos de cierre perfecto, a una temperatura no mayor de 35 °C.

[NOTA: cuando la Solución Iodoiodurada es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Identificación

A - Agregar 1 gota de Solución Iodoiodurada a una mezcla de 1 ml de almidón (SR) y 9 ml de agua: se debe desarrollar color azul intenso.

B - Evaporar unos pocos ml de Solución Iodoiodurada en un baño de vapor hasta sequedad y someter a ignición suavemente para eliminar el iodo libre: el residuo obtenido debe responder a los ensayos para *Potasio* y para *Ioduro* <410>.

VALORACIÓN

Iodo - Transferir 10 ml de Solución Iodoiodurada a un erlenmeyer, agregar 10 ml de agua y titular con tiosulfato de sodio 0,1 N (SV) agregando 3 ml de almidón (SR) antes del punto final. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver 780. *Volumetría*). Cada ml de tiosul-

fato de sodio 0,1 N equivale a 12,69 mg de I.

Ioduro de potasio - Transferir 10,0 ml de Solución Iodoiodurada a un erlenmeyer, agregar 30 ml de agua y 50 ml de ácido clorhídrico, enfriar a temperatura ambiente y titular con iodato de potasio 0,05 M (SV) hasta que la solución color marrón oscuro que se produce cambie a marrón claro. Agregar 1 ml de amaranto (SR) y continuar lentamente la titulación hasta que la solución color rojo cambie a amarillo. La diferencia entre el volumen en ml de iodato de potasio 0,05 M consumido y la mitad del volumen en ml de tiosulfato de sodio 0,1 N empleado en la *Valoración de iodo*, multiplicada por 16,60, representa la cantidad de mg de KI en la porción de Solución Iodoiodurada en ensayo.

ÓLEO CALCÁREO, LINIMENTO

MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Linimento de Calcio.

Definición - Linimento Óleo Calcáreo es una emulsión agua en aceite y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Aceite de oliva50 g

Agua de cal c.s.p.100 g

Transferir las porciones de *Aceite de Oliva* y *Agua de Cal* a un recipiente apropiado y agitar enérgicamente hasta obtener una emulsión.

[NOTA: cuando la acidez del aceite de oliva es menor de 1 % p/p puede agregarse cantidad suficiente de ácido oleico para facilitar la emulsión.]

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

[NOTA: cuando el Linimento Óleo Calcáreo es preparado en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90>

Debe cumplir con los requisitos según se indica en Asignación de límites.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que debe agitarse antes de usar.

VASELINA BORICADA

MEDICAMENTO OFICINAL

Sinonimia - Pomada Boricada.

Definición - Vaselina Boricada debe contener no menos de 9,0 por ciento y no más de 11,0 por ciento de ácido bórico (H_3BO_3) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Ácido Bórico..... 10 g

Vaselina Sólida 90 g

Triturar la porción de ácido bórico con una porción de vaselina sólida fundida hasta obtener una mezcla homogénea y agregar el resto de la vaselina sólida.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto

[NOTA: cuando Vaselina Boricada es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

VALORACIÓN

Pesar exactamente alrededor de 2,0 g de Vaselina Boricada, transferir a un erlenmeyer, agregar 30 ml de agua caliente y calentar la mezcla en un baño de agua durante 15 minutos, agitando frecuentemente. Filtrar en caliente a través de un filtro humedecido, transferir a un matraz aforado de 100 ml; lavar el erlenmeyer varias veces con agua caliente y filtrar los líquidos de lavado. Dejar enfriar y completar a volumen con agua. Transferir 50 ml de esta solución, correspondientes a 1,0 g de Vaselina Boricada, a un erlenmeyer. Agregar 20 ml de glicerina neutralizada frente a fenolftaleína (SR) y titular con hidróxido de sodio 0,1 N (SV), empleando fenolftaleína (SR) como indicador, hasta coloración rosada. Agregar 20 ml de glicerina neutralizada frente a fenolftaleína (SR) para decolorar el líquido y titular nuevamente con hidróxido de sodio 0,1 N (SV) hasta coloración rosada. Cada ml de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 6,2 mg de ácido bórico.

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de Vaselina Boricada es seis meses a partir de su preparación.

VASELINA FENICADA

MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Vaselina Fenolada. Pomada Fenicada.

Definición - Vaselina Fenicada debe contener no menos de 4,5 por ciento y no más de 5,5 por ciento de fenol (C_6H_6O) y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

FORMULACIÓN

Fenol5 g

Vaselina Sólida95 g

Disolver la porción de fenol en la porción de vaselina sólida previamente fundida y triturar la mezcla hasta obtener una pomada homogénea.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

[NOTA: cuando Vaselina Fenicada es preparada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

VALORACIÓN

Pesar exactamente alrededor de 1,0 g de Vaselina Fenicada, transferir a un balón de 150 ml, agregar 75 ml de agua, conectar a un refrigerante y destilar. Recolectar aproximadamente 150 ml del destilado en un matraz adecuado de 500 ml, con tapón esmerilado.

A 1 ml del destilado siguiente, agregar 3 ml de bromo (SR), si se produce turbidez, continuar la destilación hasta reacción negativa [NOTA: la reacción negativa indica que se ha destilado todo el fenol]. Agregar al destilado, 50 ml de bromo 0,1 N (SV) y 5 ml de ácido clorhídrico y tapar. Agitar varias veces durante 30 minutos, dejar reposar durante 15 minutos, agregar rápidamente 5 ml de solución de ioduro de potasio al 20 %, evitando que escapen vapores de bromo y tapar. Agitar y enjuagar el tapón y el cuello del matraz con agua recolectando el lavado dentro del matraz. Agregar 1 ml de cloroformo, agitar la mezcla y titular el iodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N (SV), agregando 3 ml de almidón (SR) cerca del punto final. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver *Titulación residual* en 780. *Volumetría*). Cada ml de bromo 0,1 N equivale a 1,57 mg de fenol (C_6H_6O).

ROTULADO

Indicar en el rótulo que la fecha de vencimiento de Vaselina Fenicada es seis meses a partir de su preparación.

VASELINA LÍQUIDA

MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Parafina Líquida. Petrolato Líquido.

Definición - Vaselina Líquida es una mezcla de hidrocarburos líquidos saturados, obtenida a partir del petróleo y purificada, y debe cumplir con las siguientes especificaciones

Caracteres generales - Líquido oleoso, transparente e incoloro, libre de fluorescencia; inodoro e insípido. Soluble en aceites volátiles, cloroformo, éter, éter de petróleo, sulfuro de carbono y la mayoría de los aceites fijos; poco soluble en alcohol; insoluble en aceite de ricino y agua.

CONSERVACIÓN

En envases de cierre perfecto.

[NOTA: cuando Vaselina Líquida es fraccionada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Determinación de la densidad relativa <160>

Entre 0,824 y 0,903.

Determinación de la viscosidad <190>

La viscosidad cinemática no debe ser menor de 34,5 centistokes a 40,0°C.

Neutralidad

Calentar a ebullición 10 ml de Vaselina Líquida con un volumen igual de alcohol: el alcohol debe permanecer neutro frente al papel de tornasol.

Sustancias fácilmente carbonizables

Transferir 5 ml de Vaselina Líquida a un tubo de ensayo previamente enjuagado con mezcla sulfocrómica para limpieza (ver 1090. *Limpieza de materiales de vidrio*), luego enjuagado con agua y secado. Agregar 5 ml de ácido sulfúrico (SR), tapar y calentar en un baño de agua durante 10 minutos, agitando vigorosamente tres veces en sentido vertical con una amplitud de 10 cm cada 30 segundos [NOTA: no mantener el tubo de ensayo fuera del baño durante más de 3 segundos en cada período de agitación]: la Vaselina Líquida se puede volver turbia, pero debe permanecer incolora o debe mostrar una coloración levemente rosada o amarilla; y el color obtenido con el ácido no debe ser más oscuro que el producido por una mezcla de 3 ml de cloruro férrico (SC), 1,5 ml de cloruro de cobalto (SC) y 0,5 ml de sulfato de cobre (SC), cubriendo esta mezcla con 5 ml de Vaselina Líquida.

Límite de compuestos polinucleares

Solución estándar - Disolver una cantidad exactamente pesada de naftaleno en isoocetano y diluir cuantitativamente y en etapas con el mismo solvente para obtener una solución con una concentración de 7,0 µg por ml.

Solución muestra- Transferir 25 ml de Vaselina Líquida y 25 ml de *n*-hexano a una ampolla de decantación de 125 ml y mezclar. [NOTA: emplear *n*-hexano previamente agitado dos veces con un quinto de su volumen de dimetilsulfóxido. No emplear otro lubricante que agua en el robinete, o emplear una ampolla de decantación equipada con un robinete plástico apropiado]. Agregar 5 ml de dimetilsulfóxido y agitar vigorosamente durante 1 minuto. Dejar reposar hasta que la fase inferior sea transparente, transferir la fase inferior a otra ampolla de decantación de 125 ml, agregar 2 ml de *n*-hexano, agitar vigorosamente y separar la fase inferior.

Procedimiento - Determinar la absorbancia de la *Solución muestra* en una celda de 1 cm entre 260 nm y 420 nm, empleando como blanco una mezcla de *n*-hexano y dimetilsulfóxido (25:5), previamente agitada vigorosamente durante 1 minuto. La absorbancia, en el intervalo especificado, no debe ser mayor que un tercio de la absorbancia de la *Solución estándar* a 275 nm, empleando isoocetano como blanco.

Parafina sólida

Transferir una porción de Vaselina Líquida, previamente secada en un vaso de precipitados a 105 °C durante 2 horas y enfriada a temperatura ambiente en un desecador sobre gel de sílice, a un recipiente incoloro y cilíndrico de aproximadamente 120 ml de capacidad. Tapar y sumergir en una mezcla de hielo y agua durante 4 horas: la muestra debe permanecer suficientemente transparente para que sea claramente visible una línea negra de 0,5 mm de ancho sobre un fondo blanco, sostenido verticalmente detrás del recipiente.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el nombre, la cantidad de cualquier estabilizante agregado y que la fecha de vencimiento de Vaselina Líquida es un año a partir de su fraccionamiento.

VASELINA SÓLIDA

MEDICAMENTO OFICIAL

Sinonimia - Parafina blanda. Petrolato. Vaselina blanca.

Definición - Vaselina Sólida es una mezcla purificada de hidrocarburos saturados de consistencia semisólida, obtenidos a partir del petróleo y puede contener un estabilizante apropiado. Vaselina Sólida debe cumplir con las siguientes especificaciones.

Caracteres generales - Masa amorfa, blanca o blanca ligeramente amarillenta o ligeramente verdosa. Homogénea, de aspecto graso y untuosa al tacto; a veces muy poco fluorescente; semitransparente en láminas delgadas, aún después de ser enfriada a 0 °C. Inodora, insípida e inalterable al aire. Soluble en cloroformo, éter, éter de petróleo, sulfuro de carbono y en la mayoría de los aceites fijos y volátiles; prácticamente insoluble en alcohol; insoluble en agua y glicerina.

CONSERVACIÓN

En envases bien cerrados.

[NOTA: cuando Vaselina Sólida es fraccionada en Oficinas de Farmacia, para su Aseguramiento de Calidad debe cumplir con los requisitos indicados en 1027. *Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.*]

ENSAYOS

Determinación de la densidad relativa <160>

Entre 0,815 y 0,880 determinada a 60 °C.

Determinación del punto de fusión <260>

Método III. Entre 38 y 60 °C.

Color

Transferir aproximadamente 10 g de Vaselina Sólida a un recipiente apropiado, calentar en un baño de vapor hasta fundir y transferir 5 ml del líquido obtenido a un tubo de ensayo: no debe ser más oscuro que una solución preparada mezclando 3,8 ml de cloruro férrico (SC) y 1,2 ml de cloruro cobalto-so (SC). [NOTA: comparar ambos tubos con luz reflejada sobre fondo blanco, sosteniendo el tubo directamente sobre el fondo en un ángulo tal que no haya fluorescencia.]

Alcalinidad

Transferir 35 g de Vaselina Sólida a un vaso de precipitados, agregar 100 ml de agua hirviendo, tapar y colocar sobre una placa calefactora con agitador, manteniendo el agua en ebullición. Luego de 5 minutos, dejar separar las fases y transferir la porción acuosa obtenida a una cápsula, lavar la fase sôli-

da con dos porciones de 50 ml de agua hirviendo y transferir los lavados a la cápsula. Agregar 1 gota de fenoltaleína (SR) a los lavados combinados y calentar a ebullición: la solución obtenida no debe desarrollar color rosado.

Acidez

Si el agregado de fenoltaleína (SR) en el ensayo de *Alcalinidad* no produce color rosado, agregar 0,1 ml de naranja de metilo (SR): no se debe desarrollar color rojo ni rosado.

Determinación del residuo de ignición <270>

Calentar 2 g de Vaselina Sólida en una cápsula de porcelana sobre la llama de un mechero: se debe volatilizar sin olor acre y el residuo de ignición no debe ser mayor de 0,1 %.

Aceites fijos, grasas y resinas

Calentar 10 g de Vaselina Sólida con 50 ml de hidróxido de sodio 5 N a 100 °C durante 30 minutos. Separar la fase acuosa y acidificar con ácido sulfúrico 5 N: no se deben separar sustancias aceitosas ni sólidas.

Ácidos orgánicos

Transferir 20,0 g de Vaselina Sólida a un recipiente apropiado, agregar 100 ml de una mezcla de agua y alcohol neutralizado (2:1), agitar vigorosamente y calentar hasta ebullición. Agregar 1 ml de fenoltaleína (SR) y titular rápidamente con hidróxido de sodio 0,1 N (SV), agitando hasta punto final rosa neto, observando el cambio de color en la fase alcohol-agua: no se deben consumir más de 0,4ml de hidróxido de sodio 0,1 N.

ROTULADO

Indicar en el rótulo el nombre, la cantidad de cualquier estabilizante agregado y que la fecha de vencimiento de Vaselina Sólida es un año a partir de su fraccionamiento.