

1 HEPARINA SÓDICA BOVINA

2 **Definición** - Heparina Sódica Bovina es
3 Heparina sódica no fraccionada de origen
4 bovino. Es una preparación que contiene la sal
5 sódica de glicosaminoglicanos (GAGs)
6 sulfatados presentes en los tejidos de mamíferos
7 de dicha especie. La heparina se define como
8 una familia de especies de polisacáridos, cuyas
9 cadenas están compuestas por residuos
10 alternados, unidos por enlaces 1→4, de un
11 ácido urónico y de D-glucosamina, con
12 diversos grados de sulfatación. Los residuos
13 de ácido urónico pueden ser ácido L-idurónico
14 o ácido D-glucurónico, y los residuos de
15 glucosamina pueden estar N-sulfatados o N-
16 acetilados. Tras su hidrólisis ácida completa se
17 libera D-glucosamina, ácido D-glucurónico,
18 ácido L-idurónico, ácido acético y ácido
19 sulfúrico. Las unidades de α -D-glucosamina
20 presentan un estándar de sulfatación
21 heterogéneo con una alta proporción de
22 unidades de α -glucosamina no sulfatadas en la
23 posición 6.

24 Su peso molecular es de aproximadamente
25 12.000 a 19.000 Daltons. La identidad de
26 especie se verifica durante la producción; y
27 señales características de estructura y de
28 origen en el espectro de RMN- H^1 .

29 La Heparina Sódica Bovina presenta la
30 propiedad de retrasar la coagulación
31 sanguínea potenciando, con afinidad
32 moderada, la acción de la antitrombina III
33 sobre los factores de la coagulación como la
34 trombina (factor IIa) y el factor Xa. La
35 actividad de la Heparina Sódica Bovina
36 destinada a la administración parenteral debe
37 ser mayor o igual a 150 UI por miligramo,
38 calculada sobre la sustancia seca y
39 determinada por método coagulométrico. La
40 actividad de la Heparina Sódica Bovina no
41 destinada a la administración parenteral debe
42 ser mayor o igual a 120 UI por miligramo,
43 calculada sobre la sustancia seca determinada
44 por el mismo método. La potencia calculada
45 sobre base seca no debe ser menor al 90,0 por
46 ciento ni mayor al 111,0 por ciento de la
47 potencia declarada. Heparina Sódica Bovina
48 debe cumplir con las siguientes
49 especificaciones.

50 PRODUCCIÓN

51 La Heparina Sódica Bovina se
52 obtiene a partir de mucosa intestinal de
53 animales de dicha especie que cumplen
54 con los requerimientos de animales
55 sanos apropiados para el consumo
56 humano, deben tener la autorización de
57 la Autoridad Sanitaria competente,
58 Certificación Sanitaria y la declaración
59 del estatus de libre de Encefalopatía
60 Espongiforme Bovina (BSE) del país de
61 origen. El proceso de manufactura debe
62 estar validado para demostrar la
63 apropiada inactivación o remoción de
64 cualquier contaminación por virus u
65 otro agente infeccioso como para
66 minimizar o eliminar la contaminación
67 microbiana. Los solventes utilizados
68 durante el proceso de fabricación
69 deben ser mayoritariamente
70 eliminados o identificados y evaluado
71 su impacto.

72 La identidad de la especie de origen
73 y la ausencia de material de posibles
74 especies contaminantes, como
75 porcinos, ovinos y caprinos, se
76 verifican mediante controles
77 adecuados durante la producción. El
78 método utilizado para confirmar la
79 identidad de la especie de origen y su
80 punto de aplicación en el proceso debe
81 estar validado. La identificación de
82 especies contaminantes mediante
83 técnicas basadas en la reacción en
84 cadena de la polimerasa (PCR), que
85 permiten la amplificación de
86 secuencias de ADN específicas de cada
87 especie, ha demostrado ser una
88 alternativa adecuada. Esta metodología
89 también se emplea para la detección de
90 ADN bovino y comprobar su presencia
91 en un nivel constante, acorde con el
92 proceso de fabricación utilizado. Este
93 método se aplica sobre material en el
94 cual aún hay cantidades detectables de
95 ADN (heparina cruda).

96 **Caracteres generales** - Polvo
97 higroscópico blanco o casi blanco.
98 Fácilmente soluble en agua
99 obteniéndose una solución clara.

100 Prácticamente insoluble en solventes
101 orgánicos como etanol, acetona, cloroformo,
102 entre otros.

103 **Sustancias de referencia** – Heparina
104 Sódica Bovina SR-FA; Heparina para análisis
105 físicoquímico SR-FA.; Dermatán Sulfato y
106 Condroitín Sulfato Polisulfatado SR-FA.

107 CONSERVACIÓN

108 En envases herméticos de cierre
109 inviolable, a temperatura ambiente, proteger
110 de la humedad.

111 ENSAYOS

112 Identificación

113 **A** - Debe cumplir con los requerimientos
114 descritos en Valoración.

115 **B** - Analizar por Espectrometría de
116 resonancia magnética nuclear (H-RMN) (ver
117 473. Espectroscopía de Resonancia Magnética
118 Nuclear).

119 Solución A - Preparar una solución en
120 óxido de deuterio que contiene 20 µg/mL de
121 trimetilsililpropionato de sodio deuterado
122 (TSP-d4) o trimetilsililpropanosulfonato de
123 sodio deuterado (DSS-d6) y si la señal a 5,22
124 ppm es inferior al 80% de la señal a 5,42 ppm,
125 adicionar 12 µg por mL de edetato disódico.
126 [NOTA: El almacenamiento de soluciones de
127 óxido de deuterio (con o sin TSP-d4) debe
128 realizarse en envases de vidrio. En caso de
129 almacenar las soluciones que contengan EDTA
130 las mismas deben mantenerse en botellas de
131 polietileno natural de alta densidad.]

132 Solución muestra - Disolver 20 mg de
133 Heparina Sódica Bovina en 0,7 mL de Solución
134 A.

135 Solución estándar - Disolver 20 mg de
136 Heparina Sódica Bovina SR-FA en 0,7 mL de
137 Solución A.

138 Aparato - Emplear un espectrómetro de
139 RMN por pulsos operando a un mínimo de 300
140 MHz.

141 Adquisición de espectros de ¹H-RMN
142 [NOTA: la Solución muestra y la Solución
143 estándar deben medirse el mismo día].

144 - Número de transientes: mínimo 16; se
145 ajusta hasta que la relación señal-ruido sea de

146 al menos 1000:1 para la señal del
147 metilo de la heparina a 2,04 ppm;

148 - Temperatura: alrededor de 25°C
149 [NOTA: los espectros de la Solución
150 muestra y la Solución estándar deben
151 obtenerse a la misma temperatura];

152 - Tiempo de adquisición: mínimo 2
153 segundos;

154 - Tiempo de repetición (tiempo de
155 adquisición más retardo): mínimo 4 a
156 10 segundos dependiendo del ancho de
157 pulso;

158 - Ancho espectral: 10 - 12 ppm,
159 centrado en alrededor de 4,5 ppm;

160 - Ancho de pulso: para dar un
161 ángulo de volteo entre 30° y 90°.

162 Procesamiento -

163 - Ensanchamiento de línea con
164 función de ventana
165 exponencial: máximo 0,3 Hz;

166 - Transformación de Fourier;

167 - Corrección de fase y línea de
168 base;

169 - Señal de referencia de
170 trimetilsililpropionato
171 establecida en 0,00 ppm.

172 Resultados -

173 - Las señales principales de la
174 heparina sódica bovina deben
175 estar presentes: 2,04 ppm,
176 3,27 ppm (doblete
177 parcialmente resuelto), 4,34
178 ppm, 5,22 ppm, 5,30 ppm y
179 5,42 ppm, todas dentro de ±
180 0,03 ppm. La señal a 5,22 ppm
181 puede resolverse en dos
182 señales a 5,22 y 5,24 ppm en
183 espectrómetros de campo alto
184 (¹H a 500 MHz o mayor).

185 - El espectro ¹H-RMN obtenido
186 con la Solución muestra y la
187 Solución estándar se comparan
188 cualitativamente luego de que
189 los dos espectros hayan sido
190 normalizados para tener
191 similar intensidad; se puede
192 observar el dermatán sulfato

193 con una señal metilo a $2,08 \pm 0,02$
 194 ppm; no deben estar presentes
 195 señales no identificadas superiores al
 196 4 % comparadas con la altura de la
 197 señal de heparina a 5,42 ppm en los
 198 rangos 0,10 - 2,00 ppm, 2,10 - 3,10
 199 ppm y 5,70 - 8,00 ppm; señales de
 200 solventes y otras sustancias
 201 relacionadas al proceso pueden estar
 202 presentes debiendo estar
 203 identificadas para ser aceptadas.
 204 Pueden ocurrir variaciones de la
 205 intensidad en algunas regiones de
 206 señales del espectro de heparina: las
 207 regiones de intensidad variable son
 208 entre 3,35 - 4,55 ppm, donde el
 209 patrón de señales se mantiene
 210 aproximadamente pero la intensidad
 211 varía.

212 - Ausencia de condroitín sulfato
 213 sobresulfatado: no se debe encontrar
 214 ninguna característica relacionada
 215 con condroitín sulfato sobresulfatado
 216 entre 2,12 y 3,00 ppm.

217 **C** - Proceder según se describe en
 218 Sustancias Relacionadas realizando las
 219 siguientes modificaciones:

220 Solución muestra para identificación -
 221 Pesar exactamente 50 mg de Heparina Sódica
 222 Bovina y disolver en 5,0 mL de agua. Mezclar
 223 empleando mezclador vórtex hasta disolución
 224 completa

225 Cromatografiar las Soluciones estándar C
 226 según se indica en Procedimiento: el tiempo
 227 de retención del pico de heparina es
 228 aproximadamente 26 minutos; los tiempos de
 229 retención relativos al pico de heparina son de
 230 aproximadamente 0,9 para el dermatán
 231 sulfato y condroitín sulfato; y 1,3 para el
 232 condroitín sulfato polisulfatado; la relación
 233 pico/valle, determinada por la relación entre
 234 la altura por encima de la línea de base del
 235 pico correspondiente a dermatán sulfato y
 236 condroitín sulfato Hp y la altura por encima
 237 de la línea de base del punto más bajo de la
 238 curva que separa este pico del pico
 239 correspondiente a la heparina Hv, no debe ser
 240 menor de 1,3.

241 Procedimiento - Inyectar por separado
 242 volúmenes iguales (20 µL) de la Solución
 243 estándar C y la Solución muestra para
 244 identificación. Registrar los cromatogramas y

245 medir las respuestas de los picos
 246 principales. El tiempo de retención del
 247 pico principal en el cromatograma
 248 obtenido a partir de la Solución
 249 muestra para identificación se debe
 250 corresponder con el tiempo de
 251 retención del pico principal obtenido
 252 con la Solución estándar C.

253 **D** - Debe cumplir con el ensayo
 254 descrito en Sodio

255 **Apariencia de la solución <22>**

256 Disolver una cantidad equivalente a
 257 50.000 UI de Heparina Sódica Bovina
 258 en agua y diluir a 10,0 mL con el mismo
 259 solvente. Emplear tubos de ensayo
 260 idénticos de vidrio incoloro,
 261 transparente y neutro, con un diámetro
 262 interno de entre 15 y 25 mm. Comparar
 263 observando verticalmente los tubos
 264 sobre un fondo blanco con luz natural
 265 difusa. Se debe obtener una solución
 266 clara cuando se compara con el agua
 267 purificada.

268 **Determinación del pH <250>**

269 Entre 5,5 y 8,0. Disolver 0,1 g de
 270 Heparina Sódica Bovina en agua libre
 271 de dióxido de carbono y diluir a 10,0
 272 mL con el mismo solvente.

273 **Impurezas nucleotídicas**

274 Disolver 40 mg de Heparina Sódica
 275 Bovina en agua, transferir a un matraz
 276 aforado de 10 mL, completar a volumen
 277 con el mismo solvente y mezclar. La
 278 absorbancia de esta solución (ver 470.
 279 Espectrofotometría ultravioleta y
 280 visible), determinada a 260 nm, no
 281 debe ser mayor de 0,15.

282 **Proteínas**

283 Solución A - Mezclar 2 volúmenes
 284 de una solución 10 g por litro de
 285 hidróxido de sodio y 2 volúmenes de
 286 una solución 50 g por litro de
 287 carbonato de sodio, y diluir hasta 5
 288 volúmenes con agua.

289 Solución B - Mezclar 2 volúmenes
 290 de una solución 12,5 g por litro de
 291 sulfato de cobre pentahidratado y 2
 292 volúmenes de una solución 29,8 g por

293 litro de tartrato de sodio y diluir hasta 5
294 volúmenes con agua.

295 Solución C - Solución A y Solución B (50:1).

296 Solución D - Diluir 1 volumen de Folin -
297 Ciocalteu para fenoles (SR) en 2 volúmenes de
298 agua, de manera tal que al ser agregado a la
299 Solución muestra y a las Soluciones estándar
300 luego de la adición de la Solución C, el pH final
301 se encuentre entre $10,25 \pm 0,25$.

302 Solución muestra - Disolver la Heparina
303 Sódica Bovina en agua para obtener una
304 solución de aproximadamente 5 mg por mL.

305 Soluciones estándar - Disolver albúmina
306 bovina (contiene aproximadamente un 96 %
307 de proteína) en agua para obtener una
308 solución de aproximadamente 100 mg por mL.
309 Preparar diluciones de esta solución en agua
310 para obtener al menos cinco soluciones de
311 referencia con concentraciones de proteína
312 uniformemente distribuidas en un intervalo
313 adecuado de entre 5 μg por mL y 100 μg por
314 mL.

315 Blanco - Agua.

316 Procedimiento - A 1,0 mL de cada Solución
317 estándar, de la Solución muestra y del Blanco,
318 agregar 5,0 mL de Solución C. Dejar reposar
319 durante 10 minutos y agregar 0,5 mL de
320 Solución D, mezclar y dejar reposar a
321 temperatura ambiente durante 30 minutos.
322 Filtrar a través de un filtro de membrana de
323 0,45 μm . Determinar las absorbancias a 750
324 nm (ver 470. Espectrofotometría ultravioleta
325 y visible) de todas las soluciones, empleando
326 la solución preparada a partir del Blanco para
327 llevar a cero el equipo. Obtener por regresión
328 lineal la curva estándar a partir del gráfico de
329 absorbancia de las Soluciones estándar en
330 función de concentración de proteína.
331 Determinar la concentración de proteína en la
332 Solución muestra. No debe contener más de
333 0,5 % calculado sobre la sustancia seca.

334 Sustancias relacionadas

335 Sistema cromatográfico - Emplear un
336 equipo para cromatografía de líquidos con un
337 detector ultravioleta ajustado a 202 nm, una
338 precolumna de 5 cm $\times$ 2 mm con fase
339 estacionaria constituida por resina de
340 intercambio aniónico fuertemente básica de
341 tamaño de partículas de 13 μm y una columna
342 de 25 cm $\times$ 2 mm con fase estacionaria

343 constituida por resina de intercambio
344 aniónico fuertemente básica (resina
345 aglomerada con látex funcionalizado
346 con amonio cuaternario, reticulado con
347 etilvinilbenceno-divinilbenceno) de
348 partículas de 9 μm . La temperatura de
349 la columna debe ser de
350 aproximadamente 40 °C. El caudal debe
351 ser aproximadamente 0,22 mL por
352 minuto. Programar el cromatógrafo del
353 siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0-10	75	25	Isocrático
10-35	75→0	25→100	Gradiente lineal
35-40	0	100	Isocrático
40-45	0→75	100→25	Gradiente lineal
45-60	75	25	Re-equilibrio

354 Solución A - Disolver 0,40 g de
355 fosfato dihidrógeno de sodio en 1 litro
356 de agua. Ajustar a pH 3,0 con ácido
357 fosfórico diluido. Filtrar y desgasificar.

358 Solución B - Disolver 0,40 g de fosfato
359 dihidrógeno de sodio en 1 litro de agua.
360 Agregar 140 g de perclorato de sodio y
361 ajustar a pH 3,0 con ácido fosfórico
362 diluido. Filtrar y desgasificar.

363 Fase móvil - Emplear mezclas
364 variables de Solución A y Solución B,
365 según se indica en Sistema
366 cromatográfico.

367 Solución muestra - Pesar
368 exactamente 0,1 g de Heparina Sódica
369 Bovina y disolver en 1,0 mL de agua.
370 Mezclar empleando mezclador vórtex
371 hasta disolución completa. Mezclar 500
372 μL de esta solución y 250 μL de ácido
373 clorhídrico 1 M, luego agregar 50 μL de
374 una solución de nitrito de sodio de
375 aproximadamente 250 mg por mL.
376 Mezclar suavemente y dejar reposar a
377 temperatura ambiente durante 40
378 minutos. Transcurrido este tiempo,

379 agregar 200 µL de hidróxido de sodio 1 M para
380 detener la reacción.

381 [NOTA: Las Soluciones estándar son
382 estables a temperatura ambiente durante 24
383 horas].

384 Solución estándar A - Disolver 250 mg de
385 Heparina para análisis fisicoquímico SR-FA.
386 en agua y diluir a 2,0 mL en el mismo solvente.
387 Mezclar con vórtex hasta disolución completa.

388 Solución estándar B - Agregar 1.200 µL de
389 Solución estándar A a 300 µL de Dermatán
390 Sulfato y Condroitín Sulfato Polisulfatado SR-
391 FA. Mezclar con vórtex para homogeneizar.

392 Solución estándar C - Agregar 100 µL de
393 Solución estándar B a 900 µL de agua. Mezclar
394 con vórtex para homogeneizar.

395 Solución estándar D - Agregar 400 µL de
396 Solución estándar A a 100 µL de agua y
397 mezclar con vórtex para homogeneizar.
398 Agregar 250 µL de ácido clorhídrico 1M, a
399 continuación agregar 50 µL de una solución de
400 nitrito de sodio de aproximadamente 250 mg
401 por mL. Mezclar suavemente y dejar reposar a
402 temperatura ambiente durante 40 minutos.
403 Transcurrido este tiempo, agregar 200 µL de
404 hidróxido de sodio 1 M para detener la
405 reacción.

406 Solución estándar E - A 500 µL de Solución
407 estándar B, agregar 250 µL de ácido
408 clorhídrico 1M, a continuación agregar 50 µL
409 de una solución de nitrito de sodio de
410 aproximadamente 250 mg por mL. Mezclar
411 suavemente y dejar reposar a temperatura
412 ambiente durante 40 minutos. Transcurrido
413 este tiempo, agregar 200 µL de hidróxido de
414 sodio 1 M para detener la reacción.

415 Aptitud del sistema (ver 100.
416 Cromatografía) - Cromatografiar las
417 Soluciones estándar D y E según se indica en
418 Procedimiento: el cromatograma obtenido con
419 la Solución estándar D no debe presentar
420 ningún pico al tiempo de retención de
421 heparina. En el cromatograma obtenido a
422 partir de la Solución estándar E, la resolución
423 R entre el pico de dermatán sulfato y
424 condroitín sulfato, y el pico de condroitín
425 sulfato polisulfatado no debe ser menor de
426 3,0.

427 Procedimiento - Inyectar por separado en
428 el cromatógrafo volúmenes iguales

429 (aproximadamente 20 µL) de la
430 Solución E y la Solución muestra,
431 registrar los cromatogramas y medir
432 las respuestas de todos los picos. La
433 respuesta del pico correspondiente a la
434 suma de dermatán sulfato y condroitín
435 sulfato en el cromatograma obtenido a
436 partir de la Solución muestra, no debe
437 ser mayor a la respuesta del pico
438 correspondiente a la suma de dermatán
439 sulfato y condroitín sulfato en el
440 cromatograma obtenido con la
441 Solución estándar E (2,0 %); la
442 respuesta de ningún otro pico en el
443 cromatograma obtenido a partir de la
444 Solución muestra debe ser mayor a
445 0,01 veces la respuesta del pico
446 correspondiente a dermatán sulfato y
447 condroitín sulfato en el cromatograma
448 obtenido con la Solución estándar E
449 (0,02 %). Descartar los picos que
450 aparecen durante la etapa isocrática
451 inicial.

452 **Determinación de Nitrógeno**

453 Método semi-micro

454 Solución mixta de rojo de metilo -
455 Disolver 0,1 g de rojo de metilo y 50 mg
456 de azul de metileno en 100 mL de
457 etanol (96 %), (cambio de color: pH 5,2
458 (rojo-violeta) a pH 5,6 (verde)).

459 Procedimiento - Transferir una
460 cantidad de la sustancia en ensayo,
461 exactamente pesada, que contenga
462 aproximadamente 2 mg de nitrógeno,
463 al balón de digestión; añadir 4 g de una
464 mezcla en polvo de 100 g de sulfato
465 dipotásico, 5 g de sulfato de cobre
466 pentahidratado y 2,5 g de selenio, y tres
467 perlas de vidrio. Lavar cualquier
468 partícula adherida del cuello del balón
469 con 5 mL de ácido sulfúrico, dejándolo
470 escurrir por las paredes del balón, y
471 mezclar el contenido por rotación.
472 Cerrar la boca del balón sin apretar,
473 por ejemplo, con una pera de vidrio de
474 vástago corto, para evitar una pérdida
475 excesiva de ácido sulfúrico. Calentar
476 gradualmente al principio y luego
477 aumentar la temperatura hasta que se
478 produzca una ebullición vigorosa con
479 condensación de ácido sulfúrico en el
480 cuello del balón. [NOTA: se deben

481 tomar precauciones para evitar que la parte
 482 superior del balón se sobrecaliente].
 483 Continuar el calentamiento durante 30
 484 minutos, a menos que se indique lo contrario.
 485 Enfriar, disolver el material sólido agregando
 486 con cuidado a la mezcla 25 mL de agua, enfriar
 487 nuevamente y colocar en un aparato de
 488 destilación por vapor. Agregar 30 mL de
 489 hidróxido de sodio al 40% y destilar
 490 inmediatamente haciendo pasar vapor a
 491 través de la mezcla. Recolectar alrededor de
 492 40 mL de destilado en 20,0 mL de ácido
 493 clorhídrico 0,01 M y suficiente agua para
 494 cubrir la punta del condensador. Hacia el final
 495 de la destilación, bajar el receptor de modo
 496 que la punta del condensador esté por encima
 497 de la superficie del ácido. [NOTA: tomar
 498 precauciones para evitar que el agua en la
 499 superficie exterior del condensador alcance el
 500 contenido del receptor.] Valorar el destilado
 501 con hidróxido de sodio 0,01 M, empleando
 502 Solución mixta de rojo de metilo como
 503 indicador. Registrar el volumen consumido de
 504 hidróxido de sodio 0,01 M en mL como n_1 .
 505 Repetir el ensayo utilizando
 506 aproximadamente 50 mg de glucosa en lugar
 507 de la sustancia a examinar. Registrar el
 508 volumen consumido de hidróxido de sodio
 509 0,01 M en mL como n_2 . Determinar el
 510 contenido de nitrógeno en la porción de la
 511 sustancia en ensayo, por la fórmula siguiente:

$$\frac{0,01401 (n_2 - n_1)}{m} \%$$

514 en la cual m es la cantidad en mg de Heparina
 515 Sódica Bovina en ensayo y los otros términos
 516 son los descritos anteriormente. Debe
 517 contener entre 1,5 y 2,5 %, con respecto a la
 518 sustancia seca; determinado sobre 100 mg.

519 **Sodio**

520 Determinar por espectrofotometría de
 521 absorción atómica (ver Método I en 440.
 522 Espectrofotometría de absorción y emisión
 523 atómica).

524 Solución madre del estándar - Transferir
 525 una cantidad de cloruro de sodio que
 526 corresponda a 0,509 g de cloruro de sodio a
 527 un matraz aforado de 100 mL, disolver y
 528 completar a volumen con agua.

529 Solución madre del estándar diluida (200
 530 ppm Na) - Inmediatamente antes de su
 531 empleo, transferir 1,0 mL de Solución madre

532 del estándar a un matraz aforado de 10
 533 mL, completar a volumen con agua y
 534 mezclar.

535 Diluyente - Preparar una solución
 536 en ácido clorhídrico 0,1 M que
 537 contenga 1,27 mg de cloruro de cesio
 538 por mL.

539 Soluciones estándar - Preparar
 540 soluciones de aproximadamente 25, 50
 541 y 75 ppm de sodio, a partir de la
 542 Solución madre del estándar diluida
 543 (200 ppm Na) en Diluyente.

544 Solución muestra - Pesar
 545 exactamente 50 mg de Heparina Sódica
 546 Bovina, disolver en Diluyente y diluir a
 547 100 mL con el mismo solvente.

548 Procedimiento - Determinar
 549 concomitantemente las absorbancias
 550 de las Soluciones estándar y la Solución
 551 muestra, a 330,3 nm, con un
 552 espectrofotómetro de absorción
 553 atómica, equipado con una lámpara de
 554 sodio de cátodo hueco como fuente de
 555 radiación y una llama de aire-acetileno
 556 de composición adecuada
 557 (aproximadamente 11 litros de aire y 2
 558 litros de acetileno por minuto). Debe
 559 contener entre 10,5 y 13,5 % de sodio,
 560 con respecto a la sustancia seca.

561 **Pérdida por secado <680>**

562 Secar 1,0 g de Heparina Sódica
 563 Bovina en estudio a 60°C sobre
 564 pentóxido de fósforo a una presión que
 565 no exceda los 670 Pa durante 3 horas:
 566 no debe perder más de 8,0 % de su
 567 peso.

568 **Ensayo de endotoxinas** 569 **bacterianas <330>**

570 Cuando Heparina Sódica Bovina
 571 esté destinada para preparaciones
 572 parenterales que no se sometan a un
 573 tratamiento posterior de eliminación
 574 de endotoxinas bacterianas, no debe
 575 contener más de 0,01 Unidades de
 576 Endotoxina (UE) por UI de Heparina.

577 **Solventes residuales <715>**

578 Debe cumplir con los requisitos.

579

VALORACIÓN

580 La actividad anticoagulante se determina
581 in vitro mediante un método coagulométrico,
582 por comparación de su capacidad, en las
583 condiciones del ensayo, de retrasar la
584 coagulación de plasma sustrato citratado y
585 recalcificado, con respecto a la Heparina
586 Sódica Bovina SR-FR.

587 [NOTA: durante la realización del ensayo
588 conservar la Solución de cloruro de calcio
589 dihidrato 3,7 g por litro (0,025 M) a 37°C.]

590 Solución de cloruro de calcio dihidrato 3,7
591 g por litro (0,025 M) - Pesar la cantidad
592 necesaria de cloruro de calcio dihidrato y
593 diluir con agua para obtener una solución de
594 aproximadamente de 0,2 M. Valorar con EDTA
595 0,05 M (SV). [NOTA: esta solución puede
596 conservarse entre 2 y 8 °C durante 6 meses
597 desde su preparación.]. Diluir en agua para
598 obtener la Solución de cloruro de calcio
599 dihidrato 0,025 M según el volumen necesario
600 para la realización del ensayo. [NOTA: la
601 Solución de cloruro de calcio dihidrato (0,025
602 M) puede ser conservada entre 2 y 8°C
603 durante 1 semana a partir de su preparación.]

604 Plasma sustrato - Emplear un reactivo
605 comercial de plasma humano normal o plasma
606 ovino desplaquetado apto para ensayo de
607 Heparina y/o Tiempo de tromboplastina
608 parcial activado (APTT) in vitro. En las
609 condiciones del ensayo el Plasma sustrato
610 debe permitir obtener un tiempo de
611 coagulación adecuado al método de detección
612 que se emplea y proporcionar curvas de
613 logaritmo (Log10) de la dosis en función del
614 logaritmo (Log10) de la respuesta
615 reproducibles y con pendiente significativa.
616 [NOTA: en caso de ser necesario utilizar en el
617 ensayo más de un vial de plasma, realizar un
618 pool y homogeneizar por inversión.]

619 Para reactivos liofilizados: de no estar
620 especificado por el fabricante, se recomienda
621 atemperar a temperatura ambiente previo a
622 su reconstitución. Luego, reconstituir y dejar
623 reposar entre 15 a 20 minutos para permitir la
624 completa hidratación del liofilizado.
625 Homogeneizar suavemente mediante
626 movimientos circulares, no agitar. Utilizar
627 inmediatamente. Conservar en frío durante
628 todo el ensayo. Descartar el reactivo sobrante
629 luego de su uso.

630 Para reactivos líquidos congelados:
631 de no estar especificado por el
632 fabricante, se recomienda descongelar
633 dejando correr agua a temperatura
634 ambiente sobre las paredes del frasco
635 evitando la formación de fibrina,
636 agregados o lisis. Cuando el plasma se
637 haya descongelado completamente
638 homogeneizar suavemente por
639 inversión, no agitar. Utilizar
640 inmediatamente. Conservar en baño de
641 hielo (en contacto con el hielo) durante
642 todo el ensayo. Descartar el reactivo
643 sobrante luego de su uso.

644 Reactivo de cefaloplastina activada -
645 Emplear un reactivo APTT (Tiempo de
646 tromboplastina parcial activado)
647 comercial apropiado que contiene
648 cefalina (extracto obtenido de cerebro
649 de conejo) con activador de la
650 coagulación (por ejemplo ácido elálgico;
651 caolín; sílice), con soluciones
652 reguladoras, estabilizadores y
653 conservantes. Apto para ensayo de
654 Heparina y/o Tiempo de
655 tromboplastina parcial activado
656 (APTT) in vitro. Puede contener
657 también fosfátidos (fosfolípidos
658 complejos obtenidos de soja u otros).
659 Conservar según indicación del
660 fabricante. Durante el ensayo, el
661 volumen a utilizar se debe mantener a
662 temperatura ambiente. Mezclar por
663 inversión antes de cada uso.

664 Blanco de reacción - Determinar un
665 blanco de reacción utilizando Solución
666 fisiológica (SR) en lugar de la
667 Preparación de estándar y la
668 Preparación muestra. Su resultado
669 indica el tiempo de coagulación del
670 plasma en presencia de los activadores
671 de la coagulación (cefalina, fosfolípidos
672 y cloruro de calcio) en las condiciones
673 del Procedimiento. Debe ensayarse al
674 inicio y al final tanto en la curva de
675 calibración como en cada ensayo. Los
676 valores de los dos blancos deben ser
677 menores a 60 segundos cuando se
678 utilizan los volúmenes de reactivos
679 definidos en el Procedimiento y no
680 diferir significativamente entre sí
681 (menor a un 10 %). [NOTA: en caso de
682 obtenerse tiempos mayores a 60
683 segundos, repetir el ensayo realizando

684 incrementos progresivos del Reactivo de
685 cefaloplastina activada (25µl) hasta cumplir
686 con esa condición. El volumen de reactivo
687 seleccionado debe ser el más bajo posible y no
688 debe superar los 125 µL.]

689 Preparación estándar - Rotular 6 tubos y
690 preparar 2 series independientes de 3
691 diluciones cada una (dosis) de Heparina
692 Sódica Bovina SR-FA (E₁, E₂, E₃; E'₁, E'₂, E'₃) en
693 Solución fisiológica (SR). Mezclar por
694 inversión. Las dosis se establecen según se
695 indica en Curva de Calibración.

696 Preparación muestra - Rotular 6 tubos y
697 preparar 2 series independientes de 3
698 diluciones cada una (dosis) de Heparina
699 Sódica Bovina (M₁, M₂ y M₃; M'₁, M'₂ y M'₃) con
700 Solución fisiológica (SR). Mezclar por
701 inversión. Las dosis se establecen según se
702 indica en Curva de Calibración.

703 [NOTA: las dosis de la Preparación
704 estándar y la Preparación muestra deben
705 equipotentes]

706 Curva de calibración - Se realiza para
707 determinar las dosis a utilizar en el ensayo.
708 Diluir Heparina Sódica Bovina SR-FA con
709 Solución fisiológica (SR) de modo que
710 contenga un número exactamente conocido de
711 Unidades Internacionales por mililitro.
712 Preparar una serie de diluciones (dosis) en
713 progresión geométrica utilizando como
714 diluyente Solución fisiológica (SR) de modo
715 que, en las condiciones descritas en
716 Procedimiento, el tiempo de coagulación
717 obtenido con la dosis más baja sea mayor a 1,5
718 veces el tiempo de coagulación del blanco y las
719 dosis más altas no superen los 180 segundos
720 para evitar coágulos laxos. Seleccionar 3 dosis
721 que, cuando los resultados obtenidos se
722 grafican como logaritmo (Log10) de la dosis
723 en función del logaritmo (Log10) de la
724 respuesta; cumplan con el parámetro de
725 regresión y desvío de la linealidad según se
726 especifica en el método estadístico utilizado
727 para el Cálculo de actividad.

728 [NOTA: ante el no cumplimiento de
729 parámetros estadísticos en los ensayos, se
730 puede realizar nuevamente una curva de
731 calibración para su re-ajuste de dosis; se
732 sugiere su realización ante el cambio de lote
733 de reactivos].

734 Procedimiento - La determinación
735 se realiza en cubetas plásticas
736 utilizando un equipo incubador seco
737 (37°C) que permita medir el tiempo
738 (segundos) que demora la coagulación
739 del Plasma sustrato por un mecanismo
740 de detección del punto final mecánico
741 (detección del cambio en la fluidez
742 mediante la detención del movimiento
743 de una bolita de acero adecuada para el
744 ensayo o mecanismo apropiado) o por
745 el registro espectrofotométrico de la
746 variación de absorbancia a una
747 longitud de onda de 600 nm
748 aproximadamente.

749 [NOTA: Los volúmenes citados en el
750 texto se dan a título indicativo y
751 pueden ser adaptados siempre que se
752 respeten las proporciones indicadas. El
753 agregado del Plasma sustrato,
754 Preparación estándar, Preparación
755 muestra y otros reactivos empleados
756 en este ensayo debe realizarse de
757 manera precisa utilizando
758 micropipetas automáticas y/o
759 multipette evitando que quede material
760 en las paredes de las cubetas y la
761 generación de burbujas. Teniendo en
762 cuenta el bajo volumen que se utiliza
763 en el ensayo no es necesario mezclar
764 ante cada incorporación de reactivos.
765 La medición de los tiempos de reacción
766 debe ser iniciada, de manera inmediata,
767 a partir del agregado de un
768 determinado reactivo al pocillo de la
769 cubeta de reacción.]

770 Colocar la cubeta en el equipo
771 incubador a 37°C y, en caso de utilizar
772 el método mecánico de detección de
773 punto final, incorporar una bolita
774 magnética a cada pocillo de la cubeta
775 de reacción en esta instancia o en
776 cualquier momento previo a la
777 incorporación de la Solución de cloruro
778 de calcio dihidrato 3,7 g por litro
779 (0,025 M).

780 Agregar a cada pocillo 50 µL de
781 Plasma sustrato. Luego agregar a cada
782 pocillo 50 µL del Blanco de reacción o
783 de la dilución apropiada de la
784 Preparación estándar o Preparación
785 muestra según corresponda siguiendo
786 el orden establecido para el ensayo en

787 la puesta a punto (A modo de ejemplo: Blanco,
788 E₁, E₂, E₃; M₁, M₂, M₃, M'₁, M'₂, M'₃, E'₁, E'₂, E'₃,
789 Blanco; u otro). Incubar por 300 segundos.
790 [NOTA: también puede colocarse el Plasma
791 sustrato luego del agregado en el pocillo del
792 Blanco de reacción/Preparación estándar/
793 Preparación muestra, sin que esto afecte la
794 reacción.]

795 Agregar a cada pocillo 50 µL de Reactivo
796 de cefaloplastina activada y después de 120
797 segundos agregar 50 µL de la Solución de
798 cloruro de calcio dihidrato 3,7 g por litro
799 (0,025 M). Registrar como tiempo de
800 coagulación el intervalo, en segundos, entre la
801 última adición de reactivo y el momento de la
802 coagulación, medido según el método elegido.
803 Continuar con el ensayo de la totalidad de las
804 dosis y el blanco. [NOTA: los tiempos de
805 incubación pueden ajustarse en la verificación
806 de la metodología siempre que se cumpla con
807 los requerimientos para el Blanco de reacción
808 y la Curva de Calibración.]

809 Medición de la respuesta -

810 - Método de detección mecánico: 60
811 segundos antes del agregado de la
812 Solución de cloruro de calcio dihidrato
813 3,7 g por litro (0,025 M), transferir la
814 cubeta a la posición de medición. En caso
815 de utilizarse bolita de acero para la
816 detección del punto final; transferir la
817 cubeta a la posición de agitación
818 magnética para dar inicio con el
819 movimiento de la misma. El tiempo de
820 coagulación se determina al momento de
821 la detención del movimiento de la bolita
822 metálica.

823 - Método de detección
824 espectrofotométrico: el tiempo de
825 coagulación se determina por la variación
826 de absorbancia que se detecta
827 espectrofotometría a 600 nm.

828 [NOTA: en caso de observarse una
829 diferencia mayor al 10 % entre duplicados
830 podrá incorporarse la repetición de la dosis
831 ensayada. El resultado obtenido debe ser
832 incorporado como dato adicional para dicha
833 dosis.]

834 Cálculo de la actividad - Calcular los
835 resultados a partir del análisis del logaritmo
836 de la dosis (Log 10) en función del logaritmo
837 de los tiempos de coagulación en segundos

838 (Log 10) según métodos estadísticos
839 para ensayo de líneas paralelas (ver
840 3.2 Modelo de líneas paralelas en 10.
841 Análisis estadístico de resultados de
842 ensayos biológicos). Efectuar no menos
843 de tres valoraciones independientes.
844 Para cada una de ellas preparar
845 diluciones nuevas de la Preparación
846 estándar y la Preparación muestra.

847 Calcular la potencia de la Heparina
848 Sódica Bovina en ensayo en Unidades
849 Internacionales por mililitro a partir de
850 la combinación de los resultados de los
851 tres ensayos independientes realizados
852 según los métodos estadísticos
853 habituales (ver Combinación
854 ponderada de resultados de ensayos en
855 10. Análisis estadístico de resultados
856 de ensayos biológicos) y referencia a
857 Unidades Internacionales por
858 miligramo para evaluar el
859 cumplimiento del criterio de
860 aceptación establecido. La potencia
861 estimada no debe ser menor que 90,0
862 % ni mayor a 111,0 % de la potencia
863 declarada. Los límites de confianza de
864 la potencia estimada (P=0,95) no deben
865 ser menores a 80,0 % ni mayores a
866 125,0 % de la potencia declarada.

867 ROTULADO

868 Indicar en el rótulo el número de
869 Unidades Internacionales por
870 miligramo y la especie animal de la cual
871 fue obtenida.

872

873