

1 HEPARINA SÓDICA PORCINA

2 **Definición** - Heparina Sódica Porcina es
3 Heparina sódica no fraccionada de origen
4 porcino. Es una preparación que contiene la
5 sal sódica de glicosaminoglicanos (GAGs)
6 sulfatados presentes en tejidos de mamíferos de
7 dicha especie. La Heparina se define como una
8 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.

20 Su peso molecular es de aproximadamente
21 15.000 a 19.000 Daltons. La identidad de
22 especie se verifica durante la producción; y
23 señales características de estructura y de
24 origen en el espectro de RMN-H¹.

25 La Heparina Sódica Porcina presenta la
26 propiedad de retrasar la coagulación
27 sanguínea potenciando con alta afinidad la
28 acción de la antitrombina III sobre los factores
29 de la coagulación como la trombina (factor
30 IIa) y el factor Xa. La actividad de la Heparina
31 Sódica Porcina destinada a la administración
32 parenteral debe ser mayor o igual a 180 UI por
33 miligramo, calculada sobre la sustancia seca y
34 determinada por el ensayo de Actividad anti-
35 factor IIa, según se describe en Valoración. La
36 actividad de la Heparina Sódica Porcina no
37 destinada a la administración parenteral debe
38 ser mayor o igual a 120 UI por miligramo,
39 calculada sobre la sustancia seca determinada
40 por el mismo método. La potencia calculada
41 sobre base seca no debe ser menor al 90,0 por
42 ciento ni mayor al 111,0 por ciento de la
43 potencia declarada. Heparina Sódica Porcina
44 debe cumplir con las siguientes
45 especificaciones.

46 PRODUCCIÓN

47 La Heparina Sódica Porcina se
48 obtiene a partir de mucosa intestinal de
49 animales de dicha especie que cumplen
50 con los requerimientos de animales
51 sanos apropiados para el consumo
52 humano y debe contar con la
53 autorización de la Autoridad Sanitaria
54 competente y Certificación sanitaria del
55 país de origen. El proceso de
56 manufactura debe estar validado para
57 demostrar la apropiada inactivación o
58 remoción de cualquier contaminación
59 por virus u otro agente infeccioso como
60 para minimizar o eliminar la
61 contaminación microbiana. Los
62 solventes utilizados durante el proceso
63 de fabricación deben ser
64 mayoritariamente eliminados o
65 identificados y evaluado su impacto.

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

90 **Caracteres generales** - Polvo
91 higroscópico blanco o casi blanco.
92 Fácilmente soluble en agua obteniéndose
93 una solución clara. Prácticamente
94 insoluble en solventes orgánicos como
95 etanol, acetona, cloroformo, entre
96 otros.

97 **Sustancias de referencia** – Heparina
 98 Sódica Porcina para identificación por RMN-H
 99 SR-FA; Heparina Porcina SR-FA; Heparina
 100 para análisis fisicoquímico SR-FA; Dermatán
 101 Sulfato y Condroitín Sulfato Polisulfatado SR-
 102 FA.

103 **CONSERVACIÓN**

104 En envase hermético de cierre inviolable, a
 105 temperatura ambiente, proteger de la
 106 humedad.

107 **ENSAYOS**

108 **Identificación**

109 **A** - Debe cumplir con los requerimientos
 110 descritos en Valoración.

111 **B** - La relación de actividad anti-factor Xa y
 112 anti-factor IIa debe estar comprendida entre
 113 0,9 – 1,1.

114 Para la determinación de la actividad anti-
 115 factor IIa, proceder según se indica para
 116 Actividad anti-factor IIa en Valoración.

117 Para la determinación de la actividad anti-
 118 factor Xa por método cromogénico, proceder
 119 según se indica a continuación:

120 Solución reguladora tris(hidroximetil)
 121 aminometano - Proceder según se indica en
 122 Valoración.

123 [NOTA: se puede reemplazar el
 124 polietilenglicol 6.000 por 2,00 g de albúmina
 125 bovina o humana (en este caso, tener la
 126 precaución de evitar la formación de burbujas
 127 o espuma)].

128 Solución de antitrombina III 1,0 UI por mL
 129 - Reconstituir el vial de antitrombina III tal
 130 como establece el fabricante, teniendo en
 131 cuenta sus indicaciones de conservación.
 132 Diluir para obtener la concentración de 1,0 UI
 133 por mL con Solución reguladora tris
 134 (hidroximetil) aminometano - EDTA pH 8,4
 135 considerando el volumen necesario para el
 136 ensayo. Esta dilución debe ser preparada,
 137 utilizada y descartada en el día.

138 Solución de factor Xa bovino - Reconstituir
 139 el vial de factor Xa bovino tal como establece
 140 el fabricante, teniendo en cuenta sus
 141 indicaciones de conservación. Diluir con
 142 Solución reguladora
 143 tris(hidroximetil)aminometano - EDTA pH 8,4,

144 para obtener una
 145 absorbancia comprendida entre 0,65 y
 146 1,25, a 405 nm, cuando se determina la
 147 actividad amidolítica del Blanco de
 148 reacción siguiendo el Procedimiento
 149 por el método de punto final. Esta
 150 dilución debe ser preparada, utilizada y
 151 descartada en el día.

152 Solución de sustrato cromogénico
 153 específico para factor Xa 1,0 mM - [(N-
 154 α -benciloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-
 155 arginina-4-nitroanilida
 156 dihidrocloruro)]. Reconstituir y
 157 conservar según las indicaciones del
 158 fabricante. Diluir en agua, según el
 159 volumen necesario para el ensayo, para
 160 obtener una concentración de 1,0 mM.
 161 Esta dilución debe protegerse de la luz.
 162 Utilizar y descartar en el día.

163 Blanco de reacción - Determinar la
 164 actividad amidolítica del blanco al
 165 inicio y al final del Procedimiento,
 166 utilizando la Solución reguladora tris
 167 (hidroximetil)aminometano - EDTA pH
 168 8,4 en lugar de la Preparación estándar
 169 y de la Preparación muestra. Su
 170 resultado indica el máximo de
 171 absorbancia que puede obtenerse en
 172 las condiciones del Procedimiento y
 173 debe realizarse en cada ensayo y en la
 174 curva de calibración. Los valores de los
 175 dos blancos no deben diferir
 176 significativamente entre sí, de acuerdo
 177 al porcentaje establecido en la puesta a
 178 punto del ensayo, no debiendo ser
 179 mayor a un 10 %.

180 Solución estándar - Rotular 16
 181 tubos y preparar 4 series
 182 independientes de 4 diluciones cada
 183 una (dosis) de Heparina Porcina SR-FA
 184 (E₁, E₂, E₃ y E₄ por cada serie) en
 185 Solución reguladora
 186 tris(hidroximetil)aminometano - EDTA
 187 pH 8,4, en un intervalo de
 188 concentración comprendido entre 0,03
 189 UI por mL y 0,375 UI por mL.

190 Solución muestra - Rotular 16 tubos
 191 y preparar 4 series independientes de 4
 192 diluciones cada una (dosis) de la
 193 Heparina Sódica Porcina a examinar
 194 (M₁, M₂, M₃ y M₄ por cada serie) en
 195 Solución reguladora tris(hidroximetil)

196 aminometano - EDTA pH 8,4, en un intervalo
197 de concentración comprendido entre 0,03 UI
198 por mL y 0,375 UI por mL. Las dosis se
199 establecen según se indica en Curva de
200 Calibración.

201 [NOTA: las dosis de la Preparación
202 estándar y la Preparación muestra deben ser
203 equipotentes].

204 Curva de calibración - Se realiza para
205 definir las dosis a utilizar en el ensayo. Las
206 dosis deben dar una respuesta lineal cuando
207 los resultados se grafican como absorbancia
208 en función del logaritmo (Log10) de la
209 concentración y cumplir con el parámetro de
210 regresión según se especifica en el método
211 estadístico utilizado para el Cálculo de
212 actividad. [NOTA: ante el no cumplimiento de
213 parámetros estadísticos en los ensayos, se
214 puede realizar nuevamente una curva de
215 calibración para el re-ajuste de las dosis;
216 además se sugiere su realización ante cambio
217 de lote de reactivos].

218 Procedimiento - La determinación se
219 realiza en microplaca de 96 pocillos de fondo
220 plano utilizando un incubador de placas seco
221 y un lector de placas seteado a 405 nm.
222 [NOTA: la medición de los tiempos de reacción
223 debe ser iniciada a partir del agregado de un
224 determinado reactivo a la primera fila de
225 pocillos.]. Transferir a una microplaca 50 µL
226 de cada uno de los 16 tubos de la Solución
227 estándar y 16 tubos de la Solución muestra
228 con la siguiente distribución a modo de
229 ejemplo: E₁, E₂, E₃, E₄, M₁, M₂, M₃, M₄ por fila,
230 en 4 filas consecutivas. Colocar la microplaca
231 en el incubador de placas a una temperatura
232 de 37 °C. Agregar inmediatamente a cada
233 pocillo 50 µL de Solución de antitrombina III
234 1,0 UI por mL. Dejar atemperar a 37°C
235 durante 1 minuto. Agregar a cada pocillo 100
236 µL de Solución de factor Xa bovino. Incubar
237 exactamente 2 minutos a 37°C. Agregar a cada
238 pocillo 100 µL de Solución de sustrato
239 cromogénico específico para factor Xa.

240 Medición de la respuesta:

241 - Método cinético: medir el cambio de
242 absorbancia por minuto.

243 - Método de punto final: detener la
244 reacción después de exactamente 4
245 minutos agregando a cada pocillo 50 µL
246 de una solución de ácido acético glacial al

247 20 % v/v.

248 Luego, medir la absorbancia.

249 [NOTA: durante la puesta a punto
250 del método, el tiempo de
251 incubación de 4 minutos puede
252 ser ajustado para conseguir
253 lecturas óptimas de absorbancias
254 y la mejor curva dosis-respuesta.
255 La generación de burbujas
256 interfiere en la medición de la
257 respuesta del ensayo].

258 [NOTA: Los volúmenes citados en el
259 texto se dan a título indicativo y
260 pueden ser adaptados siempre que se
261 respeten las proporciones indicadas].

262 Cálculo de la actividad - Utilizar
263 métodos estadísticos para ensayos de
264 líneas paralelas (ver 3.2 Modelo de
265 líneas paralelas en 10. Análisis
266 estadístico de resultados de ensayos
267 biológicos), para evaluar la regresión
268 de la absorbancia en función de los
269 logaritmos de la concentración (log 10)
270 de estándar y muestra. Calcular la
271 actividad anti-factor Xa de la Heparina
272 Sódica Porcina en ensayo, en Unidades
273 Internacionales por mililitro y
274 referenciar a Unidades Internacionales
275 por miligramo. Utilizar el valor
276 obtenido para calcular la relación de
277 actividades anti-factor Xa / anti-factor
278 IIa para evaluar el cumplimiento del
279 criterio de aceptación establecido.

280 C - Analizar por Espectrometría de
281 resonancia magnética nuclear (H-RMN)
282 (ver 473. Espectroscopía de
283 Resonancia Magnética Nuclear).

284 Solución A - Preparar una solución
285 en óxido de deuterio que contenga 20
286 µg por mL de trimetilsilil propionato de
287 sodio deuterado (TSP-d₄) o trimetilsilil
288 propano sulfonato de sodio deuterado
289 (DSS-d₆) y si la señal a 5,22 ppm es
290 inferior al 80 % de la señal a 5,42 ppm,
291 adicionar 12 µg por mL de edetato
292 disódico. [NOTA: El almacenamiento de
293 soluciones de óxido de deuterio (con o
294 sin TSP-d₄) debe realizarse en envases
295 de vidrio. En caso de almacenar las
296 soluciones que contengan EDTA las
297 mismas deben mantenerse en botellas
298 de polietileno natural de alta densidad].

299	Solución muestra - Disolver 20 mg de	344	- El
300	Heparina Sódica Porcina en 0,7 mL de	345	espectro ^1H -RMN obtenido con
301	Solución A.	346	la Solución muestra y la
302	Solución estándar - Disolver 20 mg de	347	Solución estándar se comparan
303	Heparina Sódica Porcina para identificación	348	cualitativamente luego que los
304	por RMN-H SR-FA en 0,7 mL de Solución A.	349	dos espectros hayan sido
305	Aparato - Emplear un espectrómetro de	350	normalizados para tener
306	RMN por pulsos operando a un mínimo de 300	351	similar intensidad; se puede
307	MHz.	352	observar el dermatán sulfato
308	Adquisición de espectros de ^1H -RMN:	353	con una señal metilo a $2,08 \pm$
309	[NOTA: la Solución muestra y la Solución	354	$0,02$ ppm; no deben estar
310	estándar deben medirse el mismo día].	355	presentes señales no
311	- Número de transientes: mínimo 16; se	356	identificadas superiores al 4 %
312	ajusta hasta que la relación señal-ruido sea de	357	comparadas con la altura de la
313	al menos 1000:1 para la señal del metilo de la	358	señal de heparina a 5,42 ppm
314	heparina a 2,04 ppm;	359	en los rangos 0,10 - 2,00 ppm,
315	- Temperatura: alrededor de 25°C ; [NOTA:	360	2,10 - 3,10 ppm y 5,70 - 8,00
316	los espectros de la Solución muestra y la	361	ppm; señales de solventes y
317	Solución estándar deben obtenerse a la misma	362	otras sustancias relacionadas
318	temperatura];	363	al proceso pueden estar
319	- Tiempo de adquisición: mínimo 2	364	presentes debiendo estar
320	segundos;	365	identificadas para ser
321	- Tiempo de repetición (tiempo de	366	aceptadas. Pueden ocurrir
322	adquisición más retardo): mínimo 4 a 10	367	variaciones de la intensidad en
323	segundos dependiendo del ancho de pulso;	368	algunas regiones de señales
324	- Ancho espectral: 10 - 12 ppm, centrado	369	del espectro de heparina: las
325	en alrededor de 4,5 ppm;	370	regiones de intensidad
326	- Ancho de pulso: para dar un ángulo de	371	variable son entre 3,35 - 4,55
327	volteo entre 30° y 90° .	372	ppm, donde el patrón de
328	Procesamiento -	373	señales se mantiene
329	- Ensanchamiento de línea con función	374	aproximadamente pero la
330	de ventana exponencial: máximo 0,3	375	intensidad varía.
331	Hz;	376	- Ausencia de condroitín sulfato
332	- Transformación de Fourier;	377	sobresulfatado: no se debe
333	- Corrección de fase y línea de base.	378	encontrar ninguna
334	- Señal de referencia de trimetilsilil	379	característica relacionada con
335	propionato o trimetilsilil	380	condroitín sulfato
336	propanosulfonato establecida en 0,00	381	sobresulfatado entre 2,12 y
337	ppm.	382	3,00 ppm.
338	Resultados -	383	D – Proceder según se describe en
339	- Las señales principales de la heparina	384	Sustancias Relacionadas con las
340	sódica porcina deben estar presentes:	385	siguientes modificaciones:
341	2,04 ppm, 3,27 ppm (doblete), 4,34	386	Solución muestra para
342	ppm, 5,22 ppm y 5,42 ppm, todas	387	identificación - Pesar exactamente
343	dentro de $\pm 0,03$ ppm.	388	alrededor de 50 mg de Heparina
		389	Sódica Porcina y disolver en 5,0 mL de
		390	agua. Mezclar empleando mezclador
		391	vórtex hasta disolución completa.
		392	Aptitud del sistema (ver 100.
		393	Cromatografía) - Cromatografiar las
		394	Soluciones estándar C según se indica
		395	en Procedimiento: el tiempo de

396 retención del pico de heparina es
 397 aproximadamente 26 minutos; los tiempos de
 398 retención relativos al pico de heparina son de
 399 aproximadamente 0,9 para el dermatán
 400 sulfato y condroitín sulfato; y 1,3 para el
 401 condroitín sulfato polisulfatado; la relación
 402 pico/valle, determinada por la relación entre
 403 la altura por encima de la línea de base del
 404 pico correspondiente a dermatán sulfato y
 405 condroitín sulfato Hp y la altura por encima de
 406 la línea de base del punto más bajo de la curva
 407 que separa este pico del pico correspondiente
 408 a la heparina Hv, no debe ser menor de 1,3.

409 *Procedimiento* - Inyectar por separado
 410 volúmenes iguales (20 µL) de la Solución
 411 estándar C y la Solución muestra para
 412 identificación. Registrar los cromatogramas y
 413 medir las respuestas de los picos principales. El
 414 tiempo de retención y la forma del pico principal
 415 en el cromatograma obtenido a partir de la
 416 Solución muestra para identificación se debe
 417 corresponder con el pico principal obtenido
 418 con la Solución estándar C.

419 **E** - Debe cumplir con el ensayo descrito en
 420 Sodio.

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

422 Disolver una cantidad equivalente a 50.000
 423 UI de Heparina Sódica Porcina en agua y diluir
 424 a 10,0 mL con el mismo solvente. Emplear
 425 tubos de ensayo idénticos de vidrio incoloro,
 426 transparente y neutro, con un diámetro
 427 interno de entre 15 y 25 mm. Comparar
 428 observando verticalmente los tubos sobre un
 429 fondo blanco con luz natural difusa. Se debe
 430 obtener una solución clara cuando se compara
 431 con el agua purificada.

432 **Determinación de pH <250>**

433 Entre 5,5 y 8,0. Disolver 0,1 g de Heparina
 434 Sódica Porcina en agua libre de dióxido de
 435 carbono y diluir a 10,0 mL con el mismo
 436 solvente.

437 **Impurezas nucleotídicas**

438 Disolver 40 mg de Heparina Sódica Porcina
 439 en agua, transferir a un matraz aforado de 10
 440 mL, completar a volumen con el mismo
 441 solvente y mezclar. La absorbancia de esta
 442 solución (ver 470. Espectrofotometría
 443 ultravioleta y visible), determinada a 260 nm,
 444 no debe ser mayor de 0,15.

445 **Proteínas**

446 Solución A - Mezclar 2 volúmenes
 447 de una solución 10 g por litro de
 448 hidróxido de sodio y 2 volúmenes de
 449 una solución 50 g por litro de
 450 carbonato de sodio y diluir hasta 5
 451 volúmenes con agua.

452 Solución B - Mezclar 2 volúmenes
 453 de una solución 12,5 g por litro de
 454 sulfato de cobre pentahidratado y 2
 455 volúmenes de una solución 29,8 g por
 456 litro de tartrato de sodio y diluir hasta
 457 5 volúmenes con agua.

458 Solución C - Solución A y Solución B
 459 (50:1).

460 Solución D - Diluir 1 volumen de
 461 Folin - Ciocalteu para fenoles (SR) en 2
 462 volúmenes de agua, de manera tal que
 463 al ser agregado a la Solución muestra y
 464 a las Soluciones estándar luego de la
 465 adición de la Solución C, el pH final se
 466 encuentre entre $10,25 \pm 0,25$.

467 Solución muestra - Disolver la
 468 Heparina Sódica Porcina en agua para
 469 obtener una solución de
 470 aproximadamente 5 mg por mL.

471 Soluciones estándar - Disolver
 472 albúmina bovina (contiene
 473 aproximadamente un 96 % de
 474 proteína) en agua para obtener una
 475 solución de aproximadamente 100 mg
 476 por mL. Preparar diluciones de esta
 477 solución en agua para obtener al menos
 478 cinco soluciones de referencia con
 479 concentraciones de proteína
 480 uniformemente distribuidas en un
 481 intervalo adecuado de entre 5 µg por
 482 mL y 100 µg por mL.

483 Blanco - Agua.

484 *Procedimiento* - A 1,0 mL de cada
 485 Solución estándar, de la Solución
 486 muestra y del Blanco, agregar 5,0 mL
 487 de Solución C. Dejar reposar durante 10
 488 minutos y agregar 0,5 mL de Solución
 489 D, mezclar y dejar reposar a
 490 temperatura ambiente durante 30
 491 minutos. Filtrar a través de un filtro de
 492 membrana de 0,45 µm. Determinar las
 493 absorbancias a 750 nm (ver 470.
 494 Espectrofotometría ultravioleta y

visible) de todas las soluciones, empleando la solución preparada a partir del Blanco para llevar a cero el equipo. Obtener por regresión lineal la curva estándar a partir del gráfico de absorbancia de las soluciones estándar en función de concentración de proteína. Determinar la concentración de proteína en la Solución muestra. No debe contener más de 0,5 % calculado sobre la sustancia seca.

504 Sustancias relacionadas

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 202 nm, una precolumna de 5 cm × 2 mm con fase estacionaria constituida por resina de intercambio aniónico fuertemente básica de tamaño de partículas de 13 µm y una columna de 25 cm × 2 mm con fase estacionaria constituida por resina de intercambio aniónico fuertemente básica (resina aglomerada con látex funcionalizado con amonio cuaternario, reticulado con etilvinilbenceno-divinilbenceno) de partículas de 9 µm. La temperatura de la columna debe ser de aproximadamente 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 0,22 mL por minuto. El cromatógrafo debe programarse del 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

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

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

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

Solución muestra - Pesar exactamente alrededor de 0,1 g de Heparina Sódica Porcina y disolver en 1,0 mL de agua. Mezclar empleando mezclador vórtex hasta disolución completa. Mezclar 500 µL de esta solución y 250 µL de ácido clorhídrico 1 M, luego agregar 50 µL de una solución de nitrito de sodio 250 mg por mL. Mezclar suavemente y dejar reposar a temperatura ambiente durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo, agregar 200 µL de hidróxido de sodio 1 M para detener la reacción.

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

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

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

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

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

Solución estándar E - A 500 µL de Solución estándar B, agregar 250 µL de ácido clorhídrico 1M, a continuación agregar 50 µL de una solución de

582 nitrito de sodio de aproximadamente 250 mg
583 por mL. Mezclar suavemente y dejar reposar a
584 temperatura ambiente durante 40 minutos.
585 Transcurrido este tiempo, agregar 200 µL de
586 hidróxido de sodio 1 M para detener la
587 reacción.

588 Aptitud del sistema (ver 100.
589 Cromatografía) - Cromatografiar las
590 Soluciones estándar D y E según se indica en
591 Procedimiento: el cromatograma obtenido
592 con la Solución estándar D no debe presentar
593 ningún pico al tiempo de retención de
594 heparina. En el cromatograma obtenido a
595 partir de la Solución estándar E, la resolución
596 R entre el pico de dermatán sulfato y
597 condroitín sulfato, y el pico de condroitín
598 sulfato polisulfatado no debe ser menor de
599 3,0.

600 Procedimiento - Inyectar por separado en
601 el cromatógrafo volúmenes iguales
602 (aproximadamente 20 µL) de la Solución E y
603 la Solución muestra, registrar los
604 cromatogramas y medir las respuestas de
605 todos los picos. La respuesta del pico
606 correspondiente a la suma de dermatán
607 sulfato y condroitín sulfato en el
608 cromatograma obtenido a partir de la Solución
609 muestra, no debe ser mayor a la respuesta del
610 pico correspondiente a la suma de dermatán
611 sulfato y condroitín sulfato en el
612 cromatograma obtenido con la Solución
613 estándar E (2,0 %); la respuesta de ningún
614 otro pico en el cromatograma obtenido a
615 partir de la Solución muestra debe ser mayor
616 a 0,01 veces la respuesta del pico
617 correspondiente a dermatán sulfato y
618 condroitín sulfato en el cromatograma
619 obtenido con la Solución estándar E (0,02 %).
620 Descartar los picos que aparecen durante la
621 etapa isocrática inicial.

622 **Determinación de Nitrógeno**

623 Método semi-micro

624 Solución mixta de rojo de metilo - Disolver
625 0,1 g de rojo de metilo y 50 mg de azul de
626 metileno en 100 mL de etanol (96 %),
627 (cambio de color: pH 5,2 (rojo-violeta) a pH
628 5,6 (verde)).

629 Procedimiento - Transferir una cantidad
630 de la sustancia en ensayo, exactamente
631 pesada, que contenga aproximadamente 2 mg
632 de nitrógeno, al balón de digestión; añadir 4 g

633 de una mezcla en
634 polvo de 100 g de sulfato dipotásico, 5
635 g de sulfato de cobre pentahidratado y
636 2,5 g de selenio, y tres perlas de vidrio.
637 Lavar cualquier partícula adherida del
638 cuello del balón con 5 mL de ácido
639 sulfúrico, dejándolo escurrir por las
640 paredes del balón, y mezclar el
641 contenido por rotación. Cerrar la boca
642 del balón sin apretar, por ejemplo, con
643 una pera de vidrio de vástago corto,
644 para evitar una pérdida excesiva de
645 ácido sulfúrico. Calentar gradualmente
646 al principio y luego aumentar la
647 temperatura hasta que se produzca una
648 ebullición vigorosa con condensación
649 de ácido sulfúrico en el cuello del balón.
650 [NOTA: se deben tomar precauciones
651 para evitar que la parte superior del
652 balón se sobrecaliente]. Continuar el
653 calentamiento durante 30 minutos, a
654 menos que se indique lo contrario.
655 Enfriar, disolver el material sólido
656 agregando con cuidado a la mezcla 25
657 mL de agua, enfriar nuevamente y
658 colocar en un aparato de destilación
659 por vapor. Agregar 30 mL de hidróxido
660 de sodio al 40% y destilar
661 inmediatamente haciendo pasar vapor
662 a través de la mezcla. Recolectar
663 alrededor de 40 mL de destilado en
664 20,0 mL de ácido clorhídrico 0,01 M y
665 suficiente agua para cubrir la punta del
666 condensador. Hacia el final de la
667 destilación, bajar el receptor de modo
668 que la punta del condensador esté por
669 encima de la superficie del ácido.
670 [NOTA: tomar precauciones para evitar
671 que el agua en la superficie exterior del
672 condensador alcance el contenido del
673 receptor.] Valorar el destilado con
674 hidróxido de sodio 0,01 M, empleando
675 Solución mixta de rojo de metilo como
676 indicador. Registrar el volumen
677 consumido de hidróxido de sodio 0,01
678 M en mL como n₁. Repetir la prueba
679 utilizando aproximadamente 50 mg de
680 glucosa en lugar de la sustancia a
681 examinar. Registrar el volumen
682 consumido de hidróxido de sodio 0,01
683 M en mL como n₂. Determinar el
684 contenido de nitrógeno en la porción
685 de la sustancia en ensayo, por la
686 fórmula siguiente:

687 $0,01401 \frac{(n_2 - n_1)}{m} \%$
688 m

689 en la cual m es la cantidad en mg de Heparina
690 Sódica Porcina en ensayo y los otros términos
691 son los descritos anteriormente. Debe
692 contener entre 1,5 y 2,5 %, con respecto a la
693 sustancia seca; determinado sobre 100 mg.

694 **Sodio**

695 Determinar por espectrofotometría de
696 absorción atómica (ver Método I en 440.
697 Espectrofotometría de absorción y emisión
698 atómica).

699 Solución madre del estándar - Transferir
700 una cantidad de cloruro de sodio que
701 corresponda a 0,509 g de cloruro de sodio a
702 un matraz aforado de 100 mL, disolver y
703 completar a volumen con agua.

704 Solución madre del estándar diluida (200
705 ppm Na) - Inmediatamente antes de su
706 empleo, transferir 1,0 mL de Solución madre
707 del estándar a un matraz aforado de 10 mL,
708 completar a volumen con agua y mezclar.

709 Diluyente - Preparar una solución en ácido
710 clorhídrico 0,1 M que contenga 1,27 mg de
711 cloruro de cesio por mL.

712 Soluciones estándar - Preparar soluciones
713 de aproximadamente 25, 50 y 75 ppm de
714 sodio, a partir de la Solución madre del
715 estándar diluida (200 ppm Na) en Diluyente.

716 Solución muestra - Pesar exactamente 50
717 mg de Heparina Sódica Porcina, disolver
718 Diluyente y diluir a 100 mL con el mismo
719 solvente.

720 Procedimiento - Determinar
721 concomitantemente las absorbancias de las
722 Soluciones estándar y la Solución muestra a
723 330,3 nm con un espectrofotómetro de
724 absorción atómica, equipado con una lámpara
725 de sodio de cátodo hueco como fuente de
726 radiación y una llama de aire-acetileno de
727 composición adecuada (aproximadamente 11
728 litros de aire y 2 litros de acetileno por
729 minuto). Debe contener entre 10,5 y 13,5 %
730 de sodio, con respecto a la sustancia seca.

731 **Pérdida por secado <680>**

732 Secar 1,0 g de Heparina Sódica Porcina en
733 estudio a 60 °C sobre pentóxido de fósforo a

734 una presión que
735 no exceda los 670 Pa durante 3 hs: no
736 debe perder más de 8,0 % de su peso.

737 **Ensayo de endotoxinas** 738 **bacterianas <330>**

739 Cuando Heparina Sódica Porcina
740 esté destinada para preparaciones
741 parenterales que no se sometan a un
742 tratamiento posterior de eliminación
743 de endotoxinas bacterianas, no debe
744 contener más de 0,01 Unidades de
745 Endotoxina (UE) por UI de Heparina.

746 **Solventes residuales <715>**

747 Debe cumplir con los requisitos.

748 **VALORACIÓN**

749 La actividad anticoagulante se
750 determina in vitro mediante un método
751 cromogénico por comparación de su
752 capacidad para acelerar la inhibición de
753 la trombina (factor IIa) por la
754 antitrombina, en comparación a la
755 Heparina Sódica Porcina SR-FA.

756 **Actividad anti-factor IIa**

757 Solución reguladora
758 tris(hidroximetil) aminometano - EDTA
759 pH 8,4 - Disolver 10,20 g de cloruro de
760 sodio, 6,10 g de tris(hidroximetil)
761 aminometano, 2,80 g de edetato
762 disódico y 1,00 g de polietilenglicol
763 6.000 al 0,1% en 800 mL de agua.
764 Ajustar el pH a 8,4 con ácido
765 clorhídrico y diluir a 1,0 litro con agua.

766 [NOTA: se puede reemplazar el
767 polietilenglicol 6.000 por 2,00 g de
768 albúmina bovina o humana (en este
769 caso, tener la precaución de evitar la
770 formación de burbujas o espuma)].

771 Solución de antitrombina III 0,125
772 UI por mL - Reconstituir el vial de
773 antitrombina III tal como establece el
774 fabricante, teniendo en cuenta sus
775 indicaciones de conservación. Diluir,
776 según el volumen necesario para el
777 ensayo, a 0,125 UI por mL con Solución
778 reguladora tris(hidroximetil)
779 aminometano - EDTA pH 8,4. Esta
780 dilución debe ser preparada, utilizada y
781 descartada en el día.

782 Solución de trombina humana 5 UI por mL
 783 -

784 Reconstituir el vial de trombina humana tal
 785 como establece el fabricante. Diluir a 5 UI por
 786 mL con Solución reguladora tris(hidroximetil)
 787 aminometano - EDTA pH 8,4 . Esta dilución
 788 debe ser preparada en tubos plásticos por su
 789 adsorción al vidrio, inmediatamente antes de
 790 su uso. Utilizar y descartar en el día.

791 Solución de sustrato cromogénico
 792 específico para factor IIa 1,25 mM - [(D-
 793 fenilalanil -L-pipecolil-L-arginina-4-
 794 nitroanilida dihidrocloruro)]. Reconstituir y
 795 conservar según las indicaciones del
 796 fabricante. Diluir en agua, según el volumen
 797 necesario para el ensayo, para obtener una
 798 concentración aproximadamente de 1,25 mM.
 799 Esta dilución debe protegerse de la luz.
 800 Utilizar y descartar en el día.

801 Blanco de reacción - Determinar la
 802 actividad amidolítica del blanco al inicio y al
 803 final del Procedimiento, utilizando la Solución
 804 reguladora tris (hidroximetil)aminometano -
 805 EDTA pH 8,4 en lugar de la Preparación
 806 estándar y de la Preparación muestra. Su
 807 resultado indica el máximo de absorbancia
 808 que puede obtenerse en las condiciones del
 809 Procedimiento y debe realizarse en cada
 810 ensayo y en la curva de calibración. Los
 811 valores de los dos blancos no deben diferir
 812 significativamente entre sí, de acuerdo al
 813 porcentaje establecido en la puesta a punto
 814 del ensayo, no debiendo ser mayor a un 10 %.

815 Preparación estándar - Rotular 16 tubos y
 816 preparar 4 series independientes de 4
 817 diluciones cada una (dosis) de Heparina
 818 Porcina SR-FA (E₁, E₂, E₃ y E₄ por cada serie)
 819 en Solución reguladora tris(hidroximetil)
 820 aminometano - EDTA pH 8,4, en un intervalo
 821 de concentración de 0,005 UI por mL a 0,03 UI
 822 por mL. Las dosis se establecen según se
 823 indica en Curva de Calibración.

824 Preparación muestra - Rotular 16 tubos y
 825 preparar 4 series independientes de 4
 826 diluciones cada una (dosis) de la Heparina
 827 Sódica Porcina (M₁, M₂, M₃ y M₄ por cada serie)
 828 en Solución reguladora tris(hidroximetil)
 829 aminometano - EDTA pH 8,4, en un rango de
 830 concentración de 0,005 UI por mL a 0,03 UI
 831 por mL. Las dosis se establecen según se
 832 indica en Curva de Calibración.

833 [NOTA: las
 834 dosis de la Preparación estándar y la
 835 Preparación muestra deben
 836 equipotentes].

837 Curva de calibración - Se realiza
 838 para definir las dosis a utilizar en el
 839 ensayo. Preparar una serie de
 840 diluciones (al menos 4 dosis) de la
 841 Preparación estándar en progresión
 842 geométrica utilizando como diluyente
 843 Solución reguladora tris(hidroximetil)
 844 aminometano - EDTA pH 8,4 en el
 845 rango de concentración de 0,005 UI por
 846 mL a 0,03 UI por mL. Realizar el ensayo
 847 según se indica en Procedimiento. Las
 848 dosis seleccionadas deben dar una
 849 respuesta lineal cuando los resultados
 850 obtenidos se grafican como
 851 absorbancia en función del logaritmo
 852 (Log 10) de la concentración; y deben
 853 cumplir con el parámetro de regresión
 854 según se especifica en el método
 855 estadístico utilizado para el Cálculo de
 856 actividad. [NOTA: ante el no
 857 cumplimiento de parámetros
 858 estadísticos en los ensayos, se puede
 859 realizar nuevamente una curva de
 860 calibración para su re-ajuste de dosis;
 861 se sugiere su realización ante el cambio
 862 de lote de reactivos].

863 Procedimiento - La determinación
 864 se realiza en microplaca de 96 pocillos
 865 de fondo plano utilizando un incubador
 866 de placas y un lector de placas seteado
 867 en 405 nm. [NOTA: La medición de los
 868 tiempos de reacción debe ser iniciada a
 869 partir del agregado de un determinado
 870 reactivo a la primera fila de pocillos].
 871 Transferir a una microplaca 50 µL de
 872 cada uno de los 16 tubos de la
 873 Preparación estándar y 16 tubos de la
 874 Preparación muestra con la siguiente
 875 distribución E₁, E₂, E₃, E₄, M₁, M₂, M₃, M₄
 876 por fila en 4 filas consecutivas. Colocar
 877 la microplaca en el incubador de placas
 878 a una temperatura de 37 °C. Agregar
 879 inmediatamente a cada pocillo 100 µL
 880 de Solución de antitrombina III 0,125
 881 UI por mL. Dejar atemperar a 37 °C
 882 durante al menos 1 minuto. Agregar a
 883 cada pocillo 25 µL de Solución de
 884 trombina humana 5 UI por mL. Incubar
 885 exactamente 1 minuto a 37°C. Agregar
 886 a cada pocillo 50 µL de Solución de

887	sustrato cromogénico específico para factor	937	Indicar en el
888	Ila 1,25 mM.	938	rótulo el número de Unidades
889	Medición de la respuesta:	939	Internacionales por miligramo y la
890	- Método cinético: medir el cambio de	940	especie animal de la cual fue obtenida.
891	absorbancia por minuto.	941	
892	- Método de punto final: detener la	942	
893	reacción después de exactamente 4	943	
894	minutos agregando a cada pocillo 50 µL	944	
895	de una solución de ácido acético glacial al	945	
896	20 % v/v. Luego, medir la absorbancia.	946	
897	[NOTA: durante la puesta a punto del	947	
898	método, el tiempo de incubación de 4	948	
899	minutos puede ser ajustado para	949	
900	conseguir lecturas óptimas de	950	
901	absorbancias y la mejor curva dosis-		
902	respuesta. La generación de burbujas		
903	interfiere en la medición de la respuesta		
904	del ensayo].		
905	[NOTA: Los volúmenes citados en el texto		
906	se dan a título indicativo y pueden ser		
907	adaptados siempre que se respeten las		
908	proporciones indicadas].		
909	Cálculo de la actividad - Utilizar métodos		
910	estadísticos para ensayos de líneas paralelas		
911	(ver 3.2 Modelo de líneas paralelas en 10.		
912	Análisis estadístico de resultados de ensayos		
913	biológicos) para evaluar la regresión de la		
914	absorbancia en función de los logaritmos de la		
915	concentración (Log10) de estándar y muestra.		
916	Efectuar no menos de tres valoraciones		
917	independientes. Para cada una de ellas		
918	preparar diluciones nuevas de la Preparación		
919	estándar y la Preparación muestra.		
920	Calcular la potencia de la Heparina Sódica		
921	Porcina en ensayo en Unidades		
922	Internacionales por mililitro a partir de la		
923	combinación de los resultados de los tres		
924	ensayos independientes realizados (ver		
925	Combinación ponderada de resultados de		
926	ensayos en 10. Análisis estadístico de		
927	resultados de ensayos biológicos) y		
928	referenciar a Unidades Internacionales por		
929	miligramo para evaluar el cumplimiento del		
930	criterio de aceptación establecido. La potencia		
931	estimada no debe ser menor que 90,0 % ni		
932	mayor a 111,0 % de la potencia declarada. Los		
933	límites de confianza de la potencia estimada		
934	(P=0,95) no deben ser menores a 80,0 % ni		
935	mayores a 125,0 % de la potencia declarada.		

936 **ROTULADO**