

HEPARINA CÁLCICA PORCINA

Definición - Heparina Cálcica Porcina es Heparina cálcica no fraccionada de origen porcino. Es una preparación que contiene la sal cálcica de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados presentes en tejidos de mamíferos de dicha especie. La heparina se define como una familia de especies de polisacáridos, cuyas cadenas están compuestas por residuos alternados, unidos por enlaces 1→4, de un ácido urónico y de D-glucosamina, con diversos grados de sulfatación. Los residuos de ácido urónico pueden ser ácido L-idurónico o ácido D-glucurónico, y los residuos de glucosamina pueden estar N-sulfatados o N-acetilados. Tras su hidrólisis ácida completa se libera D-glucosamina, ácido D-glucurónico, ácido L-idurónico, ácido acético y ácido sulfúrico.

Su peso molecular es de aproximadamente 15000 a 19000 Daltons. La identidad de especie se verifica durante la producción; y señales características de estructura y de origen en el espectro de RMN- H^1 .

La Heparina Cálcica Porcina presenta la propiedad de retrasar la coagulación sanguínea potenciando, con alta afinidad, la acción de la antitrombina III sobre los factores de la coagulación como la trombina (factor IIa) y el factor Xa. La actividad de la Heparina Cálcica Porcina destinada a la administración parenteral debe ser mayor o igual a 180 UI por miligramo, calculada sobre la sustancia seca y determinada por el ensayo de Actividad anti-factor IIa, según se describe en Valoración. La actividad de la Heparina Cálcica Porcina no destinada a la administración parenteral debe ser mayor o igual a 120 UI por miligramo, calculada sobre la sustancia seca determinada por el mismo método. La potencia calculada sobre base seca no debe ser menor al 90,0 por ciento ni mayor al 111,0 por ciento de la potencia declarada.

Heparina Cálcica Porcina debe cumplir con los requisitos establecidos para Apariencia de la solución; Determinación de pH; Impurezas

nucleótídicas; Proteínas; Sustancias relacionadas; Determinación de Nitrógeno; Pérdida por secado y Solventes residuales en Heparina Sódica Porcina teniendo en cuenta las siguientes consideraciones y especificaciones.

PRODUCCIÓN

La Heparina Cálcica Porcina se obtiene a partir de mucosa intestinal de animales de dicha especie que cumplen con los requerimientos de animales sanos apropiados para el consumo humano, y debe contar con la autorización de la Autoridad Sanitaria competente y Certificación sanitaria del país de origen. El proceso de manufactura debe estar validado para demostrar la apropiada inactivación o remoción de cualquier contaminación por virus u otro agente infeccioso como para minimizar o eliminar la contaminación microbiana. Los solventes utilizados durante el proceso de fabricación deben ser mayoritariamente eliminados o identificados y evaluado su impacto.

La identidad de la especie de origen y la ausencia de material de posibles especies contaminantes, como bovinos, ovinos y caprinos, se verifican mediante controles adecuados durante la producción. El método utilizado para confirmar la identidad de la especie de origen y su punto de aplicación en el proceso debe estar validado. La identificación de especies contaminantes mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten la amplificación de secuencias de ADN específicas de cada especie, ha demostrado ser una alternativa adecuada. Esta metodología también se emplea para la detección de ADN porcino y comprobar su presencia en un nivel constante, acorde con el proceso de fabricación utilizado. Este método se aplica sobre material en el cual aún hay cantidades detectables de ADN (heparina cruda).

99 **Caracteres generales** - Polvo higroscópico
 100 blanco o casi blanco. Fácilmente soluble en agua
 101 obteniéndose una solución clara.
 102 Prácticamente insoluble en solventes
 103 orgánicos como etanol, acetona, cloroformo,
 104 entre otros.

105 **Sustancias de referencia** - Heparina
 106 cálcica porcina para identificación por RMN-H
 107 SR-FA; Heparina Porcina SR-FA, Heparina para
 108 análisis fisicoquímico SR-FA; Dermatán sulfato
 109 y condroitín sulfato polisulfatado SR-FA.

110 CONSERVACIÓN

111 En envase hermético de cierre inviolable, a
 112 temperatura ambiente, proteger de la
 113 humedad.

114 ENSAYOS

115 Identificación

116 **A** - Debe cumplir con los requerimientos
 117 descritos en Valoración.

118 **B** - Proceder según se indica en
 119 Identificación B en Heparina Sódica Porcina. La
 120 relación de actividad anti-factor Xa y anti-
 121 factor IIa debe estar comprendida entre 0,9 -
 122 1,1.

123 **C** - Analizar por Espectrometría de
 124 resonancia magnética nuclear (H-RMN) (ver
 125 473. Espectroscopía de Resonancia Magnética
 126 Nuclear).

127 Solución A - Preparar una solución en óxido
 128 de deuterio que contenga 20 µg por mL de
 129 trimetilsilil propionato de sodio deuterado
 130 (TSP-d4) o trimetilsilil propano sulfonato de
 131 sodio deuterado (DSS-d6). [NOTA: El
 132 almacenamiento de soluciones de óxido de
 133 deuterio (con o sin TSP-d4) debe realizarse en
 134 envases de vidrio.

135 Solución muestra - Disolver 20 mg de
 136 Heparina Cálcica Porcina en 0,7 mL de Solución
 137 A.

138 Solución estándar - Disolver 20 mg de
 139 Heparina Cálcica Porcina para identificación
 140 por RMN SR-FA en 0,7 mL de Solución A.

141 Aparato - Emplear un espectrómetro de
 142 RMN por pulsos operando a un mínimo de 300
 143 MHz.

144 Adquisición de espectros de ¹H-
 145 RMN: [NOTA: la Solución muestra y la
 146 Solución estándar deben medirse el
 147 mismo día].

148 - Número de transientes: mínimo
 149 16; se ajusta hasta que la relación
 150 señal-ruido sea de al menos 1000:1
 151 para la señal del metilo de la heparina a
 152 2,05 ppm;

153 - Temperatura: alrededor de 25°C;
 154 [NOTA: los espectros de la Solución
 155 muestra y la Solución estándar deben
 156 obtenerse a la misma temperatura];

157 - Tiempo de adquisición: mínimo 2
 158 segundos;

159 - Tiempo de repetición (tiempo de
 160 adquisición más retardo): mínimo 4 a
 161 10 segundos dependiendo del ancho de
 162 pulso;

163 - Ancho espectral: 10 - 12 ppm,
 164 centrado en alrededor de 4,5 ppm;

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

167 Procesamiento -

168 - Ensanchamiento de línea con
 169 función de ventana exponencial:
 170 máximo 0,3 Hz;

171 - Transformación de Fourier;

172 - Corrección de fase y línea de
 173 base.

174 - Señal de referencia de
 175 trimetilsilil propionato o trimetilsilil
 176 propanosulfonato establecida en 0,00
 177 ppm.

178 Resultados -

179 - Las señales principales de la
 180 heparina cálcica porcina deben estar
 181 presentes: 2,05 ppm, 3,29 ppm
 182 (doblete), 4,37 ppm, 5,35 ppm y 5,43
 183 ppm, todas dentro de ± 0,03 ppm.

184 - La heparina cálcica presenta en el
 185 espectro de ¹H-RMN, corrimiento a
 186 campos bajos de la señal de H1 de ácido
 187 idurónico-2-sulfato (5,43 ppm) y un
 188 ligero corrimiento a campos altos de la
 189 señal de H-1 de glucosamina-N,6-
 190 disulfato (5,35 ppm) así como cambios

191 en el perfil de señales en la región 4,0 – 4,5
192 ppm, respecto del espectro descrito en la
193 monografía de Heparina sódica porcina.

194 - Los espectros ^1H -RMN obtenido con la
195 Solución muestra y la Solución estándar se
196 comparan cualitativamente luego que los dos
197 espectros hayan sido normalizados para tener
198 similar intensidad; se puede observar el
199 dermatán sulfato con una señal metilo a $2,08 \pm$
200 $0,02$ ppm; no deben estar presentes señales no
201 identificadas superiores al 4% comparadas con
202 la altura de la señal de heparina a $5,43$ ppm en
203 los rangos $0,10 - 2,00$ ppm, $2,10 - 3,10$ ppm y
204 $5,70 - 8,00$ ppm; señales de solventes y otras
205 sustancias relacionadas al proceso pueden
206 estar presentes debiendo estar identificadas
207 para ser aceptadas. Pueden ocurrir variaciones
208 de la intensidad en algunas regiones de señales
209 del espectro de heparina: las regiones de
210 intensidad variable son entre $3,35 - 4,55$ ppm,
211 donde el patrón de señales se mantiene
212 aproximadamente pero la intensidad varía.

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

217 **D** – Proceder según se describe en
218 Identificación D en *Heparina Sódica Porcina*,
219 empleando *Heparina Cálcica Porcina* en lugar de
220 Heparina Sódica Porcina. El tiempo de
221 retención y la forma del pico principal en el
222 cromatograma obtenido a partir de la Solución
223 muestra para identificación se debe
224 corresponder con el pico principal obtenido
225 con la Solución estándar C.

226 **E** - Debe cumplir con el ensayo descrito en
227 Calcio.

228 **Calcio**

229 Pesar exactamente alrededor de 200 mg de
230 Heparina Cálcica Porcina, transferir a un
231 erlenmeyer de 500 mL y agregar 300 mL de
232 agua. Agregar 6 mL de solución de hidróxido de
233 sodio al 42 % y 15 mg de una mezcla de cloruro
234 de sodio y ácido calcona carboxílico (99:1).
235 Titular con edetato disódico $0,1$ M (SV) hasta
236 que el color cambie de violeta a azul nítido (ver
237 780. Volumetría). Cada mL de edetato disódico
238 $0,1$ M equivale a $4,008$ mg de Calcio (Ca). No
239 debe contener menos de $9,5$ ni más de $11,5$ por
240 ciento de Calcio, calculado sobre la sustancia
241 seca.

242 **Ensayo de endotoxinas** 243 **bacterianas <330>**

244 Cuando Heparina Cálcica Porcina
245 esté destinada para preparaciones
246 parenterales que no se sometan a un
247 tratamiento posterior de eliminación
248 de endotoxinas bacterianas, no debe
249 contener más de $0,01$ Unidades de
250 Endotoxina (UE) por UI de Heparina. El
251 agregado de cationes divalentes puede
252 ser necesario para cumplir con el
253 criterio de validación del ensayo.

254 **VALORACIÓN**

255 Proceder según se indica en
256 Valoración en Heparina Sódica Porcina.

257 **ROTULADO**

258 Indicar en el rótulo el número de
259 Unidades Internacionales por
260 miligramo y la especie animal de la cual
261 fue obtenida.

262

263

264