
Contenido

Integrantes

Funcionarios (2005–2010)	3817
Junta Directiva (2005–2010)	3817
Consejo de Expertos (2005–2010)	3817
Comité Ejecutivo del Consejo de Expertos (2005–2010)	3818
Comités de Expertos (2005–2010)	3818
Paneles Asesores Ad Hoc (2005–2010)	3821

Incorporaciones

Monografías Nuevas que Aparecen en Este Suplemento	3823
Monografías, Capítulos Generales, Reactivos y Tablas de Referencia Afectadas por Cambios que Aparecen en Este Suplemento	3825

Advertencias

Introducción	3832
--------------	------

Erratas

Fe de Erratas de <i>USP–NF</i>	3834
--------------------------------	------

Capítulos Generales

Pruebas y Valoraciones Generales	3838
Requisitos Generales para Pruebas y Valoraciones	3838
Pruebas y Valoraciones Químicas	3908
Otras Pruebas y Valoraciones	3908
Pruebas y Determinaciones Físicas	3908
Información General	3927

Reactivos

Reactivos, Indicadores y Soluciones	4009
-------------------------------------	------

Tablas de Referencia

Envases para Tabletas y Cápsulas	4051
Especificaciones del Envase para Tabletas y Cápsulas	4051
Descripción y Solubilidad	4052
Descripción y Solubilidad Relativa de Artículos de la USP y del NF	4052

Suplementos Dietéticos

Monografías Oficiales	4054
-----------------------	------

Excipientes	
Excipientes USP y NF, Agrupados por Categoría	4057

Monografías, NF 25	
Monografías Oficiales de <i>NF 25</i>	4059

Monografías, USP 30	
Monografías Oficiales de <i>USP 30</i>	4066

Índice	I-1
-------------------------	-----

Integrantes

Funcionarios de la Convención de la USP, Junta Directiva y el Consejo de Expertos, Comités de Expertos y Órganos Afines

Funcionarios (2005–2010)

Darrell R. Abernethy, M.D., Ph.D.

Presidente

Baltimore, MD, EE.UU.

Larry L. Braden, R.Ph., D.Sc.

Tesorero

Acworth, GA, EE.UU.

D. Craig Brater, M.D.

Presidente Saliente

Indianapolis, IN, EE.UU.

Susan S. de Mars

Secretario

Rockville, MD, EE.UU.

Junta Directiva (2005–2010)

John W. Mauger, Ph.D.

Presidente

Representante del Sector Farmacia

Salt Lake City, UT, EE.UU.

Carolyn H. Asbury, Ph.D., Sc.M.P.H.

Representante del Interés Público

New York, NY, EE.UU.

Rene H. Bravo, M.D.

Representante At Large

San Luis Obispo, CA, EE.UU.

Carmen A. Catizone, M.S., R.Ph., D.Ph.

Representante At Large

Mt. Prospect, IL, EE.UU.

Ellen M. Cosgrove, M.D., FACP

Representante del Sector Medicina

Albuquerque, NM, EE.UU.

Duane M. Kirking, Pharm.D., Ph.D.

Representante At Large

Ann Arbor, MI, EE.UU.

Mary Anne Koda-Kimble, Pharm.D.

Representante del Sector Farmacia

San Francisco, CA, EE.UU.

June E. Osborn, M.D.

Representante del Sector Medicina

New York, NY, EE.UU.

Roger L. Williams, M.D.

Vicepresidente Ejecutivo y Director Ejecutivo (ex-oficio)

Rockville, MD, EE.UU.

Consejo de Expertos (2005–2010)

Nota—Al momento de la impresión, 40 presidentes de los 41 Comités de Expertos en el desarrollo de Normas y 14 de los 16 Comités de Expertos en Información habían sido elegidos. Aún quedan por elegir 3 presidentes de los Comités de Expertos en Información, por lo que no están incluidos en esta lista.

Roger L. Williams, M.D.

Vicepresidente Ejecutivo–Director Ejecutivo;

Presidente, Consejo de Expertos

Rockville, MD, EE.UU.

James E. Akers, Ph.D.

Kansas City, MO, EE.UU.

Lloyd V. Allen, Ph.D.

Edmond, OK, EE.UU.

Gregory E. Amidon, Ph.D.

Kalamazoo, MI, EE.UU.

Bruce R. Bacon, M.D.

St. Louis, MO, EE.UU.

Anthony C. Bevilacqua, Ph.D.

Bedford, MA, EE.UU.

Lawrence H. Block, Ph.D.

Pittsburgh, PA, EE.UU.

Judy P. Boehlert, Ph.D.

Arlington, VT, EE.UU.

Nancy Jo Braden, M.D.

Phoenix, AZ, EE.UU.

Mitchell F. Brin, M.D., FAAN

Irvine, CA, EE.UU.

Barbara A. Burtness, M.D.

Philadelphia, PA, EE.UU.

Karim A. Calis, Pharm.D.

Bethesda, MD, EE.UU.

David H. Campen, M.D.

Oakland, CA, EE.UU.

Robert C. Capen, Ph.D.

West Point, PA, EE.UU.

Zak T. Chowhan, Ph.D.

Gaithersburg, MD, EE.UU.

Edward M. Cohen, Ph.D.
Newtown, CT, EE.UU.

Michael A. Cutrera, M.Sc.
South Plainfield, NJ, EE.UU.

James E. DeMuth, Ph.D.
Madison, WI, EE.UU.

Patricia M. Dowling, D.V.M.
Saskatoon, SK, Canadá

Bonnie B. Dunn, Ph.D.
Bethesda, MD, EE.UU.

Thomas S. Foster, Pharm.D.
Lexington, KY, EE.UU.

Peter R. Ganz, Ph.D.
Ottawa, ON, Canadá

Barry D. Garfinkle, Ph.D.
West Point, PA, EE.UU.

John D. Grabenstein, M.D.
Falls Church, VA, EE.UU.

Joseph T. Hanlon, Pharm.D.
Pittsburgh, PA, EE.UU.

Samir A. Hanna, Ph.D.
Sea Girt, NJ, EE.UU.

Anthony J. Hickey, Ph.D., D.Sc.
Chapel Hill, NC, EE.UU.

Elliott Israel, M.D.
Boston, MA, EE.UU.

Joy A. Joseph, M.S.
San Fernando, CA, EE.UU.

Paul R. Keller, Ph.D.
Norwich, NY, EE.UU.

A. Douglas Kinghorn, Ph.D.
Columbus, OH, EE.UU.

David F. Long, Ph.D.
Greenfield, IN, EE.UU.

Tieraona Low Dog, M.D.
Tucson, AZ, EE.UU.

Douglas W. MacPherson, M.D.
Cheltenham, ON, Canadá

Carol S. Marcus, M.D., Ph.D.
Los Angeles, CA, EE.UU.

Patrick A. McKee, M.D.
Oklahoma City, OK, EE.UU.

Michael D. Murray, Pharm.D.
Chapel Hill, NC, EE.UU.

Steven L. Nail, Ph.D.
West Lafayette, IN, EE.UU.

David W. Newton, Ph.D.
Winchester, VA, EE.UU.

Sharon J. Northup, Ph.D.
Highland Park, IL, EE.UU.

Philip J. Palermo, Ph.D.
Bethel, CT, EE.UU.

Mark G. Papich, D.V.M.
Raleigh, NC, EE.UU.

William F. Popin, M.S.
Lehi, UT, EE.UU.

Thomas P. Reinders, Pharm.D.
Richmond, VA, EE.UU.

Susan J. Schniepp, B.S.
San Diego, CA, EE.UU.

Amy H. Schwartz, Pharm.D., B.C.P.S.
Henderson, NV, EE.UU.

Eli Shefter, Ph.D.
San Diego, CA, EE.UU.

Sarah A. Spinler, Pharm.D.
Philadelphia, PA, EE.UU.

Salomon Stavchansky, Ph.D.
Austin, TX, EE.UU.

C. Jeanne Taborsky, B.S.
Columbia, MD, EE.UU.

Henry S. I. Tan, Ph.D.
Cincinnati, OH, EE.UU.

Dennis P. West, Ph.D., F.C.C.P.
Chicago, IL, EE.UU.

Timothy J. Wozniak, Ph.D.
Indianapolis, IN, EE.UU.

Lynn C. Yeoman, Ph.D.
Houston, TX, EE.UU.

Comité Ejecutivo del Consejo de Expertos (2005–2010)

Estos 15 miembros representan a los Comités de Expertos en Normas y a los Comités de Expertos en Información.

ROGER L. WILLIAMS, M.D., *Presidente*

James E. Akers, Ph.D.; Loyd V. Allen, Ph.D.; Anthony C. Bevilacqua, Ph.D.; Nancy Jo Braden, M.D.; Mitchell F. Brin, M.D.; David H. Campen, M.D.; Zak T. Chowhan, Ph.D.; James E. DeMuth, Ph.D.; John D. Grabenstein, M.D.; Joy A. Joseph, M.S.; Michael D. Murray, Pharm.D.; Stephen J. Nail, Ph.D.; Susan J. Schniepp, B.S.; Salomon Stavchansky, Ph.D.; Lynn C. Yeoman, Ph.D.

Comités de Expertos (2005–2010)

Aerosoles (AER)

ANTHONY J. HICKEY, Ph.D., D.Sc., *Presidente*

Harris S. Cummings, Ph.D.; Paul D. Curry, Jr., Ph.D.; Bo L. Olsson, Ph.D.; Guirag Poochikian, Ph.D.; John K. Simons, Ph.D.; Charles G. Thiel, B.A.; Caroline Vanneste, B.Sc.

Productos Biológicos y Biotecnología: Sangre y Productos Hemoderivados (BB BBP)

PETER GANZ, Ph.D., *Presidente*

Christopher P. Bryant, Ph.D.; Pamela Clark, M.D., J.D.; Timothy K. Hayes, Ph.D.; Jean F. Huxsoll, Ph.D.; Patrick A. McKee, M.D.; Michael E. Passwater, B.S.; Patrick N. Shaklee, Ph.D.; John J. Sokolowski, B.S., M.S.

Productos Biológicos y Biotecnología: Terapia Génica y Celular (BB CGT)

WILLIAM E. TENTE, M.S., *Presidente*

Flavia Borellini, Ph.D.; Scott R. Burger, M.D.; Nancy H. Collins, Ph.D.; Maria A. Croyle, Ph.D.; Gary C. du Moulin, Ph.D.; Joseph F. Gallelli, Ph.D.; Beth M. Hutchins, Ph.D.; Ann A. Jakubowski, Ph.D.; Elizabeth J. Read, M.D.; Anthony A.G. Ridgway, Ph.D.; Darin J. Weber, Ph.D.

Productos Biológicos y Biotecnología: Proteínas y Polisacáridos (BB PP)

LYNN C. YEOMAN, Ph.D., *Presidente*

Janice T. Brown, M.S.; Jo Demeester, Pharm.D.; John J. Dougherty, M.S.; Julia S. Goldstein, M.D.; Anne Munk Jespersen, B.Sc.; Young-Phil Lee, Ph.D.; Venkat R. Mukku, Ph.D.; Michael G. Mulkerrin, Ph.D.; Harold N. Rode, Ph.D.; Martin Schiestl, Ph.D.; Wesley E. Workman, Ph.D.

Productos Biológicos y Biotecnología: Vacunas y Virología (BB VV)

BARRY D. GARFINKLE, Ph.D., *Presidente*

William M. Egan, Ph.D.; John D. Grabenstein, Ph.D.; Niranjan M. Kumar, Ph.D., EMTM; Douglas C. Lee, Ph.D.; Joan C. May, Ph.D.; Brian K. Nunnally, Ph.D.; Rafaella Romeo, M.D., Ph.D.; John Saldanha, Ph.D.; Phillip C. Thomas, B.A.

Biofarmacia (BPC)

THOMAS S. FOSTER, PHARM.D., *Presidente*

Diane J. Burgess, Ph.D.; G. Bryan Crist, B.S.; Mario A. Gonzalez, Ph.D.; Vivian A. Gray, B.S.; Johannes Kraemer, Ph.D.; Lewis J. Leeson, Ph.D.; Alan F. Parr, Pharm.D., Ph.D.; James E. Polli, Ph.D.; Leon Shargel, Ph.D.; Eli Shefter, Ph.D.; W. Craig Simon, Ph.D.; Clarence T. Ueda, Pharm.D., Ph.D.; David Young, Pharm.D., Ph.D.

Farmacia Magistral (CRX)LOYD V. ALLEN, PH.D., *Presidente*

Lisa D. Ashworth, B.S.; Robin H. Bogner, Ph.D.; Gigi S. Davidson, R.Ph.; Deborah R. Holly, Ph.D.; Mary Ann F. Kirkpatrick, Ph.D.; Mark G. Klang, R.Ph., M.S.; Lawson G. Kloesel, R.Ph.; Judith E. Thompson, R.Ph.; Lawrence A. Trissel, B.S.

Suplementos Dietéticos: Biodisponibilidad (DS BA)ELI SHEFTER, PH.D., *Presidente*

Hans-Konrad Biesalski, Ph.D., M.D.; Seymour D. Levine, Ph.D.; Raimar Loebenberg, Ph.D.; Phillip C. Smith, Ph.D.; Francis L. Tse, Ph.D.; Mehran Yazdanian, Ph.D.

Suplementos Dietéticos: Botánicos (DSB)A. DOUGLAS KINGHORN, PH.D., *Presidente*

Veronika Butterweck, Ph.D.; George H. Constantine, Ph.D.; Dean Gray, Ph.D.; Mahabir Prasad Gupta, Ph.D.; Ikhlal A. Khan, Ph.D.; Paul Kucera, Ph.D.; Paul L. Schiff, Jr., Ph.D.; Fabio Soldati, Ph.D.; Yoshiyuki Tokiwa, Ph.D.

Suplementos Dietéticos: Capítulos Generales (DS GC)WILLIAM F. POPIN, M.S., *Presidente*

Josef A. Brinckmann; John H. Cardellina, II, Ph.D.; Steven J. Dentali, Ph.D.; Edward J. Fletcher; Dennis K. J. Gorecki, Ph.D.; Greg A. Pennyroyal; Eike Reich, Ph.D.; James W. Rushing, Ph.D.; Roy Upton

Suplementos Dietéticos: Información (DSI)TIERAONA LOW DOG, M.D., *Presidente*

Marilyn L. Barrett, Ph.D.; Mary L. Chavez, Pharm.D.; Paula Gardiner, M.D.; Richard Ko, Pharm.D., Ph.D.; Gail B. Mahady, Ph.D.; Robin J. Marles, Ph.D.; Linda S. Pellicore, Ph.D.

Suplementos Dietéticos: No Botánicos, Nutrición y Electrolitos (DSN)JOY A. JOSEPH, M.S., *Presidente*

Roger A. Clemens, Ph.D.; Patrick Dunn, M.S.; Carol Johnston, Ph.D.; Richard A. Myers, Ph.D.; Peter J. Rice, Pharm.D., Ph.D.; Wayne Wolf, Ph.D.

Capítulos Generales de Excipientes (EGC)GREGORY E. AMIDON, PH.D., *Presidente*

Harry G. Brittain, Ph.D.; Stephen W. Hoag, Ph.D.; Richard H. Meury, B.S.; Garnet E. Peck, Ph.D.; Eric Schmitt, Ph.D.; Dale E. Wurster, Ph.D.

Monografías de Excipientes 1 (EM1)ZAK T. CHOWHAN, PH.D., *Presidente*

Harold Davis, Ph.D.; Steven H. Edelmuth, Ph.D.; Bruno C. Hancock, Ph.D.; Xiaorong He, Ph.D.; Mary C. Houck, Ph.D.; Ashok V. Katdare, Ph.D.

Monografías de Excipientes 2 (EM2)LAWRENCE BLOCK, PH.D., *Presidente*

Shireesh P. Apte, Ph.D.; Joseph R. Creekmore, Ph.D.; Richard C. Moreton, Ph.D.; Eric J. Munson, Ph.D.; Indira V. Persaud, Ph.D.; Richard H. Wendt, Ph.D.

Capítulos Generales (GC)JAMES E. DEMUTH, PH.D., *Presidente*

David E. Bugay, Ph.D.; Robert T. Cambron, Ph.D.; Geoffrey P. Carr, Ph.D.; Thomas J. DiFeo, Ph.D.; Peter R. Griffiths, D.Phil.; Gary M. Hieftje, Ph.D.; Robert L. Iser, M.S.; Nancy Lewen, B.S.; Gregory P. Martin, M.S.; Oscar A. Quattrocchi, M.S.; Galen Radebaugh, Ph.D.; Vijaya Ramesh, B.Pharm.; Van D. Reif, Ph.D.; Dennis J. Runser, Ph.D., D.D.S.; Timothy L. Shelbourn, B.S., M.S.; Bobby G. Snider, Ph.D.; Sharon V. Snorek, M.S.; Fred Xi, Ph.D.

Toxicología General y Biocompatibilidad de Dispositivos Médicos (GTMDB)SHARON J. NORTHUP, PH.D., *Presidente*

John Ademola, Ph.D.; Vasudev P. Anand, Ph.D.; Charles Barton, Ph.D., DABT; Paul T. Fawcett, Ph.D.; Lawrence H. Hecker, Ph.D.; Judith Weissinger, Ph.D.

Salud Internacional (IH)SALOMON STAVCHANSKY, PH.D., *Presidente*

Anthony Boni; Denis D. Broun, M.D.; Laura Ceron, Pharm.D.; J. C. Craft, M.D.; Prashant M. Dikshit, Ph.D.; Maurice N. G. Dukes, M.D.; Enrique Fefer, Ph.D.; Stan N. Finkelstein, M.D.; José Aparicio B. Funck, Ph.D.; Joseph F. Gallelli, Ph.D.; Jeffrey Gren, M.A.; Roman S. Kozlov, M.D., Ph.D.; Howard Levy, Ph.D.; Robert B. Myers, B.S.; Kate K. T. Nguyen, Pharm.D.; Iruka N. Okeke, Ph.D.; Andreas Seiter, Ph.D.; Andrew Walubo, M.D.; Zhong-Yuan Yang

Microbiología y Garantía de Esterilidad (MSA)JAMES E. AKERS, PH.D., *Presidente*

James P. Agalloco, M.B.A.; Ivan W. Chin, B.A.; Anthony M. Cundell, Ph.D.; Joseph K. Farrington, Ph.D.; Dennis E. Guilfoyle, Ph.D.; David Hussong, Ph.D.; Leonard W. Mestrandrea, Ph.D.; Donald C. Singer, M.S.; Scott V. W. Sutton, Ph.D.

Comité de Expertos en Directrices Modelos (MGEC)ROGER L. WILLIAMS, M.D., *Presidente*

Bruce Bacon, M.D.; Nancy Jo Braden, M.D.; Mitchell F. Brin, M.D.; Barbara A. Burtness, M.D.; Karim A. Calis, Pharm.D., M.P.H.; David H. Campen, M.D.; John D. Grabenstein, Ph.D.; Joseph T. Hanlon, Pharm.D.; Elliott Israel, M.D.; Douglas W. MacPherson, M.D.; Patrick A. McKee, M.D.; Amy H. Schwartz, Pharm.D., B.C.P.S.; Sarah A. Spinler, Pharm.D.; Dennis P. West, Ph.D.

Desarrollo de Monografías: Antibióticos (MD ANT)SAMIR A. HANNA, PH.D., *Presidente*

Rupa Iyer, M.S.; John M. Kovaleski, Ph.D.; William C. Larkins, Ph.D.; Thomas B. May, Ph.D.; Shrikant N. Pagay, Ph.D.; Jeffrey Rohrer, Ph.D.

Desarrollo de Monografías: Antivirales y Antimicrobianos (MD AA)HENRY S. I. TAN, PH.D., *Presidente*

David A. Fay, Ph.D.; Scott C. Messner, B.A.; Andrew C. Plaszc, Ph.D.; Ramnarayan Randad, Ph.D.; Timothy S. Tracy, Ph.D.; Danny L. Tuck, Ph.D.

Desarrollo de Monografías: Cardiovascular (MD CV)PAUL R. KELLER, PH.D., *Presidente*

Gary J. Allmaier, Ph.D.; Allan D. Bokser, Ph.D.; Scott A. Goodberlet; Eugene J. McGonigle, Ph.D.; Aloka Srinivasan, Ph.D.; Patricia A. Tapler, B.S.

Desarrollo de Monografías: Tos, Resfriado y Analgésicos (MD CCA)TIMOTHY J. WOZNIAC, PH.D., *Presidente*

Mahmoud M. H. Al Omari, Ph.D.; Tina M. Engel, Ph.D.; Ernest Parente, Ph.D.; Ahalya Wise, M.S.; Joseph E. Yakupovich, Ph.D.; Patrick N. Yat, Ph.D.

Desarrollo de Monografías: Gastrointestinal, Renal y Endócrino (MD GRE)JUDY P. BOEHLERT, PH.D., *Presidente*

Salah M. Blaih, Ph.D.; Richard A. Blessing, M.S.; Yuri Goldberg, Ph.D.; Ramaswamy Murari, Ph.D.; David G. Reed, B.S., M.B.A.; Stephen G. Schulman, Ph.D.

Desarrollo de Monografías: Oftalmología, Oncología y Dermatología (MD OOD)EDWARD M. COHEN, PH.D., *Presidente*

Thomas A. Broadbent, Ph.D.; J. Michael Cannon, Ph.D.; John E. Daniels, B.S., M.S.; Gregory C. Doggett, B.S.; Assad J. Kazeminy, Ph.D.; Linda L. Ng, Ph.D.; Bernard A. Olsen, Ph.D.

Desarrollo de Monografías: Psiquiátricos y Psicoactivos (MD PP)SUSAN J. SCHNIEPP, B.S., *Presidente*

David D. Allen, R.Ph., Ph.D., FASHP; Costin C. Camarasu, Ph.D.; Donald L. Lech, M.S.; Marian L. Meyer, Ph.D., M.B.A.; Alaparthi L. Prasad, M.Pharm.; James T. Stewart, Ph.D.; Martin J. Williamson, Ph.D.

Desarrollo de Monografías: Pulmonar y Esteroides (MD PS)MICHAEL A. CUTRERA, M.S., *Presidente*

Quanyin Gao, Ph.D.; Sándor Görög, Ph.D.; Peter C. Ruenitz, Ph.D.; Michael J. Skibic, B.S., M.S.; Saleh A. Turujman, Ph.D.; Terry D. Wilson, Ph.D.

Nomenclatura (NOM)THOMAS P. REINDERS, PHARM.D., *Presidente*

Lloyd V. Allen, Jr., Ph.D.; Mary B. Baker, Pharm.D.; Dawn M. Boothe, D.V.M., Ph.D.; Herbert S. Carlin, D.Sc.; Mrunal S. Chapekar, Ph.D.; Edward M. Cohen, Ph.D.; Stephanie Y. Crawford, Ph.D.; Everett Flanigan, Ph.D.; Thomas S. Foster, Pharm.D.; Michael J. Groves, Ph.D.; William Heller, Ph.D.; David F. Long, Ph.D.; Ginette A. Pepper, Ph.D.; Jerry Phillips, B.S.; Philip D. Walson, M.D.; Chao-Mei Yu, Ph.D.

Envasado y Almacenamiento (P&S)CARYL JEANNE TABORSKY, B.S., *Presidente*

Clint Bullock, B.S.; Joe Ciekowski, B.S., M.S.; Steven M. Cobb, B.S.; Michael N. Eakins, Ph.D.; Mary G. Foster, Pharm.D.; Judith Haber, B.A.; Edward L. McKinley, B.S.; Regina Peacock, R.Ph., Ph.D.; Angi S. Rosenberry, B.A.

Productos Parenterales: Industriales (PPI)STEVEN NAIL, PH.D., *Presidente*

Michael J. Akers, Ph.D.; D. Scott Aldrich, B.S.; James C. Boylan, Ph.D.; David F. Driscoll, Ph.D.; Linda Felver, Ph.D.; Michael J. Groves, Ph.D.; Dana M. Guazzo, Ph.D.; Mary Joan Hampson-Carlin, B.S., M.B.A.; Stephen E. Langille, Ph.D.; Russell E. Madsen, M.S.

Formas Farmacéuticas (PDF)DAVID F. LONG, PH.D., *Presidente*

Kenneth S. Alexander, Ph.D.; Paul M. Bummer, Ph.D.; Pramod K. Gupta, Ph.D.; Ralph A. Heasley, Ph.D.; Keith Marshall, Ph.D.; Kathi Rinesmith, R.Ph., M.S.; Allen Rudman, Ph.D.; J. Howard Rytting, Ph.D.; Thomas R. Tice, Ph.D.

Aguas para Uso Farmacéutico (PW)ANTHONY C. BEVILACQUA, PH.D., *Presidente*

Max S. Lazar, B.A.; Nrapendra Nath, Ph.D.; Carl C. Roe, B.S.; Bruno Rossi; Rostyslaw O. Slabicky, B.S.; Teri C. Soli, Ph.D.

Información Radiofarmacéutica (RI)CAROL S. MARCUS, M.D., PH.D., *Presidente*

Jorge R. Barrio, Ph.D.; R. Edward Coleman, M.D.; Alvin J. Lorman, J.D.; Donald M. Lyster, Ph.D.; James A. Ponto, M.S.; Laura L. Ponto, Ph.D.; Barry A. Siegel, M.D.; Edward B. Silberstein, M.D.; James B. Stubbs, Ph.D.; Mathew Thakur, Ph.D.

Radiofármacos y Agentes para Imágenes Médicas (RMI)BONNIE B. DUNN, PH.D., *Presidente*

Thomas E. Boothe, Ph.D.; Patricia E. Cole, M.D., Ph.D.; Joseph C. Hung, Ph.D.; Ravindra K. Kasliwal, Ph.D.; Hank Kung, Ph.D.; Jerome M. Lewis, M.D., Ph.D.; Steve Zigler, Ph.D.

Estándares de Referencia (RS)PHILIP J. PALERMO, PH.D., *Presidente*

Richard E. Ashley, B.S.; Mark S. Bailey, MRSC; Matthew W. Borer, Ph.D.; Raymond A. Cox, M.A.; David A. Fay, Ph.D.; Mamta Gautam-Basak, Ph.D.; Antony Raj Gomas, M.S.; Ralph Gomez, Ph.D.; Gyongyi S. Gratzl, Ph.D.; Vivian A. Gray, B.S.; Samir A. Hanna, Ph.D.; Ruth E. Homan, Ph.D., J.D.; Shaohong Jin, B.A.; Gregory T. Kaster, M.B.A.; Pauline M. Lacroix, M.Sc.; Judy A. Lee, Ph.D.; Dorota Matecka, Ph.D.; Moshe Nulman, M.Sc.; Brian K. Nunnally, Ph.D.; Raphael Orna, Ph.D.; Reenie Parris; Hasmuth B. Patel, Ph.D.; Guirag Poochikian, Ph.D.; Michael A. Ribick, M.A.; Maria Inés R. M. Santoro, Ph.D.; Richard H. Wendt, Ph.D.; Manfred E. Wolff, Ph.D.; Wesley E. Workman, Ph.D.

Uso Seguro de Medicamentos (SMU)MICHAEL D. MURRAY, PHARM.D., *Presidente*

Suzanne C. Beyea, Ph.D., R.N.; Maureen Cahill B.S.N., M.S.N.; William Elliot, M.D.; Elizabeth A. Flynn, Ph.D., R.Ph.; Howard E. Greenberg, M.D.; Matthew C. Grissinger, B.S.; Mark L. Horn, M.D.; William N. Kelly, Pharm.D.; Gerald McEvoy, Pharm. D.; Ronald A. Nosek, R.Ph., M.S.; Marjorie A. Phillips, M.S. R.Ph.; Joanne G. Schwartzberg, M.D.; Deborah Simmons, R.N., M.S.N., CCRN, CCNS; Carl A. Sirio, M.D.; John Straumanis, M.D.; Mark Sullivan, Pharm.D.; Kathleen Uhl, M.D.

Estadística (STAT)ROBERT C. CAPEN, PH.D., *Presidente*

Robert F. Dillard, M.S.; Kristi L. Griffiths, Ph.D.; Anthony G. Okinczyz, M.P.H., M.B.A.; Trace W. Searls, Ph.D.; Robert Singer, M.S.; Charles Y. Tan, Ph.D.; Lynn D. Torbeck, M.S.

Preparaciones Magistrales Estériles (SCC)DAVID W. NEWTON, PH.D., *Presidente*

Samuel C. Augustine, Pharm.D.; Mary B. Baker, Pharm.D.; James F. Cooper, Pharm.D.; Donald J. Filibeck, Pharm.D.; Larry W. Griffin, B.S.; Kenneth L. Hughes, B.S.; Eric S. Kastango, M.B.A.; Keith H. St. John, M.S.; Laura A. Thoma, Pharm.D.; Lawrence A. Trissel, B.S.; James Wagner

Medicamentos Veterinarios (VET)MARK G. PAPICH, D.V.M., M.S., *Presidente*

Dawn M. Boothe, D.V.M., Ph.D.; Gigi Davidson, Ph.D.; Carol A. Davis, Ph.D.; Arthur J. Faulkner, M.S.; Brian J. Fichter, Pharm. D., R.Ph.; Todd P. Foster, Ph.D.; Krishan Kumar, Ph.D.; Luis Ocampo, D.V.M.; Cathy L. Wood, B.S.

Información sobre Medicina Veterinaria (VMI)PATRICIA M. DOWLING, D.V.M., *Presidente*

Terrence P. Clark, D.V.M., Ph.D.; Devin Wade Elias; Ronette Gehring, B.V.Sc., MmedVet, MRCVS; Dinah G. Jordan, Pharm.D.; Vernon “Cory” Langston, D.V.M., Ph.D.; Katrina L. Mealey, D.V.M., Ph.D.; Mark G. Papich, D.V.M., M.S.; M. Gatz Riddell, D.V.M., Ph.D.

Comités de Expertos en Información (2005–2010)**Comité de Expertos en Cardiología**SARAH A. SPINLER, PHARM.D., *Presidente*

Joseph R. Carver, M.D.; Mark Cziraky, Pharm.D.; Cynthia Kirman, Pharm.D.; Nancy M. Allen LaPointe, Pharm.D.; Alexander Shepherd, M.D., Ph.D.; Barbara S. Wiggins, Pharm.D.

Comité de Expertos en DermatologíaDENNIS P. WEST, PH.D., F.C.C.P., *Presidente*

Robert J. Anderson, J.D.; Robert J. Anderson, Pharm.D.; Frederick A. Curro, D.M.D., Ph.D.; Steven R. Feldman, M.D., Ph.D.; Ali Moiin, M.D.

Comité de Expertos en Endocrinología

KARIM ANTON CALIS, Pharm.D., M.P.H., *Presidente*
 Glenn Braunstein, M.D.; Lawrence Frohman, M.D.; Frederick G. Hom, M.D.; Charles D. Ponte, Pharm.D.; Frank Pucino, Pharm.D.; Robert E. Ratner, M.D.

Comité de Expertos en Gastroenterología

BRUCE R. BACON, M.D., *Presidente*
 Karl E. Anderson, M.D.; Roger Clemens, Ph.D.; Neal M. Davies, Ph.D.; Arthur I. Jacknowitz, Pharm.D.; Cynthia Kirman, Pharm.D.

Comité de Expertos en Hematología

PATRICK A. MCKEE, M.D., *Presidente*
 Joseph E. Addiego, M.D.; Judith C. Anderson, M.D.; Philip C. Comp, M.D., Ph.D.; Kevill L. Moore, M.D.; Gabriel A. Shapiro, M.D.

Comité de Expertos en Inmunología

JOHN D. GRABENSTEIN, Ph.D., *Presidente*
 Roy D. Altman, M.D.; Cheston M. Berlin, M.D.; Leonard Bielory, M.D.; Philip Marcus, M.D., M.P.H.; Dennis M. Williams, Pharm.D.

Enfermedades Infecciosas

DOUGLAS W. MACPHERSON, M.D., *Presidente*
 William B. Baine, M.D.; Shukai Bala, Ph.D.; Paul O. Gubbins, Pharm.D.; Paul D. Holtom, M.D.; Marisel Segarra-Newnham, Pharm.D., M.P.H.

Neurología/Otorrinolaringología/Oftalmología

MITCHELL F. BRIN, M.D., FAAN, *Presidente*
 Andrew Blitzer, Ph.D.; Neil M. Bressler, M.D.; Vinay Chaudhry, M.D.; David A. Lee, M.D.; Joel Mindel, M.D., Ph.D.; Randal A. Otto, M.D.; Melody Ryan, Pharm.D.

Oncología

BARBARA ANN BURTNESS, M.D., *Presidente*
 Christine H. Chung, M.D.; Michael S. Edwards, Pharm.D., M.B.A.; Alok A. Khanna, M.D.; Nancy L. Lewis, M.D.; Sandra Swain, M.D.

Psiquiatría

AMY H. SCHWARTZ, Pharm.D., *Presidente*
 Lawrence J. Cohen, Pharm.D.; M. Lynn Crismon, Pharm.D.; William Fann, M.D.; Marty Mattei, Pharm.D.; Paul M. Packman, M.D.; J. Russell Teagarden, M.A.

Enfermedades Pulmonares y Alergias

ELLIOT ISRAEL, M.D., *Presidente*
 Leonard Bernstein, M.D.; Leonard Bielory, M.D.; David Lorber, M.D.; Karen J. Tietze, Pharm.D.; Dennis M. Williams, Pharm.D.

Reumatología

DAVID H. CAMPEN, M.D., *Presidente*
 Gregory J. Dennis, M.D.; Evelyn V. Hess, M.D.; Gail S. Kerr, M.D.; Lee S. Simon, M.D.; Fredrica Smith; Steve Zlotnick, Pharm.D.

Poblaciones Especiales/Farmacología Clínica

JOSEPH T. HANLON, Pharm.D., *Presidente*
 Darrell Abernathy, M.D., Ph.D.; Rudi Ansbacher, M.D.; Frederick A. Curro, Ph.D., D.M.D.; G. Robert DeYoung, Pharm.D.; Melvin B. Heyman, M.D.; Michael J. Koronowski, Pharm.D.; William Troutman, Pharm.D.; Wayne Snodgrass, M.D. Ph.D.

Proceso de Decisión Terapéutica

NANCY JO BRADEN, M.D., *Presidente*
 Elizabeth Chrischilles, Ph.D.; Trinkia Coster, M.D.; Brian L. Erstad, Pharm.D.; Sandra L. Kane-Gill, Pharm.D.; David B. Lorber, M.D.; Edward Westrick, M.D., Ph.D.

Paneles Asesores Ad Hoc (2005–2010)

Nota—El siguiente listado corresponde a los Paneles Asesores Ad Hoc, y sus respectivos miembros, que se constituyeron y aprobaron hasta el mes de mayo de 2006. Los Paneles Asesores Ad Hoc se forman continuamente durante el ciclo de revisión de la USP y en el futuro se publicarán otros listados de miembros.

Panel Asesor Ad Hoc de Análisis Bioestadístico (111)

ROBERT SINGER, M.S., *Presidente*
 Janice D. Callahan, Ph.D.; James E. DeMuth, Ph.D.; Henry Hsu, Ph.D.; David Lansky; Venkat R. Mukku, Ph.D.; Doris Weissman, N.P.

Comisión sobre los Derechos de Propiedad Intelectual, Innovación y Salud Pública (CIPHI)

STAN N. FINKELSTEIN, M.D., *Presidente*
 Linda Carrier-Walker; Mei Ling Chen, Ph.D.; Patricia M. Danzon, Ph.D.; Peter Gund, Ph.D.; Victoria Hale, Ph.D.; Chris Hentschel, Ph.D.; Ton Hoek; Precious Matsoso; Carl C. Peck, M.D.; Sauwakon Ratanawijitrasin, Ph.D.; Prof. Sir Michael Rawlins; Andreas Seiter, M.D.; Prof. Amor Toumi; Prof. Stuart Walker; Krisantha Weerasuriya, M.D.

Desarrollo de Valoraciones Biológicas (1032)

JANICE T. BROWN, M.S., *Presidente*
 Jo Demeester, Ph.D.; John Hill; Anthony Mire-Sluis, Ph.D.; David M. Lansky, Ph.D.; Venkat R. Mukku, Ph.D.; Karen J. Roberts, R.Ph.; Nancy Sajjadi; Mark Schenerman; Robert Singer, M.S.; Wesley E. Workman, Ph.D.

Desarrollo de Monografías de Heparina y Heparinoides

PATRICK N. SHAKLEE, Ph.D., *Presidente*
 Gyöngyi Gratzl, Ph.D.; Elaine Gray, Ph.D.; Kristian Johansen, Ph.D.; Jeanine M. Walenga, Ph.D.

Calibradores de Disolución

VIVIAN A. GRAY, B.S., *Presidente*
 Larry L. Augsburg, Ph.D.; William Barr; Cynthia K. Brown; G. Bryan Crist, B.S.; Paul Fackler, Ph.D.; Elisabeth Kovacs; Johannes Kraemer, Ph.D.; Herman Lam, Ph.D.; Lewis J. Leeson, Ph.D.; Mary D. Oates, Ph.D.; Rennie Parrish; Thomas S. Savage, B.S.

Suero Fetal Bovino

GARY C. DU MOULIN, Ph.D., *Presidente*
 Joseph A. Albanese, Ph.D.; Firelli Alonso-Caplen, Ph.D.; Anthony H. Davies, Ph.D.; Kimberly Dezura, M.S.; Bill Fisher; Joyce L. Frey-Vasconcellos, Ph.D.; Barry D. Garfinkle, Ph.D.; Mario Gorziglia; Kendall Graber; Greg Hanson; Niranjana M. Kumar, Ph.D., EMTM; Cindy Miller; Rod Monroy, Ph.D.; Yvonne A. Reid, Ph.D.; Mario Romano; Joseph D. Santangelo, Ph.D.; Bill Siegel; Mark J. Stramaglia R.Ph., M.B.A.; William E. Tente, M.S.; Phillip C. Thomas, B.A.; Stephen Wessman

Citometría de Flujo (1027)

ELIZABETH J. READ, M.D., *Presidente*
 David Anderson; Scott R. Burger, M.D.; Nancy H. Collins, Ph.D.; Gary C. duMoulin, Ph.D.; Burt Houtz, CLS; Ann A. Jakubowski, Ph.D., M.D.; William Telford, Ph.D.; William E. Tente, M.S.

Metales Pesados <231>NANCY LEWEN, *Presidente*

Catherine W. Andersen, M.S.; Charles Barton, Ph.D., DABT; Molly Chacko; John Geary; Assad Kazeminy, Ph.D.; Mindi Osgatharp, M.S.; Timothy L. Shelbourn, M.B.A.; Robert Wiens, M.S.; Fred Xi, Ph.D.

Plasma HumanoJEAN F. HUXSOLL, Ph.D., *Presidente*

Joseph Bertolini, Ph.D.; Pamela Clark, M.D., J.D.; Peter R. Ganz, Ph.D.; Elaine Gray, Ph.D.; Timothy K. Hayes, Ph.D.; Mary Ann Lamb, Ph.D.; Elizabeth J. Read, M.D.; John Saldanha, Ph.D.; John J. Sokolowski, B.S., M.S.; Gerold Zerlauth, Ph.D.

Métodos de Prueba Inmunológicos <1067>

NIRANJAN M. KUMAR, Ph.D., EMTM

Arun Arunachalam, Ph.D.; Anu Bansal, Ph.D.; Ronald L. Bowsher, Ph.D.; Connie Cullen, Ph.D.; Subhash Dhawan, Ph.D.; David Good; Sydney Grossberg, M.D.; Sahlini Gupta; Kelledy Manson, M.S.; John R. Mascola, M.D.; Hersh Mehta, Ph.D.; Robert Strouse, Ph.D.; Robin Thorpe, Ph.D.; Jennifer Waters, Ph.D.; Ying Zhang, Ph.D.

Análisis de los Datos de Errores en la Administración y Toma de Medicamentos

CDR. RONALD A. NOSEK, R.Ph., M.S.

W. Ray Bullman; Barbara Mark, Ph.D., R.N., FAAN; Dan Morrow, Ph.D.; Gordy Schiff, M.D.; Andrew C. Seger, Pharm.D.; Patricia Sokol, R.N., J.D.; Robert J. Weber, R.Ph., M.S., FASHP

Espectrofotometría en el Infrarrojo Cercano <1119>ROBERT T. CAMBRON, Ph.D., *Presidente*

David E. Bugay, Ph.D.; Mr. Emil W. Ciurczak; Peter R. Griffiths, D.Phil.; Zhijun Jiang, Ph.D.; Ronald W. Miller, Ph.D.

Técnicas Basadas en Ácidos Nucleicos <1125>JOHN SALDANHA, Ph.D., *Presidente*

Margaret C. Cam, Ph.D.; Carole Foy, Ph.D.; Indira Hewlett, Ph.D.; Marcia Holden, Ph.D.; Dirk Loeffert, Ph.D.; Todd Martinsky, Ph.D.; Brian K. Nunnally, Ph.D.; Charles Y. Tan, Ph.D.; Wesley E. Workman, Ph.D.; Gerold Zerlauth, Ph.D.

Pruebas de Desempeño—Vía InhalatoriaVIVIAN A. GRAY, B.S.; ANTHONY HICKEY, Ph.D., D.Sc., *Copresidentes*

Neal Davies, Ph.D.; Craig Dunbar, Ph.D.; Frank M. Etzler, Ph.D.; Marc D. Finn; Bo L. Olsson, Ph.D.; Michael T. Riebe, Ph.D.; Masahiro Sakagami, Ph.D.; Michael J. Smurthwaite; David C. Thompson, Ph.D.; John Veranth, Ph.D.

Pruebas de Desempeño—InyectablesLEON SHARGEL, Ph.D., *Presidente*

Diane J. Burgess, Ph.D.; Brian C. Clark, Ph.D.; Mary Joan Hampson-Carlin, B.S., M.B.A.; Pankaj Shah, Ph.D.; Mary Stickelmeyer, Ph.D.; Thomas R. Tice, Ph.D.; David Young, Pharm.D., Ph.D.

Pruebas de Desempeño—Vía MucosaELI SHEFTER, Ph.D., JOHANNES KRAEMER, Ph.D., *Copresidentes*

Bruce Aungst, Ph.D.; Stuart Bates; Sarath Chandar, M.B.A.; Pramod K. Gupta, Ph.D.; Munir Hussain, Ph.D.; Stig R. Knudsen, M.Sc.

Pruebas de Desempeño—Productos TópicosCLARENCE T. UEDA, Ph.D., *Presidente*

Kris Derdzinski, Ph.D.; Gary Ewing, Ph.D.; Gordon Flynn, Ph.D.; Howard Maibach, Ph.D.; J. Howard Rytting, Ph.D.; Steve Shaw, Ph.D.; Kailas Thakker, Ph.D.; Avi Yacobi, Ph.D.

Proteína AMICHAEL G. MULKERRIN, Ph.D., *Presidente*

James Bingham, Ph.D.; Tomas Björkman, Ph.D.; Russell Hart, Ph.D.; Kenneth Hoffman, Ph.D.; David Hutton, Ph.D.; Anders Larsson, M.D.; Duncan Low, Ph.D.; Jay Madan; Ariane Marolewski, Ph.D.; Victor Van Cleave, Ph.D.; Helen Wood, Ph.D.

Anticuerpos Monoclonales Recombinantes de Uso Terapéutico <1260>MICHAEL G. MULKERRIN, Ph.D., *Presidente*

Richard Francis, Ph.D.; Venkat R. Mukku, Ph.D.; Thomas Patapoff, Ph.D.; Ruth Wolff, Ph.D.; Lynn C. Yeoman, Ph.D.

Resolución 3—Nuevas Ciencias y TecnologíasJAMES E. AKERS, Ph.D., *Presidente*

Amir Attaran, J.D.; Prabir Basu, Ph.D.; J. Lyle Bootman, Ph.D.; Alan E. Guttmacher, M.D.; Rodney Ho, Ph.D.; Melvin V. Koch, Ph.D.; William F. Koch, Ph.D.; Carol Kovac; Steve Leeder, Ph.D., Pharm.D.; Peter J. Neumann, Sc.D.; Thomas R. Oliver, Ph.D.; Bernard Pécoul, M.D., M.P.H.; Cosette J. Serabjit-Singh, Ph.D.; Henry Steger, Ph.D.; Peter W. Swaan, Ph.D.; Garold S. Yost, Ph.D.

Traducción al RusoROMAN S. KOZLOV, M.D. y ALEXANDER P. ARZAMASTSEV, *Copresidentes*

Ricardo Cabeza de Vaca; Victor A. Dmitriev Sergey V. Boll; Professor Alexander A. Firsov; Valery A. Bykov; Alexander N. Schavilinsky; Liliya V. Titiova

Traducción al EspañolENRIQUE FEFER, Ph.D., *Presidente*

Peggy Casanova, M.Sc.; Ofelia Espejo, Ph.D.; Lidiette Fonseca Gonzalez, M.Sc.; José Juárez Eyzaguirre, Ph.D.; José María Parisi, M.Sc.; Regina Pezoa, Ph.D.; Luisa Fernanda Ponce D'León Quiroga, Ph.D.; Oscar Quattrocchi, M.Sc.; Doris Rivera, M.Sc.

Vacunas y Métodos de Prueba para Vacunas <1235>WILLIAM EGAN, Ph.D., *Presidente*

Kathy Coelingh, Ph.D.; Maurice W. Harmon, Ph.D.; John P. Hennessey, Jr., Ph.D.; Niranjana M. Kumar, Ph.D., EMTM; Jack Love, Ph.D.; Joan C. May, Ph.D.; Sridhar Pennathur, Ph.D.; Cecile Ponsar, Ph.D.; Susan Powers, Ph.D.

Validación de Valoraciones Biológicas <1033>ROBERT SINGER, M.S.; *Presidente*

Janice D. Callahan, Ph.D.; David Lansky, Ph.D.; Brian R. Peterson; Nancy Sajjadi; Timothy Schofield

Sistema de Clasificación Biofarmacéutica para Productos VeterinariosMARK G. PAPICH, D.V.M., M.S., *Presidente*

Gordon L. Amidon, Ph.D.; Dawn M. Boothe, D.V.M., Ph.D.; Carol A. Davis, Ph.D.; Raafat Fahmy, Ph.D.; Marilyn N. Martinez, Ph.D.; Sanja Modric, Ph.D.; James E. Polli, Ph.D.

Farmacopea de Medicina Veterinaria

VERNON "CORY" LANGSTON, D.V.M., Ph.D.

Dawn M. Boothe, D.V.M., Ph.D.; Gigi S. Davidson, R.Ph.; Patricia M. Dowling, D.V.M.; Mark G. Papich, D.V.M., M.S.

Métodos de Pruebas Viroológicas <1237>BARRY D. GARFINKLE, Ph.D., *Presidente Interino*

Robert Bell, Ph.D.; Flavia Borellini, Ph.D.; Todd M. Gierman, Ph.D.; Kendall Graber; Douglas C. Lee, Ph.D.; Raymond Nims, Ph.D.; Mario J. Marcon; Raffaella Romeo, M.D., Ph.D.; Mike Rubino; John Saldanha, Ph.D.; Phillip C. Thomas; Martin Wisher, Ph.D.

Incorporaciones

Artículos Nuevos que Aparecen en Este Suplemento

CAPÍTULOS GENERALES

- | | |
|--|--|
| <p>⟨1052⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos</p> <p>⟨1053⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis Capilar</p> <p>⟨1054⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Isoelectroenfoque</p> <p>⟨1055⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Mapeo de Péptidos</p> <p>⟨1056⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poliacrilamida</p> | <p>⟨1057⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Valoración de Proteínas Totales</p> <p>⟨1070⟩ Ambulancias y Vehículos para Servicios Médicos de Emergencia—Almacenamiento de Preparaciones</p> <p>⟨1080⟩ Excipientes Farmacéuticos a Granel—Certificado de Análisis</p> <p>⟨1184⟩ Pruebas de Sensibilización</p> <p>⟨1217⟩ Fuerza de Ruptura de las Tabletas</p> |
|--|--|

SUPLEMENTOS DIETÉTICOS

Metilsulfonilmetano
Metilsulfonilmetano, Tabletas

NF 25

Copolímero de Amino Metacrilato
Aceite de Coco
Eritritol

Dispersión de Copolímero de Acrilato
de Etilo y Metacrilato de Metilo

USP 30

<p>Alúmina, Magnesia y Carbonato de Calcio, Tabletas Masticables</p> <p>Alúmina, Magnesia y Simeticona, Tabletas Masticables</p> <p>Alúmina, Magnesia, Carbonato de Calcio y Simeticona, Tabletas Masticables</p> <p>Sulfato de Aluminio y Acetato de Calcio para Solución Tópica</p> <p>Besilato de Amlodipino</p> <p>Subsalicilato de Bismuto, Suspensión Oral</p> <p>Subsalicilato de Bismuto, Tabletas</p> <p>Bisoctrizol</p> <p>Budesónida</p> <p>Carbonato de Calcio, Magnesia y Simeticona, Tabletas Masticables</p> <p>Ciprofloxacino y Dexametasona, Suspensión Ótica</p> <p>Dantroleno Sódico</p> <p>Dantroleno Sódico para Inyección</p> <p>Acetato de Desmopresina</p> <p>Acetato de Desmopresina, Inyección</p> <p>Desogestrel y Etinil Estradiol, Tabletas</p> <p>Didanosina</p> <p>Didanosina para Solución Oral</p> <p>Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio, Tabletas Masticables</p> <p>Doxazosina, Tabletas</p> <p>Drospirenona</p> <p>Estradiol y Acetato de Noretindrona, Tabletas</p> <p>Famotidina, Inyección</p>	<p>Fosinopril Sódico</p> <p>Fosinopril Sódico, Tabletas</p> <p>Fosinopril Sódico e Hidroclorotiazida, Tabletas</p> <p>Acetato de Gonadorelina</p> <p>Bitartrato de Hidrocodona y Metilbromuro de Homatropina, Tabletas</p> <p>Suspensión de Insulina Humana Isófana e Inyección de Insulina Humana</p> <p>Irbesartán, Tabletas</p> <p>Irbesartán e Hidroclorotiazida, Tabletas</p> <p>Mononitrato de Isosorbida, Tabletas</p> <p>Acetato de Leuprolida</p> <p>Lidocaína y Prilocaina, Crema</p> <p>Magaldrato y Simeticona, Tabletas Masticables</p> <p>Meloxicam</p> <p>Mupirocina, Crema</p> <p>Mupirocina Cálcea</p> <p>Clorhidrato de Nefazodona, Tabletas</p> <p>Nevirapina, Tabletas</p> <p>Norgestimato y Etinil Estradiol, Tabletas</p> <p>Pentazocina y Acetaminofeno, Tabletas</p> <p>Prednicarbato, Crema</p> <p>Prednicarbato, Ungüento</p> <p>Clorhidrato de Ropivacaína, Inyección</p> <p>Tiabendazol, Tabletas Masticables</p>
--	---

USP 30

Fenitoína, Tabletas Masticables
Clorhidrato de Fexofenadina, Tabletas
Acetato de Fluorometolona

Topiramato
Ácido Valproico, Inyección

Cambios en Títulos Oficiales que Aparecen en Este Suplemento

Los siguientes cambios de títulos serán oficiales a partir del 1° de febrero de 2010

Título Nuevo	Título Anterior
Alúmina, Magnesia y Carbonato de Calcio, Tabletas Masticables	Alúmina, Magnesia y Carbonato de Calcio, Tabletas
Alúmina, Magnesia y Simeticona, Tabletas Masticables	Alúmina, Magnesia y Simeticona, Tabletas
Alúmina, Magnesia, Carbonato de Calcio y Simeticona, Tabletas Masticables	Alúmina, Magnesia, Carbonato de Calcio y Simeticona, Tabletas
Carbonato de Calcio, Magnesia y Simeticona, Tabletas Masticables	Carbonato de Calcio, Magnesia y Simeticona, Tabletas
Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio, Tabletas Masticables	Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio, Tabletas
Fenitoína, Tabletas Masticables	Fenitoína, Tabletas
Magaldrato y Simeticona, Tabletas Masticables	Magaldrato y Simeticona, Tabletas
Tiabendazol, Tabletas Masticables	Tiabendazol, Tabletas

LISTA DETALLADA

Advertencias Generales, Monografías, Capítulos Generales, Reactivos y Tablas Afectadas por los Cambios que Aparecen en Este Suplemento

Los números de página se refieren a este Suplemento. Nota—La siguiente tabla indica, entre paréntesis, seguido del título de la sección o subsección, si la sección es nueva o si la subsección se agregó o eliminó de una sección ya existente. Las entradas que aparecen sin ninguna designación de la forma “nueva,” “agregada” o “eliminada” tienen cambios en la redacción que se incluyeron en el texto oficial existente.

Capítulos Generales*Pruebas y Valoraciones Generales*

REQUISITOS GENERALES PARA PRUEBAS Y VALORACIONES

- ⟨1⟩ Inyectables, 3838
Etiquetas y Etiquetado
Envasado
- ⟨11⟩ Estándares de Referencia USP, 3841

PRUEBAS Y VALORACIONES QUÍMICAS

OTRAS PRUEBAS Y VALORACIONES

- ⟨311⟩ Valoración de Alginatos, 3908
Aptitud del Sistema

PRUEBAS Y DETERMINACIONES FÍSICAS

- ⟨611⟩ Determinación de Alcohol, 3908
Método II—Método de Cromatografía de Gases
- ⟨621⟩ Cromatografía, 3909
Reactivos Cromatográficos (Rellenos L1, L7, L11 y L60)
- ⟨730⟩ Espectroquímica de Plasma, 3912
- ⟨785⟩ Osmolalidad y Osmolaridad, 3917
Osmolaridad
Medición de la Osmolalidad (subsección *Procedimiento*)
- ⟨905⟩ Uniformidad de Unidades de Dosificación, 3919
Introducción
Uniformidad de Contenido
Variación de Peso
Criterios
- ⟨921⟩ Determinación de Agua, 3924
Método 1 (Volumétrico) [subtítulo *Método 1a (Valoración Volumétrica Directa)*]

Información General

- ⟨1047⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Pruebas (eliminado), 3927
- ⟨1052⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos (nuevo), 3954
- ⟨1053⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis Capilar (nuevo), 3964
- ⟨1054⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Isoelectroenfoco (nuevo), 3968
- ⟨1055⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Mapeo de Péptidos (nuevo), 3970
- ⟨1056⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poliácridamida (nuevo), 3975
- ⟨1057⟩ Artículos Obtenidos por Biotecnología—Valoración de Proteínas Totales (nuevo), 3979
- ⟨1065⟩ Cromatografía Iónica, 3983
Aparatos
- ⟨1070⟩ Ambulancias y Vehículos para Servicios Médicos de Emergencia—Almacenamiento de Preparaciones (nuevo), 3985
- ⟨1080⟩ Excipientes Farmacéuticos a Granel—Certificado de Análisis (nuevo), 3985
- ⟨1118⟩ Dispositivos de Monitoreo—Tiempo, Temperatura y Humedad, 3991
Registadores Electrónicos de Historial de Tiempo—

Temperatura

- ⟨1184⟩ Pruebas de Sensibilización (nuevo), 3991
- ⟨1208⟩ Pruebas de Esterilidad—Validación de Sistemas Aisladores, 3999
Introducción
Diseño y Construcción del Aislador
Validación del Sistema Aislador
Verificación de la Integridad del Envase
Mantenimiento de la Asepsia en el Entorno del Aislador
Interpretación de los Resultados de las Pruebas de Esterilidad
Capacitación y Seguridad
- ⟨1217⟩ Fuerza de Ruptura de las Tabletas (nuevo), 4003
- ⟨1222⟩ Productos Farmacéuticos con Esterilización Terminal—Liberación Paramétrica, 4005
Introducción
Generalidades
Formas de Esterilización
Resumen

Reactivos, Indicadores y Soluciones

ESPECIFICACIONES DE LOS REACTIVOS

- Aceite de Cedro, 4009
- Acetaldehído, 4009
- Acetanilida, 4009
- Acetato Cobaltoso, 4009
- Acetato Cúprico, 4009
- Acetato de Amilo, 4009
- Acetato de Amonio, 4009
- Acetato de Butilo Normal, 4009
- Acetato de Cadmio, 4009
- Acetato de Calcio, 4010
- Acetato de Etilo, 4010
- Acetato de Gadolinio (Gd III) Hidrato, 4010
- Acetato de Isobutilo, 4010
- Acetato de Magnesio, 4010
- Acetato de Metilo, 4010
- Acetato de Plomo, 4010
- Acetato Mercúrico, 4010
- Acetilacetona, 4010
- Acetofenona, 4010
- Acetona, 4010
- Acetonitrilo, 4010
- p*-Acetotoluidida, 4010
- Ácido Acético Glacial, 4010
- Ácido Acrílico, 4011
- Ácido Adípico, 4011
- Ácido 4-Amino-2-clorobenzoico, 4011
- Ácido 4-Amino-3-hidroxi-1-naftalensulfónico, 4011
- Ácido Aminoacético, 4011
- Ácido Arsenazo III, 4011
- Ácido Benzoico, 4011
- Ácido 3-Benzoilbenzoico, 4011
- Ácido Benzoilfórmico (Ácido Fenilglioxílico), 4011
- Ácido 4,4'-Bis(4-amino-1-naftilazo)-2,2'-etilbenodisulfónico, 4011
- Ácido Bis(2-etilhexil)fosfórico, 4011
- Ácido Bórico, 4012
- Ácido Butírico, 4012
- Ácido *dl*-10-Canforsulfónico, 4012
- Ácido Cáprico, 4012
- Ácido Cianoacético, 4012
- Ácido Cítrico Anhidro, 4012

- Ácido Clorhídrico, 4012
Ácido Clorhídrico Diluido, 4012
Ácido 4-Clorobenzoico, 4012
Ácido *m*-Clorobenzoico, 4012
Ácido Clorogénico, 4012
Ácido 2-Cloronicotínico, 4012
Ácido Cloroplatínico, 4012
Ácido 5-Clorosalicílico, 4013
Ácido Cromotrópico, 4013
Ácido 2,6-Diclorofenilacético, 4013
Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico, 4013
Ácido Etanosulfónico, 4013
Ácido Fluorhídrico, 4013
Ácido Fórmico, 4013
Ácido Fórmico al 96 por ciento, 4013
Ácido Glicólico, 4013
Ácido D-Glucónico al 50 por ciento en Agua, 4013
Ácido *p*-Hidroxibenzoico, 4013
Ácido 4-Hidroxiisofáltico, 4013
Ácido Hipofosforoso al 50 por ciento, 4014
Ácido Isonicotínico, 4014
Ácido Litocólico, 4014
Ácido Maleico, 4014
Ácido Metacrílico, 4014
Ácido Metafosfórico, 4014
Ácido Metanosulfónico, 4014
Ácido 5,5'-Metilendisalicílico, 4014
Ácido 5-Metoxi-2-metil-3-indolacético 4014
Ácido Molíbdico, 4014
Ácido Monocloroacético, 4014
Ácido 2-Naftalenosulfónico, 4014
Ácido Nítrico, 4014
Ácido Nítrico Diluido, 4014
Ácido Nítrico Fumante, 4015
Ácido Nitrilotriacético, 4015
Ácido Nonanoico, 4015
Ácido Quenodesoxicólico, 4015
Ácido Yodhídrico, 4015
Ácido Yódico, 4015
Acrilato de Etilo, 4015
Alcohol Amílico, 4015
Alcohol *terc*-Amílico, 4015
Alcohol Butílico, 4015
Alcohol Butílico Secundario, 4015
Alcohol Butílico Terciario, 4015
Alcohol 2-Hidroxibencilico, 4015
Alcohol Isobutílico, 4015
Alcohol Isopropílico, 4015
Alcohol Isopropílico Deshidratado, 4016
Aleación de Devarda, 4016
Alumbre, 4016
Alúmina Activada, 4016
Alúmina Anhidra, 4016
Aluminio, 4016
Aluminón, 4016
Amaranto, 4016
4-Amino-6-cloro-1,3-bencenodisulfonamida, 4016
2-Amino-5-clorobenzofenona, 4016
3-Amino-1-propanol, 4016
4-Aminoantipirina, 4016
4-Aminobenzoato de Metilo, 4016
1-(2-Aminoetil)piperazina, 4016
m-Aminofenol, 4017
p-Aminofenol, 4017
N-Aminohexametilenimina, 4017
Anhídrido Acético, 4017
Anilina, 4017
Anisol, 4017
Antraceno, 4017
Antrona, 4017
Aprobarbital, 4017
Araquidato de Metilo, 4017
L-Asparagina, 4018
Azul Brillante Coomassie R-250, 4018
Azul de Anilina, 4018
Azul de Hidroxinaftol, 4018
Azul de Metileno, 4018
Azul de Tetrazolio, 4018
Behenato de Metilo, 4018
Benceno, 4018
Bencenosulfonamida, 4018
2-Bencilaminopiridina, 4018
1-Bencilimidazol, 4018
Benzaldehído, 4019
Benzanilida, 4019
Benzhidrol, 4019
Benzoato de Butilo, 4019
Benzoato de Colesterilo, 4019
Benzoato de Etilo, 4019
Benzofenona, 4019
p-Benzoquinona, 4019
Bibencilo, 4019
Bicarbonato de Aminoguanidina, 4019
Bifenilo, 4020
2,2'-Bipiridina, 4020
Bis(trimetilsilil)acetamida, 4020
Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, 4020
Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con Trimetilclorosilano, 4020
Bisulfato de Amonio, 4020
Bromo, 4020
p-Bromoanilina, 4020
N-Bromosuccinimida, 4020
Bromuro de Amonio, 4020
Bromuro de Cianógeno, 4021
Bromuro Mercúrico, 4021
1,3-Butanodiol, 4021
2,3-Butanodiona, 4021
terc-Butil Metil Éter, 4021
n-Butilamina, 4021
terc-Butilamina, 4021
4-*terc*-Butilfenol, 4021
Butiraldehído (nuevo), 4021
Butirolactona, 4021
Caprato de Metilo, 4022
Caprilato de Metilo, 4022
Carbamato de Metilo, 4022
Carbazol, 4022
Carbonato de Amonio, 4022
Carbonato de Calcio, 4022
Carbonato de Calcio, Estándar de Quelatometría, 4022
Caseína, 4022
Catecol, 4022
Cianoacetato de Etilo, 4022
Ciclohexano, 4022
Ciclohexanol, 4023
Cinconidina, 4023
Cinconina, 4023
L-Cistina, 4023
Citrato Cúprico, 4023
Citrato de Calcio, 4023
Citrato Dibásico de Amonio, 4023
Cloramina T, 4023
Clorhidrato de Alprenolol, 4023
Clorhidrato de Benzamidina Hidrato, 4023
Clorhidrato de Benzfetamina, 4024
Clorhidrato de 3,3'-Diaminobenzidina, 4024
Clorhidrato de Dihidroquinidina, 4024
Clorhidrato de 2-Etilaminopropiofenona, 4024
Clorhidrato de Fenilhidrazina, 4024
Clorhidrato de Guanidina, 4024
Clorhidrato de Guanina, 4024
Clorhidrato de Hidroxilamina, 4024
Clorhidrato de 1-Naftilamina, 4024
Cloro, 4024
2-Cloro-4-nitroanilina al 99%, 4025
1-Cloroadamantano, 4025
3-Cloroanilina, 4025
Clorobenceno, 4025
4-Clorobenzofenona, 4025
Cloroformiato de 9-Fluorenilmetilo, 4025
Cloroformo, 4025
1-Cloronaftaleno, 4025

- Clorotrimetilsilano, 4025
 Cloruro Cúprico, 4025
 Cloruro de Acetilcolina, 4025
 Cloruro de Acetilo, 4026
 Cloruro de Amonio, 4026
 Cloruro de Bario, 4026
 Cloruro de Bario Anhidro, 4026
 Cloruro de Bencenosulfonilo, 4026
 Cloruro de Benciltrimetilamonio, 4026
 Cloruro de Benzoilo, 4026
 Cloruro de *n*-Butilo, 4026
 Cloruro de Calcio, 4026
 Cloruro de Calcio Anhidro (para secado), 4026
 Cloruro de Cobalto, 4026
 Cloruro de Colina, 4026
 Cloruro de 3,5-Dinitrobenzoilo, 4026
 Cloruro de Lantano, 4027
 Cloruro de Litio, 4027
 Cloruro de Magnesio, 4027
 Cloruro de Metileno, 4027
 Cloruro de Oro, 4027
 Cloruro Férrico, 4027
 Cloruro Mercúrico, 4027
 Cobre, 4027
 Colestano, 4027
 Cortisona, 4027
 Decanol, 4027
 Dextrano de Alto Peso Molecular, 4027
 Dextrina, 4027
 Di(2-etilhexil)ftalato, 4027
 2,3-Diaminonaftaleno, 4028
 2,6-Dibromoquinona-clorimida, 4028
 Dibutilamina, 4028
 Diciclohexilamina, 4028
 Diclorhidrato de *N,N*-Dimetil-*p*-fenilendiamina, 4028
 Diclorhidrato de 4,4'-Dipiridilo, 4028
 Diclorhidrato de Hidrazina, 4028
 Diclorhidrato de *N*-(1-Naftil)etilendiamina, 4028
 2,4-Dicloro-1-naftol, 4028
 2,5-Dicloroanilina, 4028
 2,6-Dicloroanilina, 4028
o-Diclorobenceno, 4029
 2,6-Diclorofenol-indofenol Sódico, 4029
 Diclorofluoresceína, 4029
 Diclorofluorometano, 4029
 Dicloruro de Etileno, 4029
 Dietilamina, 4029
N,N-Dietilanilina, 4029
 Dietilenglicol, 4029
 Dietilentriamina, 4029
 Difenilamina, 4030
 Difenilcarbazona, 4030
 Difenilcarbazona, 4030
 2,2-Difenilglicina, 4030
 Digitonina, 4030
 10-11-Dihidrocarbamazepina (eliminado), 4030
 Dihidroquinina, 4030
 Diisopropilamina, 4030
 Diisopropiletilamina, 4030
 Dimetil Sulfona, 4030
 Dimetil Sulfóxido, Grado Espectrofotométrico, 4030
 5,5-Dimetil-1,3-ciclohexanodiona, 4030
N,N-Dimetil-1-naftilamina, 4030
N,N-Dimetilacetamida, 4031
p-Dimetilaminoazobenceno, 4031
p-Dimetilaminobenzaldehído, 4031
 2,6-Dimetilanilina, 4031
N,N-Dimetilaminilina, 4031
 3,4-Dimetilbenzofenona, 4031
 2,6-Dimetilfenol, 4031
 Dimetilformamida, 4032
N,N-Dimetilformamida Dietil Acetal (eliminado), 4032
N,N-Dimetiloctilamina, 4032
 2,5-Dimetoxibenzaldehído, 4032
 1,2-Dimetoxietano, 4032
 (3,4-Dimetoxifenil)-acetonitrilo, 4032
m-Dinitrobenceno, 4032
 2,4-Dinitroclorobenceno, 4032
 2,4-Dinitrofenilhidrazina, 4032
 2,4-Dinitrofluorobenceno, 4032
 Dioxano, 4032
 Dióxido de Manganeso Activado, 4032
 Disulfuro de Carbono, CS₂, 4032
 5,5'-Ditio bis (Ácido 2-Nitrobenzoico), 4032
 Ditiotreitol, 4033
 Ditizona, 4033
 Diyodofluoresceína, 4033
 Docusato Sódico, 4033
 1-Dodecanol, 4033
n-Eicosano, 4033
 Eicosanol, 4033
 Eosina Y (Eosina Amarillenta Y), 4033
 Epiandrosterona, 4033
 Equilenina, 4033
 Eriocromo Cianina R, 4033
 Erucato de Metilo, 4033
 Estándar Certificado de Óxido Nitroso, 4033
 Estearato de Metilo, 4034
 Éster Isopropílico del Ácido 4-Hidroxibenzoico, 4034
 Éter Butílico, 4034
 Éter de Petróleo, 4034
 Éter Difenílico, 4034
 Éter Diisopropílico, 4034
 Éter Etilico, 4034
 Éter Etilico Anhidro, 4034
 Etilbenceno, 4034
 4-Etilbenzaldehído, 4034
 Etilenglicol, 4034
 2-Etoxietanol, 4035
 Fluoreno, 4035
 Fluorescamina, 4035
 4'-Fluoroacetofenona, 4035
 Fluoruro de Amonio, 4035
 Formamida, 4035
 Fosfato Dibásico de Amonio, 4035
 Fosfato Monobásico de Amonio, 4035
 Ftalato de Bis(2-etilhexilo), 4035
 Ftalato de Dibutilo, 4035
 Ftalato de Diisodecilo, 4035
 Ftalato de Dimetilo, 4035
 Ftalato de Dipropilo, 4036
 Fucsina Básica, 4036
 Gel de Sílice Octadecilsilanizada para Cromatografía, 4036
 Gitoxina, 4036
 Glicerina, 4036
 Glucosa, 4036
 D-Glucuronolactona, 4036
 Guayacol, 4036
 Hemateína, 4036
 Hematoxilina, 4036
 Hemiclорhidrato de Carboximetoxilamina, 4037
 Heptadecanoato de Metilo, 4037
n-Heptano para Cromatografía, 4037
 Hexadecanoato de Hexadecilo, 4037
 Hexametildisilazano, 4037
 Hexametenimina, 4037
 Hexanitrodifenilamina, 4037
n-Hexano, 4037
 Hexanofenona, 4037
 Hidrazina Hidrato al 85% en Agua, 4037
 Hidroquinona, 4038
 3'-Hidroxiacetofenona, 4038
 4'-Hidroxiacetofenona, 4038
 1-Hidroxibenzotriazol Hidrato, 4038
 Hidróxido de Amonio, 4038
 Hidróxido de Amonio, 4038
 Hidróxido de Amonio al 25 por ciento, 4038
 Hidróxido de Bario, 4038
 Hidróxido de Calcio, 4038
 Hidróxido de Litio, 4038
 4-(4-Hidroxifenil)-2-butanona, 4038
 D- α -4-Hidroxifenilglicina, 4038

8-Hidroxiquinolina, 4038
 Imidazol, 4038
 Iminoestilbeno (eliminado), 4038
 Indeno, 4038
 Inosina, 4039
 Inositol, 4039
 Isopropilamina, 4039
 Lactato de Calcio, 4039
 Lactosa, 4039
 Laurato de Metilo, 4039
 Lignocerato de Metilo, 4039
 Linoleato de Metilo, 4039
 Linolenato de Metilo, 4039
 L-Lisina, 4040
 Magnesio, 4040
 Maleato de Bis(2-etilhexilo), 4040
 Mercurio, 4040
 Metaborato de Litio, 4040
 Metacrilato de Butilo, 4040
 Metacrilato de 2-Dimetilaminoetilo, 4040
 Metacrilato de Metilo, 4040
 Metanol, 4040
 Metil Cloroformo, 4040
 Metil Etil Cetona, 4040
 Metil Sulfóxido, 4040
 4-Metil-2-pentanona, 4040
 2-Metil-2-propil-1,3-propanodiol, 4040
 Metilamina al 40 por ciento en Agua, 4040
N-Metilpirrolidina, 4041
 Metoxietanol, 4041
 2-Metoxietanol, 4041
 Miristato de Isopropilo, 4041
 Miristato de Metilo, 4041
 Molibdato de Amonio, 4041
 Monobromuro de Yodo, 4041
 Monocloruro de Yodo, 4041
 Monóxido de Plomo, 4041
 Morfolina, 4041
 Naftaleno, 4041
 1,3-Naftalenodiol, 4042
 2,7-Naftalenodiol, 4042
 2-Naftil Cloroformiato, 4042
 1-Naftol, 4042
 2-Naftol, 4042
p-Naftolbenceína, 4042
 Naftoresorcinol, 4042
 β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido, 4042
 Ninhidrina, 4042
 Níquel, 4042
 Nitrato de Amonio, 4042
 Nitrato de Bario, 4042
 Nitrato de Cadmio, 4042
 Nitrato de Calcio, 4043
 Nitrato de Cobalto, 4043
 Nitrato de Litio, 4043
 Nitrato de Magnesio, 4043
 Nitrato de Plomo, 4043
 Nitrato Férrico, 4043
 Nitrato Mercúrico, 4043
 5-Nitro-1,10-fenantrolina, 4043
 4'-Nitroacetofenona, 4043
o-Nitroanilina, 4043
p-Nitroanilina, 4043
 Nitrobenzeno, 4044
 4-(*p*-Nitrobencil)piridina, 4044
 Nitrometano, 4044
 1-Nitroso-2-naftol, 4044
 Nonadecano, 4044
 Oleato de Metilo, 4044
 Oxalato de Amonio, 4044
 Óxido de Aluminio, Lavado con Ácido, 4044
 Óxido de Deuterio, 4044
 Óxido de Magnesio, 4044
 Óxido de Mesitilo, 4045
 Óxido Mercúrico Amarillo, 4045
 Palmitato de Metilo, 4045

Pentacloruro de Antimonio, 4045
 Perclorato de Litio, 4045
 Perclorato de Magnesio Anhidro, 4045
 Peróxido de Hidrógeno al 30 por ciento, 4045
 Persulfato de Amonio, 4045
 Poliéster de Succinato de Dietilenglicol, 4045
 Púrpura de *m*-Cresol, 4046
 Queroseno, 4046
 Reineckato de Amonio, 4046
 Rojo Congo, 4046
 Sal de Fast Blue B, 4046
 Sal de Fast Blue BB, 4046
 Sal Disódica de Ácido Cromotrópico, 4046
 Sal Nitroso R, 4046
 Salicilato de Etilo, 4046
 Sebacato de Bis(2-etilhexilo), 4046
 Sílice de Diatomeas Calcinado, 4046
 Sulfamato de Amonio, 4047
 Sulfato Cérico, 4047
 Sulfato Cúprico Anhidro, 4047
 Sulfato de Aluminio y Potasio, 4047
 Sulfato de Amonio, 4047
 Sulfato de Brucina, 4047
 Sulfato de Calcio, 4047
 Sulfato de Litio, 4047
 Sulfato de Magnesio, 4047
 Sulfato de Magnesio Anhidro, 4047
 Sulfato de *p*-Metilaminofenol, 4047
 Sulfato de Níquel, 4048
 Sulfato Férrico, 4048
 Sulfato Ferroso, 4048
 Sulfato Mercúrico, 4048
 Sulfuro de Hidrógeno, 4048
 Tetracloruro de Carbono, 4048
 Tetrafluoroborato de *p*-Nitrobenzenodiazonio, 4048
 Tierra de Diatomeas Fundido-Calcinada, 4048
 Tierra de Diatomeas Silanizada, 4048
 Tiocianato de Amonio, 4049
 Tiocianato Mercúrico, 4049
 Tornasol, 4049
 Tricloruro de Antimonio, 4049
 Trifluoruro de Boro, 4049
 Trifluoruro de Boro al 14% en Metanol, 4049
 Trióxido de Arsénico, 4049
 Trióxido de Cromo, 4049
 Vanadato de Amonio, 4049
 Verde Brillante, 4049
 Yodo, 4049
 Yoduro de 1-Etilquinaldino, 4049
 Yoduro de Metilo, 4049
 Yoduro Mercúrico Rojo, 4050

SOLUCIONES VOLUMÉTRICAS

Hidróxido de Potasio, Normal (1 N), 4050
 Hidróxido de Sodio, Normal (1 N), 4050
 Tiosulfato de Sodio, Décimo Normal (0,1 N), 4050

Tablas de Referencia

ESPECIFICACIONES DEL ENVASE PARA TABLETAS Y CÁPSULAS

Bitartrato de Hidrocodona y Metilbromuro de Homatropina, Tabletetas (agregada), 4051
 Clorhidrato de Fexofenadina, Tabletetas (agregada), 4051
 Clorhidrato de Fexofenadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina, Tabletetas de Liberación Prolongada (agregada), 4051
 Clorhidrato de Nefazodona, Tabletetas (agregada), 4051
 Desogestrel y Etinil Estradiol, Tabletetas (agregada), 4051
 Doxazosina, Tabletetas (agregada), 4051
 Estradiol y Acetato de Noretindrona, Tabletetas (agregada), 4051
 Fosinopril Sódico, Tabletetas (agregada), 4051
 Fosinopril Sódico e Hidroclorotiazida, Tabletetas (agregada), 4051
 Irbesartán, Tabletetas (agregada), 4051
 Irbesartán e Hidroclorotiazida, Tabletetas (agregada), 4051

Metilsulfonilmetano, Tabletas (agregada), 4051
 Mononitrato de Isosorbida, Tabletas (agregada), 4051
 Nevirapina, Tabletas (agregada), 4051
 Norgestimato y Etinil Estradiol, Tabletas (agregada), 4051
 Pentazocina y Acetaminofeno, Tabletas (agregada), 4051
 Quinapril, Tabletas (agregada), 4051

DESCRIPCIÓN Y SOLUBILIDAD RELATIVA DE ARTÍCULOS DE LA USP Y DEL NF

Aceite de Coco (agregada), 4052
 Acetato de Desmopresina (agregada), 4052
 Acetato de Gonadorelina (agregada), 4052
 Besilato de Amlodipino (agregada), 4052
 Budesónida (agregada), 4052
 Copolímero de Amino Metacrilato (agregada), 4052
 Dantroleno Sódico (agregada), 4052
 Didanosina (agregada), 4052
 Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo (agregada), 4052
 Drospirenona (agregada), 4053
 Eritritol (agregada), 4053
 Estrógenos Conjugados Sintéticos (agregada), 4053
 Meloxicam (agregada), 4053
 Metilsulfonilmetano (agregada), 4053
 Milrinona, 4053
 Sevoflurano (agregada), 4053
 Topiramato (agregada), 4053

Monografías (Suplementos Dietéticos)

Extracto de Tomate con Licopeno, 4054
Recuento microbiano
Límite de aflatoxinas
 Metilsulfonilmetano (nueva), 4054
 Metilsulfonilmetano, Tabletas (nueva), 4055
 Valeriana, 4055
Envasado y almacenamiento
Sustancias extraíbles
Recuento microbiano
 Valeriana en Polvo, 4056
Envasado y almacenamiento
Etiquetado
Características botánicas
 Valeriana, Tabletas, 4056
Envasado y almacenamiento
Estándares de referencia USP

Excipientes

Agente Edulcorante
 Eritritol, 4057
 Agente Emulsionante y/o Solubilizante
 Aceite de Coco, 4057
 Agente de Recubrimiento
 Aceite de Coco, 4057
 Copolímero de Amino Metacrilato, 4057
 Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo, 4057
 Aglutinante de Tabletas
 Copolímero de Amino Metacrilato, 4058
 Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo, 4058
 Humectante
 Eritritol, 4058
 Polímero de Membrana
 Copolímero de Amino Metacrilato, 4058
 Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo, 4058

Monografías (NF 25)

Alfadex, 4059
 Definición
Envasado y almacenamiento (agregada)
Pérdida por secado (eliminada)
 Agua (agregada)
Azúcares reductores (subsección *Solución de prueba*)

Impurezas que absorben luz (subsección *Solución de prueba*)
Valoración
 Copolímero de Amino Metacrilato (nueva), 4060
 Silicato de Calcio, 4061
 Definición
pH
Límite de fluoruro
Valoración de dióxido de silicio
Valoración de óxido de calcio
 Aceite de Coco (nueva), 4062
 Eritritol (nueva), 4062
 Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo (nueva), 4063
 Óxido de Polietileno, 4064
Envasado y almacenamiento
Identificación (prueba B)
Límite de óxido de etileno libre (subsecciones *Sistema cromatográfico* y *Procedimiento*)
 Poliiisobutileno, 4065
Pérdida por secado
 Fosfato Tribásico de Sodio, 4065
Pérdida por incineración

Monografías (USP 30)

Agua Estéril para Inhalación, 4066
pH (eliminada)
Amoniaco (eliminada)
Calcio (eliminada)
Dióxido de carbono (eliminada)
Cloruros (eliminada)
Sulfatos (eliminada)
Conductividad (agregada)
 Agua Estéril para Irrigación, 4066
pH (eliminada)
Amoniaco (eliminada)
Calcio (eliminada)
Dióxido de carbono (eliminada)
Cloruros (eliminada)
Sulfatos (eliminada)
Conductividad (agregada)
 Agua Purificada Estéril, 4067
pH (eliminada)
Amoniaco (eliminada)
Calcio (eliminada)
Dióxido de carbono (eliminada)
Cloruros (eliminada)
Sulfatos (eliminada)
Conductividad (agregada)
 Alopurinol, 4067
 Definición
Envasado y almacenamiento
Estándares de referencia USP
Pureza cromatográfica (eliminada)
Compuestos relacionados (agregada)
Valoración
 Alúmina, Magnesio y Carbonato de Calcio, Tabletas, 4069
 Cambio de título
 Alúmina, Magnesio y Carbonato de Calcio, Tabletas Masticables (nueva), 4069
 Alúmina, Magnesio y Simeticona, Tabletas, 4070
 Cambio de título
 Alúmina, Magnesio y Simeticona, Tabletas Masticables (nueva), 4070
 Alúmina, Magnesio, Carbonato de Calcio y Simeticona, Tabletas, 4071
 Cambio de título
 Alúmina, Magnesio, Carbonato de Calcio y Simeticona, Tabletas Masticables, (nueva), 4071
 Sulfato de Aluminio y Acetato de Calcio para Solución Tópica (nueva), 4073
 Amifostina, 4074
Compuestos relacionados (subsección *Procedimiento*)
 Amifostina para Inyección, 4074
 Definición
Compuestos relacionados (subsecciones *Solución de prueba* y

- Procedimiento*
 Besilato de Amlodipino (nueva), 4075
 Besilato de Atracurio, 4076
Pureza cromatográfica (subsección *Procedimiento*)
Valoración (subsección *Sistema cromatográfico*)
 Azitromicina, 4077
Etiquetado
Estándares de referencia USP
Límite de sustancias relacionadas
 Subsalicilato de Bismuto, Suspensión Oral (nueva), 4078
 Subsalicilato de Bismuto, Tabletas (nueva), 4079
 Bisotrizol (nueva), 4079
 Budesónida (nueva), 4080
 Clorhidrato de Bupropión, Tabletas de Liberación Prolongada, 4082
Disolución
 Carbonato de Calcio, Magnesio y Simeticona, Tabletas, 4083
 Cambio de título
 Carbonato de Calcio, Magnesio y Simeticona, Tabletas Masticables (nueva), 4083
 Cefadroxilo para Suspensión Oral, 4084
Disolución (agregada)
 Clorhidrato de Cefepima, 4085
Límite de N-metilpirrolidina (subsecciones *Solución de enjuague de la columna*, *Sistema cromatográfico* y *Procedimiento*)
Compuestos relacionados (subsecciones *Solución A*, *Solución B*, *Sistema cromatográfico* y *Procedimiento*)
 Cimetidina, 4086
Identificación (prueba A)
Pureza cromatográfica (subsección *Procedimiento*)
 Ciprofloxacino, 4086
Pureza cromatográfica
Valoración (subsecciones *Solución de resolución* y *Sistema cromatográfico*)
 Ciprofloxacino, Inyección, 4087
Límite de análogo etilendiamínico de ciprofloxacino
Valoración
 Clorhidrato de Ciprofloxacino, 4087
Pureza cromatográfica
Valoración (subsecciones *Solución de resolución* y *Sistema cromatográfico*)
 Ciprofloxacino y Dexametasona, Suspensión Ótica (nueva), 4088
 Cladribina, 4090
Agua
 Claritromicina, Tabletas de Liberación Prolongada, 4090
Disolución
 Gluconato de Clorhexidina, Enjuague Oral, 4092
Valoración (subsección *Procedimiento*)
 Gluconato de Clorhexidina, Solución, 4092
Valoración (subsección *Procedimiento*)
 Complejo de Clorofilina—Cobre Sódico, 4093
Contenido de cobre total (subsección *Soluciones estándar*)
 Resina de Colestiramina, 4093
Aminas cuaternarias dializables (subsecciones *Solución estándar* y *Solución de prueba*)
 Dantroleno Sódico (nueva), 4094
 Dantroleno Sódico para Inyección (nueva), 4095
 Acetato de Desmopresina (nueva), 4096
 Acetato de Desmopresina, Inyección (nueva), 4098
 Desogestrel y Etil Estradiol, Tabletas (nueva), 4099
 Diazepam, Cápsulas de Liberación Prolongada, 4100
Estándares de referencia USP
Valoración (subsecciones *Solución del estándar interno* y *Procedimiento*)
 Didanosina (nueva), 4101
 Didanosina para Solución Oral (nueva), 4101
 Clorhidrato de Difenoxilato y Sulfato de Atropina, Solución Oral, 4102
Identificación
Valoración (eliminada)
Valoración de sulfato de atropina (eliminada)
Valoración (agregada)
 Clorhidrato de Difenoxilato y Sulfato de Atropina, Tabletas, 4103
Identificación
Valoración de clorhidrato de difenoxilato (eliminada)
Valoración de sulfato de atropina (eliminada)
Valoración (agregada)
 Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio, Tabletas, 4105
 Cambio de título
 Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio, Tabletas Masticables (nueva), 4105
 Doxazosina, Tabletas (nueva), 4105
 Clorhidrato de Doxepina, 4105
Estándares de referencia USP
Identificación (prueba B)
Intervalo de fusión (eliminada)
Contenido de cloruro (eliminada)
Compuestos relacionados (agregada)
 Dronabinol, 4106
Estándares de referencia USP
Identificación
Límite de delta-8-tetrahidrocannabinol (eliminada)
Compuestos relacionados (agregada)
Valoración
 Drospironona (nueva), 4108
 Espironolactona e Hidroclorotiazida, Tabletas, 4109
Disolución
 Estradiol y Acetato de Noretindrona, Tabletas (nueva), 4109
 Etotoina, Tabletas, 4111
Estándares de referencia USP
Valoración
 Famotidina, Inyección (nueva), 4112
 Fenitoína, Tabletas, 4113
 Cambio de título
 Fenitoína, Tabletas Masticables (nueva), 4113
 Clorhidrato de Fexofenadina, Tabletas (nueva), 4114
 Fluconazol, 4115
Compuestos relacionados (subsecciones *Prueba 1* y *Prueba 2*)
 Flumazenil, 4117
Estándares de referencia USP
Compuestos relacionados
Valoración
 Acetato de Fluorometolona (nueva), 4118
 Propionato de Fluticasona, 4119
 Definición
Contenido de bromofluorometano (eliminada)
 Maleato de Fluvoxamina, 4119
Ácido maleico (eliminada)
Valoración (subsección *Sistema cromatográfico*)
 Maleato de Fluvoxamina, Tabletas, 4120
Compuestos relacionados (agregada)
 Fosinopril Sódico (nueva), 4121
 Fosinopril Sódico, Tabletas (nueva), 4123
 Fosinopril Sódico e Hidroclorotiazida, Tabletas (nueva), 4124
 Acetato de Gonadorelina (nueva), 4126
 Bitartrato de Hidrocodona, 4128
Estándares de referencia USP
Impurezas comunes (eliminada)
 Bitartrato de Hidrocodona y Metilbromuro de Homatropina, Tabletas (nueva), 4128
 Ibuprofeno, 4130
Estándares de referencia USP
Límite de compuesto relacionado C de ibuprofeno
Valoración
 Ibuprofeno, Suspensión Oral, 4130
Estándares de referencia USP
Límite de compuesto relacionado C de ibuprofeno
Valoración (subsección *Preparación de valoración*)
 Ibuprofeno, Tabletas, 4131
Estándares de referencia USP
Límite de compuesto relacionado C de ibuprofeno
Valoración
 Sulfato de Indinavir, 4132
Metales pesados (eliminada)
Metales pesados (agregada)
Pureza cromatográfica (subsecciones *Sistema cromatográfico* y *Procedimiento*)
Valoración (subsección *Solución amortiguadora de fosfato de dibutilamonio*)
 Verde de Indocianina, 4133
 Definición
 Suspensión de Insulina Humana Isófana e Inyección de Insulina Humana

(nueva), 4133
 Irbesartán, 4134
Límite de azida (subsección *Sistema cromatográfico*)
Compuestos relacionados (subsección *Solución de prueba*)
 Irbesartán, Tabletas (nueva), 4135
 Irbesartán e Hidroclorotiazida, Tabletas (nueva), 4136
 Mononitrato de Isosorbida, Tabletas (nueva), 4137
 Lamivudina, 4138
Valoración (subsección *Solución de aptitud del sistema*)
 Acetato de Leuprolida (nueva), 4139
 Lidocaína y Prilocaina, Crema (nueva), 4140
 Clorhidrato de Loperamida, Solución Oral, 4141
Valoración (subsección *Preparación estándar*)
 Magaldrato y Simeticona, Tabletas, 4141
 Cambio de título
 Magaldrato y Simeticona, Tabletas Masticables (nueva), 4141
 Leche de Magnesio, 4142
Límite de calcio (eliminada)
 Meloxicam (nueva), 4143
 Metildopa, Suspensión Oral, 4145
Estándares de referencia USP
Límite de producto de reacción de metildopa-glucosa (eliminada)
 Metilprednisolona, 4145
Pureza cromatográfica (subsección *Procedimiento*)
 Mitoxantrona, Inyección, 4146
Envasado y almacenamiento
 Tartrato de Morantel, 4146
pH
 Mupirocina, Crema (nueva), 4146
 Mupirocina Cálcica (nueva), 4147
 Clorhidrato de Nefazodona, 4148
Compuestos relacionados (agregada)
 Clorhidrato de Nefazodona, Tabletas (nueva), 4149
 Nevirapina, Tabletas (nueva), 4150
 Nimodipino, 4151
Identificación (prueba B)
Compuestos relacionados
 Nitrofurantoína, Cápsulas, 4152
Disolución
 Norgestimato y Etinil Estradiol, Tabletas (nueva), 4153
 Ondansetrón, 4154
Envasado y almacenamiento (agregada)
 Cloruro de Oxibutinina, 4155
Compuestos relacionados (subsección *Procedimiento*)
 Clorhidrato de Paroxetina, 4155
Valoración (subsecciones *Fase móvil y Sistema cromatográfico*)
 Pentazocina y Acetaminofeno, Tabletas (nueva), 4156
 Pentobarbital Sódico, Inyección, 4157
Identificación

Valoración
 Clorhidrato de Piridoxina, Inyección, 4157
Valoración (subsección *Procedimiento*)
 Perclorato de Potasio, 4158
Estándares de referencia USP (eliminada)
Valoración (subsecciones *Preparación estándar y Procedimiento*)
 Prednicarbato, Crema (nueva), 4158
 Prednicarbato, Ungüento (nueva), 4159
 Fosfato Sódico de Prednisolona, 4160
Estándares de referencia USP
Identificación (prueba A)
 Quazepam, Tabletas, 4160
Estándares de referencia USP
Valoración (subsecciones *Solución del estándar interno y Sistema cromatográfico*)
 Quinapril, Tabletas, 4161
Envasado y almacenamiento
 Ritonavir, 4161
Identificación (prueba A)
Compuestos relacionados
 Clorhidrato de Ropivacaína, Inyección (nueva), 4162
 Saquinavir, Cápsulas, 4163
Disolución
 Fluoruro de Sodio y Ácido Fosfórico, Solución (eliminada), 4163
 Salicilato de Sodio, Tabletas, 4164
Disolución (subsección *Procedimiento*)
 Tiabendazol, Tabletas, 4164
 Cambio de título
 Tiabendazol, Tabletas Masticables (nueva), 4164
 Topiramato (nueva), 4165
 Triclosán, 4166
Valoración (subsecciones *Preparación estándar, Preparación de valoración y Procedimiento*)
 Tripsina Cristalizada, 4166
 Definición
 Ácido Valproico, Inyección (nueva), 4166
 Vasopresina, 4167
Identificación (prueba B)
 Clorhidrato de Verapamilo, Inyección, 4167
Estándares de referencia USP
Compuestos relacionados (subsecciones *Solución estándar y Procedimiento*)
 Clorhidrato de Verapamilo, Tabletas, 4168
Estándares de referencia USP
Compuestos relacionados (subsecciones *Solución estándar y Procedimiento*)
 Vinorelbina, Inyección, 4169
 Definición
Valoración

Primer Suplemento de USP 30 y de NF 25

INTRODUCCIÓN

Información General—Las revisiones de la USP–NF se publican en la edición anual, en alguno de los dos *Suplementos* de la edición anual, o en alguno de los *Anuncios de Revisión Intermedia* que aparecen en las ediciones bimestrales del *Pharmacopeial Forum* o en un Boletín de Revisión (*Revision Bulletin*) que aparece en el sitio web de la USP. Las revisiones entran en vigencia en la fecha oficial de la publicación, a menos que se especifique algo diferente. La USP y el NF se publican en medios impresos y electrónicos. La edición anual y ambos *Suplementos* tienen numeración consecutiva. Los *Suplementos* impresos no son acumulativos. Para asegurar la referencia acumulada, el índice del *Primer Suplemento* proporciona citas de páginas del mismo *Suplemento* y, cuando corresponde, de la edición anual. El índice del *Segundo Suplemento* proporciona citas de páginas del mismo *Suplemento* y, cuando corresponde, de la edición anual y del *Primer Suplemento*. Los productos electrónicos (Internet y CD-ROM) son acumulativos al igual que sus índices. Las revisiones de este *Suplemento* son oficiales y entran en vigencia el 1° de agosto de 2007, excepto que se especifique algo diferente.

Anuncios de Revisión Intermedia—Los *Anuncios de Revisión Intermedia* se publican, según sea necesario, en el *Pharmacopeial Forum* y se incorporan al siguiente *Suplemento* o edición anual. Los *Anuncios de Revisión Intermedia* también pueden obtenerse solicitándolos a la USP.

Símbolos que Indican Cambios en el Texto Oficial—Son los símbolos que identifican el comienzo y el final de cada revisión. En los *Suplementos*, un superíndice cuadrado de color negro marca el inicio de una revisión y un subíndice cuadrado de color negro marca el final. Para los *Anuncios de Revisión Intermedia*, que se publican seis veces por año, se utilizan círculos de color negro. Junto al subíndice hay un número que relaciona la fecha oficial de la revisión con el *Suplemento* o *Anuncio de Revisión Intermedia* correspondiente. Por ejemplo, un subíndice cuadrado de color negro con el número 1 junto a él indica que la revisión será oficial mediante el *Primer Suplemento*. La tabla siguiente muestra símbolos y fechas oficiales para los *Anuncios de Revisión Intermedia* y los *Suplementos* de USP 30–NF 25:

USP 30–NF 25 Documento de Revisión			
Suplemento	Anuncio de Revisión Intermedia	Fecha Oficial	Símbolos
1	PF 33(1)	1° de febrero de 2007	•y●
		1° de agosto de 2007	■y■ _{1S} (USP30)
	PF 33(2)	1° de abril de 2007	•y●
2	PF 33(3)	1° de junio de 2007	•y●
		1° de diciembre de 2007	■y■ _{2S} (USP30)
	PF 33(4)	1° de agosto de 2007	•y●

USP 30–NF 25 Documento de Revisión

Suplemento	Anuncio de Revisión Intermedia	Fecha Oficial	Símbolos
	PF 33(5)	1° de octubre de 2007	•y● ₅
	PF 33(6)	1° de diciembre de 2007	•y● ₆

Cambios en el Título Oficial—La frase “*Cambio de título de la monografía*” significa que el nuevo título oficial reemplaza al título anterior dondequiera que aparezca la monografía afectada. En los textos oficiales posteriores, sólo se usará el nuevo título oficial, lo que puede cambiar el orden alfabético de las monografías. Los cambios de título de una monografía a menudo no se oficializan de inmediato, sino que pueden posponerse a una fecha futura para que las partes afectadas puedan adoptar la nueva terminología y cualquier cambio de etiquetado relacionado. La fecha de entrada en vigencia generalmente es dieciocho (18) meses después de la fecha oficial y se indica en la sección de *Incorporaciones* del *Suplemento* y en la propia monografía.

Si el cambio de título es la única revisión en una monografía, entonces el título actualmente en vigencia estará seguido de una referencia al nuevo nombre oficial que entrará en vigencia en la fecha especificada. Además, y según fuera necesario, estas últimas monografías se presentarán en su totalidad para representar sin ninguna ambigüedad la norma completa a partir de la fecha de entrada en vigencia. Para indicar esto, aparece un superíndice cuadrado de color negro al inicio de la monografía y un subíndice cuadrado de color negro marcando el final.

Nuevos Estándares de Referencia USP—Los siguientes Estándares de Referencia USP, no disponibles a la fecha de oficialización de la monografía asociada, se encuentran ahora a disposición. La respectiva fecha oficial de cada norma, prueba o valoración de USP 30 o NF 25 que requiera el uso de los siguientes Estándares de Referencia USP se indica entre paréntesis luego del nombre del Estándar de Referencia.

ER Bromhidrato de Citalopram USP (1° de mayo de 2007)
 ER Cladribina USP (1° de agosto de 2007)
 ER Compuesto Relacionado A de Cladribina USP (1° de julio de 2007)
 ER Escina USP (1° de enero de 2007)
 ER Microfotografías de Referencia de Cultivo de Feocromocitoma de Ratas USP (1° de mayo de 2007)
 ER Fluvastatina Sódica USP (1° de marzo de 2007)
 ER Compuesto Relacionado B de Gabapentina USP (1° de julio de 2007)
 ER Monooleato de Glicerilo USP (1° de agosto de 2007)
 ER Hexacosanol USP (1° de marzo de 2007)
 ER Irbesartán USP (1° de agosto de 2007)
 ER Compuesto Relacionado A de Irbesartán USP (1° de julio de 2007)
 ER Compuesto Relacionado A de Mecamylamina USP (1° de marzo de 2007)
 ER Mezcla de Resolución de Naratriptán USP (1° de mayo de 2007)
 ER Nimodipino USP (1° de julio de 2007)

ER Compuesto Relacionado A de Nimodipino USP (1° de julio de 2007)
 ER Éter Polioxil 10 Oleílico USP (1° de agosto de 2007)
 ER Compuesto Relacionado B de Ramipril USP (1° de mayo de 2007)
 ER Sacarina Sódica USP (1° de marzo de 2007)
 ER Sulisobenzona USP (1° de enero de 2007)
 ER Clorhidrato de Tizanidina USP (1° de agosto de 2007)
 ER Compuesto Relacionado A de Tizanidina USP (1° de julio de 2007)
 ER Compuesto Relacionado B de Tizanidina USP (1° de julio de 2007)
 ER Compuesto Relacionado C de Tizanidina USP (1° de julio de 2007)

Estándares de Referencia USP Oficiales por Primera Vez, No Disponibles—Las fechas oficiales de cualquier norma, prueba o valoración *USP 30* o *NF 25* que requiera el uso de los siguientes nuevos Estándares de Referencia USP se posponen hasta nuevo anuncio de disponibilidad de los respectivos Estándares de Referencia. A continuación se presenta el listado actualizado al primero de diciembre de 2006.

ER Albúmina Humana USP
 ER Alteplasa USP
 ER Amifostina USP
 ER Amifostina Tiol USP
 ER Antitrombina III Humana USP
 ER Aprotinina USP
 ER Aptitud del Sistema de Aprotinina USP
 ER Bromuro de Cetrimonio USP
 ER Calibrador de Infrarrojo Cercano USP
 ER Copolímero de Polipropileno USP
 ER Decoquinato USP
 ER Microfotografías de Referencia de Sustituto Dérmico Crioconservado Derivado de Fibroblastos Humanos USP
 ER Microfotografías de Referencia de Sustituto Dérmico Temporal Derivado de Fibroblastos Humanos USP
 ER Difosfato de Dietilestilbestrol USP
 ER Ferulato de Docosilo USP
 ER Extracto en Polvo de Equinácea pálida USP
 ER Clorhidrato de Eucatrofina USP
 ER Lactonas Terpénicas de Ginkgo USP
 ER Extracto en Polvo de Ginseng Americano USP
 ER Monolinoleato de Glicerilo USP
 ER Clorhidrato de Gonadorelina USP
 ER Hemoglobina USP
 ER Mononitrato de Isosorbida USP
 ER Compuesto Relacionado A de Mononitrato de Isosorbida USP
 ER Ácido Alfa Lipoico USP

ER Extracto de Pino Marítimo USP
 ER Menotropinas USP
 ER Mibolerona USP
 ER Narasina USP
 ER Extracto de Piretro USP
 ER Clorhidrato de Quinapril USP
 ER Extracto en Polvo de Hierba de San Juan USP
 ER Sargramostim USP
 ER Sincalida USP
 ER Δ^9 -Tetrahidrocannabinol USP
 ER Valrubicina USP
 ER Compuesto Relacionado A de Valrubicina USP
 ER Vasopresina USP

Comentarios—Las propuestas de revisión que se publican en el *Pharmacopeial Forum* a menudo originan comentarios públicos que se remiten al Comité de Expertos correspondiente para su revisión y respuesta. Algunas propuestas de revisión pueden llegar a convertirse en texto oficial con modificaciones menores, según sea necesario, sin que requieran una revisión pública adicional. En tales casos, se publica un resumen de los comentarios recibidos y de las respuestas del Comité en el apartado *Comentarios* del *Suplemento* o de la edición anual en la que la revisión se oficializa. En el caso de las propuestas que requieran una revisión adicional y una nueva publicación en el *Pharmacopeial Forum*, se incluyen un resumen de los comentarios y las respuestas del Comité en la información que acompaña a cada artículo.

El apartado *Comentarios* no forma parte del texto oficial de la monografía. Más bien, explica los fundamentos de la respuesta del Comité a los comentarios del público. Si existen diferencias entre el contenido del apartado *Comentarios* y la monografía oficial, el texto de la monografía oficial prevalece. En caso de controversias o problemas de interpretación, prevalece el texto oficial, independientemente de lo expresado en el apartado *Comentarios*.

Cuando resulta apropiado, el apartado *Comentarios* incluye, por separado, las discusiones acerca de las propuestas referidas a la armonización internacional de la *USP*, la *Farmacopea Europea* y la *Farmacopea Japonesa* con el fin de destacar tales propuestas.

Si desea obtener mayores detalles, favor contactar:

Office of the Executive Secretariat
 U.S. Pharmacopeia
 12601 Twinbrook Parkway
 Rockville, MD 20852-1790
 USA

COMENTARIOS A MONOGRAFÍAS

Los comentarios que antes se encontraban en esta sección ahora están disponibles en el sitio web de la USP: <http://www.usp.org/>.

FE DE ERRATAS

A continuación se presenta una lista de erratas y correcciones a los compendios *USP–NF*. El número de página indica dónde y en cuál publicación oficial o pendiente de *USP–NF* se encuentra el ítem. Si fuera necesario, la lista se actualizará en cada número del *PF*. Esta información también se encontrará disponible como tabla acumulativa en los próximos *Suplementos* y aparecerá corregida en la próxima edición anual de *USP–NF*. Las erratas se consideran ítems que se publicaron equivocadamente, que no han sido aprobados por el Consejo de Expertos y que no reflejan el requisito oficial. El personal de USP se encuentra a su disposición para responder preguntas referentes a la exactitud de cualquier requisito, llamando al número de teléfono 1-800-822-USPC.

Página	USP–NF	Título	Sección	Descripción
144	USP 30	(121) <i>Valoración de Insulina</i>	<i>Método de la Glucemia en Co-nejos—Cuantitativo</i>	<p>En <i>Cálculos</i>, líneas 7 y 8 del tercer párrafo: Cambiar “Dilución estándar” y “Dilución de valoración” por: Solución estándar y Solución de valoración</p> <hr/> <p>Línea 6 en <i>Apéndice</i>: Cambiar la fórmula</p> $(L,U) = \frac{M' \pm \frac{t}{T_b} \sqrt{(1-g)S_N^2 + (M')^2 S_D^2}}{1-g}$ <p>por:</p> $(L,U) = \frac{M' \pm \frac{t}{T_b} \sqrt{(1-g)S_N^2 + (M')^2 S_D^2}}{1-g}$
348	USP 30	(786) <i>Estimación de la Distribución del Tamaño de Partícula por Tamizado Analítico</i>	<i>Tamices Analíticos</i>	<p>Líneas 4-7 en <i>Determinación del Punto Final</i>: Cambiar “Si en uno cualquiera de los tamices hay menos del 5% del total de la muestra, aumentar el punto final para ese tamiz hasta un 20% del peso previo obtenido en ese mismo tamiz” por: Si en cualquiera de los tamices hay menos del 5% del total de la muestra, aumentar el punto final para ese tamiz hasta un cambio de peso de no más de 20% del peso previo obtenido en ese tamiz.</p>
351	USP 30	(788) <i>Partículas en Inyecciones</i>	<i>Normalización del Instrumento</i>	<p>Última línea del segundo párrafo: Cambiar “Estos procedimientos se deben llevar a cabo cada seis meses como mínimo” por: Efectuar estos procedimientos a intervalos no mayores de 6 meses.</p>
817	USP 30	<i>Reactivos, Indicadores y Soluciones</i>	<i>Soluciones Volumétricas</i>	<p>Línea 5 en <i>Bromo, Décimo Normal (0,1 N)</i>: Cambiar “matraz con 500 mL de yodo” por: matraz para yodo de 500 mL</p>
1000	USP 30	<i>Extracto de Ciruelo Africano</i>	<i>Contenido de esteroides</i>	<p>Línea 11 en <i>Procedimiento</i>: Cambiar la fórmula “$200C/W(R_U/R_S)$,” por: $1000C/W(R_U/R_S)$</p>

Página	USP–NF	Título	Sección	Descripción
1021	USP 30	<i>Ginkgo</i>	<i>Prueba de identificación por cromatografía en capa delgada</i> (201)	Líneas 16–23 en <i>Procedimiento</i> : Cambiar “La presencia de glicósidos de flavonol en la <i>Solución de prueba</i> se observa a través de tres zonas fluorescentes de color marrón amarillento a verde, y apenas más arriba, una zona fluorescente de color azul a verde por debajo de la zona correspondiente a la rutina, una zona fluorescente azul claro aparece en el mismo lugar que la correspondiente al ácido clorogénico, así como dos zonas fluorescentes de color marrón verdoso a amarillo, ubicadas arriba. En el cromatograma de la <i>Solución de prueba</i> se pueden observar otras zonas menos intensas.” por: El cromatograma de la <i>Solución de prueba</i> presenta una zona fluorescente marrón amarillenta y una zona fluorescente de color azul claro con R_f similares a los de la rutina y el ácido clorogénico, respectivamente, en el cromatograma de la <i>Solución estándar</i> . Se detectan zonas verdes amarillentas adicionales debido a flavonoides en el cromatograma de la <i>Solución de prueba</i> . Estas zonas incluyen una debajo de la zona de la rutina, dos entre las zonas de la rutina y el ácido clorogénico, y cuatro arriba de la zona del ácido clorogénico. Otras zonas menos intensas pueden observarse en el cromatograma de la <i>Solución de prueba</i> .
1053	USP 30	<i>Pino Marítimo</i>	<i>Identificación B</i>	Línea 2 en <i>Reactivo para rociado</i> : Cambiar “vanilina” por: vainillina
1766	USP 30	<i>Carbenicilina Indanilo Sódica, Tabletas</i>	<i>Identificación</i>	Línea 7: Cambiar “solución de prueba” por: solución
2234	USP 30	<i>Maleato de Ergonovina, Inyección</i>	<i>Alcaloides relacionados</i>	Líneas 4 y 15: Cambiar “Fase móvil” por: Mezcla de disolventes
2986	USP 30	<i>Clorhidrato de Naloxona</i>	<i>Clorhidrato de noroximorfona [Clorhidrato de (–)-4,5α-epoxi-3,14-dihidroxi-morfinan-6-ona] y otras impurezas</i>	Línea 23: Cambiar “ferrocianuro” por: ferricianuro
3385	USP 30	<i>Ramipril</i>	<i>Compuestos relacionados</i>	Línea 1 en <i>Preparación estándar</i> : Cambiar “Preparación estándar” por: Solución estándar Línea 13 en <i>Procedimiento</i> : Cambiar “ER Compuesto Relacionado B de Ramipril” por: ER Ramipril USP

Página	USP–NF	Título	Sección	Descripción
3386	USP 30	Ranitidina, Inyección	Pureza cromatográfica	<p>Línea 10 en <i>Procedimiento</i>: Cambiar “Cromatografiar según se describe en <i>Pureza cromatográfica</i> en <i>Clorhidrato de Ranitidina</i>.” por: Dejar que las manchas se sequen y desarrollar los cromatogramas en una fase móvil que contenga una mezcla de acetato de etilo, alcohol isopropílico, hidróxido de amonio y agua (25 : 15 : 5 : 1) hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido no menos de 15 cm desde el origen. Retirar la placa de la cámara de desarrollo, marcar el frente de la fase móvil y dejar secar al aire. Exponer la placa a vapores de yodo en una cámara cerrada hasta que el cromatograma se revele por completo.</p>
			Valoración	<p>Borrar la subsección que comienza con “<i>Fase móvil, Preparación estándar, Solución de resolución y Sistema cromatográfico</i>”. Reemplazarla por:</p> <p><i>Fase móvil</i>—Preparar una mezcla filtrada y degasificada de metanol y acetato de amonio acuoso 0,1 M (85:15). Hacer ajustes si fuera necesario (ver <i>Aptitud del sistema</i> en <i>Cromatografía</i> (621)).</p> <p><i>Preparación estándar</i>—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Ranitidina USP en <i>Fase móvil</i> para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,112 mg (equivalente a 0,100 mg de ranitidina base) por mL.</p> <p><i>Solución de aptitud del sistema</i>—Disolver cantidades, pesadas con exactitud, de ER Clorhidrato de Ranitidina USP y de ER Compuesto Relacionado C de Ranitidina USP en <i>Fase móvil</i> para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,112 mg por mL y 0,01 mg por mL, respectivamente.</p> <p><i>Sistema cromatográfico</i> (ver <i>Cromatografía</i> (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 322 nm y una columna de 4,6 mm × 20 a 30 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la <i>Solución de aptitud del sistema</i> y registrar el cromatograma según se indica en el <i>Procedimiento</i>: la resolución, <i>R</i>, entre clorhidrato de ranitidina y <i>N</i>-[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]sulfinil]etil]-<i>N'</i>-metil-2-nitro-1,1-etenodiamina (compuesto relacionado C de ranitidina) no es menor de 1,5. Inyectar en el cromatógrafo la <i>Preparación estándar</i> y registrar el cromatograma según se indica en el <i>Procedimiento</i>: el factor de asimetría para el pico de clorhidrato de ranitidina no es mayor de 2,0; la eficiencia de la columna, determinada a partir del pico de clorhidrato de ranitidina, no es menos de 700 platos teóricos; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2%.</p>

Página	USP–NF	Título	Sección	Descripción
3387	USP 30	Ranitidina, Solución Oral	Pureza cromatográfica	Línea 9 en <i>Procedimiento</i> : Cambiar “Efectuar la cromatografía como se describe en <i>Pureza cromatográfica en Clorhidrato de Ranitidina</i> .” por: Dejar que las manchas se sequen y desarrollar los cromatogramas en una fase móvil que contenga una mezcla de acetato de etilo, alcohol isopropílico, hidróxido de amonio y agua (25 : 15 : 5 : 1) hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido no menos de 15 cm desde el origen. Retirar la placa de la cámara de desarrollo, marcar el frente de la fase móvil y dejar secar al aire. Exponer la placa a vapores de yodo en una cámara cerrada hasta que el cromatograma se revele por completo.
			Valoración	Líneas 1-3: Cambiar “ <i>Fase móvil, Preparación estándar, Solución de resolución y Sistema cromatográfico</i> —Preparar según se indica en la <i>Valoración en Clorhidrato de Ranitidina</i> ” por: <i>Fase móvil, Preparación estándar, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico</i> —Preparar según se indica en la <i>Valoración en Ranitidina, Inyección</i> ,
3388	USP 30	Ranitidina, Tabletas	Valoración	Líneas 1-3: Cambiar “ <i>Fase móvil, Preparación estándar, Solución de resolución y Sistema cromatográfico</i> —Preparar según se indica en la <i>Valoración en Clorhidrato de Ranitidina</i> ” por: <i>Fase móvil, Preparación estándar, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico</i> —Preparar según se indica en la <i>Valoración en Ranitidina, Inyección</i> ,
3389	USP 30	Ranitidina y Cloruro de Sodio, Inyección	Pureza cromatográfica	Líneas 9 y 10 en <i>Procedimiento</i> : Cambiar “Efectuar la cromatografía tal como se describe en <i>Pureza cromatográfica en Clorhidrato de Ranitidina</i> .” por: Dejar que las manchas se sequen y desarrollar los cromatogramas en una fase móvil que contenga una mezcla de acetato de etilo, alcohol isopropílico, hidróxido de amonio y agua (25 : 15 : 5 : 1) hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido no menos de 15 cm desde el origen. Retirar la placa de la cámara de desarrollo, marcar el frente de la fase móvil y dejar secar al aire. Exponer la placa a vapores de yodo en una cámara cerrada hasta que el cromatograma se revele por completo.
			Valoración de ranitidina	Líneas 1-3: Cambiar “ <i>Fase móvil, Preparación estándar, Solución de resolución y Sistema cromatográfico</i> —Preparar según se indica en la <i>Valoración en Clorhidrato de Ranitidina</i> ” por: <i>Fase móvil, Preparación estándar, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico</i> —Preparar según se indica en la <i>Valoración en Ranitidina, Inyección</i> ,

Capítulos Generales

Pruebas y Valoraciones Generales

Requisitos Generales para Pruebas y Valoraciones

{1} INECTABLES

Cambio en la redacción:

ETIQUETAS Y ETIQUETADO

Etiquetado

NOTA—Ver las definiciones de “etiqueta” y “etiquetado” en *Etiquetado* en el apartado *Conservación, Envasado, Almacenamiento y Etiquetado* de las *Advertencias y Requisitos Generales*.

La etiqueta indica el nombre de la preparación; en el caso de una preparación líquida, el contenido porcentual de fármaco o la cantidad de un fármaco en un volumen específico; en el caso de una preparación seca, la cantidad de ingrediente *activo*; la vía de administración; una leyenda con las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad; el nombre y el domicilio comercial del fabricante, envasador o distribuidor; y un número de lote identificatorio. El número de lote puede proporcionar toda la historia de fabricación del envase específico, incluyendo todas las operaciones de fabricación, llenado, esterilización y etiquetado.

Cuando una monografía individual permita variar las concentraciones de los ingredientes activos en la preparación parenteral de gran volumen, se indica la concentración de cada ingrediente nombrado en el título oficial como si fuera parte del título oficial, por ejemplo, Dextrosa 5%, Inyección; o Dextrosa (5%) y Cloruro de Sodio (0,2%), Inyección.

El etiquetado incluye la siguiente información si no se especifica la fórmula completa en la monografía individual: (1) En el caso de una preparación líquida, el contenido porcentual de cada ingrediente o la cantidad de cada ingrediente en un volumen especificado, salvo que los ingredientes agregados para ajustar a un pH dado o para hacer isotónica la solución se puedan declarar por el nombre y una leyenda cerca de su efecto; y (2) en el caso de una preparación seca

u otra preparación a la que se va a agregar un diluyente antes de utilizarla, la cantidad de cada ingrediente, la composición del diluyente o diluyentes recomendados [sólo el nombre o nombres, si la fórmula se especifica en la monografía individual], la cantidad que se va a emplear para alcanzar una concentración específica de ingrediente activo y el volumen final de la solución así obtenida, una breve descripción del aspecto físico de la solución reconstituida, instrucciones para el almacenamiento adecuado de la solución reconstituida y una fecha de caducidad que limite el período durante el cual se espera que la solución reconstituida tenga la potencia requerida o declarada si se ha almacenado como se indica.

Los envases de Inyecciones destinadas a diálisis, hemofiltración, o soluciones de irrigación que contienen un volumen de más de 1 L declaran que el contenido no está destinado para la infusión intravenosa.

Las Inyecciones para uso veterinario declaran ese fin.

El envase se etiqueta de modo que una superficie suficiente del envase quede sin cubrir en toda su longitud o circunferencia para permitir la inspección del contenido.

■CONCENTRACIÓN Y VOLUMEN TOTAL DE PRODUCTOS

FARMACÉUTICOS INECTABLES MONODOSIS Y MULTIDOSIS

Para productos farmacéuticos inyectables monodosis y multidosis, la cantidad por el volumen total debe ser la expresión principal y prominente en el espacio principal de visualización de la etiqueta, seguido muy cerca de la cantidad por mL entre paréntesis. Para envases que contienen un volumen de menos de 1 mL, la cantidad por fracción de mL debe ser la única expresión de concentración. La concentración por un sólo mL debe expresarse como mg/mL y no como mg/1 mL.

Los siguientes formatos son aceptables para contenidos de más de 1 mL:

Cantidad total/volumen total: 500 mg/10 mL

Cantidad/mL: 50 mg/mL

o

Cantidad total/volumen total: 25 000 Unidades/5 mL

Cantidad/mL: 5000 Unidades/mL

El siguiente formato es aceptable para contenidos de menos de 1 mL: 12,5 mg/0,625 mL

Existen, no obstante, algunas excepciones para la expresión de la cantidad por volumen total. En algunos casos, la expresión principal y prominente del contenido total de un fármaco por envase puede no ser efectiva en la prevención de errores en la administración y toma de medicamentos (por ej., insulina). Un ejemplo de ello es el uso de la lidocaína u otros medicamentos similares empleados como anestésicos locales, casos en que el producto se ordena y administra por porcentaje (por ej., 1%, 2%), o un anestésico local en combinación con epinefrina que se expresa como una relación (e.g., 1 : 100 000). En tales casos, la concentración debe expresarse: por ejemplo, 1% (100 mg/10 mL). Los sólidos secos, los cuales necesitan reconstituirse, deben también seguir este formato, con la excepción de que sólo se menciona la cantidad total del fármaco y no la cantidad/volumen total o la cantidad/mL. ■^{1S} (USP30)

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2009)

■ **Aluminio en Preparaciones Parenterales de Gran Volumen (PPGV), Preparaciones Parenterales de Pequeño Volumen (PPPV) y Envasados Farmacéuticos a Granel (EFG) Usados en Terapia de Nutrición Parenteral Total (NPT)**

- (a) El contenido de aluminio de las PPGV usadas en terapia de NPT no debe exceder de 25 µg por L (µg/L).
- (b) El prospecto del envase de las PPGV usadas en terapia de NPT debe declarar que el producto farmacéutico no contiene más de 25 µg de aluminio por L. Esta información debe incluirse en la sección “Precauciones” del etiquetado de todas las PPGV usadas en terapia de NPT.
- (c) Si la cantidad máxima de aluminio en las PPPV y en los EFG es 25 µg por L (µg/L) o menos, en lugar de declarar la cantidad exacta de aluminio que contiene cada uno, tal como en el párrafo (d), la etiqueta del envase primario de las PPPV y los EFG usados en la preparación de preparaciones parenterales de NPT (con las excepciones que se indican más adelante) pueden declarar: “Contiene no más de 25 µg/L de aluminio”. Si la PPPV o el EFG es un polvo liofilizado, la etiqueta del envase primario puede declarar lo siguiente: “Cuando se reconstituye según las instrucciones del prospecto adjunto, la concentración de aluminio no será más de 25 µg/L”.
- (d) El nivel máximo de aluminio a la fecha de caducidad debe declararse en la etiqueta del envase primario de todas las PPPV y los EFG usados en la preparación de preparaciones parenterales y emulsiones inyectables de NPT. El contenido de aluminio debe declararse de la siguiente manera: “No contiene más de ___ µg/L de aluminio”. La etiqueta del envase primario de todas las PPPV y los EFG que son polvos liofilizados usados en la preparación de soluciones de NPT deben declarar lo siguiente: “Cuando se reconstituye de acuerdo con las instrucciones del prospecto adjunto, la concentración de aluminio no será más de ___ µg/L.” El contenido máximo de aluminio debe declararse como el más alto entre los tres niveles siguientes: ■^{1S} (USP30)

- (1) El nivel más alto de las partidas producidas durante los últimos tres años.
- (2) El nivel más alto de las últimas cinco partidas.
- (3) El nivel máximo con respecto a los niveles históricos, pero sólo hasta completar la producción de las primeras cinco partidas después ■^{1S} (USP30) 26 de julio de 2004.

El prospecto adjunto en los envases de todas las PPGV, PPPV y los EFG usados en la preparación ■^{1S} (USP30) de productos para NPT debe contener una leyenda de advertencia. Esta advertencia debe estar incluida en la sección “Advertencias” del etiquetado y debe declarar lo siguiente: “ADVERTENCIA: Este producto contiene aluminio que puede ser tóxico. El aluminio puede alcanzar niveles tóxicos con la administración parenteral prolongada si existe insuficiencia renal. Los neonatos prematuros en particular tienen mayor riesgo por la inmadurez de sus riñones y requieren grandes cantidades de soluciones de calcio y fosfato que contienen aluminio. Los estudios indican que los pacientes con insuficiencia renal, incluidos los neonatos prematuros, que reciben niveles de aluminio por vía parenteral mayores de 4 µg a 5 µg por kg por día acumulan aluminio a niveles asociados con toxicidad ósea y del sistema nervioso central. La acumulación en los tejidos puede ocurrir incluso con niveles más bajos de administración de productos de NPT”.

■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ENVASADO

Envases para Inyecciones

Los envases, incluyendo los cierres, para preparaciones para inyecciones no deben ejercer sobre el contenido ninguna acción física o química que pueda alterar de alguna manera la concentra-

ción, calidad, o pureza mas allá de los requisitos oficiales en condiciones usuales u ordinarias de manejo, transporte, almacenamiento, venta y uso. Los envases deben estar hechos de un material que permita la inspección del contenido. Por lo general, el tipo de vidrio preferible para cada preparación parenteral se indica en la respectiva monografía. A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se pueden emplear envases plásticos para envasar las inyecciones (ver *Envases* (661)).

Para definiciones de envases monodosis y multidosis, ver *Envases* en *Advertencias y Requisitos Generales*. Los envases cumplen con los requisitos establecidos en *Envases* (661).

Los envases deben estar cerrados o sellados de tal modo que impidan la contaminación o la pérdida del contenido. La validación de la integridad del envase debe demostrar que no existe penetración de microorganismos o impurezas químicas o físicas. Además, el envase debe ser capaz de mantener las cantidades totales y relativas o concentraciones especificadas de solutos y del vehículo cuando se expone a condiciones extremas previstas en la fabricación y procesamiento, almacenamiento, transporte y distribución. Los cierres para envases multidosis deben permitir la extracción del contenido sin remover o destruir el cierre. El cierre debe permitir la penetración de una aguja y el cerramiento de inmediato luego de retirarla, protegiendo el envase de la contaminación. La validación de la integridad del envase multidosis debe incluir una verificación de que un envase de ese tipo impide la contaminación microbiana o la pérdida del contenido del producto en condiciones previstas de múltiples entradas y usos.

Los envases para venoclisis en tándem (piggyback containers) son por lo general envases de infusión intravenosa empleados para administrar una segunda infusión a través de un conector de algún tipo o a través de un inyector en el equipo de administración del primer líquido, evitándose así la necesidad de inyectar en otro sitio al paciente. Los envases para venoclisis en tándem son también conocidos como envases de infusión secundaria.

Concentrado de Cloruro de Potasio para Inyección

El uso de un sistema de cierre negro en un vial (por ejemplo, una tapa negra de fácil desprendimiento adherida al casquillo (tapa “flip-off”) y un casquillo negro para sostener el cierre elastomérico) o el uso de una banda o una serie de bandas negras sobre la constricción en una ampolla se reserva sólo para el *Concentrado de Cloruro de Potasio para Inyección* y está prohibido su uso en cualquier otra inyección.

Agentes de Bloqueo Neuromuscular y Paralizantes

Todas las preparaciones inyectables de agentes de bloqueo neuromuscular y agentes paralizantes se deben envasar en viales con una advertencia impresa en los casquillos o en las tapas de sobresello. Tanto el casquillo del frasco como la tapa de sobresello deben llevar impresas en blanco o negro (lo que proporcione el mayor contraste con el color del casquillo o la tapa) la leyenda: “Advertencia: Agente Paralizante” o “Agente Paralizante” (dependiendo del tamaño del sistema de cierre). Alternativamente, la tapa de sobresello puede ser transparente y sin impresión, de manera que permita la visualización de la leyenda de advertencia sobre el casquillo de cierre.

Envases para Sólidos Estériles

Los envases, incluyendo los cierres, para sólidos secos destinados para uso parenteral no deben ejercer sobre el contenido ninguna acción física o química que pueda alterar de alguna manera la concentración, calidad o pureza más allá de los requisitos oficiales, en condiciones normales o habituales de manejo, transporte, almacenamiento, venta y uso.

Un envase para un sólido estéril debe permitir la adición de un disolvente adecuado y la extracción de porciones de la solución o suspensión resultante de tal modo que se mantenga la esterilidad del producto.

Cuando la *Valoración* en una monografía indica un procedimiento para la *Preparación de valoración*, donde se deba tomar el contenido total extraíble de un envase monodosis con una jeringa y aguja hipodérmica, se extraerá ese contenido en la forma más completa posible con una jeringa hipodérmica seca, de una capacidad nominal que no exceda de tres veces el volumen a extraer, y prevista con una aguja número 21 de una longitud no menor de 2,5 cm (1 pulgada), tomando la precaución de expeler cualquier burbuja de aire, y se descargará en un recipiente para dilución y valoración.

Volumen en Envase

Cada envase de una inyección se llena con suficiente exceso sobre el volumen declarado o sobre el volumen que se deba extraer. Ver *Inyecciones en Formas Farmacéuticas* {1151}.

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE INYECCIÓN EN LOS ENVASES

Seleccionar uno o más envases si el volumen del envase es de 10 mL o más, tres o más si el volumen es más de 3 mL y menos de 10 mL, o cinco o más si el volumen es 3 mL o menos. Tomar individualmente el contenido de cada envase seleccionado con una jeringa hipodérmica seca de una capacidad nominal que no exceda de tres veces el volumen a medir y que lleva adosada una aguja número 21 de longitud no menos de 2,5 cm (1 pulgada). Expeler cualquier burbuja de aire de la jeringa y la aguja, y luego descargar el contenido de la jeringa, sin vaciar la aguja, en una probeta calibrada y seca (calibrada “para contener” y no “para verter” los volúmenes marcados) de un tamaño tal que el volumen que se va a medir ocupe al menos 40% del volumen nominal total de la probeta. Alternativamente, el contenido de la jeringa se puede descargar en un vaso de precipitados seco, tarado, calculando el volumen, en mL, como el peso, en g, de la Inyección tomado dividido por su densidad. Para envases con un volumen nominal de 2 mL o menos, el contenido de una cantidad suficiente de envases puede combinarse para obtener el volumen requerido para la medición, siempre que, para cada envase, se emplee un conjunto diferente y seco de jeringa y aguja. El contenido de los envases de 10 mL o más se puede determinar abriéndolos y vaciando el contenido directamente en una probeta graduada o un vaso de precipitados tarado.

El volumen no es menor que el volumen declarado en el caso de envases examinados individualmente o, en el caso de envases de 1 mL y 2 mL, no es menor que la suma de los volúmenes declarados que se toman colectivamente.

Para inyecciones en envases multidosis que declaran producir un número específico de dosis de un volumen determinado, proceder según se indicó anteriormente, empleando un número de jeringas individuales igual al número de dosis especificadas. El volumen es tal que cada jeringa descarga no menos de la dosis indicada.

Para inyecciones que contienen aceite, entibiar los envases, si fuera necesario, y agitarlos bien inmediatamente antes de retirar el contenido. Enfriar entre 20° y 25° antes de medir el volumen.

Para inyecciones en cartuchos o jeringas prellenadas, ensamblar el envase con los accesorios requeridos, como por ejemplo una aguja o un émbolo. Siguiendo el mismo procedimiento anterior, y sin vaciar la aguja, transferir todo el contenido de cada envase a un vaso de precipitados tarado y seco empujando el émbolo en forma lenta y continua. Pesar y calcular el volumen según lo descrito anteriormente. El volumen de cada envase no es menor que el volumen declarado.

Para soluciones intravenosas de gran volumen, seleccionar 1 envase y transferir el contenido a una probeta graduada seca, de un tamaño tal que el volumen que se va a medir ocupe al menos 40% de su volumen nominal. El volumen no es menor que el volumen declarado.

■ Etiquetado en los Casquillos y las Tapas de Sobresello

Sólo deben aparecer leyendas de advertencia en la superficie superior (círculo) del casquillo o la tapa de sobresello de un vial que contenga un producto farmacéutico inyectable. Una leyenda de advertencia es aquella que intenta prevenir una situación de peligro de muerte inminente si el medicamento inyectable se usa de modo inapropiado. Algunos ejemplos de tales leyendas son los siguientes: “Advertencia”, “Diluir Antes de Usar”, “Agente Paralizante”, “Sólo para Uso I.M.” y “Quimioterapia”, entre otros.

El texto de la leyenda debe aparecer en un color que contraste y sea llamativo en condiciones de uso normales. La leyenda de advertencia puede aparecer sólo en el casquillo, siempre que la tapa de sobresello se fabrique de modo que la leyenda de advertencia en el interior sea inmediatamente legible.

Los números o letras de identificación, como por ejemplo códigos, números de lote, etc., pueden aparecer en la superficie lateral (falda) del casquillo en viales que contengan productos inyectables. La presencia de estos datos de identificación en la falda del casquillo, donde no distraen o interfieren con la leyenda de advertencia en la superficie superior, debe considerarse un elemento beneficioso del control de la calidad de proceso durante todo el proceso de fabricación de un producto. Cualquier estrategia destinada a evitar la falsificación no debe distraer o interferir con las leyendas de advertencia.

Bajo ninguna circunstancia se permitirá que aparezca publicidad, como por ejemplo nombres de empresas, logotipos o nombres de productos, en la superficie superior (círculo) de los casquillos o las tapas de sobresello. ■^{1S} (USP30)

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2009)

Envasado y Almacenamiento

El volumen de inyección en envases monodosis proporciona la cantidad especificada de administración parenteral de una vez y en ningún caso es mayor del suficiente para permitir la extracción y administración de 1 L.

Las preparaciones para administración intrarraquídea, intracisternal o peridural se envasan sólo en envases monodosis.

A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, un envase multidosis contiene un volumen de Inyección suficiente para permitir la extracción de no más de 30 mL.

■ Las siguientes inyecciones están exentas de la restricción de 1 L de los requisitos anteriores relacionados con el envasado:

1. Inyecciones envasadas para uso extravascular como soluciones de irrigación o soluciones para diálisis peritoneal
2. Inyecciones envasadas para uso intravascular como nutrición parenteral o como líquido de reemplazo o sustitución para ser administrado en forma continua durante una hemofiltración

Las inyecciones envasadas para uso intravascular que pudieran usarse como líquido de reemplazo durante una hemodiálisis u otros procesos, mediante administración intermitente, continua o en bolo, deben cumplir con la restricción de 1 L, a menos que se trate de una de las excepciones mencionadas anteriormente. ■^{1S} (USP30)

Cuando se declara que las inyecciones están destinadas para uso veterinario, éstas están exentas de los requisitos de envasado y almacenamiento en lo referente a las limitaciones para envases monodosis y de las limitaciones de volumen para los envases multidosis.

(11) ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP

Cambio en la redacción:

■ Los Estándares de Referencia USP son muestras bien caracterizadas de fármacos, excipientes, impurezas que requieren informarse, productos de degradación, reactivos farmacopeicos y calibradores de desempeño.

Se requieren explícitamente para muchas valoraciones y pruebas Farmacopeicas y se suministran únicamente para este uso. Queda a criterio del usuario evaluar la aptitud para su uso en otras aplicaciones. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ Referencia Visual Auténtica

A diferencia de los estándares de referencia química, las Referencias Visuales Auténticas (AVR por sus siglas en inglés) no se emplean en los análisis químicos. En cambio, las AVR son imágenes visuales utilizadas por los analistas para comparar ciertos artículos de prueba y asegurar que cumplen con los requisitos farmacopeicos y se incorporan como referencia en la monografía. El Comité de Expertos que aprueba una monografía específica es el que decide la aprobación de las AVR para su inclusión en una monografía. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ Otras Sustancias de Referencia

Como parte de su servicio, la USPC analiza y distribuye sustancias autenticadas adicionales que actualmente no son requeridas como Estándares de Referencia USP o NF. Estas también se suministran bajo supervisión del Comité de Estándares de Referencia USP. Las sustancias adicionales se dividen en tres grupos: (1) Estándares de Referencia USP y NF antiguos, que no son requeridos en la USP o el NF vigente pero que aún tienen suficiente demanda; (2) Estándares de Referencia FCC, especificados en la edición vigente del Food Chemicals Codex; y (3) Sustancias Auténticas (AS, por sus siglas en inglés), que son muestras de sustancias químicas altamente purificadas, incluidas las sustancias de abuso, que se prueban conjuntamente y se ponen a disposición como un servicio, principalmente para los laboratorios analíticos, clínicos, farmacéuticos y de investigación.

La distribución de sustancias controladas está sujeta a las reglamentaciones y provisiones vigentes para el otorgamiento de licencias de la Administración para el Control de Drogas (DEA, por sus siglas en inglés) del Departamento de Justicia.

Como servicio adicional, la USPC distribuye varios reactivos no comerciales requeridos en ciertas monografías USP. Estos reactivos se preparan especialmente para su uso previsto y sólo los distribuirá la USPC hasta que estén comercialmente disponibles.

La Organización Mundial de la Salud, organismo de las Naciones Unidas, mantiene un programa internacional que suministra estándares biológicos y sustancias químicas de referencia. El programa de la OMS se ocupa de materiales de referencia para antibióticos, productos biológicos y agentes quimioterapéuticos. Como norma, un Estándar Internacional para un material de origen natural se discontinúa una vez que la sustancia responsable de su actividad característica se haya aislado, identificado y preparado de forma que pueda caracterizarse completamente por medios químicos y físicos. El Comité de Estándares de Referencia USP coopera

estrechamente con la OMS para minimizar las diferencias inevitables en las unidades de potencia reales y, en algunos casos, para compartir la preparación de un estándar de referencia. Dado que algunos Estándares de Referencia USP se normalizan según los Estándares Internacionales correspondientes, las Unidades USP pertinentes y las Unidades Internacionales de potencia suelen ser idénticas. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ LOTES VIGENTES

Es responsabilidad de cada analista constatar que su suministro particular de Estándar de Referencia USP esté vigente. Sólo se debe comprar la cantidad suficiente para el uso inmediato y se debe evitar el almacenamiento a largo plazo.

Para asegurar el acceso rápido a la última información, la USPC publica bimestralmente el Catálogo Oficial de Estándares de Referencia y Sustancias Auténticas, así como las designaciones de lotes en el *Pharmacopeial Forum*.^{*} Este sistema ofrece mejor control y flexibilidad que las fechas de vencimiento para responder a las revisiones del uso del Estándar de Referencia. El catálogo que aparece en el *Pharmacopeial Forum* más reciente identifica artículos que son oficiales en la recopilación de Estándares de Referencia USP al momento de su publicación.

En el Catálogo aparecen dos columnas para identificar los lotes oficiales vigentes. En una de las columnas se identifica el lote oficial que la USPC está distribuyendo en este momento. En algunos casos, el lote anterior aún puede considerarse oficial. Si es así, se identifica en la segunda columna. Normalmente, el lote anterior sigue conservando su estado oficial durante aproximadamente un año después de comenzar la distribución del lote vigente, a menos que se determine que ya no es apto debido a un cambio en los requisitos de la monografía o por limitaciones de estabilidad.

USO CORRECTO DE LOS ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP

A menos que la etiqueta de un Estándar de Referencia declare una potencia o contenido específicos, se considera que dicho Estándar de Referencia es 100,0% puro para fines farmacopeicos. La aptitud de un Estándar de Referencia USP para aplicaciones no farmacopeicas queda a criterio del usuario.

Cada Estándar de Referencia USP se debe almacenar, manipular y utilizar correctamente para que sirva al fin deseado. En general, los Estándares de Referencia deben almacenarse en sus envases originales con tapón, lejos del calor y protegidos de la luz. Deben evitarse, en especial, lugares de almacenamiento húmedos. Cuando se necesitan condiciones de almacenamiento especiales, las instrucciones se indican en la etiqueta.

Ni los Estándares de Referencia ni las Sustancias Auténticas están destinados para uso como fármacos o dispositivos médicos.

Muchas pruebas y valoraciones farmacopeicas se basan en la comparación de una muestra de prueba con un Estándar de Referencia USP. En estos casos, las determinaciones se realizan con preparaciones de la muestra y del Estándar de Referencia. Cuando se indica que se debe preparar una Solución estándar o una *Preparación estándar* para realizar una determinación cuantitativa en diluciones sucesivas o de otro modo, está previsto que la sustancia del Estándar de Referencia se pese con exactitud (ver *Pesas y Balanzas* (41) y *Aparatos Volumétricos* (31)). También se debe tomar debida nota de los errores relativamente importantes que se producen al pesar masas pequeñas (ver también *Dilución en Pruebas y Valoraciones en Advertencias y Requisitos Generales*).

Los resultados de las valoraciones y las pruebas se determinan mediante comparaciones entre la muestra en análisis y un Estándar de Referencia USP cuyos residuos volátiles o contenido de agua se

^{*} Para quienes no están suscritos, el Catálogo Oficial más reciente está disponible en: U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Reference Standards Order Department, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852. Teléfono 1-301-881-0666. Fax 1-301-816-8148. Línea gratuita en Estados Unidos 1-800-227-USPC o en el sitio web de la USP: www.usp.org/dsd/refstd.

han eliminado o corregido de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta. Cuando se encuentren requisitos especiales de secado para los Estándares de Referencia en apartados específicos de monografías de la *USP* o del *NF*, éstos reemplazan las instrucciones habituales (ver *Procedimientos en Pruebas y Valoraciones en Advertencias y Requisitos Generales*). Si se exige secar un Estándar de Referencia USP antes de usarlo, se debe transferir una cantidad que sea suficiente después del secado a un recipiente limpio y seco. No usar el envase original como recipiente de secado y no secar una muestra repetidas veces a temperaturas superiores a 25°. Si se exige una determinación volumétrica de agua en el momento de usar el Estándar de Referencia, proceder según se indica en el *Método I en Determinación de Agua* (921). Para ello se aceptan métodos instrumentales o microanalíticos. Al usar cantidades habituales, aproximadamente 50 mg, del Estándar de Referencia, valorar volumétricamente con una solución del *Reactivo* cuatro veces más diluida.

La sección *Estándares de referencia USP* de una monografía individual de la *USP* o del *NF* o de un capítulo general nombra cada Estándar de Referencia USP que se requiere para los procedimientos de prueba y valoración, y hace referencia a dicho capítulo para obtener información e instrucciones adicionales. La siguiente lista contiene las instrucciones para el uso y almacenamiento correctos de cada Estándar de Referencia USP. Estas instrucciones deben ser las mismas que aparecen en la etiqueta del Estándar de Referencia USP correspondiente. En un caso aislado, si las instrucciones de la etiqueta específica difieren del texto que figura en la siguiente lista, tienen prioridad las instrucciones de la etiqueta del artículo del lote vigente. Con poca frecuencia se presenta una situación en que, por razones científicas, es necesario cambiar de inmediato las instrucciones. Este cambio se puede realizar fácilmente en la etiqueta del Estándar de Referencia, pero el proceso formal de revisión del texto farmacopeico requiere más tiempo. Por lo tanto, resulta especialmente importante consultar el Suplemento vigente de la *USP* y el *NF* para las revisiones oficiales de la siguiente lista. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■AUTORIDAD PARA EL ESTABLECIMIENTO Y LA DISTRIBUCIÓN

Los Estándares de Referencia USP se establecen y distribuyen con la autorización de la Junta Directiva de la USPC (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos) por recomendación del Comité de Estándares de Referencia USP, el cual aprueba la aptitud para uso en aplicaciones farmacopeicas de cada lote. Para algunos Estándares de Referencia, se busca una revisión preliminar y aprobación de otros Comités de Expertos del Consejo de Expertos.

La distribución de sustancias controladas está sujeta a las reglamentaciones y provisiones para el otorgamiento de licencias de la Administración para el Control de Drogas (DEA, por sus siglas en inglés) del Departamento de Justicia.

Los Paneles Asesores de la Industria y otros grupos de expertos (como Equipos de Proyectos) pueden reunirse para asesorar a la USP en distintos aspectos del Programa de Estándares de Referencia. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■HISTORIA

La futura disponibilidad de los primeros Estándares de Referencia USP se anunció en el año 1926 (*USP X*) "... para felicitar la adopción de los estándares de valoración biológica de la Farmacopea y para proporcionar una mayor uniformidad en su aplicación." La lista de Estándares de Referencia USP que consistía en el año 1936 de 6 elementos, aumentó a casi 1650 en el año 2004, recolección que le ha seguido la pista al progreso de las ciencias farmacéuticas: las primeras vitaminas (Aceite de Hígado de Bacalao) y la primera

enzima (Pepsina) en 1936; la primera sulfonamida (Sulfanilamida) y las primeras hormonas (Insulina; Pituitaria Posterior) en 1942; los primeros estándares de desempeño (Estándares de Punto de Fusión) en 1947; la primera penicilina (Penicilina G Sódica) en 1950; la primera proteína de tecnología de ADN recombinante (Insulina Humana) en 1985, etc.

El aumento continuo en el número de Estándares de Referencia USP (más de 100 nuevos se desarrollan cada año) refleja no sólo el aumento en el número de monografías y Capítulos Generales, sino también el desarrollo y amplio uso de metodologías analíticas modernas (como por ejemplo la cromatografía, la espectrofotometría, las valoraciones biológicas y bioquímicas, etc.) que requieren mediciones relativas a un estándar de referencia. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■NOMENCLATURA

En las monografías *USP–NF* o en los Capítulos Generales, se requiere el uso de los estándares designados Estándares de Referencia USP (ER USP), salvo algunas excepciones. Estas excepciones incluyen: lotes actuales de Estándares de Referencia USP y NF para los que no se especifica uso alguno en los compendios actuales *USP* o *NF* pero que aún cuentan con suficiente demanda (lotes futuros, una vez agotados los actuales, se denominarán Sustancias Auténticas); Estándares de Referencia especificados en las monografías desarrolladas por la USP que no pretenden publicarse en los compendios *USP–NF*; Estándares de Referencia especificados en la edición vigente del *Food Chemicals Codex* [Código de Sustancias Químicas Alimentarias] (con la designación adicional "FCC"); y Dentríficos de Fluoruro (evaluados y distribuidos por el acuerdo con la FDA y la *Cosmetics, Toiletries, and Fragrances Association* [Asociación de Cosméticos, Artículos de Tocador y Fragancias]). Se puede distribuir un Estándar de Referencia USP que se requiera en una monografía o Capítulo General propuesto en el *Pharmacopeial Forum* antes de la fecha oficial de la revisión del *PF* propuesta.

Los Estándares de Referencia declarados actualmente "Estándares de Referencia NF" finalmente se designarán y declararán "Estándares de Referencia USP" conforme a la consolidación de la *USP* y el *NF* dentro de la USPC a partir del 2 de enero de 1975. Mientras tanto, cuando sea necesario un Estándar de Referencia USP, se puede emplear la sustancia correspondiente declarada "Estándar de Referencia NF".

Como parte de su servicio, la USPC analiza y distribuye Sustancias Auténticas adicionales (denominadas AS) que no se requieren actualmente en ninguna monografía USP o Capítulo General. Éstas también se suministran bajo supervisión del Comité de Estándares de Referencia USP. Son muestras de sustancias químicas altamente caracterizadas, incluidas las sustancias de abuso, que se analizan en un esfuerzo colaborativo y se ponen a disposición como un servicio primariamente para los laboratorios de investigación, farmacéuticos y analíticos. Estos materiales pueden usarse en la identificación, el desarrollo de métodos, la evaluación del desempeño de métodos, u otras aplicaciones que sean adecuadas y estén validadas por el usuario.

Referencias Visuales Auténticas

A diferencia de los estándares de referencia química, las Referencias Visuales Auténticas (AVR, por sus siglas en inglés) no se emplean en los análisis químicos. En cambio, las AVR son imágenes visuales utilizadas por los analistas para comparar ciertos artículos de prueba y asegurar que cumplen con los requisitos farmacopeicos y se incorporan como referencia en la monografía. El Comité de Expertos que aprueba una monografía específica es el que decide la aprobación de las AVR para su inclusión en una monografía. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ DIVERSIDAD Y SUS IMPLICACIONES

La colección de Estándares de Referencia USP es muy diversa en cuanto a apariencia, estructura química, composición y uso. Esta diversidad tiene implicaciones significativas en la forma en que se analizan, envasan, almacenan y utilizan los materiales.

Los Estándares de Referencia USP pueden ser polvos cristalinos o amorfos, líquidos volátiles o viscosos, soluciones o suspensiones, geles o pastas, láminas de plástico, etc. En cuanto a la estructura química, varían desde sales inorgánicas simples hasta proteínas producidas mediante tecnología de ADN recombinante. Algunos son compuestos individuales altamente puros, mientras que otros son mezclas más complejas (en la mayoría de los casos obtenidos a partir de plantas o animales). ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ USOS DE LOS ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP

Los usos oficiales y autorizados de los Estándares de Referencia USP se especifican en las monografías USP y en los Capítulos Generales e incluyen los siguientes:

- usos cuantitativos en valoraciones para fármacos y formulaciones, pruebas de límite, o blancos y controles
- usos cualitativos, como por ejemplo pruebas de identificación, pruebas de aptitud del sistema, marcadores de picos cromatográficos, etc.
- calibradores y estándares de desempeño, como por ejemplo calibradores de disolución, estándares de punto de fusión, conjuntos de conteo de partículas, etc.

Según se indica en *Nomenclatura*, la USP también establece y distribuye estándares cuyo uso no se especifica en monografías USP o Capítulos Generales.

Los Estándares de Referencia USP se aplican con más frecuencia en las metodologías espectrocópicas y cromatográficas. Sin embargo, también se utilizan extensamente en aplicaciones biológicas y bioquímicas, como por ejemplo valoraciones microbiológicas para antibióticos, reacciones enzimáticas, pruebas de cultivo celular, pruebas en animales completos; en análisis térmicos para polímeros; y en valoraciones volumétricas, etc. Algunos de los ER USP que se usan con mayor frecuencia son los utilizados en las pruebas de los Capítulos Generales como por ejemplo *Disolución* (711), *Prueba de Endotoxinas Bacterianas* (85), *Carbono Orgánico Total* (643) y *Partículas en Inyectables* (788). ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ PASOS EN EL ESTABLECIMIENTO DE UN ESTÁNDAR DE REFERENCIA USP

El establecimiento de un nuevo Estándar de Referencia USP se inicia con la propuesta de una nueva monografía o de la revisión de una monografía existente mediante la inclusión de una prueba que requiere un nuevo ER USP. La necesidad de un nuevo lote de un Estándar de Referencia USP existente se identifica cuando su inventario alcanza el umbral preestablecido. El nuevo lote se denomina “lote de reemplazo” cuando se debe adquirir el nuevo material a granel o se denomina “lote de continuación” cuando el material propuesto es una porción adicional del material a granel usado en el lote oficial existente.

Los científicos de la USP generan un conjunto de documentos que incluyen las especificaciones para la adquisición y un protocolo de análisis. El material a granel se adquiere, por lo general, de un

fabricante principal del artículo. El material se analiza y caracteriza mediante un estudio colaborativo entre laboratorios organizado según el protocolo diseñado en la sede de la USP. El personal de la USP evalúa los resultados, realiza los análisis o investigaciones adicionales, según sea necesario, y prepara un reporte que se presenta al Comité de Expertos en Estándares de Referencia USP para su revisión y aprobación. Luego de su aprobación, el material se subdivide (si no se ha envasado antes del estudio colaborativo) y etiqueta, se verifica su calidad, y el estándar se pone a la disposición para su distribución. Si el personal científico de la USP o el Comité en Estándares de Referencia determinara que el material propuesto no es adecuado, se obtiene y analiza un nuevo material a granel. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ ESTUDIO COLABORATIVO PARA LA EVALUACIÓN DE UN MATERIAL PROPUESTO COMO ER USP

Los objetivos del estudio de evaluación son: confirmar la identidad y evaluar la pureza del material, determinar la aptitud para su uso en aplicaciones oficiales, proveer al usuario toda la información necesaria y las instrucciones de uso, y adquirir información inicial (a tiempo cero) para estudios futuros de aptitud continua para su uso.

Los científicos de la USP diseñan un protocolo de análisis detallado que incluye los siguientes elementos: tipos de pruebas, número de pruebas, número de colaboradores, número de determinaciones repetidas y referencias a los procedimientos a utilizar.

Cuando se diseña un protocolo de estudio, se consideran los siguientes factores: el estado farmacopeico del estándar, sus usos oficiales, el historial del estándar, su composición y complejidad, las características de la metodología y la disponibilidad del material y de los laboratorios competentes.

El protocolo de análisis puede comprender una evaluación visual y microscópica; pruebas de identificación (más elaboradas para los estándares que se desarrollan por primera vez); determinación de las constantes físico-químicas (por ej., intervalo de fusión, rotación específica, índice de refracción, peso específico, etc); pruebas de pureza electroforética y cromatográfica; determinación de contaminantes inorgánicos; pruebas de sustancias volátiles (agua, solventes); análisis de grupos funcionales (como por ejemplo valoraciones volumétricas, absorptividad UV, análisis elemental); análisis térmico; y valoraciones contra otro estándar bien caracterizado (un lote anterior, un estándar internacional, etc.). Las pruebas especializadas se implementan cuando sea necesario, como por ejemplo para calibradores de disolución y el set de recuento de partículas, para los estándares que definen un atributo (reacción biológica negativa y positiva, capacidad de intercambio iónico, diámetro de permeabilidad) y para estándares biológicos que definen una Unidad de actividad (heparina, endotoxina, enzimas, antibióticos complejos). El análisis de sorción de vapor también puede realizarse para colaborar en la determinación de las condiciones de envasado y almacenamiento, y las instrucciones de uso. Para los ER USP liofilizados unitarios, se demuestran la reproducibilidad aceptable del contenido del vial y la estabilidad de la forma liofilizada.

El número de colaboradores por lo general no es menor de 3 (dos externos a la USP); aunque puede aumentar significativamente, especialmente cuando la metodología es compleja o no posee un alto nivel de precisión, o cuando usuarios potenciales expresan interés en participar en la evaluación del material propuesto. (La participación en todo estudio de evaluación es una actividad abierta a todas las partes competentes e interesadas.) Si fuera necesario, se ejerce control estadístico en el diseño del estudio de evaluación y en el análisis de los resultados. El Laboratorio de Estándares de Referencia USP y los laboratorios de la FDA participan en casi todos los estudios de evaluación. Entre otros colaboradores se encuentran: Health Canada, el USP Research and Development Laboratory (Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la USP) y laboratorios académicos e industriales de los Estados Unidos y del exterior. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ESTÁNDARES DE REFERENCIA BIOLÓGICOS

La Organización Mundial de la Salud, organismo de las Naciones Unidas, administra un programa que suministra Estándares Internacionales para materiales biológicos.

La USP coopera estrechamente con la OMS en la armonización de metodología analítica, en la definición de las unidades de potencia y, en algunos casos, participa en la preparación de un estándar de referencia. En repetidas oportunidades las Unidades USP y las Unidades Internacionales de potencia son idénticas. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■APTITUD PARA SU USO Y ASIGNACIÓN DE LA PUREZA

Se analizan los datos obtenidos en el estudio de evaluación colaborativo para determinar la aptitud para el uso designado en la monografía del material. Los datos de caracterización y los resultados deben contemplarse como un todo cuando se evalúa la aptitud para el uso destinado, la estrategia de asignación y el valor asignado. Para los Estándares de Referencia utilizados en aplicaciones cuantitativas, esto incluye la determinación de un valor de cálculo a emplear en el uso farmacopeico del estándar.

El método a elegir en el cálculo del valor asignado es un análisis de balance de masas, en el que se utilizan componentes determinados independientemente como por ejemplo humedad, residuos de disolvente, residuos inorgánicos, impurezas cromatográficas y contenido de iones. Los resultados de la valoración contra un lote anterior u otro estándar validado y los resultados del análisis de grupo funcional son sólo de carácter confirmatorio. Entre las excepciones al enfoque de balance de masas se encuentran muchos Estándares de Referencia biológicos, especialmente aquellos que definen la Unidad de actividad.

El número de cifras significativas en el valor de cálculo declarado es una función del uso del estándar y el número de cifras significativas en el intervalo o límite de aceptación. Por lo general, los Estándares de Referencia usados en las valoraciones declaran tres cifras significativas y los estándares usados en las pruebas de límite dos cifras significativas. Puede que los Estándares de Referencia con aplicaciones múltiples en distintas metodologías requieran diferentes asignaciones específicas a cada valoración.

Se declara el valor asignado sin incertidumbre asociada alguna. Sin embargo, para los estándares de calibración, el valor declarado es un intervalo, determinado mediante un análisis estadístico de los resultados.

Los enfoques anteriores usaban un umbral de pureza, que al ser superior, el contenido no se declaraba y se le instruía al analista usar un valor predefinido de 100,0%. Este enfoque es obsoleto hoy día; sin embargo, aún no se han modificado las declaraciones de los lotes de estándares viejos y los usuarios continuarán aplicando el valor predefinido de 100,0% en aplicaciones farmacopeicas cuantitativas.

Para antibióticos, a veces se utiliza la designación “µg/mg” como unidad de actividad biológica y pueden asignarse valores de más de 1000 µg/mg a algunos de estos estándares. Esto puede suceder cuando al primer estándar se le asigna un valor superior al de su pureza real y los estándares subsiguientes de pureza superior se definen con relación al lote anterior. También se puede obtener un valor asignado relativamente exagerado cuando se reemplazan técnicas de separación menos selectivas por metodologías modernas más selectivas. Como resultado, se pudiera haber asumido un contenido original superior a su nivel real.

No se le asigna ningún valor a los estándares con aplicaciones sólo cualitativas.

Un informe que recopila los resultados del estudio de evaluación y que incluye una propuesta para el texto de la etiqueta se presenta al Comité de Expertos en Estándares de Referencia USP para su revisión y aprobación. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■TEXTO DE LA ETIQUETA

El texto de la etiqueta se diseña para proporcionar al usuario toda la información necesaria en cuanto al correcto almacenamiento y uso del Estándar de Referencia en la o las aplicaciones de la monografía. La etiqueta incluye instrucciones de uso, advertencias de seguridad, información requerida para las sustancias controladas y un valor de cálculo para los estándares con aplicaciones cuantitativas. Para los calibradores, se proveen intervalos de aceptación. Si fuera necesario, los Estándares de Referencia USP están acompañados de documentación adicional, como por ejemplo Hojas Técnicas o Cromatogramas Típicos. La USP generalmente no proporciona Certificados de Análisis ya que toda la información que el usuario necesita para las aplicaciones oficiales o autorizadas del estándar se proveen en el texto de la etiqueta y, si fuera necesario, en la documentación adicional.

Las instrucciones de uso son específicas para cada lote y preceden cualquier otra indicación en el compendio.

Se generan Hojas de Datos de Seguridad del Material para cada estándar que distribuye la USP. Éstas se encuentran disponibles en el sitio Web de la USP. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■COMITÉ DE EXPERTOS EN ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP

El Comité de Expertos en Estándares de Referencia USP esta constituido por profesionales de la industria, agencias gubernamentales y académicos de los Estados Unidos de América y del exterior. Se organiza en grupos y puede recibir ayuda de un Panel Asesor de la Industria en la revisión de los estudios de evaluación. La aprobación del informe de evaluación debe ser unánime. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ENVASADO

El proceso de producción de los Estándares de Referencia USP opera bajo un Sistema de Calidad ISO 9001:2000 registrado y principios de Buenas Prácticas de Fabricación vigentes adecuadas.

Los Estándares de Referencia USP se envasan en unidades individuales diseñadas para mantener la integridad del material contenido de Estándar de Referencia. Las condiciones de envasado y almacenamiento para los Estándares de Referencia USP proveen protección a todos los materiales aún cuando éste no requiera tan excepcional protección debido a su estabilidad inherente. Las configuraciones de envasado más comunes son viales para materiales sólidos y ampollas para los líquidos. El ambiente de envasado se determina por la sensibilidad del material a la luz, la oxidación o a la humedad atmosférica y por su toxicidad. Si fuera necesario, los envases se llenan en una cámara cerrada bajo gas inerte en condiciones de humedad residual baja controlada. (En la etiqueta se declara la necesidad de almacenar estos estándares bajo protección de una atmósfera de gas inerte.) También se pueden envolver en una bolsa de papel de aluminio sellada como barrera protectora adicional. Las ampollas se llenan y sellan en un dispositivo automático y normalmente se purgan con un gas inerte. Los tamaños de ampollas más comunes son 2 mL y 5 mL. Los viales pueden llenarse mediante operaciones manuales, semi-automáticas o completamente automáticas. Estos pueden ser de diferentes tamaños dependiendo de la cantidad de material. La cantidad de material por envase individual depende de la aplicación farmacopeica del estándar y es, por lo general, suficiente para varias

determinaciones repetidas. Se proporcionan cantidades mayores cuando se requieren experimentos adicionales (como por ejemplo una determinación volumétrica del contenido de agua al momento de uso). En general, se sobrepasa ligeramente el llenado de los envases de los Estándares de Referencia de manera que el usuario pueda retirar la cantidad nominal declarada del material. Los viales se cierran con tapones con recubrimiento interno de Teflón y se aseguran con precintos de aluminio y un sello que evidencia su alteración intencional con el logotipo de la USP. Es posible que aún se distribuyan lotes con configuraciones anteriores de cierre de viales.

Distintas consideraciones pueden determinar la necesidad de suministrar el estándar en un envase unitario, principalmente materiales con problemas de manipulación significativos o aquellos disponibles solamente en pequeñas cantidades. Dichos envases unitarios por lo general se llenan mediante liofilización y su contenido se declara en Unidades de masa o actividad por envase. Cuando así se declara, el contenido del envase debe reconstituirse en su totalidad sin la necesidad de pesarlo nuevamente. Las instrucciones de reconstitución se proveen en la etiqueta o en las monografías en que se usa el estándar. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ESTÁNDARES DE REFERENCIA DE IMPUREZAS

El tema de las impurezas se discute en varias secciones de la USP, como por ejemplo *Advertencias Generales* y en Capítulos Generales como *Impurezas Comunes* (466), *Impurezas en Artículos Oficiales* (1086), etc. Además, la mayoría de las monografías de fármacos y muchas de las de formulaciones incluyen pruebas específicas para la identificación o cuantificación de impurezas. Dichas pruebas generalmente requieren un Estándar de Referencia oficial. El desarrollo de estos Estándares de Referencia de impurezas es una de las razones del crecimiento acelerado y continuo de los Estándares de Referencia USP.

En muchos casos, los materiales para los Estándares de Referencia de impurezas son costosos y difíciles de obtener. Es posible que sólo esté disponible una cantidad limitada del material—la obtención podría requerir una síntesis especial—y puede ser de menor calidad que los Estándares de Referencia para el artículo oficial, por lo que se requeriría purificación. La cantidad limitada de material disponible puede afectar el protocolo de análisis y el envasado. Los Estándares de Referencia de impurezas pudieran estar disponibles como materiales de compuesto individual purificado, soluciones, dispersiones sólidas o mezclas de más de una impureza. Otras opciones incluyen muestras del artículo oficial con el contenido declarado de impureza(s), la generación in situ de la impureza a partir del artículo oficial mediante un procedimiento específico validado, el uso de movilidades cromatográficas relativas y factores de respuesta relativa o de valores teóricos como por ejemplo absorptividades UV a longitudes de onda selectivas.

En ediciones anteriores del compendio, se designaban a las impurezas con sus nombres químicos. Para facilitar búsqueda y el orden en el índice, la designación de las impurezas gradualmente se ha reemplazado con “ER Compuesto Relacionado X de Y,” donde Y es el nombre del artículo oficial y X es una letra del alfabeto secuencial. Los Estándares de Referencia de mezclas de impurezas pudieran designarse según su uso, como por ejemplo “ER Aptitud del Sistema de Y”. Se hace una referencia cruzada entre los nombres convencionales y los nombres químicos al final de la sección de este capítulo y en una sección especial del *Official USP Reference Standards Catalog* (Catálogo Oficial de Estándares de Referencia USP). ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■PROGRAMA DE APTITUD CONTINUA PARA SU USO

Para asegurar que los Estándares de Referencia mantienen las propiedades determinadas en la evaluación inicial, la USP mantiene un Programa de Aptitud Continua para Su Uso. Los intervalos y protocolos para volver a analizar el estándar son una función de sus usos y propiedades así como de la información disponible acerca de su estabilidad. Los protocolos abreviados emplean la metodología indicadora de estabilidad usada en la caracterización inicial del material para confirmar la uniformidad de atributos como por ejemplo la apariencia, la pureza cromatográfica o el contenido de sustancias volátiles. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■USO CORRECTO

Ni los Estándares de Referencia ni las Sustancias Auténticas están destinadas para uso como fármacos o dispositivos médicos.

Los Estándares de Referencia USP en distribución no llevan una fecha de caducidad. Un lote de ER USP puede usarse en sus aplicaciones oficiales siempre que se publique como “Current Lot” (“Lote Vigente”) en la versión vigente (última versión) del *Official USP Reference Standards Catalog* (Catálogo Oficial de Estándares de Referencia USP). Al agotarse, se designa a este lote en el catálogo como “Previous Lot” (“Lote Anterior”) y se le asigna una “Valid Use Date” (“Fecha de Uso Válida”). La USP publica bimestralmente el *Official Catalog of Reference Standards* (el cual también incluye las Sustancias Auténticas) como un folleto separado*. Se puede encontrar una versión actualizada del catálogo en el sitio Web de la USP: www.usp.org. Es responsabilidad del usuario constatar que un suministro particular de Estándar de Referencia USP tiene un estado oficial como “Current Lot” (“Lote Vigente”) o como “Previous Lot” (“Lote Anterior”) dentro de la fecha de uso válida.

Muchas pruebas y valoraciones farmacopeicas están basadas en la comparación de una muestra de prueba con un Estándar de Referencia USP. En estos casos, las mediciones se realizan en preparaciones de la muestra de prueba y del Estándar de Referencia. Cuando se indica que se debe preparar una Solución estándar o una Preparación estándar para realizar una determinación cuantitativa en diluciones sucesivas o de otro modo, está previsto que la sustancia del Estándar de Referencia se pese con exactitud (ver *Pesas y Balanzas* (41) y *Aparatos Volumétricos* (31)). También se debe tomar debida nota de los errores relativamente importantes que se producen al pesar masas pequeñas (ver también *Dilución en Pruebas y Valoraciones en Advertencias y Requisitos Generales*).

El texto de la etiqueta provee instrucciones al usuario en cuanto al uso correcto del Estándar de Referencia. Las instrucciones incluyen una de las siguientes opciones. Un Estándar de Referencia se puede emplear de la siguiente manera:

- Tal como se encuentra, es decir, sin ningún tratamiento previo o corrección por sustancias volátiles. Esta es la opción de preferencia y se escoge siempre que los datos validados muestren que el contenido de sustancias volátiles es constante en el tiempo.
- Inmediatamente después de un período de secado bajo las condiciones declaradas. El secado no debe realizarse en el envase original. Se debe transferir una porción del material a un recipiente de secado aparte.

* Para quienes no están suscritos, el Catálogo Oficial más reciente está disponible en: U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Reference Standards Order Department, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852. Teléfono 1-301-881-0666. Fax 1-301-816-8148. Línea gratuita en Estados Unidos 1-800-227-USPC o en el sitio Web de la USP: www.usp.org/dsd/refstd.

- Con una corrección por el contenido de agua o la pérdida por secado determinada en una porción aparte del material. Si se exige una determinación volumétrica de agua al momento de usar el Estándar de Referencia, proceder según se indica en el *Método I en Determinación de Agua* (921). Para ello se aceptan métodos instrumentales o microanalíticos. Al usar cantidades habituales (aproximadamente 50 mg del Estándar de Referencia), valorar volumétricamente con una solución del reactivo diluida de dos a cinco veces más. Si se exige la determinación de la pérdida por secado de una porción aparte del Estándar de Referencia USP, proceder según se indica en la etiqueta. Se pueden usar tamaños de muestra más pequeños que los requeridos en el Capítulo General *Pérdida por Secado* (731) para un ER Estándar de Referencia USP, siempre que el usuario pueda obtener un resultado suficientemente exacto.

Siempre que las instrucciones de uso declaradas requieran un secado preliminar o una corrección por sustancias volátiles, se debe realizar “al momento” de uso. Detalles experimentales adicionales deben controlarse mediante los Procedimientos Operativos Estándares y las buenas prácticas de laboratorio del usuario. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ALMACENAMIENTO

Cada Estándar de Referencia USP se debe almacenar, manipular y utilizar correctamente para que sirva al fin deseado. En general, los Estándares de Referencia deben almacenarse en sus envases originales con tapón, lejos del calor y protegidos de la luz. Deben evitarse, en especial, lugares de almacenamiento húmedos. Cuando se necesitan condiciones de almacenamiento especiales, las instrucciones se indican en la etiqueta. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■RELACIONES CON OTRAS ORGANIZACIONES DE ESTABLECIMIENTO DE ESTÁNDARES

La USP mantiene contacto continuo con otras organizaciones que establecen Materiales de Referencia con fines farmacopeicos, entre otros, como por ejemplo las Farmacopeas Europea y Japonesa (a través del Grupo de Discusión Farmacopeico), la Organización Mundial de la Salud, el National Institute for Science and Technology (Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología), el Reference Materials Committee (Comité sobre Materiales de Referencia, REMCO) de la ISO, etc.

ISO-REMCO ha reconocido la naturaleza específica de las sustancias de referencia farmacopeica en la introducción de la Guía ISO 34—General requirements for the competence of reference material producers [Requisitos Generales para la Competencia de los Productores de Material de Referencia] (Segunda Edición 2000): “Las autoridades farmacopeicas establecen y distribuyen los estándares y sustancias farmacopeicas siguiendo el principio general de esta guía. Se debe tomar en cuenta, no obstante, que las autoridades farmacopeicas toman un enfoque distinto para proveer al usuario la información contenida en el certificado de análisis y las fechas de caducidad. Además, no se declara la incertidumbre de los valores asignados ya que es inapreciable en relación a los límites definidos de las valoraciones de métodos específicos de las farmacopeas para las cuales se emplean.”

El apartado *Estándares de referencia USP* de una monografía individual de la USP o del NF o de un capítulo general nombra a cada Estándar de Referencia USP requerido para los procedimientos de prueba y valoración, y hace referencia a este capítulo para obtener información e instrucciones adicionales. Es importante consultar el Suplemento vigente de la USP y el NF para las revisiones oficiales en la siguiente lista. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP ESPECIFICADOS EN MONOGRAFÍAS DE LA USP Y DEL NF Y CAPÍTULOS GENERALES

NOTA—Consultar el último Suplemento o *Interim Revision Announcement* (Anuncio de Revisión Intermedia) correspondiente a la USP y al NF para informarse sobre las revisiones, adiciones o eliminaciones.

Las revisiones, adiciones y eliminaciones de Estándares de Referencia USP individuales se listan acumulativamente en cada Suplemento de los compendios USP–NF. De esta manera, sólo es necesario consultar ■ la edición vigente de los compendios USP–NF ■^{1S} (USP30) y el último Suplemento para obtener la lista completa de Estándares de Referencia USP vigentes, especificados en las monografías y capítulos generales de los compendios USP–NF. Esta lista proporciona los nombres completos y actualizados, y la información química ■^{1S} (USP30) de los Estándares de Referencia USP distribuidos a partir de la fecha oficial de dicho Suplemento.

Las revisiones de este capítulo se llevan a cabo continuamente a través de los *Anuncios de Revisión Intermedia* publicados en el *Pharmacopeial Forum*. Estas revisiones interinas de los Estándares de Referencia USP se incluyen acumulativamente en el próximo Suplemento de los compendios USP–NF.

La siguiente lista alfabética constituye un índice de todas las revisiones de este capítulo. Por lo tanto, no es necesario nombrar repetidamente los Estándares de Referencia revisados en el índice general del Suplemento.

En la lista siguiente, se indican los nombres químicos de muchas sustancias (por ej., compuestos relacionados) que no son artículos de monografías de la USP o del NF. Después del nombre de una sustancia química ER, se pueden indicar entre paréntesis su fórmula empírica y su peso molecular, si se dispone de estos datos, separados por el símbolo ◊.

Cambio en la redacción:

ER Aceite de Ricino Polioxilado 35 USP. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Acesulfamo Potásico USP. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Acetaminofeno USP. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Acetato de Alfa Tocoferilo USP. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Acetato de Anecortava USP. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Acetato de Betametasona USP. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Acetato de Celulosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Clorhexidina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Cortisona USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Acetato de Desmopresina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Desoxicorticosterona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Dexametasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Flecainida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Fludrocortisona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Fluorometolona USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Acetato de Gonadorelina USP [C₅₅H₇₅N₁₇O₁₃ · xCH₃COOH
◇ 1182,3 (libre de acetatos)]. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Guanabenzol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Hidrocortisona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Isoflupredona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de L-Lisina USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Acetato de Leuprorelina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Mafenida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Medroxiprogesterona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Megestrol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Metilprednisolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Noretindrona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Parametasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Prednisolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetato de Trenbolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetazolamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetilcisteína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetilo de Sulfisoxazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetohexamida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Acetonido de Fluocinolona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acetonido de Triamcinolona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Aciclovir USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Acetohidroxámico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Adípico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido 3-Amino-2,4,6-triiodobenzoico USP (C₇H₄I₃NO₂ ◇ 514,83). ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido 5-Amino-2,4,6-triiodo-*N*-metilisoftalámico USP (C₉H₇I₃N₂O₃ ◇ 571,88). ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Aminobenzoico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Aminocaproico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Aminohipúrico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Aminosalicílico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Arsanílico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Ascórbico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Aspártico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Benzoico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Cítrico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Dehidrocólico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Diatrizoico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Edético USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Estéarico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Etacrínico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Etidróico Monohidrato USP (C₂H₈O₇P₂ · H₂O ◇ 224,04). ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Fenilbenzimidazol Sulfónico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Fluoroquinolónico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Fólico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido 10-Formilfólico USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Ácido Fumárico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Glicírrico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Glutámico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Iotalámico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Maleico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Málico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Mefenámico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Nalidíxico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Palmítico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Pamoico USP (C₂₃H₁₆O₆ ⇄ 388,38). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Pentético USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Quínico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Salicílico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Sulfanílico USP (C₆H₇NO₃S ⇄ 173,19). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Trisalicílico USP (C₂₁H₁₄O₇ ⇄ 378,34). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Undecilénico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Valerénico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Valproico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido Xantanoico USP (C₁₄H₁₀O₃ ⇄ 226,23). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ácido *o*-Yodohipúrico USP (C₉H₅INO₃ ⇄ 305,07). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Adenina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Adenosina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Agigenina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Agnósido USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER L-Alanina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alantoína USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Albendazol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Albuterol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alcohol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alcohol Bencílico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alcohol Cetílico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alcohol Deshidratado USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alcohol Estearílico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alcohol Fenilético USP ■(C₈H₁₀O ◊ 122,17). ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alcoholes de Lanolina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alendronato Sódico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alfa Ciclodextrina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alfa Tocoferol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Aliína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER S-Alil-L-Cisteína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Almidón Glicolato de Sodio Tipo A. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Almidón Glicolato de Sodio Tipo B. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alopurinol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alprazolam USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Alprostadil USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Altretamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Amcinónida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Amfotericina B USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Amifostina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**

ER Amifostina Tiol USP [diclorhidrato de 2-[(3-aminopropil)amino]-etanotiol] (C₅H₁₆N₂SCl₂ ◊ 207,17). ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Amikacina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Amilasa y Proteasa de Pancreatina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**

ER 2-Amino-5-clorobenzofenona USP (C₁₃H₁₀ClNO ◊ 231,68). ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Aminobenzoato Potásico USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Aminobutanol USP (C₄H₁₁NO ⇌ 89,14). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER *N*-(Aminocarbonil)-*N*-[([5-nitro-2-furanil]-metileno)-amino]-glicina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER *m*-Aminofenol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Aminoglutetimida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER *m*-Aminoglutetimida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Amitraz USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Amobarbital USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Amoxapina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Amoxicilina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Ampicilina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Ampicilina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Ampicilina Trihidrato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Amprolio USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Análogo Etilendiamina de Ciprofloxacino USP [clorhidrato de ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-[(2-aminoetil)amino]-3-quinolin carboxílico] (C₁₅H₁₆FN₃O₃ · HCl ⇌ 341,77). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Análogo Nitrofenilpiridínico de Nifedipino USP [4-(2-nitrofenil)-2,6-dimetilpiridin-3,5-dicarboxilato de dimetilo] (C₁₇H₁₆N₂O₆ ⇌ 344,33). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Análogo Nitrosofenilpiridínico de Nifedipino USP [4-(2-nitrosofenil)-2,6-dimetilpiridin-3,5-dicarboxilato de dimetilo] (C₁₇H₁₆N₂O₅ ⇌ 328,33). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Antipirina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Antralina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Apigenina-7-Glucósido USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Aptitud del Sistema de Clorhidrato de Cefepima USP—Es una mezcla del compuesto relacionado A de clorhidrato de cefepima (cloruro de [6*R*-[6*α*,7*β*(*E*)]-1-[[7-[[[(2-amino-4-tiazolil) (metoxiimino)acetil]amino]-2-carboxi-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-3-il]metil]-1-metilpirrolidinio, monoclóhidrato, monohidrato; (C₁₉H₂₅ClN₆O₅S₂ · HCl · H₂O ⇌ 571,50); compuesto relacionado B de cefepima (ácido [6*R-trans*]-7-[[[2-[[[(2-amino-4-tiazolil) (metoxiimino)acetil]amino]-4-tiazolil](metoxiimino)acetil]amino]-3-(1-metilpirrolidinio-1-il)metil]-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-3-en-2-carboxílico, sal interna; (C₂₅H₂₉N₉O₇S₃ ⇌ 663,75); y clorhidrato de cefepima. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Aptitud del Sistema de Valoración de Vitamina D USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER L-Arginina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Ascorbato de Calcio USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ascorbato de Sodio USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Aspartamo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Acesulfamato de Aspartamo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Aspirina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Astemizol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Atenolol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Atovacuona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Aurotioglucosa USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Avobenzona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Azaeritromicina A USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Azaperona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Azatioprina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Azitromicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Azo-aminoglutetimida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Aztreonam USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Aztreonam de Anillo Abierto USP (C₁₈H₁₉N₅O₉S₂ ⇨ 453,46). ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Azul de Metileno USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bacitracina Cinc USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Baclofeno USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Behenato de Glicerilo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bencilato de 3-Quinuclidinilo USP (C₂₁H₂₃NO₃ ⇨ 337,42). ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bendroflumetiazida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Benzoato de Bencilo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Benzoato de Betametasona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Benzoato de Denatonio USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Benzoato de Metronidazol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Benzocaína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Benzonatato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER 1,4-Benzoquinona USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Besilato de Amlodipino USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Besilato de Atracurio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Besilato de Mesoridazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Beta Ciclodextrina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Betametasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Biorreacción Positiva USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Biotina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Biperideno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER 4,4'-Bis[1,2,3,6-tetrahidro-4-(2-oxo-1-benzimidazolinil)-1-piridil]butirofenona USP (C₃₄H₃₄N₆O₃ ⚡ 574,69). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bisacodilo USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Bisotrizol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bitartrato de Colina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bitartrato de Dihidrocodeína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bitartrato de Epinefrina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bitartrato de Fenilpropanolamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bitartrato de Hidrocodona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bitartrato de Metaraminol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bitartrato de Nicotina Dihidrato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bitartrato de Norepinefrina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Brinzolamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bromhidrato de Cefelina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bromhidrato de Dextrometorfano USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Bromhidrato de Escopolamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Bromhidrato de Hidroxianfetamina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Bromhidrato de Homatropina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER 8-Bromoteofilina USP [8-bromo-3,7-dihidro-1,3-dimetil-1*H*-purina-2,6-diona] (C₇H₇N₄O₂Br ⇄ 259,06). ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Bromuro de Clidinio USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Bromuro de Demecario USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Bromuro de Metescopolamina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Bromuro de Neostigmina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Bromuro de Piridostigmina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Bromuro de Propantelina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Bromuro de Vecuronio USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Bumetanida USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Butabarbital USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Butalbital USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Butambén USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER 2-*terc*-Butil-4-hidroxianisol USP (C₁₁H₁₆O₂ ⇄ 180,25). ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER 3-*terc*-Butil-4-hidroxianisol USP (C₁₁H₁₆O₂ ⇄ 180,25). ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER 3-(Butilamino)-4-fenoxi-5-sulfamoilbenzoato de Butilo USP (C₂₁H₂₈N₂O₅S ⇄ 420,53). ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Butilparabeno USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Butirato de Hidrocortisona USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Butirato de Sodio USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Cafeína USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Calcifediol USP. ■_{1S} (USP30)***Agregar lo siguiente:***■ER Calcitonina Salmón USP. ■_{1S} (USP30)***Agregar lo siguiente:***^ER Calcitrol USP. ■_{1S} (USP30)▲USP30***Cambio en la redacción:***ER Calibración de Dextrano 4 USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Calibración de Dextrano 10 USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Calibración de Dextrano 40 USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Calibración de Dextrano 70 USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Calibración de Dextrano 250 USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Caprato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Caprilato de Colesterilo USP (C₃₅H₆₀O₂ ⇨ 512,86).
■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Caprilato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Caproato de Hidroxiprogesterona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Caproato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Capsaicina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Captopril USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Carbacol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Carbamazepina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Carbenicilina Indanilo Sódica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Carbenicilina Monosódica Monohidrato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Carbidopa USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Carbonato de Litio USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Carbonato de Propileno USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Carboplatino USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Carisoprodol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Casticina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Cefaclor USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Cefadroxilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Cefalexina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Cefalotina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Cefamandol de Litio USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Cefapirina Benzatínica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Cefapirina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefazolina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefixima USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefmetazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefonicida Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefoperazona Dihidrato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ceforanida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefotaxima Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefotetán USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefoxitina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefpiramida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefpodoxima Proxetilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefradina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ceftazidima Pentahidrato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ceftizoxima USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ceftriaxona Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefuroxima Axetilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cefuroxima Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Celaburato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Celacefato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**

ER Células F₁ para la Prueba de Proliferación Celular USP
(Línea celular ATCC FDCP-F1 enviada con autorización de la USP).
■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Cera de Candelilla USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cianocobalamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ciclandelato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ciclofosfamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ciclometicona 4 USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ciclometicona 5 USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Ciclometicona 6 USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ciclopirox USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ciclopirox Olamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER 2-Ciclopropilmetilamino-5-clorobenzofenona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cicloserina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ciclosporina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cimetidina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cinoxacino USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cipionato de Estradiol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cipionato de Testosterona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ciprofloxacino USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cisplatino USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citarabina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Acetiltributilo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Acetiltriethyl USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Bismuto USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Clomifeno USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Dietilcarbamazina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Difenhidramina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Feniltoloxamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Fentanilo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Orfenadrina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Sufentanilo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Tamoxifeno USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Tributilo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Citrato de Trietilo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Claritromicina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clavam-2-Carboxilato Potásico USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clavulanato de Litio USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clioquinol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clofazimina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clofibrato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clonazepam USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clonidina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorambucilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Cloranfenicol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorazepato Dipotásico USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clordiazepóxido USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhexidina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de 5-Aminoimidazol-4-carboxamida USP
(C₄H₆N₄O · HCl ⇨ 162,58). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Acebutolol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Amantadina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Amilorida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Amitriptilina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Amodiaquina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Anileridina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Apomorfina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Apraclonidina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Arginina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Bacampicilina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Benazepril USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de 1-Bencil-3-metil-5-aminopirazol USP
(C₁₁H₁₃N₃ · HCl ⇨ 223,71). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Benoxinato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Clorhidrato de Betahistina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Betaína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Betaxolol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Biperideno USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Bromodifenhidramina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Bupivacaína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Buprenorfina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Bupropión USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Buspirona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Carteolol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Catinona USP [clorhidrato de α -aminopropiofenona] ($C_9H_{11}NO \cdot HCl \rightleftharpoons 185,65$). ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Cefepima USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Cefmenoxima USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Cefotiam USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Ciclizina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Ciclobenzaprina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Ciclopentolato USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Cimetidina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Ciproheptadina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de L-Cisteína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Clindamicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Clomipramina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Clonidina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Clordiazepóxido USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Cloroprocaina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Clorpromazina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Clorhidrato de Clortetraciclina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Cocaína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Colestipol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Daunorrubicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Demeclociclina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Desacetil Diltiazem USP (C₂₀H₂₄N₂O₃S · HCl
◇ 408,95). ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Deshidrocarteolol USP [clorhidrato de 5-(3-*terc*-butilamino-2-hidroxi)-propoxycarbostirilo] (C₁₆H₂₂N₂O₃ · HCl ◇
326,82). ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Desipramina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Dibucaína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Diclomina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Diclonina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Dietilpropión USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Difenhidramina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Difenoxilato USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Diltiazem USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Dipivefrina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Dobutamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Dopamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Dorzolamida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Doxapram USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Doxepina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Doxorrubicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Emetina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de 4-Epianhidrotetraciclina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Espectinomina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Etambutol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Eucatropina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Fenazopiridina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Fenilefrina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Fenilpropanolamina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Fenmetrazina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Fenoxibenzamina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Fentermina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Fexofenadina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Flufenazina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Fluoxetina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Flurazepam USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Gemcitabina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Glucosamina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Guanfacina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Hidralazina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Hidromorfona USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Hidroxizina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Idarrubicina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Imipramina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Isoetarina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Isoproterenol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Isoxsuprina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Ketamina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Labetalol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Levamisol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Levobunolol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de L-Lisina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Lincomicina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Clorhidrato de Loperamida USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Clorhidrato de Maprotilina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Mecamilamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Meclizina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Mecloretamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Melfalán USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Meperidina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Mepivacaína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Metaciclina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Metadona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Metanfetamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Metformina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Metildopa USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Metilfenidato USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Metoclopramida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Metodilazina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Mexiletina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Minociclina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Mitoxantrona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Molindona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Moricizina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Nafazolina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Naftifina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Nalorfina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Naratriptán USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Noroximorfona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Nortriptilina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Ondansetrón USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Oximetazolina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Clorhidrato de Oxprenolol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Palmitato de Clindamicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Papaverina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Paroxetina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Pilocarpina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Piridoxina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Pramoxina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Prazosina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Prilocaina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Procaína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Procainamida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Procarbazina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Prociclidina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Promazina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Prometazina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Propafenona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Proparacaina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Propoxicaína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Propoxifeno USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Propranolol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Protriptilina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Pseudoefedrina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Quinapril USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Ranitidina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Ritodrina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Selegilina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Sotalol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tacrina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Clorhidrato de Terazosina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tetracaína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tetraciclina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tetrahidrozolina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tiagabina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tiamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tiletamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tioridazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tocainida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tolazolina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Trazodona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Trientina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Trifluoperazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Triflupromazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Trihexifenidilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Trimetobenzamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Tripelenamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Triprolidina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Vancomicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Verapamilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Xilazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Xilometazolina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Yohimbina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorhidrato de Zolazepam USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER 2-Cloro-3,5-dimetilfenol USP (C₈H₉ClO ⇨ 156,61).
■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorobutanol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER β -Clorogenina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorotiazida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloroxilenol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorpropamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER (E)-Clorprotixeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorsulón USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clortalidona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Acetilcolina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Amonio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Benzalconio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Betanecol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Cetilpiridinio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Colina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Edrofonio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Oxibutinina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Pralidoxima USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Succinilcolina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Succinilmonocolina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloruro de Tubocurarina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clorzoxazona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clotrimazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloxacilina Benzatina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Cloxacilina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Clozapina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Colchicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Colecalciferol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER $\Delta^{4,6}$ -Colestadienol USP [colesta-4,6-dien-3 β -ol] ($C_{27}H_{44}O$ \diamond 384,64). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Colistimetato Sódico USP. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado A de Acetato de Gonadorelina USP** [ácido libre de gonadorelina] ($C_{55}H_{74}N_{16}O_{14}$ \diamond 1183,3). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado A de Acetato de Anecortava USP.** ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Acetato de Medroxiprogesterona USP [acetato de 4,5 β -dihidromedroxiprogesterona] ($C_{24}H_{36}O_4$ \diamond 388,54). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Acetato de Melengestrol USP [17-acetato de 16-metilen-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ácido Diatrizoico USP [ácido 5-acetamido-3-amino-2,4,6-triyodobenzoico] ($C_9H_7I_3N_2O_3$ \diamond 571,88). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ácido Fólico USP [formiltetrahidrofolato de calcio]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ácido Valproico USP [ácido dialilacético] ($C_8H_{12}O_2$ \diamond 140,18). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Alopurinol USP [hemisulfato de 3-amino-4-carboxamidopirazol] ($C_4H_6N_4O_2 \cdot H_2SO_4$ \diamond 350,32). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Aspartamo USP [ácido 5-bencil-3,6-dioxo-2-piperazin acético] ($C_{13}H_{14}N_2O_4$ \diamond 262,27). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Atovacuona USP [*cis*-2[4-(4-clorofenil)ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftoquinona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Baclofeno USP [4-(4-clorofenil)-2-pirrolidinona] ($C_{10}H_{10}ClNO$ \diamond 195,65). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Benazepril USP [ácido (3*R*) 3-[[[(1*R*) 1-(etioxicarbonil)-3-fenilpropil]amino]-2,3,4,5-tetrahydro-2-oxo-1*H*-1-benzazepin-1-acético, monohidrato] ($C_{24}H_{28}N_2O_5 \cdot HCl$ \diamond 460,95). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina USP [4-amino-6-cloro-1,3-benzenodisulfonamida] ($C_6H_8ClN_3O_4S_2$ \diamond 285,73). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado A de Bisotrizol USP.** ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Bitartrato de Hidrocodona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Brinzolamida USP [isómero (*S*) de brinzolamida] ($C_{12}H_{21}N_3O_5S_3$ \diamond 383,52). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Bromuro de Clidinio USP [bromuro de 3-hidroxi-1-metilquinuclidinio] ($C_8H_{16}BrNO$ \diamond 222,13). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Bromuro de Propantelina USP [bromuro de 9-hidroxiopropantelina] ($C_{23}H_{30}BrNO_4$ \diamond 464,39). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Bumetanida USP [ácido 3-amino-4-fenoxi-5-sulfamoylbenzoico] ($C_{13}H_{12}N_2O_5S$ ⇌ 308,31). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Buprenorfina USP [21-[3-(1-propenil)]-7 α -(S)-1-hidroxi-1,2,2-trimetilpropil]-6,14-*endo*-etano-6,7,8,14-tetrahydrooripavina] ($C_{29}H_{41}NO_4$ ⇌ 467,65). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado A de Calcitonina Salmón USP** [N-acetil-cis¹-calcitonina] ($C_{146}H_{243}N_{44}O_{49}S_2$ ⇌ 3463). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Carbidopa USP [3-*O*-metilcarbidopa] ($C_{11}H_{16}N_2O_4$ ⇌ 240,26). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ciclopirox USP [ácido-3-ciclohexil-4,5-dihidro-5-metil-5-isoxazolil acético]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado A de Citalopram USP** [1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4'-fluorofenil)-1,3-dihidroisobenzofurano-5-carboxamida] ($C_{20}H_{23}FN_2O_2$ ⇌ 342,22). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Claritromicina USP [6,11-di-*O*-metilclitromicina A] ($C_{39}H_{71}NO_{13}$ ⇌ 762,00). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Clomifeno USP [clorhidrato de (*E,Z*)-2-[4-(1,2-difeniletetil)fenoxi]-*N,N*-dietiletanamina] ($C_{26}H_{29}NO \cdot HCl$ ⇌ 407,98). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Clonazepam USP [3-amino-4-(2-clorofenil)-6-nitrocarbostirilo] ($C_{15}H_{10}ClN_3O_3$ ⇌ 315,72). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Clordiazepóxido USP [4-óxido de 7-cloro-1,3-dihidro-5-fenil-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-ona] ($C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ ⇌ 286,72). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Clorhidrato de Bupropión USP [clorhidrato de 2-(*terc*-butilamino)-4'-cloropropiofenona] ($C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ ⇌ 276,21). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Clorhidrato de Dorzolamida USP [(4*R*,6*R*)-4-(etilamino)-5,6-dihidro-6-metil-4*H*-tieno[2,3-*b*]tiopiran-2-sulfonamida-7,7-dióxido, monoclóridato] ($C_{10}H_{16}N_2O_4S_3 \cdot HCl$ ⇌ 360,91). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Cloroxilenol USP [2-cloro-3,5-dimetilfenol]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Clortalidona USP [ácido 4'-cloro-3'-sulfamoyl-2-benzofenona carboxílico]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Clorzoxazona USP [2-amino-4-clorofenol] (C_6H_6ClNO ⇌ 143,57). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Clotrimazol USP [(*o*-clorofenil)difenilmetanol] ($C_{19}H_{15}ClO$ ⇌ 294,78). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Dacarbazina USP [clorhidrato de 5-aminoimidazol-4-carboxamida]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado A de Dantroleno USP** [5-(4-nitrofenil)furaldehído azina] ($C_{22}H_{14}N_4O_6$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Desflurano USP [bis-(1,2,2,2-tetrafluoroetil)éter] ($C_4H_2F_8O$ ⇌ 218,05). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado A de Desogestrel USP** [13-etil-11-metileno-18, 19-dinor-5 α , 17 α -pregn-3-en-20-in-17-ol, Δ^3 -isómero de desogestrel] ($C_{22}H_{30}O$ ⇌ 310,48). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Diazepam USP [2-metilamino-5-clorobenzofenona] ($C_{14}H_{12}ClNO$ ⇌ 245,71). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado A de Didanosina USP [hipoxantina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Diclofenaco USP [*N*-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona] (C₁₄H₉Cl₂NO ⇄ 278,14). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado A de Doxepina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Etidronato Disódico USP [fosfito dibásico de sodio pentahidrato] (Na₂HPO₃ · 5H₂O ⇄ 216,04 ⇄ CAS-13708-85-5). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado A de Etil Estradiol USP [6-ceto-etil estradiol] (C₂₀H₂₃O₃ ⇄ 311,39). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Etodolaco USP [ácido (±)-8-etil-1-metil-1,3,4,9-tetrahidropirano [3,4-*b*]-indol-1-acético] (C₁₆H₁₉NO₃ ⇄ 273,33). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Etopabato USP [metil-4-acetamido-2-hidroxibenzoato] (C₁₀H₁₁NO₄ ⇄ 209,20). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Felodipino USP [metil 4-(2,3-diclorofenil)-2,6-dimetilpiridin-3,5-dicarboxilato de etilo] (C₁₈H₁₇Cl₂NO₄ ⇄ 382,24). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Fenbendazol USP [metil (1*H*-bencimidazol-2-il)carbamato] (C₉H₉N₃O₂ ⇄ 191,19). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Feniltoloxamina USP [clorhidrato de 2-(2-benzilfenoxi)etilmetilamina] (C₁₆H₁₉NO · HCl ⇄ 277,79). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Fenitoína USP [difetilglicina] (C₁₄H₁₅NO₂ ⇄ 227,26). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Fenoldopam USP [6-cloro-2,3,4,5-tetrahidro-1-(4-hidroxifenil)-metanosulfonato de 1-metil-3-benzazepin-7,8-diol (sal)] (C₁₇H₁₈ClNO₃ · CH₄SO₃ ⇄ 415,89). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Fexofenadina USP [ácido 4-[1-oxi-4-[4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]butil]-α,α-dimetil bencenoacético,] (C₃₂H₃₇NO₄ ⇄ 499,65). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Fludesoxiglucosa USP [4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosano] (C₁₈H₃₆N₂O₆ ⇄ 376,49). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Fluoxetina USP [clorhidrato de *N*-metil-3-fenil-3-[(α,α,α-(trifluoro-*m*-tolil)oxi]propilamina] (C₁₇H₁₈F₃NO · HCl ⇄ 345,79). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Flurbiprofeno USP [ácido 2-(4-bifenilil)propiónico] (C₁₅H₁₄O₂ ⇄ 226,28). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado A de Fosinopril USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Furosemda USP [ácido 2-cloro-4-*N*-furfurilamino-5-sulfamoilbenzoico] (C₁₂H₁₁ClN₂O₅S ⇄ 330,74). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Gabapentina USP [2-aza-espiro[4.5]decan-3-ona] (C₉H₁₅NO ⇄ 153,22). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Gadodiamida USP [monometilamida del ácido dietilentriamina pentaacético de sodio y gadolinio] (C₁₅H₂₂GdN₄NaO₉ ⇄ 582,60). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Gadoversetamida USP [hidrógeno [8,11,14-tris(carboximetil)-6-oxo-2-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-oato(4-)]gadolinio]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ganciclovir USP [(*RS*)-2-amino-9-(2,3-dihidroxi-propoximetil)-1,9-dihidro-purin-6-ona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Gemfibrozilo USP [ácido 2,2-dimetil-5-[2,5-dimetil-4-propen-1-il]fenoxi]valérico] (C₁₈H₂₆O₃ ◇ 290,40). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Glipizida USP [*N*-{2-[(4-aminosulfonyl)fenil]etil}-5-metil-pirazincarboxamida] (C₁₄H₁₆N₄O₃S ◇ 320,37). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Haloperidol USP [4,4'-bis[4-*p*-clorofenil]-4-hidroxi-piperidin]butirofenona] (C₃₂H₃₆Cl₂N₂O₃ ◇ 567,56). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Hidroxizina USP [*p*-clorobencidrilpiperazina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Inamrinona USP [5-carboxamido[3,4'-bipiridin]-6(1*H*)-ona] (C₁₁H₉N₃O₂ ◇ 215,21). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Iohexol USP [5-(acetilamino)-*N,N'*-bis(2,3-dihidroxipropil)-2,4,6-triyodo-1,3-bencenodicarboxamida]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Iopamidol USP [*N,N'*-bis-(1,3-dihidrox-2-propil)-5-amino-2,4,6-triyodoisofalamida] (C₁₄H₁₈I₃N₃O₆ ◇ 705,03). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Iopromida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ioversol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ioxilán USP [ácido 5-amino-2,4,6-triyodo-3-*N*-(2-hidroxietyl)carbamoil benzoico] (C₁₀H₉I₃N₂O₄ ◇ 601,90). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Isradipino USP [4-(4-benzofurazanyl)-2,6-dimetil-3,5-piridinodicarboxilato de isopropilo y metilo] (C₁₉H₁₉N₃O₅ ◇ 369,38). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ketamina USP [1-[(2-clorofenil)(metilimino)metil]ciclopentanol] (C₁₃H₁₆NOCl ◇ 237,73). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Lansoprazol USP [2-[[[3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)-2-piridil]metil]sulfonyl]bezimidazol] (C₁₆H₁₄F₃N₃O₃S ◇ 385,36). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Letrozol USP [4,4'-(1*H*-1,3,4-triazol-1-ilmetilen)dibenzonitrilo] (C₁₇H₁₁N₅ ◇ 285,31). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Levocarnitina USP [cloruro de 3-carboxi-*N,N,N*-trimetil-2-propen-1-aminio] (C₇H₁₄ClNO₂ ◇ 179,65). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Levodopa USP [3-(3,4,6-trihidroxifenil)alanina] (C₉H₁₁NO₃ ◇ 213,19). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Loratadina USP [8-cloro-6,11-dihidro-11(4-piperidiliden)-5*H*-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-*b*] piridina] (C₁₉H₁₉ClN₂ ◇ 310,83). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Lorazepam USP [7-cloro-5-(*o*-clorofenil)-1,3-dihidro-3-acetoxi-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-ona] (C₁₇H₁₂Cl₂N₂O₃ ◇ 363,20). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Lovastatina USP [[dihidro-lovastatina] [éster 2-metil-, 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-3,7-dimetil-8-[2(tetrahidro-4-hidroxi-6-oxo-2*H*-piran-2-il)-etil]-1-naftalenílico del ácido butanoico [1*S*-[1α(*R**),3α,7β,8β(2*S**,4*S**),-8αβ]]]-] (C₂₄H₃₈O₅ ◇ 406,56). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Mafenida [4-formilbencenosulfonamida] ($C_7H_7NO_3S$ \diamond 185,20). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Mangafodipir USP [dipiridoxal monofosfato de manganeso(II) sal de sodio]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado A de Meloxicam** USP [ácido de 4-hidroxi-2-metil-2*H*-1,2-benzotiazina-3-carboxílico éter etílico 1,1-dióxido]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Mesilato de Dolasetrón USP [clorhidrato de hexahidro-8-hidroxi-2,6-metano-2*H*-quinolizin-3 (4*H*)-ona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Metformina USP [1-cianoguanidina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Meticlotiazida USP [4-amino-6-cloro-*N*³-metil-*m*-bencenodisulfonamida] ($C_7H_{10}ClN_3O_4S_2$ \diamond 299,76). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Metilfenidato USP [clorhidrato del ácido α -fenil-2-piperidinacético] ($C_{13}H_{17}NO_2 \cdot HCl$ \diamond 255,75). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Metoprolol USP [(±)1-etilamino)-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-propan-2-ol] ($C_{14}H_{23}NO_3$ \diamond 253,34). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Milrinona USP [1,6-dihidro-2-metil-6-oxo-(3,4'-bipiridin)-5-carboxamida] ($C_{12}H_{11}N_3O_2$ \diamond 229,23). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Nabumetona USP [1-(6-metoxi-2-naftil)-but-1-en-3-ona] ($C_{15}H_{14}O_2$ \diamond 226,27). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Naltrexona USP [clorhidrato de *N*-(3-butenil)-noroximorfona] ($C_{20}H_{23}NO_4 \cdot HCl$ \diamond 377,87). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Naratriptán USP [clorhidrato de 3-(1-metilpiperidin-4-il)-1*H*-indol] ($C_{14}H_{18}N_2 \cdot HCl$ \diamond 250,8). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Nevirapina USP [5,11-dihidro-6*H*-11-etil-4-metil-dipirido[3,2-*b*: 2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-ona] ($C_{14}H_{14}N_4O$ \diamond 254,29). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Nitrofurantoína USP [*N*-(aminocarbonil)-*N*-[([5-nitro-2-furanil]metilen)amino]glicina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Nitrofurazona USP [5-nitro-2-furfuraldazina] ($C_{10}H_6N_4O_6$ \diamond 278,18). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ondansetrón USP [3[(dimetilamino)metil]-1,2,3,9-tetrahidro-9-metil-4*H*-carbazol-4-ona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Oxibutinina USP [ácido fenilciclohexilglicólico] ($C_{14}H_{18}O_3$ \diamond 234,30). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Paclitaxel USP [cefalomanina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Prazicuantel USP [2-benzoil-1,2,3,6,7,11*b*-hexahidro-4*H*-pirazino [2,1-*a*]isoquinolin-4-ona] ($C_{19}H_{18}N_2O_2$ \diamond 306,37). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Prednicartrato USP [1,2-dihidroprednicartrato]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Prilocaina USP [clorhidrato de *o*-toluidina] ($\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2\text{HCl}$ \diamond 143,62 \diamond CAS-636-21-5). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Probucof USP [2,2',6,6'-tetra-*tert*-butildifeniquinona] ($\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_2$ \diamond 408,63). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Propionato de Clobetasol USP [9 α -fluoro-11 β -hidroxi-16 β -metil 3-oxo-androsta-1,4-dien-17(*R*)-espiro-2'-[4'-cloro-5'-etilfuran-3'(*2'H*)-ona]] ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClFO}_4$ \diamond 448,96). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Propofol USP [3,3'-5,5'-tetraisopropildifenol]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Propoxifeno USP [clorhidrato de *a-d*-4-dimetilamino-1,2-difenil-3-metil-2-butanol] ($\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO} \cdot \text{HCl}$ \diamond 319,87). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Quazepam USP [7-cloro-1-(2,2,2-trifluoroetil)-5-(2-fluorofenil)-1,3-dihidro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-ona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Quinapril USP [[3*S*-[(2*R**), 3*a*, 11*ab*]]-1,3,4,6,11,11*a*-hexahidro-3-metil-1,4-dioxo-*a*-(2-feniletil)-2*H*-pirazino[1,2-*b*]isoquinolin-2-acetato de etilo] ($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$ \diamond 419,49). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ramipril USP. [ácido (2*S*,3*aS*,6*aS*)-1-[(*S*)-2-[[(*S*)-1-(metoxicarbonil)-3-fenilpropil]amino]-1-oxopropil]-octahidrociclopenta[*b*]pirrol-2-carboxílico] ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$ \diamond 402,48). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Ranitidina USP [sal de hemifumarato de 5-[[2-(aminoetil)tio]metil]-*N,N*-dimetil-2-furanmetanamina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Repaglinida USP [sal *N*-acetil-L-glutamato de (*S*)-3-metil-1-[2-(1-piperidinil)fenil]butilamina] ($\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2 \cdot \text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_5$ \diamond 435,6). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Sevoflurano USP [1,1,1,3,3-pentafluoroisopropenil fluorometil éter] ($\text{C}_4\text{H}_2\text{F}_6\text{O}$ \diamond 179,97). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Sotalol USP [monoclorhidrato de *N*[(4-[[1-(metiletil)amino]acetil]fenil]metanosulfonamida] ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S} \cdot \text{HCl}$ \diamond 306,81). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Succinato de Sumatriptán USP [sal succinato de [3-[2-(dimetilamino)etil]-2-[[3-[2-(dimetilamino)etil]-1*H*-indol-5-il]metil]-1*H*-indol-5-il]-*N*-metilmetsulfonamida] ($\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_2\text{S} \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ \diamond 613,77). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Sulfaquinoxalina USP [*N*¹-*N*²-diquinoxalin-2-ilsulfanilamida] ($\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{SO}_2$ \diamond 428,50). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Terazosina USP [diclorhidrato de 1-(4-amino-6,7-dimetoxi-2-quinazolinil)piperazina] ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ \diamond 362,25). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Terbutalina USP [sulfato de 3,5-dihidroxi- ω -*t*-butilaminoacetofenona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Tiagabina USP [1-[4,4-bis(3-metil-2-tienil)-3-butenil]-3-piperidincarboxilato de (*R*)-etilo] ($\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_2\text{S}_2 \cdot \text{HCl}$ \diamond 440,0). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Tiamulina USP [tosil pleuromutilina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Tinidazol USP [(2-metil-5-nitroimidazol] ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$ \diamond 127,10). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Tioconazol USP [clorhidrato de 1-[2,4-dicloro- β -[(3-tenil)-oxi]fenetil]imidazol] ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS} \cdot \text{HCl}$ \diamond 389,73). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Tolcapona USP [(4*N*-metil-3,4-dihidroxibenzofenona)] (C₁₄H₁₂O₃ ⇄ 228,24). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado A de Topiramato USP** [2,3: 4,5-bis-*O*-(1-metiletilideno)-β-*D*-fructopiranosas] (C₁₂H₂₀O₆ ⇄ 260,28). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Torsemida USP [4-[(3-metilfenil)amino]-3-piridinsulfonamida] (C₁₂H₁₃N₃O₂S ⇄ 263,32). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Trifluridina USP [5-carboxi-2'-desoxiuridina] (C₁₀H₁₂N₂O₇ ⇄ 272,22). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Valrubicina USP [*N*-trifluoroacetil-14-bromodaunorrubicina-13,13-dimetilcetal]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

▲**ER Compuesto Relacionado A de Valsartán USP** [(*R*-*N*-valeril-*N*-[(2'-(1*H*-tetrazol-5-il)bifen-4-il]metil)valina] (C₂₄H₂₉N₅O₃ ⇄ 435,52). ■_{1S} (USP30)▲USP30

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Verapamilo USP [monoclorhidrato de 3,4-dimetoxi-α-[3-(metilamino)propil]-α-(1-metiletil)-bencenacetonitrilo] (C₁₇H₂₆N₂O₂ · HCl ⇄ 326,87). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Verteporfina USP [ácido *trans*-(±)-18-etenil-4,4a-dihidro-3,4-bis(metoxycarbonil)-4a,8,14,19-tetrametil-23*H*,25*H*-benzo[*b*]porfin-9,13-dipropiónico] (C₄₀H₄₀N₄O₈ ⇄ 704,77). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Vinorelbina USP [4-*O*-desacetilvinorelbina] (C₄₃H₅₂N₄O₇ · 2C₄H₆O₆ ⇄ 1037,07). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Warfarina USP [3-(*o*-hidroxifenil)-5-fenil-2-ciclohexen-1-ona] (C₁₈H₁₆O₂ ⇄ 264,33). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado A de Zileutón USP [*N*-(1-Benzo-*[b]*tien-2-iletil)urea] (C₁₁H₁₂N₂OS ⇄ 220,30). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Acetato de Melengestrol USP [17-acetato de 17α-hidroxi-6,16-dimetilenprogna-4-en-3,20-diona]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado B de Alopurinol USP** [5-(formilamino)-1*H*-pirazol-4-carboxamida] (C₅H₆N₄O₂ ⇄ 154,13). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Benazepril USP [ácido (3*S*) 3-[[[(1*R*) 1-(etoxicarbonil)-3-fenilpropil]amino]-2,3,4,5-tetrahydro-2-oxo-1*H*-1-benzazepin-1-acético, monoclorhidrato] (C₂₄H₂₈N₂O₅ · HCl ⇄ 460,95). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Brinzolamida USP [(etanodioato de *R*-4-amino)-2,3-dihidro-2-(3-metoxipropil)-4*H*-tieno[3,2,-*e*]-tiazin-6-sulfonamida-1,1-dióxido 1:1] (C₁₀H₁₇N₃O₅S₃ · C₂H₂O₄ ⇄ 445,49). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Bumetanida USP [ácido 3-nitro-4-fenoxi-5-sulfamoilbenzoico] (C₁₃H₁₀N₂O₇S ⇄ 338,29). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Ciclopirox USP [6-ciclohexil-4-metil-2-pirona]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado B de Citalopram USP** [1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-3-hidroxi-1,3-dihidroisobenzofurano-5-carbonitrilo] (C₂₀H₂₁FN₂O₂ ⇄ 340,22). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Clonazepam USP [2-amino-2'-cloro-5-nitrobenzofenona] (C₁₃H₉ClN₂O₃ ⇄ 276,68). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Clonidina USP [2-[(*E*)-2,6-diclorofenilimino]-1-(1-{2-[(*E*)-2,6-diclorofenilimino]-imidazolidin-1-il}-etil)-imidazolidina] ▲(C₂₀H₂₀Cl₄N₆ ⇄ 486,23).▲USP30
■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Clorhidrato de Bupropión USP [clorhidrato de 2-(*terc*-butilamino)-3'-bromopropiofenona] ($C_{13}H_{18}BrNO \cdot HCl \diamond 320,66$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Dacarbazina USP [2-azahipoxantina] ($C_4H_3N_5O \diamond 137,10$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado B de Dantroleno USP** [5-(4-nitrofenil)-2-furaldehído-2-carboximetil semicarbazona] ($C_{14}H_{12}N_4O_6$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado B de Desogestrel USP** [3-hidroxi-desogestrel] ($C_{22}H_{30}O_2 \diamond 326,48$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Diazepam USP [3-amino-6-cloro-1-metil-4-fenilcarbostirilo] ($C_{16}H_{13}ClN_2O \diamond 284,74$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado B de Doxepina USP.** ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Fenbendazol USP [metil [5(6)-clorobenzimidazol-2-il]carbamato] ($C_9H_8ClN_3O_2 \diamond 225,63$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Fenitoína USP [ácido difenilhidantoico] ($C_{15}H_{14}N_2O_3 \diamond 270,29$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Fenoldopam USP [2,3,4,5-tetrahydro-1-(4-hidroxifenil)-metanosulfonato de 1*H*-3-benzazepin-7,8-diol (sal)] ($C_{16}H_{16}NO_3 \cdot CH_4SO_3 \diamond 366,42$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Fexofenadina USP [clorhidrato del ácido 3-[1-hidroxi-4-[4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]butil]- α,α -dimetil bencenoacético] ($C_{32}H_{39}NO_4 \cdot HCl \diamond 538,12$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Fluconazol USP [2-(4-fluorofenil)-1,3-bis(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)-propan-2-ol]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Fludesoxiglucosa USP ($C_6H_{11}ClO_5 \diamond 198,60$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Fluoxetina USP [*N*-metil-3-fenilpropilamina] ($C_{10}H_{15}N \diamond 149,24$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado B de Fosinopril USP.** ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Furosemida USP [ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico] ($C_7H_7ClN_2O_4S \diamond 250,66$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Gadodiamida USP [ácido dietilentriammina pentaacético de sodio y gadolinio] ($C_{14}H_{18}GdN_3Na_2O_{10} \diamond 591,54$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Inamrinona USP [*N*-(1,6-dihidro-6-oxo-(3,4'-bipiridin)-5-il)-2-hidroxiopropanamida] ($C_{13}H_{13}N_3O_3 \diamond 259,3$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Iohexol USP [5-amino-*N,N'*-bis(2,3-dihidroxiopropil)-2,4,6-triyodo-1,3-bencenodicarboxamida]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Iopamidol USP [5-glicolamido-*N,N'*-bis[2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil]-2,4,6-triyodoisofalamida] ($C_{16}H_{20}I_3N_3O_7 \diamond 747,07$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Iopromida USP [5-(acetilamino)-*N,N'*-bis(2,3-dihidroxiopropil)-2,4,6-triyodo-*N*-metil-1,3-bencenodicarboxamida]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Ioversol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Isoflurano USP [éter de 2,2,2-trifluoroetil difluorometilo] ($\text{C}_3\text{H}_3\text{F}_5\text{O}$ \diamond 150,05). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Levodopa USP [3-metoxitirosina] ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ \diamond 211,22). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Loratadina USP [8-cloro-6,11-dihidro-11(*N*-metil-4-piperiniliden)-5*H*-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-*b*]piridina] ($\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_2$ \diamond 324,88). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Lorazepam USP [2-amino-2',5-diclorobenzofenona] ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}$ \diamond 266,13). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Mangafodipir USP [dipiridoxal difosfato mono sobrealquilado de manganeso(II) sal de sodio]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado B de Meloxicam USP** [2-amino-5-metil-tiazol]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Metoprolol USP [(±)1-cloro-2-hidroxi-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-propano] ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClO}_3$ \diamond 244,71). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Naratriptán USP [metilamida oxalato del ácido 2-[3-(1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-4-il)-1*H*-indol-5-il]etanosulfónico] ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S} \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ \diamond 423,5). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Nevirapina USP [5,11-dihidro-4-metil-6*H*-dipirido[3,2-*b*: 2',3'-*e*][1,4]diazepin-6-ona] ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$ \diamond 226,23). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Oxibutinina USP [éster metílico del ácido fenilciclohexilglicólico, o CHMME (éster metílico del ácido ciclohexil mandélico)]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Paclitaxel USP [10-deacetil-7-epipaclitaxel]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Paroxetina USP [clorhidrato de trans-4-fenil-3-[(3,4-metilendioxi)fenoxi]metilpiperidina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Prazicuantel USP [2-(ciclohexilcarbonyl)-2,3,6,7-tetrahidro-4*H*-pirazino [2,1-*a*]isoquinolin-4-ona] ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ \diamond 310,40). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado B de Prednicarbato USP** [prednisolona-17-etilcarbonato]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Prilocaina USP [(*ER*)-*N*-(4-metilfenil)-2-(propilamino)propanamida] ($\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ \diamond 220,31). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Probutol USP [4,4'-(ditio)bis(2,6-di-*tert*-butilfenol)] ($\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_2$ \diamond 474,78). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Propofol USP [2,6-diisopropilbenzoquinona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Propoxifeno USP [α -*d*-2-acetoxi-4-dimetilamino-1,2-difenil-3-metilbutano] ($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_2$ \diamond 325,45). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Quinapril USP [ácido [3*S*-[2[*R**(*R**),3*R**]]]-2-[2-[(1-carboxi-3-fenilpropil)amino]-1-oxopropil]-1,2,3,4-tetrahidro-3-isoquinolincarboxílico. ($\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$ \diamond 410,47). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Ramipril USP [ácido (2*S*,3*aS*,6*aS*)-1-[(*S*)2-[[(*S*)1-(metiletoxi)carbonyl-3-fenilpropil]amino]-1-oxopropil]-octahidrociclopenta[*b*]pirrol-2-carboxílico] ($\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5$ \diamond 430,54). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Ranitidina USP [*N,N'*-bis[2-[[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]tio]etil]-2-nitro-1,1-etendiamina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Repaglinida USP [ácido 3-etoxi-4-etoxicarbonilfenilacético] (C₁₃H₁₆O₅ ⇌ 252,27). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Sevoflurano USP [1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metoxi-propano]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Sotalol USP [*N*-(4-formilfenil)metanosulfonamida] (C₈H₉NO₃S ⇌ 199,23). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Terazosina USP [1-(4-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-quinazolinil)-4-[(tetrahidro-2-furanil)carbonil]piperazina] (C₁₉H₂₄N₄O₅ ⇌ 388,42). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Tinidazol USP [1-(2-etil-sulfoniletil)-2-metil-4-nitroimidazol] (C₈H₁₃N₃O₄S ⇌ 247,28). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Tioconazol USP [clorhidrato de 1-[2,4-dicloro-β-(2,5-dicloro-3-tenil)oxi]fenetil]imidazol] (C₁₆H₁₂Cl₄N₂OS · HCl ⇌ 458,62). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Tolcapona USP [4-hidroxi-3-metoxi-4'-metil-5-nitrobenzofenona] (C₁₅H₁₃NO₅ ⇌ 287,27). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Torsemida USP [*N*-(*n*-butilamino)carbonil]-4-[(3-metilfenil)amino]-3-piridinsulfonamida] (C₁₇H₂₂N₄O₃S ⇌ 362,45). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

▲**ER Compuesto Relacionado B de Valsartán USP** [(*S*-*N*-butiril-*N*-(2'-(1*H*-tetrazol-5-il)bifen-4-il]metil)-valina] (C₂₃H₂₇N₅O₃ ⇌ 421,49). ■_{1S} (USP30)▲USP30

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Verapamilo USP [monoclorhidrato de α-[2-[[2-(3,4-dimetoxifenil)-etil]metilamino]etil]-3,4-dimetoxi-α-(1-metiletil)-bencenacetónitrilo] (C₂₆H₃₆N₂O₄ · HCl ⇌ 477,05). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Zidovudina USP [3'-cloro-3'-desoxitimidina] (C₁₀H₁₃ClN₂O₄ ⇌ 260,68). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado B de Zileutón USP [2-(benzo[*b*]tien-2-*oil*)benzo[*b*]tiofeno] (C₁₇H₁₀OS₂ ⇌ 294,40). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado C de Alopurinol USP** [*N*-(4*H*-1,2,4-triazol-4-il)-1*H*-pirazol-4-carboxamida] (C₆H₆N₆O ⇌ 178,15). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Benazepril USP [ácido 3-(1-carboxi-3-fenil-1(*S*)-propil)amino-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1*H*-1-(3*S*)-benzazepin-1-acético] (C₂₂H₂₄N₂O₅ ⇌ 396,44). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado C de Citalopram USP** [3-(3-*N*,*N*-dimetilamino)-1-(4-fluorofenil)-6-ciano-1(3*H*)-isobenzofuranona] (C₂₀H₁₉FN₂O₂ ⇌ 338,22). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Clonazepam USP [2-bromo-2'-(2-clorobenzoil)-4'-nitroacetanilida]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Clorhidrato de Bupropión USP [1-(3-clorofenil)-2-hidroxi-1-propanona] (C₉H₉O₂Cl ⇌ 184,62). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado C de Dantroleno USP** [5-(4-nitrofenil)-1-furancarboxialdehído] (C₁₁H₇NO₄). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Desogestrel USP [3-ceto-desogestrel] (C₂₂H₂₈O₂ ⇌ 324,46). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado C de Doxepina USP.** ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado C de Flumazenil USP [N,N-dimetilformamida dietil acetal]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Fluoxetina USP [ácido N-metil-N-[3-fenil-3-(4-trifluorometil-fenoxi)-propil] succinámico] (C₂₁H₂₂F₃NO₄ ⇄ 409,40). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Flurazepam USP [clorhidrato de 5-cloro-2-(2-dietilaminoetil(amino)-2'-fluorobenzofenona] (C₁₉H₂₂ClFN₂O · HCl ⇄ 385,31). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado C de Fosinopril USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Inamrinona USP [1,6-dihidro-6-oxo-(3,4'-bipiridin)-5-carbonitrilo] (C₁₁H₇N₃O ⇄ 197,20). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Iohexol USP [N,N'-bis(2,3-dihidroxipropil)-5-nitro-1,3-benzenodicarboxamida]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Lorazepam USP [6-cloro-4-(o-clorofenil)-2-quinazolinocarboxaldehído] (C₁₅H₈Cl₂N₂O ⇄ 303,15). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Mangafodipir USP [dipiridoxal difosfato de manganeso(II)sal de sodio]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado C de Meloxicam USP [isopropil-4-hidroxi-2-metil-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxilato-1,1-dióxido]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Metoprolol USP [(±)4-[2-hidroxi-3-(1-metiletil)aminopropoxi]benzalaldehído] (C₁₃H₁₉NO₃ ⇄ 237,29). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Ondansetrón USP [1,2,3,9-tetrahydro-9-metil-4H-carbazol-4-ona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Oxibutinina USP [análogo metil-etílico de cloruro de oxibutinina, o (clorhidrato de 4-(etilmetilamino) but-2-inil (±) 2-ciclohexil-2-hidroxi-2-fenilacetato)]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Paroxetina USP [clorhidrato de (+)-trans-paroxetina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Prazicuantel USP [2-(N-formilhexahidropuroil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-ona] (C₁₉H₂₂N₂O₄ ⇄ 342,39). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado C de Prednicarbato USP [prednisolona-21-propionato]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Probucol USP [4-[(3,5-di-*terc*-butil-2-hidroxiifenil)isopropilidéntico]-2,6-di-*terc*-butilfenol] (C₃₁H₄₈O₂S₂ ⇄ 516,86). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Propofol USP [éter de 2,6-diisopropilfenilisopropilo] (C₁₄H₂₂O ⇄ 206,32). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Ramipril USP [ácido (2S,3aS,6aS)-1-[(S)2-[[[(S)1-etoxicarbonil-3-ciclohexilpropil]amino]-1-oxopropil]-octahidrociclopenta[b]pirrol-2-carboxílico] (C₂₃H₃₈N₂O₅ ⇄ 422,56). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Ranitidina USP [N-2-[[[5-[(dimetilamino)metil]-2-furanil]metil]sulfinil]etil]-N-metil-2-nitro-1,1-etendiamina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Repaglinida USP [ácido (S)-2-etoxi-4-[2-[[2-fenil-1-[2-(1-piperidinil)fenil]etil]amino]-2-oxoetil]benzoico] (C₃₀H₃₄N₂O₄ ⇄ 486,61). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Sevoflurano USP [1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Sotalol USP [monoclorhidrato de *N*-[4-[2-[(1-metiletil)amino]etil]fenil]metanosulfonamida] ($C_{12}H_{20}N_2O_2S \cdot HCl \diamond 292,83$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Terazosina USP [diclrorhidrato de 1,4-bis(4-amino-6,7-dimetoxi-2-quinazolinil)piperazina] ($C_{24}H_{28}N_8O_4 \cdot 2HCl \diamond 565,45$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Tioconazol USP [clorhidrato de 1-[2,4-dicloro- β -[(5-bromo-2-cloro-3-tenil)-oxi]-fenetil]imidazol] ($C_{16}H_{13}BrCl_2N_2OS \cdot HCl \diamond 468,63$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Torsemida USP [*N*-[(etilamino)carbonil]-4-[(3-metilfenil)amino]-3-piridinsulfonamida] ($C_{15}H_{18}N_4O_3S \diamond 334,39$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

▲ER Compuesto Relacionado C de Valsartán USP [éster bencílico (*S*-*N*-valeril-*N*-[(2'-(1*H*-tetrazol-5-il)bifen-4-il]metil)-valina] ($C_{31}H_{35}N_5O_3 \diamond 525,64$). ■_{1S} (USP30)▲USP30

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Zidovudina USP [timina] ($C_5H_6N_2O_2 \diamond 126,12$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado C de Zileutón USP [1-benzo-*[b]*tien-2-iletanona] ($C_{10}H_8OS \diamond 176,24$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado D de Alopurinol USP** [etil 5-amino-1*H*-pirazol-4-carboxilato] ($C_6H_9N_3O_2 \diamond 155,15$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado D de Fosinopril USP**. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado D de Lorazepam USP [ácido 6-cloro-4-(*o*-clorofenil)-2-quinazolinicarboxílico] ($C_{15}H_8Cl_2N_2O_2 \diamond 319,15$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado D de Meloxicam USP** [4-metoxi-2-metil-*N*-(5-metil-1,3-tiazol-2il)-2*H*-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado D de Metoprolol USP [(±) *N,N*-bis[2-hidroxi-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]propil](1-metiletil)amina] ($C_{27}H_{41}NO_6 \diamond 475,62$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado D de Ondansetrón USP [1,2,3,9-tetrahydro-9-metil-3-metilen-4*H*-carbazol-4-ona]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado D de Ramipril USP [(2*S*)-[(3*S*, 5*aS*, 8*aS*, 9*aS*)-3-metil-1,4-dioxodecahidro-1*H*-ciclopenta[*e*]pirrolo[1,2-*a*]pirazin-2-il]-4-fenil-butanoato de etilo] **Ramipril Dicetopiperazina** ($C_{23}H_{30}N_2O_4 \diamond 398,50$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado D de Verapamilo USP**. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado E de Alopurinol USP** [etil 5-(formilamino)-1*H*-pirazol-4-carboxilato]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado E de Citalopram USP** [1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidrobenzofurano-5-carbonitrilo-*N*-óxido] ($C_{20}H_{21}FN_2O_2 \diamond 340,22$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado E de Fosinopril USP**. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado E de Lorazepam USP [6-cloro-4-(*o*-clorofenil)-2-quinazolin metanol] ($C_{15}H_{10}Cl_2N_2O \diamond 305,16$). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado E de Verapamilo USP** [3,4-dimetoxibenzaldehído]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Compuesto Relacionado F de Alopurinol USP** [etil 3-(2-carbeto-2-cianoetenil)amino-1*H*-pirazol-4-carboxilato]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado F de Clorhidrato de Bupropión USP [1-(3-clorofenil)-1-hidroxi-2-propanona] ($C_9H_9O_2$ \diamond 184,62). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado F de Flurazepam USP [7-cloro-5-(2-fluorofenil)-1,3-dihidro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona] ($C_{15}H_{10}ClFN_2O$ \diamond 288,71). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado F de Fosinopril USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado F de Paroxetina USP [*trans*(-)-1-metil-3-[1,3-benzodioxol-5-iloxi]metil]-4-(fluorofenil)piperidina] ($C_{20}H_{22}FNO_3$ \diamond 343,39). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado F de Verapamilo USP [(3,4-dimetoxifenil)metanol]. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado G de Fosinopril USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado G de Paroxetina USP [clorhidrato de (\pm)*trans*-3-[(1,3-benzodioxol-5-iloxi)metil]-4-(4'-fluorofenil-4'-fenil)piperidina] ($C_{25}H_{24}FNO_3$ \diamond 405,46). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Compuesto Relacionado H de Fosinopril USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuesto Relacionado N de Eritromicina USP [*N*-desmetileritromicina A] ($C_{36}H_{65}NO_{13}$ \diamond 719,91). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Compuestos Relacionados de Clorhexidina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Condroitina Sulfatada Sódica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Copolímero de Ácido Metacrílico, Tipo A USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Copolímero de Ácido Metacrílico, Tipo B USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Copolímero de Ácido Metacrílico, Tipo C USP. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Copolímero de Metacrilato de Amino USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Copolímero de Metacrilato de Amonio, Tipo A USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Copolímero de Metacrilato de Amonio, Tipo B USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Copovidona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Corticotropina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Creatinina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Cromolín Sódico USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Crospovidona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Crotamitón USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Dacarbazina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Dactinomicina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Danazol USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Dantroleno USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Dantroleno Sódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dantrón USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dapsona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Decanoato de Nandrolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Desflurano USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Deslanósido USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Desoaminilazitromicina USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Desogestrel USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Desoximetasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Determinación de Alcohol—Acetonitrilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Determinación de Alcohol—Alcohol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dexametasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dexpanthenol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dextrano 1 USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dextrano T-10 USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dextrometorfano USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dextrosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diacetato de Diflorasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diacetato de Etinodiol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diacetato de Nitrofurfural USP (C₉H₉NO₇ ⇌ 243,17). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diacetato de Triamcinolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diacetilfluoresceína USP (C₂₄H₁₆O₇ ⇌ 416,39). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diámetro de Permeabilidad de Griseofulvina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diazepam USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diazóxido USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Diclofenaco Sódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diclorfenamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diclorhidrato de Decanoato de Flufenazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diclorhidrato de Enantato de Flufenazina USP
(C₂₉H₃₈F₃N₃O₂S · 2HCl ⇨ 622,63). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diclorhidrato de Histamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dicloxacilina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Didanosina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Didrogesterona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dienestrol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dietanolamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dietilestilbestrol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dietiltoluamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Difilina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Diflunisal USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Difumarato de Emedastina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Digital USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Digitoxina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Digoxina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dihidrocapsaicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER 17 α -Dihidroequilina USP (C₁₈H₂₂O₂ ⇨ 270,37). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dihidrotaquisterol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dihidroxiacetona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dimenhidrinato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dimetil Sulfóxido USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dinitrato de Isosorbida Diluido USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dinoprost Trometamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dioxibenzona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Dipiridamol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dipropionato de Alclometasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dipropionato de Beclometasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Dipropionato de Betametasona USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Dispersión Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER 2,4-Disulfamil-5-trifluorometilánilina USP (C₇H₈F₃N₃O₄S₂ ⇨ 319,29). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Disulfiram USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Disulfuro de Amifostina USP [tetraclorhidrato de *N,N*-(ditiodi-2,1 etandiil)bis 1,3-propandiamina] (C₁₀H₃₀N₄S₂Cl₄ ⇨ 412,32). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Disulfuro de Captopril USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Disulfuro de Penicilamina USP (C₁₀H₂₀N₂O₄S₂). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Docusato Cálcico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Docusato Potásico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Docusato Sódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Droperidol USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Drospirenona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Edetato Cálcico Disódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Edetato Disódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Enalaprilat USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Enantato de Testosterona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Endotoxina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Enflurano USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Epilactosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Equilina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ergocalciferol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ergosterol USP (C₂₈H₄₄O ⇨ 396,66). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ergotaminina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Eritromicina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Eritromicina B USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Eritromicina C USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Escopoletina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Escualano USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Espironolactona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estanozolol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estavudina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estearato de Eritromicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estearato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estearato de Polioxilo 40 USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estearil Fumarato de Sodio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estolato de Eritromicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estradiol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estriol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estrona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Estropipato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Éter Sevometílico USP [1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-metoxi-propano]. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etidronato Disódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etil Vainillina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etilcelulosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etilparabeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etilsuccinato de Eritromicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etinil Estradiol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etionamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etodolaco USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etopabato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Etopósido USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etosuximida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Etotoína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Extracto de Pino Marítimo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Extracto en Polvo de Cardo Mariano USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Extracto en Polvo de Cimicífuga Racemosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Extracto en Polvo de Eleuterococo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Extracto en Polvo de *Equinácea angustifolia* USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Extracto en Polvo de *Equinácea purpúrea* USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Extracto en Polvo de Ginseng Asiático USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Extracto en Polvo de Trébol Rojo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Famotidina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Felodipino USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenbendazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER L-Fenilalanina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenilbutazona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER 5-Fenilhidantoína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenilpropanodiol USP [1-fenil-1,2-propanodiol] (C₉H₁₂O₂ ◇ 152,19). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenitoína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenitoína Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenobarbital USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenopropeno Cálcico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenopropeno Sódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenoxietanol USP [2-fenoxietanol]. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fenpropionato de Nandrolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fensuximida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Finasterida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fitonadiona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Floxuridina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Flucitosina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fluconazol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fludesoxiglucosa USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Flumazenil USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Flunisolida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Flunixin Meglumínico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fluocinónida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fluoresceína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fluorometolona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fluorouracilo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fluoruro de Sodio USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fluoximesterona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Flurandrenolida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Flurbiprofeno USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Flurbiprofeno Sódico USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Flutamida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**

ER *o*-Flutamida USP [2-metil-*N*-[6-nitro-3-(trifluorometil)fenil]propanamida] (C₁₁H₁₁F₃N₂O₃ ◇ 276,22).
■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Formononetina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfato de Antazolina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfato de Clindamicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfato de Cloroquina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfato de Codeína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfato de Dexametasona USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Fosfato de Disopiramida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfato de Fludarabina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfato de Hidrocortisona Trietilamina USP ($C_{21}H_{31}O_8P \cdot C_6H_{15}N \diamond 543,64$). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfato de Primaquina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfato Sódico de Betametasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fosfenitoína Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Fosinopril Sódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fructosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ftalato de Dibutilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ftalato de Dietilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ftalato de Hipromelosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fumarato de Bisoprolol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fumarato de Clemastina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fumarato de Metoprolol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Fumarato de Tiamulina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Furazolidona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Furoato de Diloxanida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Furoato de Mometasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Furosemda USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Gabapentina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Gadodiamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Gadoversetamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Galactosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Galato de Propilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ganciclovir USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Gel de Hidróxido de Aluminio Desecado USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Gemfibrozilo USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Gitoxina USP (C₄₁H₆₄O₁₄ ⚡ 780,96). ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Gliburida USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Glicerina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Glicina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Glicopirrolato USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Glipizida USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Glucagón USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Gluceptato de Calcio USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Gluceptato de Eritromicina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Gluconato de Potasio USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Gluconato de Quinidina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER N₄-Glucósido de Sulfametoxazol USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER γ-Glutamil-(S)-Alil-L-Cisteína USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Glutamina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Gonadotropina Coriónica USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Gramicidina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Griseofulvina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Guaifenesina USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Guayacol USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Guayacolsulfonato de Potasio USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Halcinónida USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Haloperidol USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Halotano USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Hemisuccinato de Hidrocortisona USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Hemisuccinato de Metilprednisolona USP. ■_{1S} (USP30)***Cambio en la redacción:***ER Hemisuccinato de Prednisolona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Heparina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hetacilina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hexacetónido de Triamcinolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hexaclorofeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hexilenglicol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hexilresorcinol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hialuronidasa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hiclato de Doxiciclina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hidrato de Terpina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hidroclorotiazida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hidrocortisona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hidroflumetiazida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hidroquinona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hidroxipropil Celulosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hidroxiurea USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hipromelosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Hipurato de Metenamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER L-Histidina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Homopolímero de Polipropileno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Homosalato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ibuprofeno USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**

■ER Identidad de Azitromicina USP [Una mezcla de azitromicina, 3'-(N-N-dimetil-3'-N-formil-azitromicina, 3'-N-demetil-3'-N-formilazitromicina (Rotámero 1), 3'-N-demetil-3'-N-formilazitromicina (Rotámero 2), 3'-de(dimetilamino)-3'-oxoazitromicina, 2-desetil-2-propilazitromicina, 3-deoxiazitromicina y 3'-N-demetil-3'-N-[(4-metilfenil)sulfonyl]azitromicina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Idoxuridina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ifosfamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Imidazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Imidurea USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Iminodibencilo USP ($C_{14}H_{13}N \rightleftharpoons 195,28$). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Imipenem Monohidrato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**

ER Impurezas Relacionadas de Succinato de Sumatriptán USP [Mezcla de succinato de sumatriptán, sal de maleato de [3-[2-(metilamino)etil]-1*H*-indol-5-il]-*N*-metilmetansulfonamida, compuesto relacionado C de succinato de sumatriptán, [3-[2-(dimetilamino-*N*-óxido)etil]-1*H*-indol-5-il]-*N*-metilmetansulfonamida y [3-[2-(aminoetil)-1*H*-indol-5-il]-*N*-metilmetansulfonamida]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Inamrinona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Indapamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Indigotindisulfonato Sódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Indinavir USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Indinavir Aptitud del Sistema USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Indometacina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Insulina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Insulina (Bovina) USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Insulina Humana USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Insulina (Porcina) USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Iodipamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Iodixanol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Iodoquinol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Iohexol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Iopamidol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Iopodato de Sodio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Iopromida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ioxilán USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Irbesartán USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isobutilamida del Ácido 2*E*,4*E*-Hexadienoico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isoflurano USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER L-Isoleucina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isomalatión USP (C₁₀H₁₉O₆PS₂ ⇨ 330,37). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isómero Delta-3 de Cefaclor USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isómero Delta-3 de Ceftazidima USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isómeros Delta-3 de Cefuroxima Axetilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isómero E de Aztreonam USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isómero (E) de Cefprozilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isómero E de Ceftriaxona Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isómero L de Loracarbef USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isómero (Z) de Cefprozilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isómero Z de Clorhidrato de Triprolidina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isoniazida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isosorbida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isotretinoína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Isradipino USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ivermectina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Jengibre en Polvo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ketoconazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ketoprofeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ketorolaco Trometamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Lactasa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Lactato de Sodio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Lactobionato de Calcio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Lactobionato de Eritromicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Lactosa Anhidra USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Lactosa Monohidrato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Lactulosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Lamivudina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Lanolina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Lansoprazol USP ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ ⋄ 369,36). ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Laurato de Metilo USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Letrozol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER L-Leucina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Leucovorina Cálcica USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Levmetanfetamina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Levocarnitina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Levodopa USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Levonordefrina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Levotiroxina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Lidocaína USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Lindano USP. ■■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Linestrenol USP [(17 α)-19-Norpregn-4-en-20-in-17-ol] ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}$ ⋄ 284,42). ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Linoleato de Metilo USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Linolenato de Metilo USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Liotironina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Lipasa de Pancreatina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Lisinopril USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Loracarbef USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Loratadina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Lorazepam USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Lovastatina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Luteína USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Magaldrato USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Malatión USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Acepromazina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Azatadina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Bis(2-etilhexilo) USP (C₂₀H₃₆O₄ ⇨ 340,51). ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Bromfeniramina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Carbinoxamina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Clorfeniramina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Dexbromfeniramina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Dexclorfeniramina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Enalapril USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Ergonovina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Feniramina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Fluvoxamina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Metilergonovina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Metisergida USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Monoestearilo USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Pirilamina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Proclorperazina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Tietilperazina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maleato de Timolol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maltitol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maltosa USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Maltosa Monohidrato USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mandelato de Metenamina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mangafodipir Trisódico USP [dipiridoxal difosfato de manganeso(II)]. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Manitol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mazindol USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mebendazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mebrofenina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Meclofenamato Sódico USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mefobarbital USP. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Meloxicam USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Menadiona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mentol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Meprednisona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Meprobamato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mercaptopurina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Meropenem USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesalamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesilato de Benztropina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesilato de Bromocriptina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesilato de Deferoxamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesilato de Dihidroergotamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesilato de Dolasetrón USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesilato de Fenoldopam USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesilato de Fentolamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesilato de Pergolida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mesilatos de Ergoloides USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mestranol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metazolamida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metenamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Meticilina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Meticlotiazida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER 5-Metil-3-Isoxazolcarboxilato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metilbromuro de Homatropina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metildopa USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER 3-*O*-Metilmetildopa USP (C₁₁H₁₅NO₄ ⋄ 225,25). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metilparabeno USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metilprednisolona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metilsulfato de Neostigmina USP. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Metilsulfonilmetano USP [dimetil sulfona] (C₂H₆O₂S ⋄ 94,13). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metiltestosterona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metimazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER L-Metionina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metirapona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metirosina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metocarbamol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metohexital USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metolazona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metotrexato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metotrimeprazina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metoxaleno USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metoxiflurano USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metrifonato USP [triclorfón]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metronidazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Metsuximida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla de Aptitud del Sistema de Estavudina USP—Es una mezcla de estavudina y los siguientes compuestos relacionados: timidina, timina, alfa-estavudina y *xilo*-timidina. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla de Aptitud del Sistema de Mitoxantrona USP [clorhidrato de 8-amino-1,4-dihidroxi-5[[2-[(2-hidroxietil)amino]etil]amino]-9,10-antracendiona] (C₁₈H₁₉N₃O₅ · HCl ⋄ 393,83). ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Mezcla de Aptitud del Sistema de Risperidona USP—Contiene risperidona y aproximadamente 0,2% de cada uno de los siguientes:

Z-oxima-3-[2-[4-[(Z)-(2,4-difluorofenil)(hidroxiimino)metil]piperidina-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4*H*-pirido[1,2-*a*]pirimidin-4-ona;

9-hidroxisperidona-(6*RS*)-3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-il)piperidina-1-il]etil]-2,6-dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-4*H*-pirido[1,2-*a*]pirimidin-4-ona;

6-metilrisperidona-(6*RS*)-3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-il)piperidina-1-il]etil]-2,6-dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-4*H*-pirido[1,2-*a*]pirimidin-4-ona. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla de Compuesto Relacionado E de Paroxetina USP
[clorhidrato de paroxetina al que se le ha agregado una cantidad conocida de 1-metil-4-(*p*-fluorofenil)-1,2,3,6-tetrahidropiridina]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla de Resolución A de Lamivudina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla de Resolución B de Lamivudina USP. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**ER Mezcla de Resolución de Bisotrizol USP.** ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla de Resolución de Ciclosporina USP [Este material es una mezcla 100 : 1 de ciclosporina y ciclosporina U.] ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla de Resolución de Etopósido USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla de Resolución de Ondansetrón USP—Clorhidrato de ondansetrón con aproximadamente 0,4% p/p tanto del compuesto relacionado A de ondansetrón, como de 6,6'-metilen bis-[(1,2,3,9-tetrahidro-9-metil-3-[(2-metil-1*H*-imidazol-1-il)-metil]-4*H*-carbazol-4-ona)]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla de Resolución de Propionato de Fluticasona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezcla Racémica de Clorhidrato de Tiagabina USP
[clorhidrato del ácido (*S*)-(+), (*R*)-(-)-1-[4,4-bis(3-metil-2-tienil)-3-butenil]nipecótico] (C₂₀H₂₅NO₂S₂ · HCl ⇨ 412,0). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mezlocilina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Miconazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Milrinona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Minoxidil USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Miristato de Isopropilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Miristato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mirtazapina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mitomicina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mitotano USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Monobenzona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Monoetanolamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Monoglicéridos USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Monoglicéridos Diacetilados USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Monosulfato de Guanetidina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Mupirocina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Mupirocina de Litio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nabumetona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nadolol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nafato de Cefamandol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nafcilina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Naloxona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Naltrexona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nandrolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Naproxeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Naproxeno Sódico USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Napsilato de Propoxifeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Natamicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nevirapina Anhidra USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nevirapina Hemihidrato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Niacina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Niacinamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nifedipino USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nistatina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nitrato de Butoconazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nitrato de Econazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nitrato de Miconazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nitrato de Pilocarpina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nitrato de Sulconazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nitrofurantoína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nitrofurazona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nitroglicerina Diluida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Nitroprusiato de Sodio USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Nizatidina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Nonoxinol 9 USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Nordazepam USP [7-cloro-1,3-dihidro-5-fenil-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-ona] (C₁₅H₁₁ClN₂O ⇄ 270,72). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Noretindrona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Noretinodrel USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Norfloxacin USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Norgestimato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Norgestrel USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Noscapina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Novobiocina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Octasulfato Potásico de Sacarosa USP [NOTA—El nombre Sucrosofato Potásico es USAN] [sal octapotásica de tetrakis (sulfato ácido) de 1,3,4,6-tetra-*O*-sulfo-β-D-fructofuranosil-α-D-glucopiranosido, heptahidrato] (C₁₂H₁₄K₈O₃₅S₈ · 7H₂O ⇄ 1413,64 ⇄ CAS-76578-81-9). (C₁₂H₁₄K₈O₃₅S₈ ⇄ anhidro 1287,53 ⇄ CAS-73264-44-5). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Octildodecanol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Octinoxato USP [metoxicinamato de octilo]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Octisalato USP [salicilato de octilo]. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Octocrileno USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Octoxinol 9 USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Ofloxacin USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oleato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Omeprazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxacilina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxandrolona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxaprozina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxazepam USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxfendazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxibenzona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxicodona USP. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER N-Óxido de Azitromicina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER N-Óxido de Codeína USP ($C_{18}H_{21}NO_4 \rightleftharpoons 315,37$). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Óxido de Polietileno USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oximetolona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oximorfona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxitetraciclina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxitocina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Oxtrifilina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Paclitaxel USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Padimato O USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Palmitato de Cetilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Palmitato de Cloranfenicol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Palmitato de Cloranfenicol No Polimorfo A USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Palmitato de Cloranfenicol Polimorfo A USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Palmitato de Isopropilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Palmitato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Palmitoleato de Metilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Pamoato de Hidroxizina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Pamoato de Pirantel USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Pamoato de Pirvinio USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Pantenol Racémico USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Pantolactona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Pantotenato de Calcio USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Papaína USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Parbendazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Partenolida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Penicilamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Penicilina G Benzatínica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Penicilina G Potásica USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Penicilina G Procaínica USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Penicilina G Sódica USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Penicilina V USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Penicilina V Potásica USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pentazocina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pentobarbital USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pentoxifilina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Perfenazina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Perflubron USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Picolinato de Cromo USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pilocarpina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pimozida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pindolol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Piperacilina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pirazinamida USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pirimetamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Piroxicam USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pituitaria Posterior USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pivalato de Clorcortolona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pivalato de Desoxicorticosterona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Pivalato de Flumetasona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Plicamicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Polacrilina Potásica USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Polidimetilsiloxano USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Polietileno de Alta Densidad USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Polietileno de Baja Densidad USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Polioxilglicéridos de Caprilcaproilo USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Polioxilglicéridos de Estearoilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Polioxilglicéridos de Lauroilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Polioxilglicéridos de Linoleoilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Polioxilglicéridos de Oleoilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Poloxaleno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Prazicuantel USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Prednicarbato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Prednisolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Prednisona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Primidona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Probenecid USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Probucoil USP. ■_{1S} (USP30)**Eliminar lo siguiente:**■ER Producto de Reacción de Metildopa-Glucosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Progesterona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER L-Prolina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Propilenglicol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Propilparabeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Propiltiouracilo USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Propionato de Clobetasol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Propionato de Sodio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Propionato de Testosterona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Propofol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Prostaglandina A₁ USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Prostaglandina B₁ USP (C₂₀H₃₂O₄ ⚡ 336,47). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Punto de Fusión de Acetanilida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Punto de Fusión de Cafeína USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Punto de Fusión de Fenacetina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Punto de Fusión de Sulfanilamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Punto de Fusión de Sulfapiridina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Punto de Fusión de Vainillina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Quazepam USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Quercetina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Quimotripsina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Quininona USP (C₂₀H₂₂N₂O₂ ⇨ 322,40). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ramipril USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Rauwolfia Serpentina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Recuento de Partículas USP (2 blancos y 2 suspensiones). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Repaglinida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Reserpina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Resina de Colestiramina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Resina Polacrilex USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Resorcinol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ribavirina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Riboflavina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Riboflavina Fosfatada USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Rifabutina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Rifampín USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Rifampín Quinona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Rimexolona USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER Risperidona USP [3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-il)piperidino]etil]-6,7,8,9-tetrahidro-2-metil-4*H*-pirido[1,2-*a*]pirimidin-4-ona] (410,48 ⇨ CAS-106266-06-2). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Roxarsona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Rutina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sacarato de Calcio USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Sacarina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sacarina Cálcica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sacarina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sacarosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sal 1,2-Difeniletilamínica del Ácido 3-Mercapto-2-metilpropanoico USP ($C_4H_7O_2S \cdot C_{14}H_{16}N$ ◇ 317,45). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sal de Amonio de Cilastatina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sales Biliares USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Salicilamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Salicilato de Fisostigmina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Salicilato de Magnesio USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Salsalato USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Secobarbital USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Senósidos USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER L-Serina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sevoflurano USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Silibina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Silidianina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Simeticona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Simvastatina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER β -Sitosterol USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**▲ER Solución de Calcitrol USP. ■_{1S} (USP30)▲USP30**Cambio en la redacción:**ER Solución de Isómero Eritro de Clorhidrato de Metilfenidato USP—Esta solución contiene 0,5 mg de isómero eritro de clorhidrato de metilfenidato por mL en metanol. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Somatropina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER 1,4-Sorbitán USP ($C_6H_{12}O_5$ ◇ 164,16). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sorbitol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Subsalicilato de Bismuto USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Succinato Ácido de Alfa Tocoferilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Succinato de Doxilamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Succinato de Loxapina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Succinato de Metoprolol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Succinato de Sumatriptán USP [butandioato de 3-[2-(dimetilamino)etil]-*N*-metil-, 1*H*-indol-5-metansulfonamida (1 : 1)] (C₁₄H₂₁N₃O₂S · C₄H₆O₄ ⇨ 413,49). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sucralosa USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulbactam USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfabenzamida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfacetamida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfacetamida Sódica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfaclopiridazina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfadiazina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfadiazina de Plata USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfadimetoxina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfadoxina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfamerazina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfametazina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfametizol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfametoxazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfanilamida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfapiridina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfasalazina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfatiazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfato de Albuterol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfato de Aminopentamida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfato de Atropina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Sulfato de Bleomicina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Sulfato de Capreomicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Codeína USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Colistina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Dextroanfetamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Dihidroestreptomicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Efedrina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Estreptomicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Fenelzina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Gentamicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Guanadrel USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Hidroxicloroquina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Hiosciamina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Kanamicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Metaproterenol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Morfina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Neomicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Netilmicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Oxiquinolona USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Paromomicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Penbutolol USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Polimixina B USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Pseudoefedrina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Quinidina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Quinina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Sisomicina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Terbutalina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Vinblastina USP. ■■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfato de Vincristina USP. ■■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Sulfinpirazona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfisoxazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfosalicilato de Meclociclina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfóxido de Perfenazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulfóxido de Pergolida USP [(8β)-8-[(metilsulfinil)metil]-6-propil-D-ergolina]. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sulindaco USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Sumatriptán USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Suprofeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tabletas de Ácido Salicílico USP (Calibrador de Disolución, No desintegrables). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tabletas de Liberación Prolongada de Clorfeniramina USP (Calibrador para la Liberación de Fármacos, Unidad Simple). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tabletas de Prednisona USP (Calibrador de Disolución, Desintegrable). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tagatosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Talidomida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tartrato de Butorfanol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tartrato de Ergotamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tartrato de Fendimetrazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tartrato de Levorfanol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tartrato de Metoprolol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tartrato de Morantel USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tartrato de Tilosina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tartrato de Trimeprazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tartrato de Vinorelbina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Taurina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tebutato de Prednisolona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Temazepam USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Teofilina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Terconazol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Tereftalato de Polietileno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tereftalato G de Polietileno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Testolactona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Testosterona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Δ^8 -Tetrahidrocannabinol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Δ^9 -Tetrahidrocannabinol USP. ■_{1S} (USP30)**Agregar lo siguiente:**■ER *exo*-Tetrahidrocannabinol USP [(6aR, 10aR)-6,6-dimetil-9-metileno-3-pentil-6a,7,8,9,10,10a-hexahidro-6H-benzo[c]cromen-1-ol] (C₂₁H₃₀O₂ ⋄ 314,46). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tiabendazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ticarcilina Monosódica Monohidrato USP (C₁₅H₁₅N₂NaO₆S₂ · H₂O ⋄ 424,43). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tilmicosina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tiloxapol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Timerosal USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tinidazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tioconazol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tioguanina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tiopental USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tioridazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tioestreptón USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tiotepa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tiotixeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER (E)-Tiotixeno USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER L-Tirosina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tobramicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tolazamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tolbutamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tolcapona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tolmetina Sódica USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Tolnaftato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER *o*-Toluenosulfonamida USP (C₇H₉NO₂S ⇨ 171,22).
■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER *p*-Toluenosulfonamida USP (C₇H₉NO₂S ⇨ 171,22).
■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Topiramato USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Torsemida USP (Forma 1). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Tosil Pleuromutilina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Tosilato de Bretilio USP. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ER Tosilato Disulfato de Ademetonina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Transplatino USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Trenbolona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER L-Treonina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Tretinoína USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Triacetina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Triamcinolona USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Triamtereno USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Triazolam USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Triclorometiazida USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Tricloroaminoplatinato de Potasio USP (Cl₃H₃KNPt ⇨ 357,58). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Triclosán USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Trietioduro de Galamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Trifluridina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Trimetoprima USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Trioxaleno USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Tripsina Cristalizada USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER L-Triptófano USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

ER Trolamina USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Troleandomicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Trometamina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Tropicamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ubidecarenona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ubidecarenona para Aptitud del Sistema USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Uracilo Arabinósido USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Urea USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Urea C 13 USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Ursodiol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Vainillina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Valerato de Betametasona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Valerato de Estradiol USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Valerato de Hidrocortisona USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER L-Valina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Valrubicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**▲ER Valsartán USP. ■_{1S} (USP30)▲USP30**Agregar lo siguiente:**■ER Vancomicina B con Monodeclorovancomicina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Verde de Indocianina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Verteporfina USP (C₄₁H₄₂N₄O₈ ⚡ 718,79). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Vidarabina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Violeta de Genciana USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Vitamina A USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Vitexina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Warfarina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Xantona USP (C₁₃H₈O₂ ⚡ 196,21). ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Xilazina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Xilitol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:ER Xilosa USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Yoduro de Isopropamida USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Zalcitabina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Zidovudina USP. ■_{1S} (USP30)**Cambio en la redacción:**ER Zileutón USP. ■_{1S} (USP30)

Pruebas y Valoraciones Químicas

OTRAS PRUEBAS Y VALORACIONES

{311} VALORACIÓN DE ALGINATOS

Cambio en la redacción:**APTITUD DEL SISTEMA**

Empleando D-glucuronolactona como el estándar, proceder como se indica en el *Procedimiento*, pero no realizar los pasos previos a la ebullición. El sistema es adecuado si se cumplen los siguientes criterios: (1) la determinación con un blanco da como resultado un valor neto de volumetría, C , de entre 0,02 y 0,06 mEq. ■_{1S} (USP30) calculado de la siguiente manera:

$$A_b - B_b$$

en donde A_b es el número de mEq de hidróxido de sodio 0,25 N en los 25 mL utilizados y B_b es el número de mEq de ácido clorhídrico 0,1 N utilizado en la volumetría con un blanco; y (2) el porcentaje de dióxido de carbono, CO_2 , obtenido a partir del estándar está entre ■24,2% y 25,7%. ■_{1S} (USP30)

Pruebas y Determinaciones Físicas

{611} DETERMINACIÓN DE ALCOHOL

Cambio en la redacción:

MÉTODO II—MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ■_{1S} (USP30)

■Usar el *Método IIa* cuando el *Método II* ■_{1S} (USP30) se especifica en la monografía individual. Para obtener un análisis de los principios en los que se basa, ver *Cromatografía de Gases en Cromatografía* {621}.

Estándares de referencia USP—ER Determinación de Alcohol—Acetonitrilo USP. ER Determinación de Alcohol—Alcohol USP.

■Método IIa ■_{1S} (USP30)

Aparato—En condiciones típicas, usar un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización a la llama y una columna de vidrio de 4 mm × 1,8 m rellena con soporte S3 de malla 100 a 120, usando nitrógeno o helio como gas transportador. Antes de usar, acondicionar la columna durante la noche a 235° con un flujo lento de gas transportador. Mantener la temperatura de la columna a 120° y la temperatura del inyector y el detector a 210°. Ajustar el flujo del gas transportador y la temperatura de modo que el acetonitrilo, el estándar interno, eluya entre 5 y 10 minutos.

Soluciones—

Preparación Madre de Prueba—Diluir la muestra en análisis en diluciones sucesivas con agua para obtener una solución que contenga aproximadamente 2% (v/v) de alcohol.

Preparación de Prueba—Pipetear 5 mL de la *Preparación Madre de Prueba* y de ER Determinación de Alcohol—Acetonitrilo USP [NOTA—Alternativamente, se puede usar una solución acuosa de acetonitrilo al 2% de calidad adecuada como solución de estándar interno], transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Preparación Estándar—Pipetear 5 mL de ER Determinación de Alcohol—Alcohol USP y de ER Determinación de Alcohol—Acetonitrilo USP [NOTA—Alternativamente, se puede usar una solución acuosa de acetonitrilo al 2% de calidad adecuada como solución de estándar interno], transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Inyectar por duplicado en el cromatógrafo de gases aproximadamente 5 µL de la *Preparación de Prueba* y de la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y determinar los cocientes entre las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de alcohol (v/v) en la muestra en análisis, por la fórmula:

$$CD(R_U/R_S)$$

en donde C es la concentración declarada de ER Determinación de Alcohol—Alcohol USP; D es el factor de dilución (cociente entre el volumen de la *Preparación Madre de Prueba* y el volumen de muestra tomado); y R_U y R_S son los cocientes de respuesta entre los

picos obtenidos a partir de la *Preparación de Prueba* y de la *Preparación Estándar*, respectivamente.

Prueba de Aptitud del Sistema—En un cromatograma adecuado, el factor de resolución, R , no es menor de 2; el factor de asimetría del pico de alcohol no es mayor de 2,0; y seis inyecciones repetidas de la *Preparación Estándar* presentan una desviación estándar relativa de no más de 2,0% en el cociente entre los picos de alcohol y del estándar interno.

■ Método IIb

Aparato—Equipar un cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama y una columna capilar de 0,53 mm × 30 m recubierta con una película de 3,0 μm de fase G43. Usar helio como gas transportador a una velocidad de flujo de 34,0 cm por segundo y una relación de partición de 5 : 1. Programar el cromatógrafo para mantener la temperatura de la columna a 50° durante 5 minutos, luego aumentar la temperatura a una velocidad de 10° por minuto hasta 200°, y mantener a esa temperatura durante 4 minutos. Mantener la temperatura del inyector a 210° y la del detector a 280°.

Soluciones—

Preparación Madre de Prueba—Diluir la muestra en análisis en diluciones sucesivas con agua para obtener una solución que contenga aproximadamente 2% (v/v) de alcohol.

Preparación de Prueba—Pipetear 5 mL de la *Preparación Madre de Prueba* y de ER Determinación de Alcohol—Acetonitrilo USP [NOTE—Alternativamente, se puede usar una solución acuosa de acetonitrilo al 2% de calidad adecuada como solución de estándar interno], y transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Preparación Estándar—Pipetear 5 mL de ER Determinación de Alcohol—Alcohol USP y de ER Determinación de Alcohol—Acetonitrilo USP [NOTE—Alternativamente, se puede usar una solución acuosa de acetonitrilo al 2% de calidad adecuada como solución de estándar interno], y transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Inyectar por duplicado en el cromatógrafo de gases aproximadamente de 0,2 a 0,5 μL de la *Preparación de Prueba* y de la *Preparación Estándar*; registrar los cromatogramas y determinar los cocientes de respuesta de los picos. Calcular el porcentaje de alcohol (v/v) en la muestra en análisis, por la fórmula:

$$CD(R_U/R_S)$$

en donde C es la concentración declarada de ER Determinación de Alcohol—Alcohol USP; D es el factor de dilución (cociente entre el volumen de la *Preparación Madre de Prueba* y el volumen de muestra tomado); y R_U y R_S son los cocientes de respuesta entre los picos obtenidos a partir de la *Preparación de Prueba* y de la *Preparación Estándar*, respectivamente.

Prueba de Aptitud del Sistema—En un cromatograma adecuado, el factor de resolución, R , entre alcohol y el estándar interno no es menor de 4; el factor de asimetría del pico de alcohol no es mayor de 2,0; y seis inyecciones repetidas de la *Preparación Estándar* presentan una desviación estándar de no más de 4,0% en el cociente entre los picos de alcohol y del estándar interno. ■^{1S} (USP30)

<621> CROMATOGRAFÍA

Cambio en la redacción:

REACTIVOS CROMATOGRÁFICOS

La siguiente lista de rellenos (L), fases (G) y soportes (S) pretende ser una referencia útil para el técnico en cromatografía. [NOTA—Los tamaños de partícula que se proporcionan en esta lista son los que se pueden obtener generalmente. Cuando se requiera otro tamaño, normalmente más fino, la monografía individual especifica el tamaño de partícula deseado. Dentro de cualquier categoría de materiales de relleno o de fases que se enumeran a continuación, puede existir una amplia variedad de columnas disponibles. Cuando es necesario definir más específicamente las condiciones cromatográficas, la monografía individual así lo indica.]

Rellenos

L1—Octadecilsilano unido químicamente a micropartículas de sílice o cerámica porosas, de ■^{1,5}■^{1S} (USP30) μm a 10 μm de diámetro, o una varilla sílice monolítica.

L2—Octadecilsilano unido químicamente a gel de sílice de una porosidad de superficie controlada, que se ha unido a un núcleo esférico sólido, de 30 μm a 50 μm de diámetro.

L3—Partículas de sílice porosas de 5 μm a 10 μm de diámetro.

L4—Gel de sílice de una porosidad de superficie controlada que se ha unido a un núcleo esférico sólido, de 30 μm a 50 μm de diámetro.

L5—Alúmina de una porosidad de superficie controlada que se ha unido a un núcleo esférico sólido, de 30 μm a 50 μm de diámetro.

L6—Relleno de intercambio catiónico fuerte—polímero de fluorocarbono sulfonado recubierto sobre un núcleo esférico sólido, de 30 μm a 50 μm de diámetro.

L7—Octilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de ■^{1,5}■^{1S} (USP30) μm a 10 μm de diámetro.

L8—Capa esencialmente monomolecular de aminopropilsilano unida químicamente a un soporte de gel de sílice totalmente poroso, de 3 μm a 10 μm de diámetro.

L9—Gel de sílice totalmente poroso, irregular o esférico, unido químicamente a un recubrimiento de intercambio catiónico fuertemente ácido, de 3 μm a 10 μm de diámetro.

L10—Grupos nitrilo unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 3 μm a 10 μm de diámetro.

L11—Grupos fenilo unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de ■^{1,5}■^{1S} (USP30) μm a 10 μm de diámetro.

L12—Relleno de intercambio aniónico fuerte obtenido uniendo químicamente un grupo amino cuaternario a un núcleo esférico de sílice sólido, de 30 μm a 50 μm de diámetro.

L13—Trimetilsilano unido químicamente a partículas de sílice porosas, de 3 μm a 10 μm de diámetro.

L14—Gel de sílice unido químicamente a un recubrimiento de intercambio aniónico de amonio cuaternario fuertemente básico, de 5 μm a 10 μm de diámetro.

L15—Hexilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 μm a 10 μm de diámetro.

L16—Dimetilsilano unido químicamente a partículas de sílice porosas, de 5 μm a 10 μm de diámetro.

L17—Resina de intercambio catiónico fuerte que consta de un copolímero sulfonado entrecruzado de estireno-divinilbenceno, en forma de hidrógeno, de 7 μm a 11 μm de diámetro.

L18—Grupos amino y ciano unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 3 μm a 10 μm de diámetro.

L19—Resina de intercambio catiónico fuerte que consta de un copolímero sulfonado entrecruzado de estireno-divinilbenceno, en la forma cálcica, de aproximadamente 9 μm de diámetro.

L20—Grupos dihidroxipropano unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 5 μm a 10 μm de diámetro.

L21—Un copolímero rígido, esférico de estireno-divinilbenceno, de 5 µm a 10 µm de diámetro.

L22—Resina de intercambio catiónico constituida por gel de poliestireno poroso con grupos ácidos sulfónicos, de un tamaño aproximado de 10 µm.

L23—Resina de intercambio aniónico constituida por gel de poliácido o polimetacrilato poroso con grupos de amonio cuaternario, de un tamaño aproximado de 10 µm.

L24—Gel hidrófilo semirrígido que consta de polímeros de vinilo con numerosos grupos hidroxilo sobre la superficie de la matriz, de 32 µm a 63 µm de diámetro.

[NOTA—Está disponible como YMC-Pack PVA-SIL, fabricado por YMC Co., Ltd. y lo distribuye Waters Corp. (www.waters.com).]

L25—Relleno con capacidad para separar compuestos en un intervalo de peso molecular de 100 a 5000 (determinado con óxido de polietileno), aplicable a polímeros hidrosolubles neutros, aniónicos y catiónicos. Se determinó que una base de resina de polimetacrilato, entrecruzada con éter polihidroxilado (la superficie contiene algunos grupos funcionales carboxilo residuales) es adecuada.

L26—Butilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 µm a 10 µm de diámetro.

L27—Partículas de sílice porosas, de 30 µm a 50 µm de diámetro.

L28—Un soporte multifuncional, que consiste en un sustrato de sílice esférico de alta pureza, de 100 Å, unido a un intercambiador aniónico, con funcionalidad amina, además de una funcionalidad en fase reversa convencional de C8.

L29—Gamma alúmina de fase reversa con bajo porcentaje, en peso, de carbono y partículas esféricas de polibutadieno con base de alúmina, de 5 µm de diámetro con un volumen de poro de 80 Å.

L30—Etilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 µm a 10 µm de diámetro.

L31—Resina de intercambio aniónico fuerte, hidróxido-selectivo, unida por amina cuaternaria a partículas de látex ligadas a un núcleo de partículas macroporosas de 8,5 µm con un tamaño de poro de 2000 Å y constituidas de etilvinilbenceno entrecruzado con 55% de divinilbenceno.

L32—Relleno de intercambio con ligando quiral-complejo de L-prolina y cobre unido covalentemente a partículas de sílice irregulares, de 5 µm a 10 µm de diámetro.

L33—Relleno con capacidad para separar dextranos de un tamaño molecular en un intervalo de entre 4000 y 500 000 Da. Es esférico con base de sílice y tiene un procesamiento que le proporciona estabilidad frente al pH.

[NOTA—Está disponible como TSKgel G4000 SWXL que se puede obtener de Tosoh Biosep (www.tosohbiosep.com).]

L34—Resina de intercambio catiónico fuerte que consiste de un copolímero sulfonado entrecruzado de estireno-divinilbenceno en la forma de plomo, de aproximadamente 9 µm de diámetro.

L35—Relleno de sílice esférica estabilizada con zirconio con una fase unida que consta de una monocapa molecular hidrófila (tipo diol), con un tamaño de poro de 150 Å.

L36—Derivado 3,5-dinitrobenzoilo de L-fenilglicina unido covalentemente a sílice aminopropilica de 5 µm.

L37—Relleno con capacidad para separar proteínas por tamaño molecular en un intervalo de entre 2000 y 40 000 Da. Es un gel de polimetacrilato.

L38—Relleno para exclusión por tamaño a base de metacrilato para muestras hidrosolubles.

L39—Gel de polihidroximetacrilato hidrófilo de resina esférica totalmente porosa.

L40—Partículas de sílice porosas cubiertas con tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulosa, de 5 µm a 20 µm de diámetro.

L41—Glicoproteína α₁-ácida inmovilizada sobre partículas esféricas de sílice, de 5 µm de diámetro.

L42—Grupos octilsilano y octadecilsilano unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 5 µm de diámetro.

L43—Grupos pentafluorofenilo unidos químicamente a partículas de sílice mediante un espaciador propilo, de 5 µm a 10 µm de diámetro.

L44—Soporte multifuncional, que consiste en un sustrato de sílice esférico de alta pureza, 60 Å, unido a un intercambiador catiónico, con funcionalidad sulfónica ácida, además de una funcionalidad en fase reversa convencional de C8.

L45—Beta ciclodextrina unida a partículas de sílice porosas, de 5 µm a 10 µm de diámetro.

L46—Sustrato de poliestireno y divinilbenceno aglomerado con perlas de látex con funcionalidad de aminas cuaternarias, de aproximadamente 10 µm de diámetro.

L47—Sustrato microporoso de intercambio aniónico de alta capacidad, totalmente funcionalizado con grupos trimetilamino, de 8 µm de diámetro.

[NOTA—Está disponible como CarboPac MA1 y lo distribuye Dionex Corp. (www.dionex.com).]

L48—Poliestireno entrecruzado sulfonado, con una capa exterior de micropérlas de intercambio aniónico porosas submicrométricas, de 15 µm de diámetro.

L49—Relleno en fase reversa obtenido por recubrimiento con una capa fina de polibutadieno sobre partículas porosas esféricas de zirconio, de 3 µm a 10 µm de diámetro.

[NOTA—Está disponible como Zirchrom PBD, fabricado por ZirChrom Separations, Inc. y lo distribuye Alltech, www.Alltechweb.com.]

L50—Resina multifuncional, con retención en fase reversa y funcionalidades de intercambio de aniones fuerte. La resina consta de etilvinilbenceno, entrecruzado al 55% con copolímero de divinilbenceno, de 3 µm a 15 µm de diámetro, y una superficie de no menos de 350 m² por g. El sustrato está recubierto de partículas de látex con funcionalidad de amonio cuaternario que constan de estireno entrecruzado con divinilbenceno.

[NOTA—Está disponible como OmniPac PAX-500 y lo distribuye Dionex Corp. (www.dionex.com).]

L51—Partículas de sílice esféricas, porosas, recubiertas con amilosa tris-3,5-dimetilfenilcarbamato, de 5 µm a 10 µm de diámetro.

[NOTA—Está disponible como Chiralpak AD que se puede obtener de Chiral Technologies, Inc., (www.chiralttech.com).]

L52—Resina de intercambio catiónico fuerte de sílice porosa con grupos sulfopropilo, de 5 µm a 10 µm de diámetro.

[NOTA—Está disponible como TSK IC SW Cation que se puede obtener de Tosoh Biosep (www.tosohbiosep.com).]

L53—Resina de intercambio catiónico débil que consta de etilvinilbenceno, entrecruzado al 55% con copolímero de divinilbenceno, de 3 µm a 15 µm de diámetro. El sustrato está injertado en la superficie con ácido carboxílico y/o monómeros funcionalizados de ácido fosfórico. La capacidad es de no menos de 500 µEq/columna.

[NOTA—Está disponible como IonPac CS14 lo distribuye Dionex Corp. (www.dionex.com).]

L54—Medio de exclusión por tamaño constituido por dextrano unido covalentemente a perlas de agarosa porosa altamente entrecruzada, de aproximadamente 13 µm de diámetro.

[NOTA—Está disponible como Superdex Peptide HR 10/30 que se puede obtener de Amersham Pharmacia Biotech (www.amershambiosciences.com).]

L55—Resina de intercambio catiónico fuerte hecha de sílice porosa recubierta con copolímero de polibutadieno-ácido maleico, de aproximadamente 5 µm de diámetro.

[NOTA—Está disponible como IC-Pak C M/D que se puede obtener de Waters Corp. (www.waters.com).]

L56—Propilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 µm a 10 µm de diámetro.

[NOTA—Está disponible como Zorbax SB-C3 que se puede obtener de Agilent Technologies. (www.agilent.com/chem).]

L57—Proteína de reconocimiento quiral, ovomucoide, unida químicamente a partículas de sílice, de aproximadamente 5 µm de diámetro, con un tamaño de poro de 120 Å.

[NOTA—Está disponible como Ultron ES-OVM que se puede obtener de Agilent Technologies (www.agilent.com/chem).]

L58—Resina de intercambio catiónico fuerte, que consiste de copolímero sulfonado entrecruzado de estireno-divinilbenceno en la forma sódica, de aproximadamente 7 µm a 11 µm de diámetro.

[NOTA—Está disponible como Aminex HPX-87N que se puede obtener de Bio-Rad Laboratories, (N° 125-0143 del catálogo 2000/01) www.bio-rad.com.]

L59—Relleno con capacidad para separar proteínas por peso molecular en un intervalo de entre 10 y 500 kDa. Es esférico (10 µm), con base de sílice y tiene un procesamiento que le proporciona características hidrófilas y estabilidad de pH.

[NOTA—Está disponible como TSKgel G3000SW Column (columna analítica) y como TSKgel Guard (guarda columna) que se pueden obtener de Tosoh Biosep (número de pieza 05789 y 05371, respectivamente) (www.tosohbiosep.com).]

L60—Gel de sílice poroso, esférico, de $\leq 10 \mu\text{m}$ o menos μm (USP30) de diámetro, cuya superficie se ha modificado covalentemente con grupos $\text{N}^+\text{alquil amida}$ μm (USP30) y se ha recubierto exhaustivamente.

[NOTA—Está disponible como Supelcosil ABZ que se puede obtener de Supelco (www.sigmaaldrich.com/supelco).]

L61—Resina de intercambio aniónico fuerte hidróxido-selectiva compuesta de un núcleo altamente entrecruzado de partículas microporosas de $13 \mu\text{m}$ con un tamaño de poro de menos de 10 \AA y que consiste en etilvinilbenceno entrecruzado con divinilbenceno al 55%, con un recubrimiento de látex compuesto de micropelotas de 85 nm de diámetro unidas con iones alcánol amonio cuaternario (6%).

[NOTA—Está disponible como Ion Pac AS 11 y como AG 11 que se pueden obtener de Dionex (www.dionex.com).]

L62—Fase de silano C30 unida a sílice esférica, totalmente porosa, de $3 \mu\text{m}$ a $15 \mu\text{m}$ de diámetro.

Fases

G1—Aceite de dimetilpolisiloxano.

G2—Goma de dimetilpolisiloxano.

G3—50% de fenilpolisiloxano y 50% de metilpolisiloxano.

G4—Poliéster de succinato de dietilenglicol.

G5—3-Cianopropilpolisiloxano.

G6—Trifluoropropilmetilpolisiloxano.

G7—50% de 3-cianopropilsilicona y 50% de fenilmetilsilicona.

G8—80% de bis(3-cianopropil)polisiloxano y 20% de 3-ciano-propilfenilpolisiloxano (los porcentajes hacen referencia a la sustitución molar).

G9—Metilvinilpolisiloxano.

G10—Poliamida formada por reacción de un ácido dicarboxílico de C_6 con 1,3-di-4-piperidilpropano y piperidina en una relación molar de 1,00 : 0,90 : 0,20.

G11—Poliéster de sebacato de bis(2-etilhexilo).

G12—Poliéster de succinato de fenildietanolamina.

G13—Sorbitol.

G14—Polietilenglicol (peso molecular promedio de 950 a 1050).

G15—Polietilenglicol (peso molecular promedio de 3000 a 3700).

G16—Compuesto de polietilenglicol (peso molecular promedio de aproximadamente 15 000). Un compuesto de polietilenglicol de alto peso molecular con un enlazador diepóxido.

[NOTA—Está disponible comercialmente como Polyethylene Glycol Compound 20M, o como Carbowax 20M, que se pueden obtener de proveedores de reactivos para cromatografía.]

G17—75% de fenilpolisiloxano y 25% de metilpolisiloxano.

G18—Polialquilenglicol.

G19—25% de fenilsilicona, 25% de cianopropilsilicona y 50% de metilsilicona.

G20—Polietilenglicol (peso molecular promedio de 380 a 420).

G21—Succinato de neopentilglicol.

G22—Ftalato de bis(2-etilhexilo).

G23—Adipato de polietilenglicol.

G24—Ftalato de diisodécilo.

G25—Compuesto de polietilenglicol y ácido tereftálico (TPA, por sus siglas en inglés). Un compuesto de alto peso molecular de un polietilenglicol y un diepóxido que se esterifica con ácido tereftálico.

[NOTA—Está disponible comercialmente como Carbowax 20M-TPA que se puede obtener de proveedores de reactivos para cromatografía.]

G26—25% de 2-cianoetilpolisiloxano y 75% de metilpolisiloxano.

G27—5% de fenilpolisiloxano y 95% de metilpolisiloxano.

G28—25% de fenilpolisiloxano y 75% de metilpolisiloxano.

G29—3,3'-Tiodipropionitrilo.

G30—Tetraetilenglicol dimetil éter.

G31—Nonilfenoxipoli(etilenoxi)etanol (la longitud promedio de la cadena etilenoxi es 30); Nonoxinol 30.

G32—20% de fenilmetilpolisiloxano y 80% de dimetilpolisiloxano.

G33—20% de carboranosilicona y 80% de metilsilicona.

G34—Poliéster de succinato de dietilenglicol estabilizado con ácido fosfórico.

G35—Compuesto de alto peso molecular de un polietilenglicol y un diepóxido que se esterifica con ácido nitrotereftálico.

G36—1% de vinilpolisiloxano y 5% de fenilmetilpolisiloxano.

G37—Poliimida.

G38—Fase G1 que contiene un pequeño porcentaje de inhibidor de asimetría.

[NOTA—Un grado adecuado está disponible comercialmente como “SP2100/0.1% Carbowax 1500” que se puede obtener de Supelco, Inc., (www.sigmaaldrich.com/supelco).]

G39—Polietilenglicol (peso molecular promedio aproximadamente 1500).

G40—Adipato de etilenglicol.

G41—Fenilmetildimetilsilicona (sustituida al 10% por fenilo).

G42—35% de fenilpolisiloxano y 65% de dimetilpolisiloxano (los porcentajes hacen referencia a la sustitución molar).

G43—6% de cianopropilfenilpolisiloxano y 94% de dimetilpolisiloxano (los porcentajes hacen referencia a la sustitución molar).

G44—2% de grasa de hidrocarburos de vaselina de bajo peso molecular y 1% de solución de hidróxido de potasio.

G45—Divinilbenceno-etilenglicol-dimetilacrilato.

G46—14% de cianopropilfenilpolisiloxano y 86% de metilpolisiloxano.

G47—Polietilenglicol (peso molecular promedio aproximadamente 8000).

G48—Cianopolisiloxano altamente polar y parcialmente entrecruzado.

Soportes

NOTA—A menos que se especifique algo diferente, se indican tamaños de malla de 80 a 100 o alternativamente de 100 a 120.

S1A—Tierra silícea para cromatografía de gases que ha sido fundida-calcinada mezclando diatomita con flujo de Na_2CO_3 y calcinada a una temperatura superior a 900° . La tierra silícea se lava con ácido, luego se lava con agua hasta lograr la neutralidad, pero no se lava con bases. La tierra silícea puede ser silanizada al tratarla con un agente como dimetildiclorosilano [NOTA—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se indica un soporte silanizado.] para enmascarar los grupos silanoles superficiales.

S1AB—Tierra silícea conforme a la descripción anterior pero lavada con ácido y base. [NOTA—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se indica un soporte silanizado.]

S1C—Soporte preparado con ladrillo refractario molido y calcinado o quemado con arcilla como aglutinante, a una temperatura por encima de los 900° y lavado posteriormente con ácido. Puede estar silanizado.

S1NS—Tierra silícea no tratada.

S2—Copolímero de estireno-divinilbenceno con un área nominal de menos de 50 m^2 por g y un diámetro de poro promedio de $0,3 \mu\text{m}$ a $0,4 \mu\text{m}$.

S3—Copolímero de etilvinilbenceno y divinilbenceno con un área nominal de 500 m^2 a 600 m^2 por g y un diámetro de poro promedio de $0,0075 \mu\text{m}$.

S4—Copolímero de estireno-divinilbenceno con grupos aromáticos $-\text{O}$ y $-\text{N}$ con un área nominal de 400 m^2 a 600 m^2 por g y un diámetro de poro promedio de $0,0076 \mu\text{m}$.

S5—Polímero de tetrafluoroetileno de alto peso molecular de malla 40 a 60.

S6—Copolímero de estireno-divinilbenceno con un área nominal de 250 m^2 a 350 m^2 por g y un diámetro de poro promedio de $0,0091 \mu\text{m}$.

S7—Carbono grafitizado que tiene un área nominal de 12 m^2 por g.

S8—Copolímero de 4-vinil-piridina y estireno-divinilbenceno.

S9—Polímero poroso a base de óxido de 2,6-difenil-*p*-fenileno.

S10—Copolímero altamente polar entrecruzado con acrilonitrilo y divinilbenceno.

S11—Carbono grafitizado que tiene un área nominal de 100 m^2 por g modificado con cantidades pequeñas de vaselina y compuestos de polietilenglicol.

[NOTA—Está disponible comercialmente como SP1500 en Carbo-pack B que se puede obtener de Supelco (www.sigmaaldrich.com/supelco).]

S12—Carbono grafitizado que tiene un área nominal de 100 m² por g.

{730} ESPECTROQUÍMICA DE PLASMA

Cambio en la redacción:

■ Las técnicas instrumentales basadas en plasma que se utilizan en el análisis farmacéutico se clasifican en dos grandes grupos: a) las técnicas que se basan en plasma inductivamente acoplado y b) las técnicas en las que el plasma se genera en la superficie de la muestra o cerca de ella. El plasma inductivamente acoplado (ICP, por sus siglas en inglés) es una fuente de excitación de alta temperatura que desolvata, vaporiza y atomiza muestras aerosolizadas e ioniza los átomos resultantes. Estos iones y átomos excitados pueden detectarse posteriormente mediante la observación de sus líneas de emisión, un método denominado espectroscopía de emisión atómica de plasma inductivamente acoplado (ICP–AES, por sus siglas en inglés), que también se conoce como espectroscopía de emisión óptica de plasma inductivamente acoplado (ICP–OES, por sus siglas en inglés), o los iones excitados o en estado fundamental pueden determinarse mediante una técnica que se denomina espectrometría de masas de plasma inductivamente acoplado (ICP–MS, por sus siglas en inglés). La ICP–AES y la ICP–MS son técnicas que permiten analizar uno o varios elementos y constituyen procedimientos generales apropiados, tanto para análisis secuenciales como para análisis simultáneos, con un amplio intervalo lineal y buena sensibilidad.

Una nueva técnica de espectroscopía de plasma es la espectroscopía de descomposición inducida por láser (LIBS, por sus siglas en inglés). La técnica LIBS consiste en calentar directamente la muestra en estado líquido, sólido o gaseoso con un láser pulsado o indirectamente por un plasma generado por el láser. Como resultado, en el plasma que se forma en la superficie de la muestra o un poco más arriba de ella, la muestra se volatiliza en el punto de contacto con el rayo láser, reduciendo los constituyentes volatilizados a átomos, fragmentos moleculares y grupos más grandes. La emisión de los átomos e iones de la muestra se recolecta, generalmente con fibra óptica u otro sistema de visualización remota y se mide con un dispositivo detector, como por ejemplo un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD, por sus siglas en inglés). La LIBS se puede utilizar para realizar análisis cualitativos o cuantitativos con una curva estándar de trabajo. Aunque la industria farmacéutica aún no ha incorporado la utilización generalizada de la LIBS, ésta puede resultar adecuada para realizar mediciones tanto en el área de producción como en el laboratorio, en el lugar físico o en línea. Su potencial la convierte en una técnica viable para la espectroquímica de plasma en el laboratorio farmacéutico, pero como la LIBS es una técnica relativamente nueva, este capítulo general no la tratará de forma detallada.¹

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación de la muestra es de suma importancia en el análisis mediante técnicas basadas en plasma y es el primer paso en todo

análisis por ICP–AES o ICP–MS. Los resultados de las técnicas basadas en plasma dependen en gran medida del transporte de la muestra al plasma. Como el sistema de introducción de muestra de la ICP–AES y la ICP–MS es el mismo, los métodos mediante los cuales se preparan las muestras pueden aplicarse a ambas técnicas. El método más convencional para introducir la muestra en el plasma es la nebulización de la solución. Si se emplea la nebulización de la solución, es necesario disolver las muestras sólidas para introducir las en el plasma para su análisis. Las muestras se pueden disolver en cualquier disolvente apropiado. Existe una gran preferencia por el uso de soluciones acuosas o diluidas de ácido nítrico porque sus interferencias son mínimas en comparación con otros disolventes. Para disolver la muestra también se pueden emplear peróxido de hidrógeno, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido perclórico, distintas combinaciones de ácidos o mezclas de ácidos con distintas concentraciones. El ácido fluorhídrico diluido también se puede usar, aunque cuando se emplea es necesario tomar las precauciones necesarias para garantizar la seguridad del analista y proteger el equipamiento de cuarzo para introducción de muestra; específicamente, el nebulizador, la cámara de rocío y el tubo interno de la antorcha los cuales deben estar fabricados con materiales resistentes al ácido fluorhídrico. Se pueden emplear otras alternativas para disolver la muestra, tales como bases diluidas, disolventes orgánicos puros o diluidos, combinaciones de ácidos o bases y distintas combinaciones de disolventes orgánicos, entre otras.

Cuando las muestras se introducen en el plasma por nebulización de la solución, es importante considerar los posibles efectos de la matriz e interferencias que el disolvente pueda generar. En casos en los que la exactitud y la precisión no sean adecuadas, se debe emplear un estándar interno apropiado y/o se debe homologar la matriz del estándar con la matriz de las muestras en los análisis ICP–AES e ICP–MS. En todo caso, la selección de un estándar interno apropiado debe tener en cuenta el analito en cuestión, la energía de ionización, las longitudes de onda o las masas y la naturaleza de la matriz de la muestra.

Cuando una muestra no es soluble en ninguno de los disolventes aceptables, se pueden emplear diferentes técnicas de digestión. Entre ellas cabe mencionar la digestión por calentamiento en placa o la digestión asistida por microondas, tanto en recipientes cerrados como abiertos. La selección del tipo de técnica de digestión depende de la naturaleza de la muestra a digerir y de los analitos en estudio.

Por lo general no se recomienda la digestión en recipientes abiertos en los análisis de metales volátiles; por ejemplo, selenio y mercurio. La aptitud de una técnica de digestión, sea en un recipiente abierto o cerrado, debe respaldarse con experimentos de recuperación de cantidades conocidas agregadas para comprobar que, en un intervalo de tolerancia aceptable, los metales volátiles no se han evaporado durante la preparación de la muestra. Utilizar ácidos, bases y peróxido de hidrógeno ultra puros, especialmente cuando se emplea la ICP–MS. El agua desionizada debe tener 18 megaohmios como mínimo. Verificar las posibles interferencias del diluyente antes de utilizarlo en un análisis. Seleccionar los disolventes orgánicos de la calidad más alta disponible con respecto al contenido de contaminantes metálicos, ya que no siempre es posible obtener estos disolventes exentos de metales.

Es importante tomar en cuenta la selección del tipo, material de construcción, tratamiento previo y limpieza del instrumental de laboratorio analítico empleado en los análisis ICP–AES e ICP–MS. El material debe ser inerte y, dependiendo de la aplicación específica, resistente a cáusticos, ácidos y/o disolventes orgánicos. En algunos análisis, se debe proceder con la diligencia debida para prevenir la adsorción de analitos sobre la superficie de los recipientes, especialmente en los análisis a nivel de ultratrazas. La contaminación de soluciones de muestra con metales o iones presentes en el envase puede también generar resultados inadecuados.

El uso de instrumental que no ha sido certificado para cumplir con las tolerancias Clase A de matraces volumétricos es aceptable si se ha demostrado experimentalmente que la linealidad, exactitud y precisión del método son adecuadas para el estudio a realizar.

INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA

Existen dos formas de introducir la muestra en el nebulizador: con una bomba peristáltica o por autosucción. Se prefiere el uso de la bomba peristáltica, la cual garantiza que la velocidad de flujo de la

¹ Yueh F-Y, Singh JP, Zhang H. Laser-induced breakdown spectroscopy, elemental analysis. En: *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*. New York: Wiley; 2000:2066–2087.

muestra y de la solución estándar hacia el nebulizador es la misma, independientemente de la viscosidad de la muestra. En algunos casos, cuando no es indispensable emplear la bomba peristáltica, puede utilizarse la autosucción.

Existen varios tipos de nebulizadores disponibles: neumáticos (concéntricos y de flujo cruzado), de rejilla y ultrasónicos. También están disponibles los micronebulizadores, los nebulizadores de alta eficacia, los nebulizadores de alta eficacia por inyección directa y los nebulizadores de inyección de flujo. La selección del nebulizador para cada análisis se debe hacer en función de la matriz de la muestra, del analito y de la sensibilidad deseada. Algunos nebulizadores son mejores para las soluciones viscosas o las que contengan sólidos disueltos en altas concentraciones, mientras que otros son mejores para soluciones orgánicas.

Tener en cuenta que la autosucción de un fluido se debe a los efectos de Bernoulli o de Venturi. No se puede obtener autosucción con todos los tipos de nebulizadores. Por ejemplo, se requiere de un nebulizador concéntrico para la autosucción de una solución.

Una vez que la muestra sale del nebulizador en forma de aerosol, ingresa a la cámara de rocío que está diseñada para seleccionar sólo las gotitas más pequeñas de la solución de muestra para que ingresen al plasma, como resultado, normalmente sólo de 1% a 2% del aerosol de muestra llega al ICP, aunque algunos nebulizadores con fines específicos están diseñados para permitir que prácticamente todo el aerosol de la muestra ingrese al ICP. Al igual que con los nebulizadores, existen varios tipos de cámaras de rocío disponibles para ICP–AES o ICP–MS, como por ejemplo la cámara de rocío de doble pasaje de Scott y las cámaras de rocío ciclónica con distintas configuraciones. Seleccionar una cámara de rocío compatible con la muestra y el disolvente, considerando que es necesario que se equilibre y vacíe en el menor tiempo posible. Cuando se seleccione una cámara de rocío, se debe tener en cuenta la naturaleza de la matriz de la muestra, la sensibilidad deseada y el analito.

Los sistemas de cromatografía de líquidos o de gases pueden interconectarse con ICP–AES e ICP–MS para lograr especiación molecular, iónica u otros modos de separación química basados en emisión elemental o espectrometría de masas.

En última instancia, se debe demostrar experimentalmente que la selección del equipo de introducción de la muestra ofrece suficiente especificidad, sensibilidad, linealidad, exactitud y precisión en el análisis.

Además de soluciones nebulizadas, también es posible analizar muestras sólidas por ablación láser (LA, por sus siglas en inglés). En esos casos, la muestra ingresa directamente a la antorcha en forma de humo. En vista de las dificultades que presenta la obtención de estándares apropiados, las técnicas de LA–ICP y LA–ICP–MS se consideran más adecuadas para los análisis cualitativos de compuestos farmacéuticos. Sin embargo, se pueden realizar análisis cuantitativos si se demuestra mediante un método de validación apropiado que los estándares disponibles son adecuados.²

PREPARACIÓN ESTÁNDAR

Se pueden adquirir soluciones estándar de uno o múltiples elementos, con concentraciones rastreables a estándares de referencia primarios, como los del Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés), para emplearlas en la preparación de soluciones estándar de trabajo. Como alternativa, se pueden preparar soluciones estándar de elementos a partir de materiales estándar y determinar independientemente sus concentraciones, según corresponda. Las soluciones estándar de trabajo, especialmente aquellas empleadas en los análisis a nivel de ultratrazo, pueden tener una vida útil limitada. Como regla general, las soluciones estándar de trabajo deben conservarse por un período no mayor a 24 horas a menos que se demuestre estabilidad experimentalmente. La selección de la matriz de la preparación estándar es de vital importancia. Los experimentos de recuperación de cantidades conocidas agregadas deben realizarse sobre matrices específicas para la muestra para determinar la exactitud del método. Si los efectos de matriz de la

muestra ocasionan demasiadas inexactitudes, los estándares, blancos y soluciones de muestra deben ser lo más parecidos posible a la matriz para reducir al mínimo las interferencias.

Cuando no sea posible homologar la matriz, se recomienda utilizar para la ICP–AES o ICP–MS un estándar interno apropiado o el método de estándar adicionado. También se pueden introducir estándares internos a través de un conector "T" en el tubo de subida de la muestra. En cualquier caso, en la selección de un estándar interno apropiado se debe tener en cuenta los analitos en cuestión, sus energías de ionización y excitación, sus comportamientos químicos, sus longitudes de onda o masas y la naturaleza de la matriz de la muestra. En última instancia, se debe demostrar experimentalmente que la selección del estándar interno ofrece suficiente especificidad, sensibilidad, linealidad, exactitud y precisión en el análisis.

El método de estándar adicionado consiste en el agregado a la muestra de una concentración conocida del elemento analito a no menos de dos niveles de concentración además de una preparación de la muestra sin el agregado de cantidades conocidas. La respuesta del instrumento se grafica en función de la concentración del elemento analito agregado y se traza la recta de regresión lineal correspondiente a los datos. La concentración del analito en la muestra se obtiene multiplicando el valor absoluto del punto donde la recta corta el eje x por el factor de dilución que corresponda.

La presencia de carbón disuelto a concentraciones de pequeño porcentaje en soluciones acuosas eleva la ionización de selenio y de arsénico en un plasma de argón inductivamente acoplado. Este fenómeno por lo general resulta en el sesgado positivo de las medidas cuantitativas de selenio y arsénico mediante ICP–AES e ICP–MS, las cuales pueden corregirse mediante el método de estándar adicionado o el agregado de un pequeño porcentaje de carbón, como el ácido acético glacial analíticamente puro, a los estándares de linealidad.

ICP

La fuente de excitación de ICP está compuesta por un suministro de gas argón, una antorcha, una bobina de inducción de radio frecuencia (RF), una unidad apareadora de impedancia y un generador RF. El gas que se utiliza más comúnmente en la ICP es el argón. La antorcha de plasma consiste en tres tubos de cuarzo concéntricos, denominados tubo interno, intermedio y exterior. Los tubos intermedios y externos por lo general están hechos de cuarzo. El tubo interno puede estar hecho de cuarzo o alúmina si el análisis se realiza con soluciones con ácido fluorhídrico. El flujo del gas nebulizador transporta el aerosol de la solución de muestra a través del tubo interno de la antorcha y lo introduce en el plasma. El tubo intermedio transporta el gas intermedio (a veces denominado auxiliar). El flujo del gas intermedio ayuda a elevar el plasma y a hacerlo salir de los tubos intermedio e interno para evitar que se fundan y que se depositen carbono y sales en el tubo interno. El tubo exterior transporta el gas exterior (a veces denominado plasma o refrigerante) que se utiliza para crear y mantener el plasma toroidal. El flujo tangencial del gas refrigerante a través de la antorcha mantiene el plasma donde debe estar, impidiendo que el ICP se expanda hacia el tubo exterior y lo llene y que la antorcha se funda. Alrededor de la antorcha se encuentra la bobina de inducción RF, también denominada bobina de carga, que genera un campo magnético oscilatorio. Este campo genera a su vez una corriente oscilatoria en los iones y electrones formados a partir del argón. La unidad apareadora de impedancia permite acoplar eficientemente la energía RF del generador con la de la bobina de carga. La unidad puede ser de tipo activa o pasiva. Una unidad apareadora activa ajusta la impedancia de la energía RF mediante una red capacitiva, mientras que la de tipo pasiva ajusta la impedancia directamente a través del circuito generador. La transferencia de energía entre la bobina y el argón que se produce dentro de la bobina de carga del generador RF genera un plasma autónomo. Los iones y electrones del argón colisionan con los átomos del analito que están en el plasma a alta temperatura, ionizándolos y excitándolos. La temperatura del plasma es de 6000 a 10 000 K, tal que básicamente todas las uniones covalentes y las interacciones entre los analitos se han eliminado.

² Para información adicional acerca de la ablación láser, ver Russo R, Mao X, Borisov O, Liu H. Laser ablation in atomic spectrometry. En: *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*. New York: Wiley; 2000.

ICP-AES

El plasma inductivamente acoplado puede emplearse en sistemas de detección ópticos o de espectrometría de masas. En el primer caso, ICP-AES, la detección del analito se realiza a alguna de las longitudes de onda de emisión del analito en cuestión. Existe una amplia variedad de sistemas ICP-AES disponibles con distintas tecnologías, cada uno con distintas capacidades y con sus propias ventajas y desventajas. Los sistemas de detección simultánea permiten analizar varios elementos al mismo tiempo, reduciendo los tiempos de análisis, y mejorando la detección y corrección de ruido de fondo. Los sistemas secuenciales funcionan con una longitud de onda a la vez y luego pasan a la siguiente y, a menudo, ofrecen una variedad más amplia de bandas analíticas para seleccionar la de trabajo. Los detectores en arreglo, incluyendo los dispositivos de acoplamiento de carga y los de inyección de carga, con detectores dispuestos en un chip, brindan la posibilidad de combinar las ventajas que ofrecen los sistemas secuenciales y los simultáneos. Estos tipos de dispositivos de detección se usan con los espectrómetros más potentes, ofreciendo un análisis rápido y una amplia selección de bandas analíticas.

El ICP puede observarse en planos axiales o radiales (también llamados laterales). La antorcha se coloca por lo general en posición horizontal en plasmas de observación axial y la muestra se observa desde el ápice; la antorcha se coloca en posición vertical en plasmas de observación radial y la muestra se observa lateralmente. La observación axial del plasma puede ofrecer relaciones señal ruido mayores (mejores límites de detección y precisión); no obstante, también incurre en mayores interferencias espectrales y de matriz. Los métodos validados con un instrumento de configuración radial probablemente no serán cien por ciento aplicables a un instrumento de configuración axial y viceversa.

También existen sistemas con ambas configuraciones de observación, lo que permite al analista aprovechar la configuración de antorcha más ventajosa. La selección de la configuración de la antorcha óptima dependerá de la matriz de la muestra, del analito en cuestión, de la(s) longitud(es) de onda analítica seleccionada(s), del costo de la instrumentación, de la sensibilidad requerida y de los instrumentos disponibles en cada laboratorio.

Independientemente de la configuración de la antorcha o de la tecnología del detector, la ICP-AES es una técnica que proporciona una medición cuantitativa y/o cualitativa de la emisión óptica de átomos e iones excitados a longitudes de onda específicas. Estas mediciones luego se utilizan para determinar la concentración del analito en la muestra en estudio. Un átomo o ión atómico excitado emite un conjunto de diferentes frecuencias de luz características de la transición energética típica de ese elemento. En general, la intensidad de la luz es proporcional a la concentración del analito. Es necesario realizar correcciones por emisión de fondo proveniente del plasma. Las concentraciones de la muestra se determinan por lo general a partir de una curva de trabajo de estándares conocidos sobre el intervalo de concentraciones similar al intervalo de interés. Sin embargo, es posible realizar calibraciones de un único punto en determinadas circunstancias, como por ejemplo en el caso de las pruebas de límite, si la metodología se ha validado en cuanto a su suficiente especificidad, sensibilidad, linealidad, exactitud, precisión, tolerancia y robustez.

Debido a que las transiciones entre los niveles de energía atómica están bien definidas y a que los átomos en ICP están bastante diluidos, las líneas de emisión tienen anchos de bandas estrechos. Sin embargo, dado que los espectros de emisión de la ICP contienen muchas líneas y que "alas" de estas líneas se superponen para producir un ruido de fondo casi continuo por encima del ruido continuo que resulta de la recombinación de iones de argón con electrones, se requiere un espectrómetro de alta resolución en la ICP-AES. La decisión respecto a qué línea espectral se va a medir debe incluir una evaluación de las potenciales interferencias espectrales. En la muestra, todos los átomos se excitan simultáneamente, de manera que la presencia de múltiples elementos puede producir una superposición de espectros. Las interferencias espectrales también pueden deberse a emisiones de fondo de la muestra o del plasma. Los ICP modernos generalmente cuentan con un dispositivo que permite realizar las correcciones de ruido de fondo así como se pueden aplicar varias técnicas de corrección de ruido de fondo. La corrección de ruido de fondo simple generalmente consiste en medir la intensidad de la emisión de fondo en algún punto que no

se encuentre cercano al pico principal y restar el valor obtenido de la señal total. Los modelos matemáticos para restar la señal de la interferencia como corrección de ruido de fondo también pueden emplearse con ciertos tipos de espectrómetros ICP-AES.

La selección de la línea espectral apropiada para el análisis es fundamental para un buen análisis por ICP-AES, independientemente de la configuración de antorcha o del tipo de detector que se utilice. Aunque por lo general se prefieran ciertas longitudes de onda, la selección final debe hacerse en el contexto de la matriz de la muestra, el tipo de instrumento y la sensibilidad requerida. El analista podría comenzar con las longitudes de onda recomendadas por el fabricante del instrumento y luego seleccionar otras longitudes de onda alternativas según las recomendaciones del fabricante o en función de las tablas de longitudes de onda publicadas.^{3,4,5,6,7} En última instancia, se debe demostrar experimentalmente que la selección de longitudes de onda para el análisis ofrece suficiente especificidad, sensibilidad, linealidad, exactitud y precisión en cada caso particular.

Se pueden optimizar la potencia, las velocidades de flujo del gas, la altura de la visualización y la posición de la antorcha a fin de obtener la mejor señal. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estas variables pueden influir en las interferencias espectrales y de matriz.

En general, es recomendable utilizar la ICP en condiciones robustas, las cuales se pueden evaluar basándose en el par de líneas MgII/MgI a (280,270 nm/285,213 nm). Si el cociente de las intensidades es mayor de 6,0 en una solución acuosa, la ICP es *robusta*, y menos susceptible a interferencias de la matriz. Generalmente se busca un cociente de aproximadamente 10,0. Tener en cuenta que el término *condiciones robustas* no guarda relación alguna con el término *robustez* aplicado a la validación de métodos analíticos. No es obligatorio utilizar un instrumento con un cociente MgII/MgI mayor de 6,0, sin embargo, se sugiere para optimizar los parámetros del instrumento en circunstancias diversas.

El análisis de los elementos del Grupo I puede considerarse una excepción a esta estrategia. Cuando se forman iones atómicos a partir de elementos de este grupo, éstos asumen una configuración electrónica de gas noble, con la correspondiente alta energía de excitación. Dado que el primer estado de excitación de estos iones es extremadamente alto, se excitan sólo unos pocos, por lo que la intensidad de la emisión es baja. Esta situación puede mejorarse reduciendo la ionización fraccionada, lo que puede lograrse ajustando a una potencia menor en combinación con ajustes en la altura de la visualización o el flujo del gas nebulizador, o mediante el agregado de un agente supresor de la ionización a las muestras y estándares.

Cuando se utilizan disolventes orgánicos, a menudo es necesario usar más potencia, más flujo del gas intermedio e interno y menos flujo del gas nebulizador que con soluciones acuosas, y reducir el flujo del gas nebulizador. Cuando se emplean disolventes orgánicos, puede ser necesario inyectar pequeñas cantidades de oxígeno para que no se acumule carbón en la antorcha.

Calibración

La exactitud de la longitud de onda en ICP-AES debe determinarse de acuerdo con los procedimientos operativos del fabricante. Debido a las diferencias inherentes entre los distintos tipos de instrumentos disponibles, no se puede establecer un procedimiento de aptitud del sistema general. Deben efectuarse las rutinas de calibración recomendadas por el fabricante de cada ICP-AES. Estas pruebas pudieran incluir, de manera no taxativa, la calibración de la longitud de onda para varios elementos con una solución de referencia, la calibración de la longitud de onda interna

³ Payling R, Larkins P. *Optical Emission Lines of the Elements*. New York: Wiley; 2000.

⁴ Harrison GR. *Massachusetts Institute of Technology Wavelength Tables* [también conocida como *MIT Wavelength Tables*]. Cambridge, MA: MIT Press; 1969.

⁵ Winge RK, Fassel VA, Peterson VJ, Floyd MA. *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy: An Atlas of Spectral Information*. New York: Elsevier; 1985.

⁶ Boumans PWJM. *Spectrochim Acta A*. 1981;36B:169.

⁷ Boumans PWJM. *Line Coincidence Tables for Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*. 2nd ed.; Oxford, UK: Pergamon; 1984.

con mercurio (Hg) y el barrido espectral para ubicar los picos. El analista debe verificar el sistema según las recomendaciones del fabricante.

Estandarización

El instrumento debe estandarizarse para la cuantificación al momento de utilizarlo. Sin embargo, dado que la ICP–AES es una técnica considerada en general lineal en el intervalo de 6 a 8 órdenes de magnitud, no siempre es necesario demostrar continuamente la linealidad con una curva estándar compuesta por varios estándares. Una vez que el método se ha desarrollado y se emplea de forma rutinaria, el instrumento se puede calibrar con un blanco y un único estándar. Es apropiado emplear la calibración de un único punto en las pruebas de límite de materiales de producción y productos finales si la metodología se ha validado de forma rigurosa en cuanto a su suficiente especificidad, sensibilidad, linealidad, exactitud, precisión, tolerancia y robustez. También es aceptable el empleo de estandarización de un único punto en análisis cualitativos ICP–AES en los que el propósito del experimento es confirmar la presencia o ausencia de elementos sin el requisito de una cuantificación exacta.

Se deben valorar un blanco y soluciones estándares que abarquen el intervalo esperado de concentraciones de la muestra y graficar la respuesta del detector en función de la concentración del analito, tal como en el caso en que la concentración de un componente conocido se determina dentro de una tolerancia específica. Sin embargo, no siempre es posible emplear un estándar que abarque estas concentraciones cuando se realiza un análisis en el límite de detección o en su cercanía. En análisis realizados para demostrar la ausencia o eliminación de elementos por debajo de un límite específico es aceptable prescindir de un conjunto de estándares que abarquen todas las concentraciones. Es necesario elegir la cantidad y las concentraciones de las soluciones estándar utilizadas según el propósito de la cuantificación, el analito en estudio, la sensibilidad deseada y la matriz de la muestra. Se debe emplear el análisis de regresión de la gráfica del estándar para evaluar la linealidad de la respuesta del detector y, a menudo, las monografías individuales pueden establecer criterios para el error residual de la línea de regresión. En un escenario óptimo, se debe demostrar un coeficiente de correlación para la curva de trabajo no menor de 0,99 u otro valor distinto si así se especifica en la monografía individual. Sin embargo, la naturaleza de la matriz de la muestra, el o los analitos, la sensibilidad deseada y el tipo de instrumentación disponible pueden hacer que un coeficiente de correlación inferior a 0,99 sea aceptable. En estos casos se recomienda que el analista proceda con sumo cuidado y que utilice estándares de trabajo adicionales.

A fin de demostrar la estabilidad de la estandarización inicial del sistema, se debe volver a determinar una solución de las usadas para trazar la curva estándar inicial, a modo de estándar de verificación, a intervalos apropiados durante el análisis de todo el conjunto de muestras. El estándar nuevamente analizado debe concordar con una aproximación de $\pm 10\%$ con su valor esperado, o según se especifique en la monografía individual, para el caso de análisis de un único elemento, con longitudes de onda analíticas comprendidas entre 200 y 500 nm o con concentraciones de $> 1 \mu\text{g}$ por mL. El estándar nuevamente analizado debe concordar con una aproximación de $\pm 20\%$ con su valor teórico, o según se especifique en la monografía individual, para el caso de análisis de varios elementos con longitudes de onda analíticas de < 200 o > 500 nm o con concentraciones de $< 1 \mu\text{g}$ por mL. Si la monografía individual proporciona pautas diferentes para el nuevo análisis del estándar de verificación, rige lo que especifica la monografía.

Procedimiento

Utilizar los parámetros del instrumento especificados en la monografía individual. Sin embargo, debido a las diferencias en las configuraciones de los equipos, los parámetros recomendados por el fabricante pueden emplearse y modificarse según sea necesario. Aunque una monografía especifique los parámetros a utilizar, se pueden utilizar otros parámetros operativos adecuados y ajustar las condiciones de trabajo cuando sea necesario. Pero es necesario contar con datos de validación adecuados que respalden la

utilización de condiciones alternativas, y para fines oficiales, las condiciones especificadas en la monografía tienen precedencia. La información obtenida de cada introducción de una única muestra se considera un único resultado. Éste puede ser el promedio de lecturas secuenciales y repetidas de una única introducción de la solución de la muestra o del estándar apropiado. Las concentraciones de la muestra se calculan a partir de la curva de trabajo que se obtiene graficando la respuesta del detector en función de la concentración del analito en las soluciones estándar. Con frecuencia, el instrumento realiza este cálculo directamente.

ICP–MS

Cuando el plasma inductivamente acoplado emplea un sistema de detección de espectrometría de masas, la técnica se denomina de plasma inductivamente acoplado y espectrometría de masas (ICP–MS, por sus siglas en inglés). En esta técnica, los analitos se detectan directamente a sus masas atómicas. Como estas masas deben estar cargadas para que se puedan detectar en la ICP–MS, el método depende de la capacidad de la fuente del plasma de atomizar e ionizar los componentes de la muestra. Al igual que en la ICP–AES, se encuentra disponible una amplia variedad de sistemas ICP–MS.

Los sistemas más comunes son los de cuadrupolo. Los sistemas de ICP–MS de "tiempo de vuelo" cobran cada vez mayor importancia. Si bien aún no se utilizan de forma generalizada, es muy probable que aumente su uso en el futuro. Adicionalmente, también se encuentran disponibles instrumentos de alta resolución por sectores de campo.

La ICP–MS, cualquiera sea el diseño o la configuración del instrumento, proporciona una medida cuantitativa y cualitativa de los componentes de la muestra. Los átomos del analito generan iones por efecto del plasma. Estos iones se extraen del plasma que se encuentra a presión atmosférica a través de un cono de muestreo y se transfieren a una zona de baja presión, que normalmente se mantiene a una presión cercana a 1 Torr. En este proceso de extracción, se forma un haz supersónico a partir de los gases del plasma muestreados conteniendo los analitos que determina muchas de las propiedades de los iones resultantes del analito. El cono de selección, ubicado detrás del cono de muestreo, "selecciona" los iones de haz supersónico a medida que emergen del cono de muestreo. Detrás del cono de selección se encuentra una zona de baja presión, que normalmente se mantiene cercana a un miliTorr. Finalmente, los iones seleccionados atraviesan el orificio de una tercera etapa e ingresan a una zona que se mantiene cercana a un microTorr, donde encuentran la óptica para iones y pasan al espectrómetro de masas. Allí los iones se separan según su relación masa-carga: (m/z). El intervalo de masas de ICP–MS comprende hasta 240 unidades de masa atómica (uma). Según la configuración del equipo, se pueden formar aductos de analito con diluyentes, argón o sus productos de descomposición. También se forman óxidos e iones de analito de carga múltiple, los cuales pueden aumentar la complejidad de los espectros de masa resultantes. La optimización de los parámetros operativos reduce las interferencias; estos parámetros incluyen los flujos de gas (velocidades de flujo del gas central, intermedio y exterior), flujo de la solución de la muestra, potencia de RF, voltaje del lente de extracción, etc.; o mediante la utilización de celdas de colisión o de reacción, u operando con plasma frío, si estuviera disponible en el instrumento. Salvo que el laboratorio genere o analice isótopos que no existen en la naturaleza, una lista de isótopos naturales proporcionará al analista isótopos aceptables para fines analíticos. Los perfiles isotópicos también facilitan la identificación y confirmación de elementos. Además, existen tablas de interferencias comunes y de interferencias isobáricas poliatómicas con factores de corrección.

La ICP–MS generalmente ofrece límites de detección considerablemente más bajos (mejores) que la ICP–AES, en gran medida gracias a que genera un ruido de fondo extremadamente bajo. Esta capacidad es una de las grandes ventajas de la ICP–MS en la determinación de concentraciones muy bajas de un analito o cuando se requiere la eliminación de interferencias de la matriz. En el último caso, algunas interferencias se pueden evitar simplemente con una dilución adicional de la solución de muestra. En algunas aplicaciones, se pueden detectar analitos a concentraciones inferiores a ng

por L (ppt) empleando la ICP–MS. Como regla general, la ICP–MS como técnica requiere que las muestras contengan sustancialmente menos sólidos totales disueltos que los que requiere la ICP–AES.

El éxito de un análisis ICP–MS depende de la selección correcta de la masa analítica, independientemente del diseño del instrumento. Si bien algunas masas se consideran primariamente, dada su rica abundancia natural, a veces se utiliza una masa alternativa para un elemento determinado a fin de evitar la superposición de espectros (interferencias isobáricas). La selección de la masa analítica siempre se debe realizar en función de la matriz de la muestra, del tipo de instrumento y de las concentraciones a medir. El analista podría comenzar con las masas recomendadas por el fabricante del instrumento en particular y luego seleccionar otras masas alternativas según las recomendaciones del fabricante o en función de las tablas de isótopos naturales publicadas.⁸

La optimización de un método de ICP–MS depende de los parámetros del plasma y el medio de introducción de la muestra. Estos instrumentos permiten regular la potencia, las velocidades de flujo del gas y la posición de la antorcha a fin de obtener la señal más adecuada. Cuando se utilizan disolventes orgánicos, a menudo es necesario utilizar más potencia y menos flujo del gas nebulizador que con soluciones acuosas. En algunos casos puede que sea necesario agregar pequeñas cantidades de oxígeno en el gas central o intermedio para que no se deposite carbón en la antorcha o en el orificio del cono de muestreo. Con algunos disolventes orgánicos puede ser necesario usar conos de muestreo o de selección con punta de platino para disminuir la degradación del cono.

Calibración

En las determinaciones por ICP–MS, la exactitud del espectro de masas debe estar de acuerdo con lo indicado en los procedimientos operativos aplicables. Debido a las diferencias inherentes en los distintos tipos de instrumentos disponibles, no se ha establecido un procedimiento de aptitud del sistema general. Se deben consultar las pruebas recomendadas por el fabricante de cada instrumento de ICP–MS. Estas pruebas pueden incluir, de manera no taxativa, la puesta a punto con una o más masas de referencia, el barrido espectral para ubicar los picos y la calibración de masas. El analista debe verificar el sistema según las recomendaciones del fabricante del instrumento.

Estandarización

Se debe estandarizar el instrumento para la cuantificación al momento de su uso. Como la respuesta (señal en función de la concentración) de la ICP–MS normalmente se considera lineal en el intervalo de 6 a 8 órdenes de magnitud, no siempre es necesario demostrar continuamente la linealidad mediante una curva de trabajo. Una vez que el método se ha desarrollado y se emplea de forma rutinaria, el instrumento se puede calibrar con un blanco y un único estándar. Es apropiado emplear la calibración de un único punto en las pruebas de límite de materiales de producción y productos finales si la metodología se ha validado de forma rigurosa en cuanto a su suficiente especificidad, sensibilidad, linealidad, exactitud, precisión, tolerancia y robustez. Se deben valorar un blanco y soluciones estándares que abarquen el intervalo esperado de concentraciones de la muestra y graficar la respuesta del detector en función de la concentración del analito. La selección de la cantidad y concentración de las soluciones estándar utilizadas se realizará según el analito en estudio, las concentraciones esperadas y la matriz de la muestra y quedan a criterio del analista. En un escenario óptimo, se debe demostrar un coeficiente de correlación para la curva estándar de trabajo no menor de 0,99 u otro valor distinto si así se especifica en la monografía individual. Sin embargo, la naturaleza de la matriz de la muestra, el analito, la sensibilidad deseada y el tipo de instrumentación disponible pueden hacer que un coeficiente de correlación inferior a 0,99 sea aceptable. En estos casos se recomienda que el analista proceda con sumo cuidado y que utilice estándares de trabajo adicionales.

A fin de demostrar la estabilidad del sistema desde la normalización inicial, se debe volver a determinar una solución de las usadas para trazar la curva estándar inicial, a modo de estándar de verificación, a intervalos apropiados durante el análisis de todo el conjunto de muestras. Se pueden establecer intervalos apropiados, como por ejemplo cada 5 ó 10 muestras o según lo considere satisfactorio el analista, teniendo en cuenta el tipo de análisis en cuestión. El estándar nuevamente analizado debe concordar con una aproximación de $\pm 10\%$ con su valor esperado para el caso de análisis de un único elemento, con masas analíticas exentas de interferencias o con concentraciones de > 1 ng por mL. El estándar nuevamente analizado debe concordar con su valor esperado con una aproximación de $\pm 20\%$ para análisis de múltiples elementos o cuando las concentraciones son de < 1 ng por mL. Si la monografía individual proporciona pautas diferentes para el nuevo análisis del estándar de verificación, rige lo que especifica la monografía.

El método de estándar adicionado debe usarse en situaciones en que se esperan o sospechan interferencias de la matriz. Este método implica agregar una concentración conocida del elemento analito a la solución de muestra a no menos de dos niveles de concentración. La respuesta del instrumento se grafica en función de la concentración del elemento analito agregado y se traza la recta de regresión lineal correspondiente a los datos. La concentración del analito en la muestra se obtiene multiplicando el valor absoluto del punto donde la recta corta el eje x por el factor de dilución que corresponda.

Procedimiento

Utilizar los procedimientos que se indican en la monografía individual para el modo de detección y los parámetros del instrumento. Aunque una monografía especifique los parámetros a utilizar, se pueden utilizar otros parámetros operativos adecuados y ajustar las condiciones de trabajo según sea necesario. Pero es necesario contar con datos de validación adecuados que respalden la utilización de condiciones alternativas, y para fines oficiales, las condiciones especificadas en la monografía tienen precedencia. Sin embargo, debido a las diferencias en las configuraciones de los equipos, el analista puede comenzar con los parámetros por defecto sugeridos por el fabricante y modificarlos según sea necesario. La información obtenida de cada introducción de una única muestra se considera un único resultado. Éste puede ser el promedio de lecturas secuenciales y repetidas de una única introducción de la solución de la muestra o del estándar apropiado. Las concentraciones de la muestra se calculan a partir de la curva de trabajo que se obtiene graficando la respuesta del detector en función de la concentración del analito en las soluciones estándar. Los instrumentos más modernos cuentan con dispositivos que realizan este cálculo.

GLOSARIO

ANTORCHA: Serie de tres tubos concéntricos, generalmente de cuarzo, donde se genera el plasma inductivamente acoplado.

CELDA DE COLISIÓN: Característica de diseño de algunos de los instrumentos de ICP–MS. Las celdas de colisión permiten reducir las interferencias causadas por el argón o iones poliatómicos y facilitan el análisis de los elementos que podrían estar afectados por esas interferencias.

CELDA DE REACCIÓN: Es similar a la *Celda de Colisión*, pero funciona bajo un principio diferente. Está diseñada para reducir o eliminar las interferencias de espectro.

CONO DE MUESTREO: Un cono de metal (generalmente con la punta de platino, aluminio o níquel) con una pequeña abertura a través de la cual fluye la muestra ionizada una vez que emergió del plasma.

CONO DE SELECCIÓN: Un cono metálico con una abertura por donde fluye la muestra ionizada luego de pasar por el cono de muestreo y antes de ingresar a la zona de alto vacío de ICP–MS.

ESTÁNDAR ADICIONADO: Método que se utiliza para determinar la concentración real del analito en la muestra cuando la viscosidad o los efectos de la matriz pueden causar determinaciones erróneas.

⁸ Horlick G, Montaser A. Analytical characteristics of ICPMS. En: Montaser A, Editor. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. New York: Wiley-VCH; 1998 : 516–518.

ESTÁNDAR INTERNO: El elemento que se agrega o está presente en la misma concentración en los blancos, estándares y muestras, y se usa como referencia de intensidad en el análisis. Es un requisito indispensable en los análisis cuantitativos por ICP–MS y es recomendable para trabajar con ICP–AES.

GAS AUXILIAR: Ver *Gas Intermedio (o Auxiliar)*.

GAS CENTRAL (O NEBULIZADOR): Uno de los tres flujos de argón en una antorcha ICP. El gas central se emplea para nebulizar la solución de la muestra, formando una neblina de finísimas partículas, que luego pasa al tubo central de la antorcha para ingresar al plasma.

GAS DE PLASMA: Ver *Gas Externo (o Refrigerante o de Plasma)*.

GAS EXTERNO (O REFRIGERANTE O DE PLASMA): Fuente principal de suministro de gas para el plasma.

GAS INTERMEDIO (O AUXILIAR): Gas que se utiliza para “despegar” el plasma de la superficie de la antorcha, y así se impide que el tubo intermedio se funda y se acumulen carbón y sales en el tubo interno.

GAS REFRIGERANTE: Ver *Gas Externo (o Refrigerante o de Plasma)*.

IONES CON CARGA MÚLTIPLE: Átomos que se convierten en iones con carga doble o triple (X^{++} , X^{+++} , etc.) cuando se someten a la alta temperatura de ionización de la ICP. Cuando se detectan por MS, la masa aparente de estos iones será $\frac{1}{2}$ ó $\frac{1}{3}$ de la masa atómica.

NEBULIZADOR: El dispositivo que se utiliza para transformar la muestra en un aerosol homogéneo que se mezcla con el argón, que posteriormente se envía a la ICP.

PLASMA FRÍO: Condiciones para el plasma empleado por ICP–MS que producen un plasma más frío que lo habitual en estos análisis. Esta condición se obtiene mediante menos potencia y mayor velocidad de flujo del gas central, y se emplea para contribuir en la reducción de interferencias isotópicas ocasionadas por el argón y algunos iones poliatómicos.

POTENCIA: El número de vatios necesario para encender el gas y mantener el plasma durante un análisis. Los requisitos de potencia varían según la matriz de la muestra y cada analito.

m: La masa del ión en estudio.

SECUENCIAL: Una de las posibles configuraciones para la AES o MS en la que las líneas de emisión discretas o picos isotópicos se observan mediante un barrido o salteo del intervalo espectral con un monocromador o por barrido del espectrómetro de masas.

SIMULTÁNEA: Una de las posibles configuraciones para la AES o MS en la que las líneas de emisión escogidas o picos isotópicos se observan al mismo tiempo con un policromador o espectrómetro de masas simultáneo, con lo cual aumenta la velocidad del análisis en un análisis de muestras con varios elementos.

OBSERVACIÓN AXIAL: Configuración del plasma en la técnica de AES en la que el plasma está orientado hacia el recorrido óptico del espectrómetro, también conocida con el nombre de “observación desde el ápice”.

OBSERVACIÓN LATERAL: Ver *Observación Radial*.

OBSERVACIÓN RADIAL: Configuración del plasma en la técnica de AES en la que el plasma se visualiza de forma ortogonal con respecto al recorrido óptico del espectrómetro. También se denomina “observación de lado.” Ver también *Observación Lateral*. ■_{1S} (USP30)

<785> OSMOLALIDAD Y OSMOLARIDAD

Cambio en la redacción:

OSMOLARIDAD

La osmolaridad de una solución es una cantidad teórica expresada en osmoles por L (Osmol por L) de una solución y se usa ampliamente en la práctica clínica porque expresa los osmoles en función del volumen. La osmolaridad no se puede medir pero se calcula teóricamente a partir del valor de osmolalidad medido experimentalmente.

A veces, la osmolaridad (ξ_c) se calcula teóricamente a partir de las concentraciones molares:

$$\xi_c = \sum \nu_i c_i$$

en donde ν_i es la que se define anteriormente y c_i es la concentración molar del *i*ésimo soluto (el número ordinal del soluto) en solución. Por ejemplo, la osmolaridad de una solución que se prepara disolviendo 1 g de vancomicina en 100 mL de solución de cloruro de sodio al 0,9% se puede calcular de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} & \left[3 \times 10 \text{ g/L} / 1449,25 (\text{peso mol. de vancomicina}) + 2 \times 9 \text{ g/L} / \right. \\ & \left. 58,44 (\text{peso mol. de cloruro de sodio}) \right] \times 1000 = 329 \text{ mOsmol/L} \end{aligned}$$

■_{1S} (USP30)

El resultado sugiere que la solución es ligeramente hiperosmótica dado que la osmolalidad de la sangre está entre 285 y 310 mOsmol por kg. Sin embargo, la solución ha resultado ser hipoosmótica y tiene una osmolalidad determinada experimentalmente de 255 mOsmol por kg.¹ El ejemplo ilustra que los valores de osmolaridad calculados teóricamente a partir de la concentración de una solución se deben interpretar con cautela y este valor puede no representar las propiedades osmóticas de las soluciones de infusión.

La discrepancia entre los resultados teóricos (osmolaridad) y los experimentales (osmolalidad) se debe, en parte, al hecho de que la presión osmótica está relacionada con la osmolalidad y no con la osmolaridad. Más significativamente, la discrepancia entre los resultados experimentales y los cálculos teóricos se debe a que la presión osmótica de una solución real es menor que la de una solución ideal debido a las interacciones entre las moléculas del soluto o entre las moléculas del soluto y del disolvente en una solución. Estas interacciones reducen la presión que ejercen las moléculas del soluto sobre la membrana semipermeable, lo que reduce los valores experimentales de la osmolalidad en comparación con los valores teóricos. Esta diferencia está relacionada con el coeficiente osmótico molar ($\Phi_{m,i}$). El ejemplo también ilustra la importancia de determinar experimentalmente la osmolalidad de una solución, en vez de calcular el valor teóricamente.

Cambio en la redacción:

MEDICIÓN DE LA OSMOLALIDAD

Normalmente, el valor de osmolalidad de una solución se determina midiendo el descenso del punto de congelación de una solución.

Aparato—El aparato, un osmómetro para medir el descenso del punto de congelación, consiste en lo siguiente: un medio para enfriar el recipiente utilizado para la medición; un resistor sensible a la temperatura (termistor), con un dispositivo adecuado para medir la

¹ Kastango, E.S. y Hadaway, L. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* 5, (2001) 465–469.

diferencia de potencial o de corriente y que puede graduarse en función de cambios de temperatura o en osmolalidad; y un mecanismo para mezclar la muestra.

Los osmómetros que miden la presión de vapor de las soluciones se emplean con menor frecuencia. Requieren un volumen de muestra más pequeño (generalmente aproximadamente 5 µL), aunque la exactitud y precisión de los resultados de las determinaciones de osmolalidad son comparables a las obtenidas mediante el uso de osmómetros que dependen de la observación del punto de congelación de las soluciones.

Soluciones Estándar—Preparar las *Soluciones Estándar* como se indica en la *Tabla 1*, según sea necesario.

Solución de Prueba—En el caso de un sólido para inyección, reconstituir con el diluyente apropiado según se indica en las instrucciones del etiquetado. En el caso de soluciones, usar la muestra tal como se encuentra. [NOTA—Se puede diluir una solución para que quede dentro del intervalo de medición del osmómetro, si fuera necesario, pero el resultado se deberá expresar como el de la solución diluida y NO se debe multiplicar por un factor de dilución para calcular la osmolalidad de la solución original, ■a menos que se especifique algo diferente en la monografía. ■^{1S} (USP30)] El coeficiente osmótico molal es una función de la concentración. Por lo tanto, cambia con la dilución.]

Procedimiento—■Primero, calibrar el instrumento según las instrucciones del fabricante. Confirmar la calibración del instrumento con, por lo menos, dos soluciones de la *Tabla 1* de manera que las osmolalidades de las *Soluciones Estándar* abarquen el intervalo de osmolalidad esperado de la *Solución de Prueba*. La lectura del instrumento debe estar dentro de ± 2 mOsmol/kg de la *Solución Estándar* (sobre el intervalo estándar de 100 a 700 mOsmol/kg). ■^{1S} (USP30) Introducir un volumen adecuado de cada *Solución Estándar* en la celda de medición conforme a las instrucciones del fabricante y poner en marcha el sistema de enfriamiento. En general, el dispositivo de mezcla se programa para que opere a una temperatura inferior a la temperatura más baja esperada de descenso del punto de congelación. El aparato indica cuando se ha logrado el equilibrio. Calibrar el osmómetro utilizando un dispositivo de ajuste adecuado de modo que la lectura corresponda a la osmolalidad o al valor de descenso del punto de congelación de la *Solución Estándar* que aparece en la *Tabla 1*.

[NOTA—Algunos instrumentos indican la osmolalidad y otros muestran el descenso del punto de congelación.] Antes de cada medición, enjuagar la celda de medición por lo menos dos veces con la solución a analizar. Repetir el procedimiento con cada *Solución de Prueba*. Leer la osmolalidad de la *Solución de Prueba* directamente o calcularla a partir del valor obtenido para el descenso del punto de congelación.

Suponiendo que el valor del coeficiente osmótico es esencialmente el mismo ya sea que la concentración se exprese en molalidad o molaridad, la osmolalidad de una solución determinada experimentalmente se puede convertir en osmolaridad de la misma manera que la concentración de una solución se convierte de molalidad a molaridad. A menos que una solución esté muy concentrada, la osmolaridad de una solución (ξ_c) se puede calcular a partir de su osmolalidad determinada experimentalmente (ξ_m):

$$\xi_c = 1000\xi_m / (1000/\rho + \sum w_i \nu_i)$$

donde w_i es el peso en g; y ν_i es el volumen específico parcial, en mL por g, del *i*ésimo soluto (el número ordinal del soluto). El volumen específico parcial de un soluto es el cambio en volumen de una solución cuando se disuelve 1 g adicional de soluto en la solución. Este volumen se puede determinar midiendo las densidades de la solución antes y después de agregar el soluto. Los volúmenes específicos parciales de las sales son generalmente muy pequeños, alrededor de 0,1 mL por g. Sin embargo, los otros solutos son generalmente mayores. Por ejemplo, los volúmenes específicos parciales de los aminoácidos están entre 0,6 mL y 0,9 mL por g. ■Se puede demostrar por la ecuación anterior que correlaciona la osmolaridad con la osmolalidad que,

$$\xi_c = \xi_m (\rho - c)$$

donde ρ es la densidad de la solución y c es la concentración de soluto total, ambas expresadas en g por mL. Por lo tanto, alternativamente, la osmolaridad puede calcularse también a partir de la osmolalidad determinada experimentalmente a partir de la medición de la densidad de la solución mediante un método adecuado y el peso total del soluto, después de la corrección por contenido de agua, disuelto por mL de la solución. ■^{1S} (USP30)

Tabla 1. Soluciones Estándar para Calibración del Osmómetro²

Soluciones Estándar (Peso en g de cloruro de sodio por kg de agua)	Osmolalidad (mOsmol/kg) (ξ_m)	Coeficiente Osmótico Molal (Φ_m, NaCl)	Descenso del Punto de Congelación (°) ΔT_f
3,087	100	0,9463	0,186
6,260	200	0,9337	0,372
9,463	300	0,9264	0,558
12,684	400	0,9215	0,744
15,916	500	0,9180	0,930
19,147	600	0,9157	1,116
22,380	700	0,9140	1,302

² Adaptado de la *Farmacopea Europea*, 4a Edición, 2002, pg. 50.

(905) UNIFORMIDAD DE UNIDADES DE DOSIFICACIÓN

Cambio en la redacción:

[NOTA—En este capítulo, los términos *unidad* y *unidad de dosificación* son sinónimos.]

Para garantizar la uniformidad de las unidades de dosificación, cada unidad en un lote debe tener un contenido de fármaco dentro de un intervalo estrecho alrededor de la cantidad declarada. Las unidades de dosificación se definen como formas farmacéuticas que contienen una única dosis o parte de una dosis de un fármaco en cada unidad. •Para suspensiones, emulsiones o geles en envases de dosis única destinadas para administración tópica no se aplica la especificación de la uniformidad de las unidades de dosificación. •^{1S (USP30)}

El término “uniformidad de unidades de dosificación” se define como el grado de uniformidad en el contenido del fármaco entre las unidades de dosificación. Por lo tanto, los requisitos de este capítulo son aplicables a cada fármaco incluido en unidades de dosificación que contengan uno o más fármacos, a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual.

La uniformidad de las unidades de dosificación se puede demostrar mediante uno de los siguientes métodos, *Uniformidad de Contenido* o *Variación de Peso* (ver *Tabla 1*). La prueba de *Uniformidad de Contenido* se basa en la valoración individual del contenido de un fármaco o fármacos en un número de unidades de dosificación para determinar si el contenido individual se encuentra dentro de los límites fijados. El método de *Uniformidad de Contenido* se puede aplicar en todos los casos. La prueba de *Uniformidad de Contenido* se requiere para las formas farmacéuticas que se describen en (C1)–(C6) a continuación:

- (C1) tabletas recubiertas, excepto las tabletas recubiertas con película que contengan 25 mg o más de un fármaco que corresponda al 25% o más (en peso) de una tableta;
- (C2) sistemas transdérmicos;
- (C3) suspensiones, emulsiones o geles en envases •unitarios. •^{1S (USP30)} o en cápsulas blandas destinadas exclusivamente para administración sistémica (no aplicable a los medicamentos destinados para administración •tópica); •^{1S (USP30)}
- (C4) inhalaciones envasadas en unidades de dosis fija (excepto las soluciones para inhalación envasadas en ampollas de vidrio o de plástico destinadas para usar en nebulizadores). Para inhaladores y unidades de dosis fija que declaran estar destinadas para ser utilizadas con un dispositivo de inhalación específico, ver también *Aerosoles*, *Atomizadores Nasales*, *Inhaladores de Dosis Fija* e *Inhaladores de Polvo Seco* (601);
- (C5) sólidos (incluidos los sólidos estériles) envasados en envases unitarios y que contienen sustancias agregadas inactivas o activas, excepto cuando se pueda aplicar la prueba de *Variación de Peso* en los •casos. •^{1S (USP30)} especiales que se indican a continuación en (W3). •^{1S (USP30)}; y
- (C6) supositorios.

La prueba de *Variación de Peso* es aplicable para las siguientes formas farmacéuticas:

- (W1) soluciones para inhalación envasadas en ampollas de vidrio o de plástico, destinadas para usar en nebulizadores, y soluciones orales envasadas en envases de dosis única y en cápsulas blandas;
- (W2) sólidos (incluidos los sólidos estériles) envasados en envases unitarios y que no contienen sustancias agregadas, ya sea activas o inactivas;

- (W3) sólidos (incluidos los sólidos estériles) envasados en envases unitarios, con o sin sustancias agregadas, activas o inactivas, que hayan sido preparados por liofilización a partir de soluciones verdaderas en sus envases finales y que declaran este método de preparación; y
- (W4) cápsulas duras, tabletas sin cubierta o tabletas recubiertas con películas que contengan 25 mg o más de un fármaco que corresponda al 25% o más, en peso, de la unidad de dosificación o, en el caso de cápsulas duras, el contenido de las cápsulas, excepto que se demuestre la uniformidad de otros fármacos presentes en proporciones menores en cumplimiento de los requisitos de *Uniformidad de Contenido*.

La prueba de *Uniformidad de Contenido* se requiere para todas las formas farmacéuticas que no cumplen las condiciones enumeradas anteriormente para la prueba de *Variación de Peso*. •Cuando se requiere el cumplimiento con la prueba de *Uniformidad de Contenido*, aplicando la cláusula que permite el uso de métodos alternativos provista en la sección *Advertencias Generales* de esta Farmacopea, los fabricantes pueden cumplir con este requisito mediante la aplicación de la prueba de *Variación de peso*, cuando la desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) de la concentración del fármaco en las unidades de dosificación final no es más de 2%. La determinación de la RSD puede basarse en datos de validación del proceso y de desarrollo del producto en poder del fabricante. •^{1S (USP30)} La RSD de la concentración es la RSD de la concentración por unidad de dosificación (p/p o p/v), en donde la concentración por unidad de dosificación es igual al resultado de la valoración por unidad de dosificación dividido por el peso de la unidad de dosificación individual. Ver la fórmula de la RSD en la *Tabla 2*. •Sin embargo, aunque se emplee la prueba de *Variación de peso* con tales propósitos, si fuera analizado, el producto deberá cumplir con la prueba farmacopeica oficial de *Uniformidad de Contenido*. •^{1S (USP30)}

Cambio en la redacción:

UNIFORMIDAD DE CONTENIDO

Seleccionar no menos de 30 unidades y proceder como se indica a continuación para cada forma farmacéutica especificada. Cuando la cantidad de fármaco en una única unidad de dosificación difiera de la cantidad requerida para la *Valoración*, ajustar el grado de dilución de las soluciones y/o el volumen de las alícuotas de manera que la concentración de los fármacos en la solución final sea del mismo orden que la obtenida en el procedimiento de *Valoración*; o, en el caso de una volumetría, usar una solución volumétrica de distinta concentración, si fuera necesario, de manera que se requiera un volumen adecuado de solución volumétrica (ver *Volumetría* (541)); ver también *Procedimientos* en *Pruebas y Valoraciones* en *Advertencias y Requisitos Generales*. Si se realizan tales modificaciones en el procedimiento de *Valoración* establecido en la monografía individual, hacer los cambios correspondientes en la fórmula de cálculo y en el factor de valoración volumétrica.

Cuando se especifica un *Procedimiento especial para uniformidad de contenido* en la prueba de *Uniformidad de unidades de dosificación* en la monografía individual, hacer las correcciones necesarias de los resultados obtenidos como se indica a continuación.

- (1) Preparar una muestra compuesta por un número suficiente de unidades de dosificación para proporcionar la cantidad de muestra requerida en la *Valoración* en la monografía individual más la cantidad requerida para el *Procedimiento especial para uniformidad de contenido* en la monografía, reduciendo a polvo fino las tabletas o mezclando el contenido de las cápsulas o las soluciones orales, las suspensiones, las emulsiones, los geles o los sólidos en envases unitarios para obtener una mezcla homogénea. Si no se puede obtener una mezcla homogénea de

Tabla 1. Aplicación de las Pruebas de Uniformidad de Contenido (UC) y Variación de Peso (VP) para Formas Farmacéuticas

Forma Farmacéutica	Tipo	Subtipo	Dosis y Proporción de Fármaco	
			≥25 mg y ≥25%	<25 mg o <25%
Tabletas	Sin cubierta		VP	UC
	Recubiertas	Película	VP	UC
		Otras	UC	UC
Cápsulas	Duras		VP	UC
	Blandas	Suspensión, emulsión o gel	UC	UC
		Soluciones	VP	VP
Sólidos en envases unitarios	Componente único		VP	VP
	Varios componentes	Solución liofilizada en envase final	VP	VP
		Otros	UC	UC
Suspensión, emulsión o gel para uso sistémico exclusivamente, envasado en envases unitarios			UC	UC
Soluciones para inhalación envasadas en ampollas de vidrio o de plástico y destinadas para usar en nebulizadores, y soluciones orales envasadas en envases de dosis única y en cápsulas blandas			VP	VP
Inhalaciones (que no sean soluciones para inhalación envasadas en ampollas de vidrio o de plástico y destinadas para usar en nebulizadores) envasadas en unidades de dosificación prefijadas			UC	UC
Sistemas transdérmicos			UC	UC
Supositorios			UC	UC
Otros			UC	UC

esta manera, emplear disolventes adecuados u otros procedimientos para preparar una solución que contenga todo el fármaco y usar alícuotas apropiadas de esta solución para los procedimientos especificados.

- (2) Valorar porciones separadas, medidas con exactitud, de la muestra compuesta de cápsulas o tabletas o suspensiones o inhalaciones o sólidos en envases unitarios, (a) como se indica en *Valoración* y (b) empleando el *Procedimiento especial para uniformidad de contenido* en la monografía.
- (3) Calcular el peso del fármaco equivalente a 1 unidad de dosificación promedio, usando: (a) los resultados obtenidos mediante el procedimiento de *Valoración* y (b) los resultados obtenidos mediante el procedimiento especial.
- (4) Calcular el factor de corrección, F , por la fórmula:

$$F = W/P$$

en donde W es el peso del fármaco equivalente a 1 unidad de dosificación promedio obtenido mediante el procedimiento de *Valoración* y P es el peso del fármaco equivalente a 1 unidad de dosificación promedio obtenido mediante el procedimiento especial. Si

$$\frac{100|W - P|}{W}$$

es mayor de 10, el uso de un factor de corrección no es válido.

- (5) El factor de corrección sólo se aplica si F no es menor de 1,030 ni mayor de 1,100, o no es menor de 0,900 ni mayor de 0,970. Si F está comprendido entre 0,970 y 1,030, no se requiere corrección.

- (6) Si F está entre 1,030 y 1,100, o entre 0,900 y 0,970, calcular el peso del fármaco en cada unidad de dosificación multiplicando por F cada uno de los pesos hallados usando el procedimiento especial.

Tabletas Sin Cubierta, Recubiertas o Moldeadas, Cápsulas, Soluciones Orales en •Envases de Dosis Única, Suspensiones, Emulsiones o Geles en Envases Unitarios (destinadas exclusivamente para administración sistémica),^{1S (USP30)} y Sólidos (incluidos Sólidos Estériles) en Envases Unitarios—Valorar 10 unidades individualmente como se indica en *Valoración* en la monografía individual, a menos que se especifique algo diferente en *Procedimiento para uniformidad de contenido* en la monografía individual. Calcular el valor de aceptación como se indica a continuación.

Para soluciones orales •en envases de dosis única y para suspensiones, emulsiones o geles en envases unitarios destinados exclusivamente para administración sistémica,^{1S (USP30)} realizar la *Valoración* sobre la cantidad de material bien mezclado que escurre de un envase individual en no más de 5 segundos o, para productos con valores altos de viscosidad, realizar la *Valoración* sobre la cantidad de material bien mezclado que se obtiene retirando cuantitativamente el contenido de un envase individual y expresar los resultados como la dosis entregada.

Cálculo del Valor de Aceptación—Calcular el valor de aceptación, por la fórmula:

$$|M - \bar{X}| + ks$$

en donde los términos se definen en la *Tabla 2*.

Supositorios, Sistemas Transdérmicos e Inhalaciones Envasados en Unidades de Dosis Fija—[NOTA—Para estas formas farmacéuticas no se requiere el cálculo de valores de aceptación.] Valorar 10 unidades individualmente como se indica en *Valoración* en la monografía individual, a menos que se indique algo diferente en *Procedimiento para uniformidad de contenido*.

Cambio en la redacción:

VARIACIÓN DE PESO

Seleccionar no menos de 30 unidades de dosificación y proceder como se indica a continuación para la forma farmacéutica especificada. El resultado de la *Valoración*, obtenido como se indica en la monografía individual, se designa como resultado *A*, y se expresa como % de la cantidad declarada (ver *Cálculo del Valor de Aceptación*). Suponer que la concentración (el peso del fármaco por el peso de la unidad de dosificación) es uniforme. [NOTA—Para determinaciones de valoración se pueden extraer del mismo lote muestras diferentes de estas unidades de prueba.]

Tabletas sin Cubierta o Recubiertas con Película—Pesar con exactitud 10 tabletas individualmente. Calcular el contenido de fármaco de cada tableta, expresado como % de la cantidad declarada, a partir del peso de la tableta individual y del resultado de la *Valoración*. Calcular el valor de aceptación.

Cápsulas Duras—Pesar con exactitud 10 cápsulas individualmente, teniendo cuidado de preservar la identidad de cada cápsula. Retirar el contenido de cada cápsula por un medio adecuado. Pesar individualmente con exactitud las cubiertas vacías y calcular para cada cápsula el peso neto de su contenido restando el peso de la cubierta del peso bruto respectivo. Calcular el contenido de fármaco de cada cápsula, expresado como % de la cantidad declarada, a partir del peso neto del contenido de la cápsula individual y del resultado de la *Valoración*. Calcular el valor de aceptación.

Cápsulas Blandas—Pesar con exactitud 10 cápsulas intactas individualmente para obtener sus pesos brutos, teniendo cuidado de preservar la identidad de cada cápsula. Luego cortar y abrir las cápsulas con ayuda de un instrumento cortante seco, limpio y adecuado, como por ejemplo una tijera o una cuchilla afilada, y retirar el contenido lavando con un disolvente adecuado. Dejar que el disolvente ocluido se evapore de las cubiertas a temperatura ambiente durante un período de aproximadamente 30 minutos, tomando precauciones para evitar la absorción o la pérdida de humedad. Pesar las cubiertas individuales y calcular el contenido neto. Calcular el contenido de fármaco en cada cápsula, expresado como % de la cantidad declarada, a partir del peso neto del producto retirado de la cápsula individual y del resultado de la *Valoración*. Calcular el valor de aceptación.

Sólidos (Incluidos los Sólidos Estériles) en Envases Unitarios—Proceder como se indica para *Cápsulas Duras*, tratando cada unidad como allí se describe. Calcular el valor de aceptación.

Soluciones Orales Envasadas en Envases •de Dosis Única•_{1S} (USP30)—Pesar con exactitud la cantidad de líquido que escurre durante no más de 5 segundos de cada uno de 10 envases individuales. Si fuera necesario, calcular el volumen equivalente después de determinar la densidad. Calcular el contenido de fármaco del líquido que escurre de cada unidad, expresado como % de la cantidad declarada, a partir del peso neto del contenido del envase individual y del resultado de la *Valoración*. Calcular el valor de aceptación.

Cálculo del Valor de Aceptación—Calcular el valor de aceptación como se muestra en *Uniformidad de Contenido* con la excepción de que el contenido individual de las unidades se reemplaza por el contenido estimado individual, como se define más adelante.

$$\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_n = \text{contenido estimado individual de las unidades analizadas, en donde } \chi_i = w_i \times A / \bar{W},$$

$$\begin{aligned} w_1, w_2, \dots, w_n &= \text{pesos individuales de las unidades analizadas, •por variación de peso, •}_{1S} \text{ (USP30)} \\ A &= \text{contenido de fármaco (\% de la cantidad declarada) determinado como se describe en la } Valoración \text{ y} \\ \bar{W} &= \text{media de pesos individuales } (w_1, w_2, \dots, w_n) \text{ •de las unidades utilizadas en la } Valoración. \bullet_{1S} \text{ (USP30)} \end{aligned}$$

Soluciones para Inhalación Envasadas en Ampollas de Vidrio o de Plástico y Destinadas para Usar en Nebulizadores—[NOTA—Para estas formas farmacéuticas no se requiere el cálculo de valores de aceptación.] Pesar con exactitud 10 envases individualmente, teniendo cuidado de preservar la identidad de cada envase. Retirar el contenido de cada envase por un medio adecuado. Pesar individualmente con exactitud los envases vacíos y calcular para cada envase el peso neto de su contenido, restando el peso del envase del peso bruto respectivo. A partir de los resultados de la *Valoración*, obtenidos como se indica en la monografía individual, calcular el contenido de fármaco, expresado como % de la cantidad declarada, en cada uno de los envases.

Cambio en la redacción:

CRITERIOS

Aplicar los siguientes criterios, a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual.

Tabletas Sin Cubierta, Recubiertas o Moldeadas, Cápsulas, Soluciones Orales en •Envases de Dosis Única, Suspensiones, Emulsiones o Geles en Envases Unitarios (destinadas exclusivamente para administración sistémica)•_{1S} (USP30) y **Sólidos (incluidos Sólidos Estériles) en Envases Unitarios**—Se cumple con los requisitos de uniformidad de dosificación si el valor de aceptación de las primeras 10 unidades de dosificación es menor o igual a *L1*%. Si el valor de aceptación es mayor que *L1*%, analizar las siguientes 20 unidades y calcular el valor de aceptación. Se cumple con los requisitos si el valor de aceptación final de las 30 unidades de dosificación es menor o igual a *L1*%, y si el contenido individual de ninguna unidad de dosificación es menor de $\bullet[1 - (0,01)(L2)] M_{\bullet 1S} \text{ (USP30)}$ ni mayor de $\bullet[1 + (0,01)(L2)] M_{\bullet 1S} \text{ (USP30)}$ como se especifica en *Cálculo del Valor de Aceptación* en *Uniformidad de Contenido* o en *Variación de Peso*. A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, *L1* es 15,0 y *L2* es 25,0.

Supositorios—

Límite A (si el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual es 100,0 por ciento o menos)—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, los requisitos para uniformidad de dosificación se cumplen si la cantidad de fármaco en cada una de las 10 unidades de dosificación, como se determina en el método de *Uniformidad de Contenido*, están comprendidas entre 85,0% y 115,0% de la cantidad declarada, y la RSD es menor o igual a 6,0%.

Si 1 unidad está fuera del intervalo de 85,0% a 115,0% de la cantidad declarada y ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0% a 125,0% de la cantidad declarada, o si la RSD es más de 6,0%, o si ambas condiciones prevalecen, analizar 20 unidades adicionales. Los requisitos se cumplen si no más de 1 unidad de las 30 está fuera del intervalo de 85,0% a 115,0% de la cantidad declarada y ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0% a 125,0% de la cantidad declarada y la RSD de 30 unidades de dosificación no es más de 7,8%.

Límite B (si el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual es más de 100,0 por ciento)—

Tabla 2

Variable	Definición	Condiciones	Valor
\bar{X}	Media de los contenidos individuales ($\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_n$), expresados como el porcentaje de la cantidad declarada		
$\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_n$	Contenido individual de las unidades analizadas, expresado como porcentaje de la cantidad declarada		
n	Tamaño de la muestra (número de unidades en una muestra)		
k	Constante de aceptabilidad	Si $n = 10$, entonces $k =$ Si $n = 30$, entonces $k =$	2,4 2,0
s	Desviación estándar de la muestra		$\left[\frac{\sum_{i=1}^n (\chi_i - \bar{X})^2}{n-1} \right]^{\frac{1}{2}}$
<i>RSD</i>	Desviación estándar relativa (la desviación estándar de la muestra expresada como porcentaje de la media)		$\frac{100s}{\bar{X}}$
M (caso 1) a aplicar cuando $T \leq 101,5$	Valor de referencia	Si $98,5\% \leq \bar{X} \leq 101,5\%$, entonces	$M = \bar{X}$ ($AV = ks$)
		Si $\bar{X} < 98,5\%$, entonces	$M = 98,5\%$ ($AV = 98,5 - \bar{X} + ks$)
		Si $\bar{X} > 101,5\%$, entonces	$M = 101,5\%$ ($AV = \bar{X} - 101,5 + ks$)
M (caso 2) a aplicar cuando $T > 101,5$	Valor de referencia	Si $98,5 \leq \bar{X} \leq T$, entonces	$M = \bar{X}$ ($AV = ks$)
		Si $\bar{X} < 98,5\%$, entonces	$M = 98,5\%$ ($AV = 98,5 - \bar{X} + ks$)
		Si $\bar{X} > T$, entonces	$M = T\%$ ($AV = \bar{X} - T + ks$)

Tabla 2 (Continuación)

Variable	Definición	Condiciones	Valor
Valor de Aceptación (AV)			fórmula general: $ M - \overline{X} + ks$ (Más arriba se especifican cálculos para cada uno de los casos.)
L1	Máximo valor de aceptación permitido		L1 = 15,0 a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual
L2	Máximo intervalo permitido para la desviación de cada unidad de dosificación analizada a partir del valor calculado de M	Para los valores inferiores, ningún resultado de unidad de dosificación puede ser menor de $\lceil [1 - (0,01)(L2)]M_{\blacksquare IS (USP30)} \rceil$ menos que para los valores superiores ningún resultado de unidad de dosificación puede ser mayor de $\lceil [1 + (0,01)(L2)]M_{\blacksquare IS (USP30)} \rceil$ (Esto está basado en un valor de L2 de 25,0.)	L2 = 25,0 a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual
T	\blacksquare Contenido $\blacksquare_{IS (USP30)}$ deseado \blacksquare por unidad de dosificación al momento de la fabricación, expresado como porcentaje de la cantidad declarada. $\blacksquare_{IS (USP30)}$ A los efectos de esta Farmacopea, a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, T es \blacksquare el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual al $\blacksquare_{IS (USP30)}$		

- (1) Si el valor promedio de las unidades de dosificación analizadas es 100,0 por ciento o menos, los requisitos son los especificados en el *Límite A*.
- (2) Si el valor promedio de las unidades de dosificación analizadas es mayor o igual al promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual, los requisitos son los especificados en el *Límite A*, excepto que la frase “cantidad declarada” se reemplaza por la frase “cantidad declarada multiplicada por el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual dividido por 100”.
- (3) Si el valor promedio de las unidades de dosificación analizadas está entre 100 por ciento y el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual, los requisitos son los especificados en el *Límite A*, excepto que la frase “cantidad declarada” se reemplaza por la frase “cantidad declarada multiplicada por el valor promedio de las unidades de dosificación analizadas (expresado como un porcentaje de la cantidad declarada) dividido por 100”.

Sistemas Transdérmicos e Inhalaciones Envasadas en Unidades de Dosis Fija—

Límite A (si el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual es 100,0 por ciento o menos)—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se cumple con los requisitos de uniformidad de dosificación si la cantidad de fármaco en no menos de 9 de las 10 unidades de dosificación, como se determina a partir del método *Uniformidad de Contenido* (o en el caso de soluciones para inhalación envasadas en ampollas de vidrio o de plástico y destinadas para usar en nebulizadores, a partir ya sea del método de *Uniformidad de Contenido* o del método *Variación de Peso*), está comprendida en el intervalo de 85,0% a 115,0% de la cantidad declarada, y ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0% a 125,0% de la cantidad declarada y la RSD de las 10 unidades de dosificación es menor o igual a 6,0%.

Si 2 ó 3 unidades de dosificación están fuera del intervalo de 85,0% a 115,0% de la cantidad declarada pero no fuera del intervalo de 75,0% a 125,0% de la cantidad declarada, o si la RSD es más de 6,0%, o si ambas condiciones prevalecen, analizar 20 unidades adicionales. Los requisitos se cumplen si no más de 3 unidades de las 30 están fuera del intervalo de 85,0% a 115,0% de la cantidad declarada y ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0% a 125,0% de la cantidad declarada y la RSD de las 30 unidades de dosificación no excede de 7,8%.

Límite B (si el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual es más de 100,0 por ciento)—

- (1) Si el valor promedio de las unidades de dosificación analizadas es 100,0 por ciento o menos, los requisitos son los especificados en el *Límite A*.
- (2) Si el valor promedio de las unidades de dosificación analizadas es mayor o igual al promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual, los requisitos son los especificados en el *Límite A*, excepto que la frase “cantidad declarada” se reemplaza por la frase “cantidad declarada multiplicada por el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual dividido por 100”.
- (3) Si el valor promedio de las unidades de dosificación analizadas está entre 100 por ciento y el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía individual, los requisitos son los especificados en el *Límite A*, excepto que la frase “cantidad declarada” se reemplaza por la frase “cantidad declarada multiplicada por el valor promedio de las unidades de dosificación analizadas (expresado como un porcentaje de la cantidad declarada) dividido por 100”.

(921) DETERMINACIÓN DE AGUA

Cambio en la redacción:

MÉTODO I (VOLUMÉTRICO)

Determinar el agua mediante el *Método Ia*, a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual.

Método Ia (Valoración Volumétrica Directa)

Principio—La determinación volumétrica del agua está basada en la reacción cuantitativa del agua con una solución anhidra de dióxido de azufre y yodo en presencia de una solución amortiguadora que reacciona con los iones hidrógeno.

En la solución volumétrica original, conocida como Reactivo de Karl Fischer, el dióxido de azufre y el yodo se disuelven en piridina y metanol. La muestra de prueba puede valorarse volumétricamente con el *Reactivo* directamente o el análisis puede realizarse mediante un procedimiento de volumetría residual. La estequiometría de la reacción no es exacta y la reproducibilidad de la determinación depende de factores tales como las concentraciones relativas de los ingredientes del *Reactivo*, la naturaleza del disolvente inerte utilizado para disolver la muestra y la técnica utilizada en la determinación en cuestión. Por lo tanto, para conseguir la exactitud deseada se utiliza una técnica empíricamente estandarizada. La precisión del método depende en gran parte de la medida en que la humedad atmosférica es eliminada del sistema. Normalmente la volumetría del agua se realiza utilizando metanol anhidro como disolvente para la muestra de prueba, aunque también pueden utilizarse otros disolventes adecuados para muestras de prueba especiales o no habituales.

Aparato—Puede utilizarse cualquier aparato que garantice una exclusión de la humedad atmosférica y una determinación del punto final adecuadas. En el caso de valoraciones volumétricas directas de una solución incolora, el punto final se puede observar visualmente como un cambio de color de amarillo canario a ámbar. El caso inverso se observa cuando se realiza una volumetría residual de una muestra de prueba. Sin embargo, de forma más habitual el punto final se determina de forma electrométrica utilizando un aparato con un circuito eléctrico simple que genera un potencial aplicado de aproximadamente 200 mV entre un par de electrodos de platino sumergidos en la solución que se desea valorar volumétricamente. En el punto final de la volumetría un ligero exceso de reactivo aumenta el flujo de corriente entre 50 y 150 microamperios durante un período de 30 segundos a 30 minutos, dependiendo de la solución que se esté valorando volumétricamente. Este período es menor en el caso de sustancias que se disuelven en el reactivo. En algunos tituladores automáticos el cambio abrupto de corriente o de potencial en el punto final hace cerrar una válvula operada por solenoide que controla la bureta que suministra la solución volumétrica. Los aparatos comerciales generalmente comprenden un sistema cerrado que consta de una o dos buretas automáticas y un vaso para la volumetría cubierto herméticamente equipado con los electrodos necesarios y un mezclador magnético. El aire en el sistema se mantiene seco con un desecante adecuado y el vaso para la volumetría puede purgarse mediante una corriente de nitrógeno seco o de aire seco.

Reactivo—Preparar el Reactivo de Karl Fischer como se indica a continuación. Agregar 125 g de yodo a una solución que contenga 670 mL de metanol y 170 mL de piridina y enfriar. Colocar 100 mL de piridina en una probeta graduada de 250 mL y, manteniendo la piridina fría en un baño de hielo, introducir dióxido de azufre seco hasta alcanzar un volumen de 200 mL. Agregar lentamente esta solución, agitando, a la mezcla de yodo enfriada. Agitar para disolver el yodo, transferir la solución al aparato y dejar la solución en reposo durante la noche antes de estandarizar. Un mL de esta

solución recién preparada equivale aproximadamente a 5 mg de agua. La solución se deteriora gradualmente, por lo que se recomienda estandarizarla dentro de un periodo de 1 hora antes de su uso o diariamente si su uso es continuo. Proteger la solución de la luz mientras se esté utilizando. Conservar el reactivo a granel en un recipiente adecuado sellado y con tapón de vidrio, totalmente protegido de la luz y refrigerado.

Puede utilizarse una solución estabilizada de reactivo de tipo Karl Fischer disponible comercialmente. También pueden utilizarse reactivos disponibles comercialmente que contengan disolventes o bases diferentes a la piridina o alcoholes diferentes al metanol. Estos pueden ser soluciones individuales o reactivos creados in situ combinando los componentes de los reactivos presentes en dos soluciones distintas. El *Reactivo* diluido requerido en algunas monografías debe diluirse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como diluyente puede utilizarse metanol u otro disolvente adecuado, como el éter monometílico de etilenglicol.

Preparación de Prueba—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, utilizar una cantidad pesada o medida con exactitud de la muestra en análisis con un contenido de agua estimado de $\square 2$ a 250 mg. La cantidad de agua depende del factor de equivalencia de agua del *Reactivo* y del método de determinación del punto final. En la mayoría de los casos, se puede calcular la cantidad mínima de la muestra, en mg, por la fórmula:

$$FCV/KF$$

en donde F es el factor de equivalencia de agua del *Reactivo*, en mg por mL; C es el volumen usado, en porcentaje, de la capacidad de la bureta; V es el volumen de la bureta, en mL; y KF es el límite o contenido razonable de agua esperado en la muestra, en porcentaje. C es entre 30% y 100% para la volumetría manual, y entre 10% y 100% para el método instrumental de determinación del punto final. \square_{1S} (USP30)

Si la muestra en análisis es un aerosol con propelente, conservarla en el congelador durante no menos de 2 horas, abrir el envase y analizar 10,0 mL de la muestra bien mezclada. Para valorar volumétricamente la muestra, determinar el punto final a una temperatura de 10° o mayor.

Si la muestra en análisis son cápsulas, utilizar una porción del contenido mezclado de no menos de 4 cápsulas.

Si la muestra en análisis son tabletas, utilizar el polvo de no menos de 4 tabletas molidas hasta polvo fino en una atmósfera con valores de temperatura y humedad relativa que se sepa que no afectan los resultados.

En los casos en los que la monografía especifique que la muestra en análisis es higroscópica, utilizar una jeringa seca para inyectar un volumen adecuado de metanol, u otro disolvente adecuado, medido con exactitud, a un recipiente tarado y agitar para disolver la muestra. Con la misma jeringa retirar la solución del recipiente y transferirla a un vaso de volumetría preparado según se indica en el *Procedimiento*. Repetir el procedimiento con una segunda porción de metanol, u otro disolvente adecuado, medido con exactitud, agregar el volumen de lavado al vaso de volumetría y valorar inmediatamente. Determinar el contenido de agua, en mg, de una porción de disolvente con el mismo volumen total que el utilizado para disolver la muestra y para lavar el recipiente y la jeringa, según se indica en *Estandarización de la Solución de Agua para Valoraciones Volumétricas Residuales*, y restar este valor del contenido de agua, en mg, obtenido en la volumetría de la muestra en análisis. Secar el recipiente y su cierre a 100° durante 3 horas, dejar enfriar en un desecador y pesar. Determinar el peso de la muestra analizada a partir de la diferencia en peso con respecto al peso inicial del recipiente.

Estandarización del Reactivo—Colocar una cantidad suficiente de metanol o de otro disolvente adecuado en el vaso de volumetría para cubrir los electrodos y agregar suficiente *Reactivo* para obtener el color del punto final característico, o 100 ± 50 microamperios de corriente continua con un potencial aplicado de aproximadamente 200 mV.

Para determinar cantidades de trazas de agua (menos de 1%) \square_{es} es preferible usar *Reactivo* con un factor de equivalencia de agua de no más de 2,0. Puede \square_{1S} (USP30) utilizarse tartrato de sodio como sustancia adecuada de referencia de agua. Agregar rápidamente de \square_{75} a 125 mg \square_{1S} (USP30) de tartrato de sodio ($C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$),

pesados con exactitud por diferencia, y valorar volumétricamente hasta el punto final. El factor de equivalencia de agua F , en mg de agua por mL de reactivo, se calcula por la fórmula:

$$2(18,02/230,08)(W/V)$$

en donde 18,02 y 230,08 son los pesos moleculares del agua y del tartrato de sodio dihidrato, respectivamente; W es el peso, en mg, del tartrato de sodio dihidrato; y V es el volumen, en mL, del *Reactivo* consumido en la segunda volumetría.

Para una determinación precisa de cantidades significativas de agua (1% o más), utilizar *Agua purificada* como sustancia de referencia. Agregar rápidamente entre 25 y 250 mg de agua, pesados con exactitud por diferencia, con una pipeta de pesada o con una jeringa o micropipeta precalibrada. La cantidad tomada depende de la concentración del reactivo y del tamaño de la bureta, como se indica en *Aparatos Volumétricos* (31). Valorar volumétricamente hasta el punto final. Calcular el factor de equivalencia de agua F , en mg de agua por mL de reactivo, por la fórmula:

$$W/V$$

en donde W es el peso, en mg, del agua; y V es el volumen, en mL, del reactivo necesario.

Procedimiento—A menos que se especifique algo diferente, transferir de 35 a 40 mL de metanol o de otro disolvente adecuado al vaso de volumetría y valorar con el *Reactivo* hasta el punto final electrométrico o visual para consumir la humedad que pudiera estar presente. (No tener en cuenta este volumen consumido, ya que no se utiliza en los cálculos). Agregar rápidamente la *Preparación de Prueba*, mezclar y volver a valorar volumétricamente con el *Reactivo* hasta el punto final electrométrico o visual. Calcular el contenido de agua de la muestra tomada, en mg, por la fórmula:

$$SF$$

en donde S es el volumen, en mL, del *Reactivo* consumido en la segunda volumetría; y F es el factor de equivalencia de agua del *Reactivo*.

Método Ib (Valoración Volumétrica Residual)

Principio—Ver la información que figura en la sección *Principio* en *Método Ia*. En la volumetría residual se agrega un exceso de *Reactivo* a la muestra de prueba, se espera un tiempo suficiente para que se complete la reacción y se valora volumétricamente el *Reactivo* no consumido con una solución estándar de agua en un disolvente como el metanol. El procedimiento de volumetría residual se aplica de forma general y evita los problemas que pueden surgir en la volumetría directa de aquellas sustancias en las que el agua unida se libera lentamente.

Aparato, Reactivo y Preparación de Prueba—Utilizar el *Método Ia*.

Estandarización de la Solución de Agua para Valoraciones Volumétricas Residuales—Preparar una *Solución de Agua* diluyendo 2 mL de agua con metanol u otro disolvente adecuado hasta 1000 mL. Estandarizar esta solución valorando volumétricamente 25,0 mL con el *Reactivo*, previamente estandarizado como se indica en *Estandarización del Reactivo*. Calcular el contenido de agua, en mg por mL, de la *Solución de Agua* tomada, por la fórmula:

$$V'F/25$$

en donde V' es el volumen del *Reactivo* consumido y F es el factor de equivalencia de agua del *Reactivo*. Determinar el contenido de agua de la *Solución de Agua* semanalmente y estandarizar periódicamente el *Reactivo* contra éste según sea necesario.

Procedimiento—Si la monografía individual especifica que el contenido de agua debe ser determinado por el *Método Ib*, transferir de 35 a 40 mL de metanol o de otro disolvente adecuado al vaso de volumetría y valorar con el *Reactivo* hasta el punto final electrométrico o visual. Agregar rápidamente la *Preparación de Prueba*, mezclar y agregar un exceso medido con exactitud de *Reactivo*. Esperar un tiempo suficiente para que se complete la reacción y valorar volumétricamente el *Reactivo* no consumido con

la *Solución de Agua* estandarizada hasta el punto final electrométrico o visual. Calcular el contenido de agua de la muestra tomada, en mg, por la fórmula:

$$F(X' - XR)$$

en donde F es el factor de equivalencia de agua del *Reactivo*; X' es el volumen, en mL, del *Reactivo* agregado después de introducir la muestra; X es el volumen, en mL, de la *Solución de Agua* estandarizada necesaria para neutralizar el *Reactivo* no consumido; y R es el cociente, $V/25$ (mL de *Reactivo*/mL de *Solución de Agua*), determinado a partir de la *Estandarización de la Solución de Agua para Valoraciones Volumétricas Residuales*.

Método Ic (Valoración Culombimétrica)

Principio—Para la determinación culombimétrica del agua se utiliza la reacción de Karl Fischer. El yodo, sin embargo, no se agrega en forma de solución volumétrica sino que se obtiene por oxidación anódica en una solución que contiene yoduro. La celda de reacción consta normalmente de un amplio compartimiento anódico y de un pequeño compartimiento catódico, separados entre sí por un diafragma. También pueden utilizarse otros tipos adecuados de celdas de reacción (p. ej., sin diafragma). Cada compartimiento tiene un electrodo de platino que conduce la corriente a través de la celda. El yodo, que se produce en el electrodo anódico, reacciona inmediatamente con el agua que está presente en el compartimiento. Cuando se ha consumido toda el agua, se produce un exceso de yodo que normalmente se detecta electrométricamente, lo que indica el punto final. La humedad se elimina del sistema mediante pre-electrólisis. No es necesario cambiar la solución de Karl Fischer después de cada determinación ya que las diferentes determinaciones pueden realizarse de forma sucesiva en la misma solución reactivo. Un requisito de este método es que cada componente de la muestra de prueba tiene que ser compatible con los demás componentes y que no se produzcan reacciones secundarias. Normalmente las muestras son transferidas al vaso en forma de solución mediante la inyección a través de un septo. Los gases se pueden introducir en la celda utilizando un tubo de entrada de gas adecuado. La precisión del método depende fundamentalmente del grado de eliminación de

la humedad atmosférica en el sistema; por tanto no se recomienda la introducción de sólidos en la celda salvo que se tomen serias precauciones tales como trabajar en una cámara cerrada en una atmósfera de gas inerte seco. El control del sistema se puede monitorizar midiendo el desplazamiento de la línea base. Este método es especialmente adecuado para sustancias químicas inertes como hidrocarburos, alcoholes y éteres. En comparación con la volumetría de Karl Fischer, la culombimetría es un micrométodo.

Aparato—Resulta adecuado cualquier aparato comercialmente disponible que conste de un sistema absolutamente hermético equipado con los electrodos necesarios y un mezclador magnético. El microprocesador del instrumento controla el procedimiento analítico y muestra los resultados. No es necesario calibrar el instrumento ya que la corriente consumida puede medirse de forma absoluta.

Reactivo—Ver *Reactivo* en *Método Ia*.

Preparación de prueba—Si la muestra es un sólido soluble, disolver una cantidad adecuada, pesada con exactitud, en metanol anhidro o en otros disolventes adecuados. Los líquidos pueden utilizarse tal cual o como soluciones preparadas con exactitud en disolventes anhidros adecuados.

Si la muestra es un sólido insoluble, el agua puede extraerse utilizando un disolvente anhidro adecuado del cual puede inyectarse una cantidad adecuada, pesada con exactitud, en la solución del anolito. De forma alternativa, puede utilizarse una técnica de evaporación en la que el agua se libera y se evapora calentando la muestra en un tubo en una corriente de gas inerte seco, pasando a continuación este gas a la celda.

Procedimiento—Con una jeringa seca, inyectar rápidamente en el anolito la *Preparación de Prueba*, medida con exactitud y con un contenido estimado de 0,5 a 5 mg de agua, o de acuerdo con las instrucciones del fabricante del instrumento, mezclar y realizar la valoración culombimétrica hasta el punto final electrométrico. Leer el contenido de agua de la *Preparación de Prueba* directamente en la pantalla del instrumento y calcular el porcentaje presente en la sustancia. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias.

Capítulos Generales

Información General

Eliminar lo siguiente:

■ (1047) ARTÍCULOS OBTENIDOS POR BIOTECNOLOGÍA— PRUEBAS

El advenimiento de fármacos macromoleculares obtenidos a través de procesos biotecnológicos ha producido un conjunto de pruebas y valoraciones especializadas para determinar la calidad, identidad, pureza y potencia de estos artículos, que se suman a los métodos tradicionalmente usados para otros productos farmacéuticos. Estas pruebas especiales que se presentan a continuación son el *Análisis de Aminoácidos*, la *Electroforesis Capilar*, el *Isoelectroenfoque*, el *Mapeo de Péptidos*, la *Electroforesis en Gel de Poliacrilamida* y la *Valoración de Proteínas Totales*.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

El análisis de aminoácidos se refiere a la metodología usada para determinar la composición o el contenido de aminoácidos de proteínas, péptidos y otras preparaciones farmacéuticas. Las proteínas y los péptidos son macromoléculas formadas por aminoácidos unidos covalentemente organizados como polímeros lineales. La secuencia de los aminoácidos en una proteína o un péptido determina las propiedades de la molécula. Las proteínas se consideran moléculas grandes que existen comúnmente como estructuras plegadas con una conformación específica, mientras que los péptidos son más pequeños y pueden estar formados por pocos aminoácidos. El análisis de aminoácidos se puede usar para cuantificar proteínas y péptidos, para determinar la identidad de proteínas o péptidos basándose en su composición de aminoácidos, para respaldar el análisis estructural de proteínas y péptidos, para evaluar estrategias de fragmentación para el mapeo de péptidos y para detectar aminoácidos atípicos presentes en una proteína o un péptido. Antes del análisis de aminoácidos, es necesario hidrolizar una proteína o péptido descomponiéndolo en sus aminoácidos constituyentes. Después de la hidrólisis de la proteína o el péptido, el procedimiento de análisis de aminoácidos puede ser igual al utilizado para aminoácidos libres en otras preparaciones farmacéuticas. Los aminoácidos constituyentes de la muestra de prueba normalmente se derivatizan para su análisis.

Aparatos

Los métodos usados para el análisis de aminoácidos por lo general se basan en una separación cromatográfica de los aminoácidos presentes en la muestra de prueba. Las técnicas actuales aprovechan

la instrumentación cromatográfica automatizada diseñada para las metodologías analíticas. Un instrumento de análisis de aminoácidos típico es un cromatógrafo de líquidos de baja presión o de alta presión, capaz de generar gradientes de fase móvil que separan los aminoácidos en una columna cromatográfica. El instrumento debe tener la capacidad de derivatizar los aminoácidos después de pasar por la columna, a menos que la muestra se analice con derivatización anterior a la columna. El detector generalmente es de luz UV-visible o de fluorescencia, según el método de derivatización usado. Se usa un dispositivo de registro (por ejemplo, un integrador) para transformar la señal analógica del detector y para la cuantificación. Es preferible que los instrumentos utilizados para el análisis de aminoácidos se destinen específicamente a esos fines.

Precauciones Generales

La contaminación es siempre una preocupación en el análisis de aminoácidos. Se requieren reactivos de alta pureza (por ejemplo, el ácido clorhídrico de baja pureza puede contribuir a la contaminación con glicina). Los reactivos analíticos se cambian rutinariamente cada varias semanas y se usan solamente disolventes para cromatografía de líquidos de alta presión (grado HPLC). La posible contaminación microbiana y los materiales extraños presentes en los disolventes se reducen por filtración antes de usarlos, cubriendo los recipientes y colocando el instrumental para análisis de aminoácidos alejado de la luz solar directa.

Las prácticas de laboratorio pueden determinar la calidad del análisis de aminoácidos. Colocar los instrumentos en una zona de poco tránsito del laboratorio. Mantener limpio el laboratorio. Hay que limpiar y calibrar las pipetas según un plan de mantenimiento. Mantener las puntas de las pipetas en una caja cubierta; los analistas no deben manipular las puntas de las pipetas con las manos. Los analistas pueden usar guantes de látex sin polvo o similares. Limitar la cantidad de veces que se abre y se cierra un vial de muestra ya que el polvo puede hacer que aparezcan niveles elevados de glicina, serina y alanina.

Se necesitan instrumentos bien mantenidos para que los resultados de los análisis de aminoácidos sean aceptables. Si el instrumento se usa de modo rutinario, se debe revisar diariamente para detectar pérdidas, verificar la estabilidad del detector y la lámpara y la capacidad de la columna para lograr una buena resolución de los aminoácidos individuales. Limpiar o reemplazar, de acuerdo a un plan de rutina, todos los filtros de los instrumentos y demás artículos de mantenimiento.

Material Estándar de Referencia

Los estándares de aminoácidos aptos para este tipo de análisis están disponibles comercialmente¹ y consisten generalmente en una mezcla acuosa de aminoácidos. Cuando se determina la composición de aminoácidos, estándares de proteínas o péptidos se analizan junto con el material de prueba como un control para demostrar la

¹ Los estándares adecuados se pueden obtener de NIST (Gaithersburg, MD), Beckman Instruments (Fullerton, CA), Sigma Chemical (St. Louis, MO), Pierce (Rockford, IL) o Hewlett-Packard.

integridad de todo el procedimiento. Para este propósito, se ha usado seroalbúmina bovina altamente purificada como estándar de proteína.

Calibración de los Instrumentos

La calibración del instrumental para análisis de aminoácidos por lo general involucra el análisis de estándares de aminoácidos, que son una mezcla de aminoácidos de varias concentraciones, para determinar el factor de respuesta y el intervalo de análisis de cada aminoácido. Se conoce la concentración de cada aminoácido en el estándar. En el procedimiento de calibración, el analista diluye el estándar de aminoácidos para obtener distintos niveles de concentración de analito dentro del intervalo lineal esperado de la técnica de análisis de aminoácidos. Luego, se analizan repetidamente las diversas concentraciones de analito. Las áreas de los picos obtenidos para cada aminoácido se grafican en función de la concentración conocida para cada uno de los aminoácidos en la dilución estándar. Estos resultados permiten al analista determinar el intervalo de concentraciones de aminoácidos donde el área del pico de cada aminoácido es una función aproximadamente lineal de su concentración. Es importante que el analista prepare las muestras para el análisis de aminoácidos de manera que estén dentro de los límites analíticos (por ejemplo, intervalo de trabajo lineal) de la técnica empleada a fin de obtener resultados exactos y repetibles.

Se analizan de cuatro a seis concentraciones del estándar de aminoácidos para determinar un factor de respuesta para cada aminoácido. El factor de respuesta se calcula como el área del pico o la altura del pico promedio por nmol de aminoácido presente en el estándar. Para calcular la concentración de cada aminoácido presente en la muestra de prueba se prepara y se usa un registro de calibración con el factor de respuesta de cada aminoácido. En este cálculo se divide el área del pico de un aminoácido dado por su correspondiente factor de respuesta, y se obtienen así los nmol del aminoácido. Para los análisis de rutina, basta una calibración de un solo punto; sin embargo, el archivo de calibración se actualiza frecuentemente y se prueba por análisis de controles analíticos para asegurar su integridad.

Repetibilidad

Los resultados uniformes y de alta calidad de los análisis de aminoácidos de un laboratorio analítico exigen prestar atención a la repetibilidad de la valoración. Durante el análisis de la separación cromatográfica de los aminoácidos o sus derivados, se observan numerosos picos en el cromatograma. El gran número de picos exige un sistema de análisis de aminoácidos que los pueda identificar repetidamente basándose en el tiempo de retención e integrar las áreas de los picos para la cuantificación. Una evaluación de repetibilidad típica involucra la preparación de una solución de aminoácidos estándar y el análisis de varias determinaciones repetidas (es decir, seis análisis o más) de la misma solución estándar. La desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) se determina para el tiempo de retención y el área del pico integrada de cada aminoácido. La evaluación de la repetibilidad se amplía incluyendo múltiples valoraciones realizadas durante varios días por distintos analistas. Las múltiples valoraciones incluyen la preparación de diluciones estándar a partir de materiales iniciales para determinar la variación debida a la manipulación de la muestra. A menudo, la composición de aminoácidos de una proteína estándar (por ejemplo, seroalbúmina bovina) se analiza como parte de la evaluación de repetibilidad. La evaluación de la variación de determinaciones repetidas (es decir, la RSD) permite al laboratorio establecer límites analíticos para asegurar que sus análisis se encuentren bajo control. Es conveniente establecer los límites de variación mínimos practicables para asegurar los mejores resultados. Para disminuir la variabilidad del análisis de aminoácidos, conviene enfocarse en la preparación de la muestra, la elevada interferencia espectral de fondo debida a la calidad de los reactivos o las prácticas del laboratorio, el desempeño y mantenimiento de los instrumentos, el análisis y la interpretación de los datos y el desempeño y los hábitos del analista. Todos los parámetros se investigan a fondo como parte del trabajo de validación.

Preparación de la Muestra

La obtención de resultados exactos del análisis de aminoácidos exige muestras purificadas de proteínas y péptidos. Los componentes de una solución amortiguadora (por ejemplo, sales, urea, detergentes) pueden interferir con el análisis de aminoácidos y se eliminan de la muestra antes del análisis. Los métodos que derivatizan los aminoácidos después de su paso por la columna no se ven tan afectados generalmente por los componentes de la solución amortiguadora como se observa en los métodos de derivatización anteriores a la columna. Es conveniente limitar las manipulaciones de las muestras con el fin de reducir la posible contaminación de fondo, para mejorar la recuperación de analitos y para reducir el trabajo. Las técnicas comunes empleadas para eliminar los componentes de las soluciones amortiguadoras del pH de las muestras de proteínas incluyen: (1) inyectar la muestra de proteína en un sistema HPLC en fase reversa, extrayendo la proteína con un disolvente volátil que contenga suficiente componente orgánico y secando la muestra en una centrifuga de vacío; (2) diálisis contra una solución amortiguadora del pH volátil o agua; (3) ultrafiltración centrifuga para el reemplazo de la solución amortiguadora del pH por una solución amortiguadora del pH volátil o agua; (4) precipitar la proteína de la solución amortiguadora del pH usando un disolvente orgánico (por ejemplo: acetona); y (5) filtración con gel.

Estándares Internos

Se recomienda usar un estándar interno para controlar las pérdidas y variaciones físicas y químicas durante el análisis de aminoácidos. Antes de la hidrólisis, se puede agregar a la solución de proteína una cantidad de estándar interno conocida con exactitud. La recuperación del estándar interno indica la recuperación general de los aminoácidos de la solución de proteína. Sin embargo, los aminoácidos libres no se comportan igual que los aminoácidos unidos a proteínas durante la hidrólisis ya que sus velocidades de liberación o destrucción son variables. Por lo tanto, el uso de un estándar interno para corregir las pérdidas durante la hidrólisis puede proporcionar resultados no confiables. Hay que tener en cuenta este punto cuando se interpretan los resultados. También se pueden agregar estándares internos a la mezcla de aminoácidos después de la hidrólisis para corregir por las diferencias en la aplicación de las muestras y los cambios en la estabilidad del reactivo y las velocidades de flujo. Idealmente, un estándar interno es un aminoácido primario que no se encuentra naturalmente y que está disponible comercialmente a bajo precio. También debe ser estable durante la hidrólisis, su factor de respuesta debe ser función lineal de su concentración y debe eluir con un tiempo de retención único, sin superponerse con otros aminoácidos. Los estándares de aminoácidos comúnmente empleados incluyen la norleucina, la nitrotirosina y el ácido α -aminobutírico.

Hidrólisis de Proteínas

La hidrólisis de muestras de proteínas y péptidos es necesaria para el análisis de aminoácidos de estas moléculas. El material de vidrio usado para la hidrólisis debe estar muy limpio para evitar resultados erróneos. Los polvos para guantes y las huellas dactilares en los tubos de hidrólisis pueden causar contaminación. Para limpiar los tubos de vidrio para hidrólisis, hay que hervir los tubos durante 1 hora en ácido clorhídrico 1N o sumergirlos en ácido nítrico concentrado o en una mezcla de ácido clorhídrico concentrado y ácido nítrico concentrado (1:1). Los tubos de hidrólisis limpios se enjuagan con agua de alta pureza, seguido por un enjuague con metanol de grado HPLC, se secan de un día para el otro en una estufa y se almacenan cubiertos hasta su uso. Alternativamente, el material de vidrio limpio se puede someter a pirólisis a 500° durante 4 horas para eliminar la contaminación de los tubos para hidrólisis. También se puede usar material de laboratorio desechable adecuado.

La hidrólisis ácida es el método más común para hidrolizar una muestra de proteína antes del análisis de aminoácidos. La técnica de hidrólisis ácida puede aumentar la variabilidad del análisis debido a la destrucción completa o parcial de varios aminoácidos. El triptófano se destruye; la serina y la treonina se destruyen

parcialmente; la metionina puede oxidarse; y la cisteína típicamente se recupera como cistina (pero la recuperación de la cistina suele ser mala debido a la destrucción o reducción parcial a cisteína). La aplicación de vacío adecuado (menos de 200 µm de mercurio o 26,7 Pa) o la introducción de un gas inerte (argón) en la cámara gaseosa superior del recipiente de reacción puede reducir la destrucción oxidativa. En las uniones peptídicas que involucran isoleucina y valina, las uniones amida de Ile-Ile, Val-Val, Ile-Val y Val-Ile se escinden parcialmente; y la asparagina y la glutamina se desamidan, dando como resultado ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente. La pérdida de triptófano, asparagina y glutamina durante una hidrólisis ácida limita la cuantificación a 17 aminoácidos. Algunas de las técnicas de hidrólisis descritas se usan para tratar estos problemas. Algunas de las técnicas de hidrólisis descritas (es decir, los *Métodos 4–11*) pueden modificar otros aminoácidos. Por lo tanto, hay que considerar las ventajas de usar una técnica de hidrólisis en comparación con sus problemas; estas ventajas se analizan adecuadamente antes de emplear un método que no sea la hidrólisis ácida.

A menudo se emplea un estudio en función del tiempo (es decir, un análisis de aminoácidos con tiempos de hidrólisis ácida de 24, 48 y 72 horas) para analizar la concentración inicial de aminoácidos que se destruyen parcialmente o que se escinden lentamente. Al graficar la concentración observada de aminoácidos lábiles (es decir, serina y treonina) en función del tiempo de hidrólisis, se puede extrapolar la línea hasta su origen para determinar la concentración inicial de estos aminoácidos. Los estudios de hidrólisis en función del tiempo también se usan con aminoácidos que se escinden lentamente (por ejemplo, isoleucina y valina). Durante el transcurso del tiempo de hidrólisis, el analista observa una meseta en estos residuos. El nivel de esta meseta se considera la concentración de residuo. Si el tiempo de hidrólisis es demasiado largo, la concentración del residuo en la muestra comienza a disminuir, indicando una destrucción por las condiciones de hidrólisis.

Una alternativa aceptable al estudio en función del tiempo es someter un estándar de calibración de un aminoácido a las mismas condiciones de hidrólisis que la muestra de prueba. El aminoácido libre puede no ser totalmente representativo de la velocidad de destrucción de los aminoácidos lábiles dentro de un péptido o una proteína durante la hidrólisis. Esto es especialmente válido para las uniones peptídicas que se escinden lentamente (por ejemplo, uniones Ile-Val). Sin embargo, esta técnica permite al analista dar cuenta de cierta destrucción de residuos. Se ha empleado la hidrólisis ácida por microondas y ésta es rápida, pero exige equipo y precauciones especiales. Las condiciones óptimas para la hidrólisis por microondas se deben investigar para cada muestra de proteína o péptido. La técnica de hidrólisis por microondas típicamente toma sólo unos minutos, pero una desviación de 1 minuto puede proporcionar resultados inadecuados (por ejemplo, hidrólisis incompleta o destrucción de aminoácidos lábiles). Se ha empleado la proteólisis completa usando una mezcla de proteasas pero puede ser complicada, exige controles adecuados y, por lo general, se puede aplicar más a péptidos que a proteínas. [NOTA—Durante los análisis iniciales de una proteína desconocida, se realizan experimentos con diferentes tiempos de hidrólisis y condiciones de temperatura para determinar las condiciones óptimas.]

MÉTODO 1

La hidrólisis ácida usando ácido clorhídrico que contenga fenol es el procedimiento más comúnmente usado para la hidrólisis de proteínas o péptidos antes del análisis de aminoácidos. La adición de fenol a la reacción evita la halogenación de la tirosina.

Solución de Hidrólisis: ácido clorhídrico 6N que contenga entre 0,1% y 1,0% de fenol.

Procedimiento—

Hidrólisis en Fase Líquida—Colocar la muestra de proteína o péptido en un tubo para hidrólisis y secar. [NOTA—La muestra se seca para que el agua de la muestra no diluya el ácido empleado para la hidrólisis.] Agregar 200 µL de la *Solución de Hidrólisis* por cada 500 µg de proteína liofilizada. Congelar el tubo de la muestra en un baño de hielo seco y acetona y sellar a la llama en vacío. Las muestras típicamente se hidrolizan a 110° durante 24 horas al vacío

o en una atmósfera inerte para evitar la oxidación. Se investigan tiempos mayores de hidrólisis (por ejemplo, 48 y 72 horas) si existe la preocupación de que la proteína no esté totalmente hidrolizada.

Hidrólisis en Fase de Vapor—Éste es uno de los procedimientos de hidrólisis ácida más comunes y se prefiere para el microanálisis cuando sólo se dispone de pequeñas cantidades de muestra. La contaminación de la muestra por el reactivo ácido también se minimiza usando la hidrólisis en fase de vapor. Colocar los viales que contengan las muestras secas en un recipiente con un cantidad adecuada de la *Solución de Hidrólisis*. La *Solución de Hidrólisis* no entra en contacto con la muestra de prueba. Aplicar una atmósfera inerte o vacío (menos de 200 µm de mercurio o 26,7 Pa) a la cámara gaseosa del recipiente y calentar aproximadamente a 110° durante un tiempo de hidrólisis de 24 horas. El vapor ácido hidroliza la muestra seca. Minimizar toda condensación del ácido en los viales de la muestra. Después de la hidrólisis, secar la muestra al vacío para eliminar el ácido residual.

MÉTODO 2

La oxidación del triptófano durante la hidrólisis disminuye si se usa ácido mercaptoetanosulfónico (MESA) como ácido reductor.

Solución de Hidrólisis: solución de MESA 2,5 M.

Hidrólisis en Fase de Vapor—Secar aproximadamente de 1 a 100 µg de la proteína o péptido en análisis en un tubo de hidrólisis. Colocar el tubo de hidrólisis en un tubo más grande con aproximadamente 200 µL de la *Solución de Hidrólisis*. Sellar al vacío el tubo más grande (aproximadamente a 50 µm de mercurio o 6,7 Pa) para vaporizar la *Solución de Hidrólisis*. Calentar el tubo de hidrólisis entre 170° y 185° durante aproximadamente 12,5 minutos. Después de la hidrólisis, secar el tubo de hidrólisis al vacío durante 15 minutos para eliminar el ácido residual.

MÉTODO 3

La oxidación del triptófano durante la hidrólisis se evita usando ácido tioglicólico (TGA) como ácido reductor.

Solución de Hidrólisis: una solución que contenga ácido clorhídrico 7M, 10% de ácido trifluoroacético, 20% de ácido tioglicólico y 1% de fenol.

Hidrólisis en Fase de Vapor—Secar aproximadamente de 10 µg a 50 µg de la proteína o péptido en análisis en un tubo de muestra. Colocar el tubo de muestra en un tubo más grande con aproximadamente 200 µL de la *Solución de Hidrólisis*. Sellar el tubo más grande al vacío (aproximadamente a 50 µm de mercurio o 6,7 Pa) para vaporizar el TGA. Calentar el tubo de muestra a 166° durante aproximadamente 15 a 30 minutos. Después de la hidrólisis, secar el tubo de muestra al vacío durante 5 minutos para eliminar el ácido residual. La recuperación de triptófano por medio de este método puede depender de la cantidad de muestra presente.

MÉTODO 4

La oxidación de la cisteína-cistina y de la metionina se realiza con ácido per fórmico antes de la hidrólisis de la proteína.

Solución de Oxidación—Preparar ácido per fórmico en el momento de análisis mezclando ácido fórmico y peróxido de hidrógeno al 30% (9 : 1) e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Procedimiento—Disolver la muestra de proteína o péptido en 20 µL de ácido fórmico y calentar a 50° durante 5 minutos; agregar luego 100 µL de la *Solución de Oxidación*. En esta reacción, la cisteína se convierte en ácido cisteico y la metionina se convierte en metionina sulfona. Dejar que la oxidación continúe durante de 10 a 30 minutos. Eliminar el reactivo en exceso de la muestra en una centrifuga de vacío. Esta técnica puede modificar los residuos de tirosina en presencia de haluros. Luego se puede realizar una hidrólisis ácida de la proteína oxidada usando el *Método 1* o el *Método 2*.

MÉTODO 5

La oxidación de cisteína-cistina se logra durante la hidrólisis en fase líquida con azida de sodio.

Solución de Hidrólisis: agregar azida de sodio a ácido clorhídrico 6 N que contenga 0,2 % de fenol, para obtener una concentración final de 0,2% (p/v). El fenol agregado evita la halogenación de la tirosina.

Hidrólisis en Fase Líquida—Realizar la hidrólisis de la proteína o péptido aproximadamente a 110° durante 24 horas. Durante la hidrólisis, la cisteína-cistina presente en la muestra se convierte en ácido cisteico mediante la azida de sodio presente en la *Solución de Hidrólisis*. Esta técnica permite una mejor recuperación de tirosina que el *Método 4*, pero no es cuantitativa para la metionina. La metionina se convierte en una mezcla de la metionina original y sus dos productos de oxidación, metionina sulfoxido y metionina sulfona.

MÉTODO 6

La oxidación de cisteína-cistina se logra con dimetil sulfoxido (DMSO).

Solución de Hidrólisis: agregar DMSO a ácido clorhídrico 6 N que contenga de 0,1% a 1,0% de fenol, para obtener una concentración final de 2% (v/v).

Hidrólisis en Fase de Vapor—Realizar la hidrólisis de la proteína o péptido aproximadamente a 110° durante 24 horas. Durante la hidrólisis, la cisteína-cistina presente en la muestra se convierte en ácido cisteico por el DMSO presente en la *Solución de Hidrólisis*. Para reducir la variabilidad y compensar la destrucción parcial, se recomienda evaluar la recuperación de ácido cisteico de las hidrólisis oxidativas de proteínas estándar que contengan de 1 a 8 moles de cisteína. Los factores de respuesta del hidrolizado de proteínas o péptidos por lo general son aproximadamente 30% menores que los de los estándares de ácido cisteico no hidrolizado. Como la histidina, la metionina, la tirosina y el triptófano también se modifican, con esta técnica no se obtiene un análisis completo de la composición.

MÉTODO 7

La reducción y la alquilación de cisteína-cistina se logra a través de una reacción de piridiletilación en fase de vapor.

Solución Reductora—Transferir 83,3 µL de piridina, 16,7 µL de 4-vinilpiridina, 16,7 µL de tributilfosfina y 83,3 µL de agua a un recipiente adecuado y mezclar.

Procedimiento—Agregar la proteína o péptido (entre 1 y 100 µg) a un tubo de hidrólisis y colocar en un tubo más grande. Transferir la *Solución Reductora* al tubo más grande, sellar al vacío (aproximadamente a 50 µm de mercurio o 6,7 Pa), e incubar aproximadamente a 100° durante 5 minutos. Luego, retirar el tubo de hidrólisis interior y secarlo en un desecador de vacío durante 15 minutos para eliminar los reactivos residuales. Después, se puede realizar una hidrólisis ácida de la proteína o péptido piridiletilados usando los procedimientos descritos previamente. La reacción de piridiletilación se realiza simultáneamente con una muestra de un estándar de proteína que contenga de 1 a 8 moles de cisteína, para mejorar la exactitud de la recuperación de piridiletil-cisteína. Mayores tiempos de incubación en la reacción de piridiletilación pueden modificar el grupo α-amino terminal y el grupo ε-amino de la lisina en la proteína.

MÉTODO 8

La reducción de cisteína-cistina y la alquilación se logran a través de una reacción de piridiletilación en fase líquida.

Soluciones Madre—Preparar y filtrar tres soluciones: clorhidrato de Tris 1 M (pH 8,5) que contenga edetato disódico 4 mM (*Solución Madre 1*), clorhidrato de guanidina 8 M (*Solución Madre 2*) y 2-mercaptoetanol al 10% en agua (*Solución Madre 3*).

Solución Reductora—Preparar una mezcla de la *Solución Madre 2* y la *Solución Madre 1* (3:1) para obtener una solución amortiguada de clorhidrato de guanidina 6 M en clorhidrato de Tris 0,25 M.

Procedimiento—Disolver aproximadamente 10 µg de la muestra de prueba en 50 µL de la *Solución Reductora* y agregar aproximadamente 2,5 µL de la *Solución Madre 3*. Almacenar bajo nitrógeno o argón durante 2 horas a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Para lograr la reacción de piridiletilación, agregar aproximadamente 2 µL de 4-vinilpiridina a la solución de proteína, e incubar durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente en un lugar oscuro. La proteína o péptido se desaliniza por recolección de la fracción de proteína o péptido luego de una separación por HPLC en fase reversa. La muestra recolectada se puede secar en una centrifuga de vacío antes de la hidrólisis ácida.

MÉTODO 9

La reducción de cisteína-cistina y la alquilación se logran a través de una reacción de carboximetilación en fase líquida.

Soluciones Madre—Preparar según se indica en el *Método 8*.

Solución de Carboximetilación—Preparar una solución que contenga 100 mg de yodoacetamida por mL de alcohol.

Solución Amortiguadora—Usar la *Solución Reductora*, preparada según se indica en el *Método 8*.

Procedimiento—Disolver la muestra de prueba en 50 µL de la *Solución Amortiguadora* y agregar aproximadamente 2,5 µL de la *Solución Madre 3*. Almacenar bajo nitrógeno o argón durante 2 horas a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Agregar la *Solución de Carboximetilación* en una relación de 1,5 veces el contenido teórico total de tioles, e incubar durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente en un lugar oscuro. [NOTA—Si el contenido de tioles de la proteína se desconoce, agregar 5 µL de yodoacetamida 100 mM por cada 20 nmol de proteína presente.] La reacción se detiene agregando un exceso de 2-mercaptoetanol. La proteína o péptido se desaliniza por recolección de la fracción de proteína o péptido luego de una separación por HPLC en fase reversa. La muestra recolectada se puede secar en una centrifuga de vacío antes de la hidrólisis ácida. La *S*-carboxiamidometilcisteína formada se convierte en *S*-carboximetilcisteína durante la hidrólisis ácida.

MÉTODO 10

La cisteína-cistina se hace reaccionar con el ácido ditioglicólico o el ácido ditiopropiónico para producir un disulfuro mixto. [NOTA—La elección del ácido ditioglicólico o del ácido ditiopropiónico depende de la resolución exigida por el método de análisis de aminoácidos.]

Solución Reductora: una solución que contenga 10 mg de ácido ditioglicólico (o ácido ditiopropiónico) por mL de hidróxido de sodio 0,2 M.

Procedimiento—Transferir aproximadamente 20 µg de la muestra de prueba a un tubo de hidrólisis y agregar 5 µL de la *Solución Reductora*. Agregar 10 µL de alcohol isopropílico y luego eliminar todo el líquido de la muestra mediante centrifugación al vacío. Luego, hidrolizar la muestra usando el *Método 1*. La ventaja de este método es que no se derivatizan otros residuos aminoácidos por reacciones secundarias y no es necesario desalinizar la muestra antes de la hidrólisis.

MÉTODO 11

La asparagina y la glutamina se convierten en ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente, durante la hidrólisis ácida. Los residuos de asparagina y ácido aspártico se suman y se representan con *Asx*, y los residuos de glutamina y ácido glutámico se suman y se representan con *Glx*. Las proteínas o péptidos pueden hacerse reaccionar con bis(1,1-trifluoroacetoxi)iodobenceno (BTI) para convertir los residuos de asparagina y glutamina en residuos de ácido diaminopropiónico y ácido diaminobutírico, respectivamente,

en la hidrólisis ácida. Estas conversiones permiten al analista determinar el contenido de asparagina y glutamina de una proteína o péptido en presencia de residuos de ácido aspártico y ácido glutámico.

Soluciones Reductororas—Preparar y filtrar tres soluciones: una solución de ácido trifluoroacético 10 mM (*Solución 1*), una solución de clorhidrato de guanidina 5 M y ácido trifluoroacético 10 mM (*Solución 2*) y una solución recién preparada de dimetilformamida que contenga 36 mg de BTI por mL (*Solución 3*).

Procedimiento—A un tubo de hidrólisis limpio, transferir aproximadamente 200 µg de la muestra de prueba y agregar 2 mL de la *Solución 1* o la *Solución 2* y 2 mL de la *Solución 3*. Sellar el tubo de hidrólisis al vacío. Calentar la muestra a 60° durante cuatro horas en un lugar oscuro. Luego, dializar la muestra con agua para eliminar el exceso de reactivos. Extraer la muestra dializada tres veces con volúmenes iguales de acetato de *n*-butilo y luego liofilizar. Después, se puede realizar la hidrólisis ácida de la proteína usando los procedimientos descritos previamente. Los residuos de ácido α -, β -diaminopropiónico y ácido α -, γ -diaminobutírico típicamente no se resuelven de los residuos de lisina en la cromatografía de intercambio iónico basada en el análisis de aminoácidos. Por lo tanto, cuando se usa el intercambio iónico para separar los aminoácidos, el contenido de asparagina y glutamina es la diferencia cuantitativa entre el ácido aspártico y ácido glutámico determinados por hidrólisis ácida sin derivatizar y el contenido que se obtiene por derivatización con BTI. [NOTA—El contenido determinado para treonina, metionina, cisteína, tirosina e histidina puede cambiar por la derivatización con BTI; se debe realizar una hidrólisis sin BTI si el analista está interesado en el contenido de estos otros aminoácidos en proteínas o péptidos.]

Metodologías de Análisis de Aminoácidos

Existen muchas técnicas de análisis de aminoácidos y la elección de una de estas técnicas a menudo depende de la sensibilidad que requiera la valoración. En general, aproximadamente la mitad de las técnicas de análisis de aminoácidos empleadas se basan en la separación de los aminoácidos libres mediante cromatografía de intercambio iónico seguida por derivatización postcolumna (por ejemplo, con ninhidrina u *o*-ftalaldehído). Las técnicas de detección postcolumna se pueden utilizar con muestras que contienen pequeñas cantidades de los componentes de las soluciones amortiguadoras, tales como sales y urea, y por lo general necesitan entre 5 y 10 µg de muestra de proteína por análisis. Las demás técnicas de aminoácidos generalmente involucran la derivatización precolumna de los aminoácidos libres (por ejemplo, isotiocianato de fenilo; carbonato de 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidilo; cloruro de (dimetilamino)azobencensulfonilo; 9-fluorenil-metilcloroformiato; y 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) seguida de HPLC en fase reversa. Las técnicas de derivatización precolumna son muy sensibles y por lo general necesitan entre 0,5 y 1,0 µg de la muestra de proteína por análisis, aunque pueden ser influenciadas por sales amortiguadoras presentes en las muestras. Las técnicas de derivatización precolumna también pueden producir múltiples derivados de un aminoácido dado, lo cual complica la interpretación de los resultados. Las técnicas de derivatización postcolumna generalmente están menos influenciadas por variaciones en el desempeño de la valoración que las técnicas de derivatización precolumna.

Se pueden usar los siguientes *Métodos* para el análisis cuantitativo de aminoácidos. Los instrumentos y reactivos para estos procedimientos están disponibles comercialmente. Además, existen muchas modificaciones de estas metodologías con diferentes preparaciones de reactivos, procedimientos de reacción, sistemas cromatográficos, etc. Los parámetros específicos pueden variar según los equipos y procedimientos usados. Muchos laboratorios usan más de una técnica de análisis de aminoácidos para aprovechar la ventajas de

cada una. En cada uno de estos *Métodos*, la señal analógica se visualiza mediante un sistema de captación de datos y las áreas de los picos se integran con fines de cuantificación.

MÉTODO 1—DETECCIÓN POSTCOLUMNA CON NINHIDRINA

La cromatografía de intercambio iónico con detección postcolumna con ninhidrina es uno de los métodos más comúnmente usados para el análisis cuantitativo de aminoácidos. Por lo general, se emplea un sistema de intercambio catiónico a base de Li para el análisis de muestras fisiológicas más complejas y un sistema de intercambio catiónico a base de Na, que es más rápido, para mezclas de aminoácidos más simples obtenidas de hidrolizados proteicos (que típicamente contienen 17 aminoácidos). La separación de los aminoácidos en una columna de intercambio iónico se logra a través de una combinación de cambios en el pH y en la fuerza catiónica. A menudo se emplea un gradiente de temperatura para mejorar la separación.

Cuando el aminoácido reacciona con la ninhidrina, el reactante adquiere un color púrpura o amarillo característico. Los aminoácidos, a excepción de los iminoácidos, dan un color púrpura y muestran máxima absorción a 570 nm. Los iminoácidos, como por ejemplo la prolina, dan un color amarillo y muestran una absorción máxima a 440 nm. La reacción postcolumna entre la ninhidrina y cada aminoácido eluido de la columna se controla a 440 nm y 570 nm y el cromatograma obtenido se usa para determinar la composición de aminoácidos.

Se considera que el límite de detección es 10 pmol para la mayoría de los derivados de aminoácidos, pero es 50 pmol para la prolina. Se obtiene una respuesta lineal entre 20 y 500 pmol con coeficientes de correlación superiores a 0,999. Para obtener buenos datos de composición, es mejor contar con muestras de más de 1 µg antes de la hidrólisis para este análisis de aminoácidos de proteínas o péptidos.

Más adelante se muestra un método para la detección postcolumna con ninhidrina. Existen muchos otros métodos, con instrumental y reactivos disponibles comercialmente.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A—Transferir aproximadamente 1,7 g de citrato de sodio anhidro y 1,5 mL de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. Ajustar, si fuera necesario, con ácido clorhídrico hasta un pH de 3,0.

Solución B—Transferir aproximadamente 1,7 g de citrato de sodio anhidro y 0,7 mL de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. Ajustar con ácido clorhídrico, si fuera necesario, hasta un pH de 4,3.

Solución C—Preparar una solución que contenga 5% de cloruro de sodio, 1,9% de citrato de sodio anhidro y 0,1% de fenol en agua y ajustar hasta un pH de 6.

Solución Regeneradora de la Columna—Preparar una solución que contenga 0,8% de hidróxido de sodio en agua y ajustar hasta un pH de 13.

Fase Móvil—Usar mezclas variables de *Solución A*, *Solución B* y *Solución C* como se indica en el *Sistema Cromatográfico*.

Reactivo Postcolumna—Transferir aproximadamente 18 g de ninhidrina y 0,7 g de hidrindantina a 900 mL de una solución que contenga 76,7% de dimetil sulfóxido, 0,7% de acetato de litio dihidrato y 0,1% de ácido acético y mezclar durante un mínimo de 3 horas bajo un gas inerte, como por ejemplo nitrógeno. [NOTA—Este reactivo es estable durante 30 días si se mantiene a una temperatura entre 2° y 8° bajo un gas inerte.]

Solución Amortiguadora—Preparar una solución que contenga 2% de citrato de sodio anhidro, 1% de ácido clorhídrico, 0,5% de tiodiglicol y 0,1% de ácido benzoico en agua y ajustar hasta un pH de 2.

Sistema Cromatográfico—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector con filtros de interferencia apropiados a 440; 570 o 690 nm y una columna de 4,0 mm × 120 mm rellena con copolímero sulfonado de estireno-divinilbenceno de 7,5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 14 mL por hora. Programar el sistema del siguiente modo. Inicialmente, equilibrar la columna con *Solución A*; a los 25 minutos, cambiar la composición de la *Fase Móvil* a 100% de *Solución B*; y a los 37

minutos, cambiar la composición al 100% de *Solución C*. A los 75 minutos de la corrida, eluye el último aminoácido de la columna y se regenera la columna con la *Solución Regeneradora de la Columna* durante 1 minuto. Equilibrar luego la columna con *Solución A* durante 11 minutos antes de la siguiente inyección. Programar la temperatura de la columna del siguiente modo. La temperatura inicial es 48°; después de 11,5 minutos, aumentar la temperatura a 65° a una velocidad de 3° por minuto; aproximadamente a los 35 minutos, aumentar la temperatura a 77° a una velocidad de 3° por minuto; y finalmente aproximadamente a los 52 minutos, disminuir la temperatura a 48° a una velocidad de 3° por minuto.

Procedimiento y Reacción Postcolumna—Reconstituir el hidrolizado proteico o peptídico liofilizado en la *Solución Amortiguadora*, inyectar una cantidad adecuada en el cromatógrafo y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*. Cuando los aminoácidos eluyen de la columna, se mezclan con el *Reactivo Postcolumna*, que se suministra a una velocidad de flujo de 7 mL por hora, a través de una llave T. Después de mezclar, el efuente de la columna y el *Reactivo Postcolumna* pasan a través de un reactor tubular a una temperatura de 135°, donde se forma un color púrpura o amarillo característico. Desde el reactor, el líquido pasa a través de un colorímetro con una cubeta de flujo de 12 mm. La luz que emerge de la cubeta se divide en tres haces que son analizados por el detector con filtros de interferencia a 440; 570 ó 690 nm. La señal de 690 nm se puede restar electrónicamente de las otras señales para obtener mejores relaciones señal-ruido. Las señales de 440 nm (iminoácidos) y de 570 nm (aminoácidos) se pueden sumar para simplificar el manejo de datos.

MÉTODO 2—DERIVATIZACIÓN FLUOROMÉTRICA POSTCOLUMNA CON OPA

Se usa la cromatografía de intercambio iónico con detección postcolumna fluorométrica con *o*-ftalaldehído (OPA). El procedimiento emplea una columna de intercambio iónico para la separación de aminoácidos libres seguida de una oxidación postcolumna con hipoclorito de sodio y derivatización usando OPA y *N*-acetil-L-cisteína. El paso de oxidación con hipoclorito de sodio permite a las aminas secundarias, como por ejemplo la prolina, reaccionar con el reactivo OPA.

El OPA reacciona con las aminas primarias en presencia de un tiol para formar productos de isoindol altamente fluorescentes. Esta reacción se utiliza para la derivatización postcolumna en el análisis de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico. La regla de separación es la misma que la del *Método 1*. Los instrumentos y reactivos para esta forma de análisis de aminoácidos están disponibles comercialmente. Existen muchas modificaciones de este método.

Si bien el OPA no reacciona con aminas secundarias (iminoácidos, como por ejemplo la prolina) para formar sustancias fluorescentes, la oxidación con hipoclorito de sodio permite que las aminas secundarias reaccionen con OPA. El procedimiento emplea una columna de intercambio catiónico fuertemente ácida para la separación de aminoácidos libres seguida de una oxidación postcolumna con hipoclorito de sodio y derivatización postcolumna usando OPA y un compuesto tiol, como por ejemplo *N*-acetil-L-cisteína y 2-mercaptoetanol. La derivatización de aminoácidos primarios no se altera perceptiblemente con el aporte continuo de hipoclorito de sodio.

La separación de los aminoácidos en una columna de intercambio iónico se logra a través de una combinación de cambios en el pH y en la fuerza catiónica. Después de la derivatización postcolumna con OPA de los aminoácidos eluidos, el reactante pasa a través de un detector fluorométrico. La intensidad de la fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con OPA se controla con una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm.

Se considera que el límite de detección es de unas pocas decenas de picomoles para la mayoría de los derivados de aminoácidos. La respuesta es lineal entre unos pocos picomoles y unas pocas decenas de nanomoles. Para obtener buenos datos de composición en este análisis de aminoácidos de proteínas o péptidos, es mejor contar con muestras de más de 500 ng antes de la hidrólisis.

A continuación se muestra un método para la detección postcolumna fluorométrica con OPA.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A—Preparar una solución de hidróxido de sodio, ácido cítrico y alcohol en agua de grado HPLC con una concentración de sodio 0,2 N y que contenga 7% de alcohol (p/v), ajustada hasta un pH de 3,2.

Solución B—Preparar una solución de hidróxido de sodio y ácido cítrico en agua de grado HPLC con una concentración de sodio 0,6 N, ajustada a un pH de 10,0.

Solución C: hidróxido de sodio 0,2 N.

Fase Móvil—Usar mezclas variables de *Solución A*, *Solución B* y *Solución C* como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Preparación de Reactivo Postcolumna—

Solución Amortiguadora Alcalina—Preparar una solución que contenga carbonato de sodio 384 mM, ácido bórico 216 mM y sulfato de potasio 108 mM y ajustar hasta un pH de 10,0.

Reactivo de Hipoclorito—Agregar 0,4 mL de una solución de hipoclorito de sodio (10% de cloro) a 1 L de la *Solución Amortiguadora Alcalina*. [NOTA—La solución de hipoclorito es estable durante 2 semanas.]

Reactivo OPA—Transferir 2 g de *N*-acetil-L-cisteína y 1,6 g de OPA a un matraz volumétrico de 15 mL, disolver con alcohol, diluir a volumen con alcohol y mezclar. Transferir esta solución y 4 mL de una solución acuosa al 10% de éter polietilenglicol (23) laurílico² a un matraz volumétrico de 1 litro, diluir con 980 mL de *Solución Amortiguadora Alcalina* y mezclar.

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm y con una columna de 4,0 mm × 150 mm rellena con material L17 de 7,5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,3 mL por minuto y la temperatura de la columna se ajusta a 50°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con *Solución A*; durante los siguientes 20 minutos, cambiar linealmente la composición de la *Fase Móvil* a 85% de *Solución A* y 15% de *Solución B*; luego cambiar abruptamente a 40% de *Solución A* y 60% de *Solución B*; durante los siguientes 18 minutos, cambiar linealmente la composición a 100% de *Solución B* y mantenerla durante 7 minutos; luego cambiar abruptamente a 100% de *Solución C* y mantenerla durante 6 minutos; luego cambiar abruptamente a la *Solución A*, mantener esta composición durante los siguientes 8 minutos.

Procedimiento y Reacción Postcolumna—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 1,0 nmol de cada aminoácido en análisis y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*. Cuando el efuente deja la columna, se mezcla con el *Reactivo de Hipoclorito*. La mezcla pasa a través del primer reactor postcolumna que es un tubo de acero inoxidable de 0,5 mm × 2 m. Inmediatamente a continuación del primer reactor postcolumna se coloca un segundo reactor postcolumna de diseño similar que se usa para la reacción postcolumna con OPA. La velocidad de flujo tanto para el *Reactivo de Hipoclorito* como para el *Reactivo OPA* es 0,2 mL por minuto, dando como resultado una velocidad de flujo total (es decir, *Reactivo de Hipoclorito*, *Reactivo OPA* y el efuente de la columna) de 0,7 mL por minuto que sale de los reactores posteriores al paso por la columna. Las reacciones postcolumna se realizan a 55°. Esto produce un tiempo de permanencia de aproximadamente 33 segundos en el reactor postcolumna con OPA. Después de la derivatización postcolumna, el efuente pasa a través del detector fluorométrico.

MÉTODO 3—DETERMINACIÓN PRECOLUMNA

Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con fenilisotiocianato (PITC) seguida de una separación por HPLC en fase reversa con detección UV.

El PITC reacciona con los aminoácidos para formar derivados de feniltiocarbamilo (PTC) que se pueden detectar con alta sensibilidad a 254 nm. Por lo tanto, se usa la derivatización precolumna de

² Un grado adecuado está disponible comercialmente como "Palladium Catalyst, Type I (Paladio al 5% en Carbonato de Calcio)," de Engelhard Industries, Inc., número de fax (864) 885-1375.

aminoácidos con PITC seguida por separación por HPLC en fase reversa con detección UV para analizar la composición de aminoácidos.

Después de eliminar el reactivo al vacío, los aminoácidos derivatizados se pueden almacenar secos y congelados durante varias semanas sin degradación significativa. Si la solución para inyección se mantiene fría, no hay pérdida perceptible en la respuesta cromatográfica después de tres días.

La separación de los aminoácidos-PTC por HPLC en fase reversa con una columna ODS se logra a través de una combinación de cambios en las concentraciones de acetonitrilo y en la fuerza iónica de la solución amortiguadora. Los aminoácidos-PTC eluidos de la columna se controlan a 254 nm.

Se considera que el límite de detección es 1 pmol para la mayoría de los derivados aminoácidos. Se obtiene una respuesta lineal entre 20 y 500 pmol con coeficientes de correlación superiores a 0,999. Para obtener buenos datos de la composición, en este análisis de aminoácidos de proteínas o péptidos es mejor contar con una muestra de más de 500 ng de proteína o péptido antes de la hidrólisis.

Más adelante se describe un método de derivatización precolumna con PITC.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A: acetato de amonio 0,05 M, ajustado con ácido fosfórico a un pH de 6,8.

Solución B: Preparar acetato de amonio 0,1 M, ajustar con ácido fosfórico a un pH de 6,8 y luego preparar una mezcla de esta solución y acetonitrilo (1 : 1).

Solución C: una mezcla de acetonitrilo y agua (70 : 30).

Fase Móvil: Usar mezclas variables de la *Solución A*, *Solución B* y *Solución C* como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Preparación del Reactivo de Derivatización—

Solución Amortiguadora de Acoplamiento: una mezcla de acetonitrilo, piridina, trietilamina y agua (10 : 5 : 2 : 3).

Disolvente de la Muestra: una mezcla de agua y acetonitrilo (7 : 2).

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Disolver la muestra de prueba liofilizada en 100 µL de *Solución Amortiguadora de Acoplamiento* y luego secar en una centrifuga de vacío para eliminar todo el clorhidrato si se realizó un paso de hidrólisis de proteína. Disolver la muestra en 100 µL de *Solución Amortiguadora de Acoplamiento*, agregar 5 µL de PITC e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. La muestra de prueba se seca nuevamente en una centrifuga de vacío y se disuelve en 250 µL de *Disolvente de la Muestra*.

Sistema Cromatográfico—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 250 mm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 52°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con la *Solución A*; durante los siguientes 15 minutos, cambiar linealmente la composición de la *Fase Móvil* a 85% de *Solución A* y 15% de *Solución B*; durante los siguientes 15 minutos, cambiar linealmente la composición a 50% de *Solución A* y 50% de *Solución B*; luego cambiar abruptamente a 100% de *Solución C* y mantenerla durante 10 minutos; luego cambiar abruptamente a 100% de *Solución A* y dejar que la columna se equilibre antes de la siguiente inyección.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 1,0 nmol de cada aminoácido-PITC en análisis (10 µL de la muestra en el *Disolvente de la Muestra*) y proceder según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

MÉTODO 4—DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA CON AQC

Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) y después se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica.

El AQC reacciona con los aminoácidos para formar derivados de urea estables, fluorescentes y no simétricos (aminoácidos AQC) que se pueden someter fácilmente al análisis por HPLC en fase reversa.

Por lo tanto, se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con AQC seguida de la separación por HPLC en fase reversa para analizar la composición de aminoácidos.

La separación de los aminoácidos-AQC en una columna ODS se logra a través de una combinación de cambios en las concentraciones de acetonitrilo y sal. La detección de fluorescencia selectiva de los derivados con una longitud de onda de excitación de 250 nm y una longitud de onda de emisión de 395 nm permite la inyección directa de la mezcla de reacción sin ninguna interferencia significativa del único subproducto fluorescente importante del reactivo, la 6-aminoquinolina. El exceso de reactivo se hidroliza rápidamente ($t_{1/2} < 15$ segundos) para producir 6-aminoquinolina-*N*-hidroxisuccinimida y dióxido de carbono y después de 1 minuto no se puede producir ninguna otra derivatización.

Las áreas de los picos para los aminoácidos-AQC esencialmente no cambian durante al menos 1 semana a temperatura ambiente y los derivados tienen más que suficiente estabilidad para permitir el análisis cromatográfico automatizado durante la noche.

Se considera que el límite de detección está entre aproximadamente 40 fmol y 320 fmol para cada aminoácido, a excepción de la cisteína. El límite de detección para la cisteína es aproximadamente 800 fmol. Se obtiene una respuesta lineal entre 2,5 µM y 200 µM con coeficientes de correlación superiores a 0,999. Se pueden obtener buenos datos de composición a partir del análisis de hidrolizados proteicos derivatizados que contengan tan solo 30 ng de proteína o péptido.

Más adelante se muestra un método de derivatización precolumna con AQC.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A: Preparar una solución de acetato de sodio 140 mM y trietilamina 17 mM y ajustar con ácido fosfórico hasta un pH de 5,02.

Solución B: una mezcla de acetonitrilo y agua (60 : 40).

Fase móvil: Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Disolver aproximadamente 2 µg de la muestra de prueba en 20 µL de ácido clorhídrico 15 mM y diluir con una solución amortiguadora de borato 0,2 M (pH 8,8) a 80 µL. Iniciar la derivatización agregando 20 µL de AQC 10 mM en acetonitrilo y dejar que prosiga durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 250 nm, una longitud de onda de emisión de 395 nm y con una columna de 3,9 mm × 150 mm rellena con material L1 de 4 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 37°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con la *Solución A*; durante los siguientes 0,5 minutos, cambiar linealmente la composición de la *Fase Móvil* a 98% de *Solución A* y 2% de *Solución B*; luego durante los siguientes 14,5 minutos a 93% de *Solución A* y 7% de *Solución B*; durante los siguientes 4 minutos a 87% de *Solución A* y 13% de *Solución B*; durante los siguientes 14 minutos a 68% de *Solución A* y 32% de *Solución B*; luego cambiar abruptamente a 100% de *Solución B* para un lavado de 5 minutos; durante los siguientes 10 minutos, cambiar abruptamente a 100% de *Solución A* y dejar que la columna se equilibre antes de la siguiente inyección.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 0,05 nmol de cada aminoácido-AQC en análisis y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

MÉTODO 5—DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA CON OPA

Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con OPA y luego se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica. Esta técnica no detecta los aminoácidos que existen como aminos secundarios (por ejemplo, prolina).

El OPA junto con un reactivo tiol reacciona con grupos amino primarios para formar productos isoindol altamente fluorescentes. Se puede usar 2-mercaptoetanol y ácido 3-mercaptopropiónico como tiol. El OPA por sí mismo no muestra fluorescencia y por lo tanto no produce picos que interfieren. Además, su solubilidad y estabilidad

en soluciones acuosas, junto con la rápida cinética de reacción permiten la derivatización y análisis automatizados usando un muestreador automático para mezclar la muestra con el reactivo. Sin embargo, la falta de reactividad con aminoácidos secundarios ha sido una desventaja importante. Este método no detecta los aminoácidos que son aminor secundarios (por ejemplo, prolina). Para compensar esta desventaja, esta técnica se puede combinar con la técnica descrita en el *Método 7* o en el *Método 8*.

A la derivatización precolumna de aminoácidos con OPA le sigue la separación por HPLC en fase reversa. Debido a la inestabilidad de los derivados aminoácidos-OPA, la separación y el análisis por HPLC se realizan inmediatamente después de la derivatización. El cromatógrafo de líquidos está equipado con un detector fluorométrico para la detección de aminoácidos derivatizados. La intensidad de fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con OPA se controla con una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm.

Se ha informado de límites de detección de sólo 50 fmol a través de fluorescencia, aunque el límite práctico de análisis se mantiene en 1 pmol. A continuación se muestra un método de derivatización precolumna con OPA.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A: una mezcla de acetato de sodio 100 mM (pH 7,2), metanol y tetrahidrofurano (900:95:5).

Solución B: metanol.

*Fase móvil—*Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Reactivo de Derivatización—Disolver 50 mg de OPA en 1,25 mL de metanol (apto para secuenciación de proteína). Agregar 50 µL de 2-mercaptoetanol y 11,2 mL de borato de sodio 0,4 M (pH 9,5) y mezclar. [NOTA—El reactivo es estable durante 1 semana.]

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Transferir aproximadamente 5 µL de la muestra de prueba a un recipiente adecuado, agregar 5 µL del *Reactivo de Derivatización* y mezclar. Después de 1 minuto, agregar no menos de 20 µL de acetato de sodio 0,1 M (pH 7,0). Usar 20 µL de esta solución para el análisis. [NOTA—Se recomienda usar un estándar interno (por ejemplo, norleucina) para el análisis cuantitativo debido a variaciones potenciales en el volumen del reactivo en la derivatización de la muestra. La derivatización de la muestra se realiza de manera automatizada en línea. Debido a la inestabilidad de los derivados aminoácido-OPA, la separación y análisis por HPLC se realizan inmediatamente después de la derivatización.]

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm y con una columna de 4,6 mm × 75 mm rellena con material L3 de 3 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,7 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 37°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con 92% de *Solución A* y 8% de *Solución B*; durante los siguientes dos minutos, cambiar la composición de la *Fase Móvil* a 83% de *Solución A* y 17% de *Solución B* y mantener durante 3 minutos más; después durante los siguientes 5 minutos cambiar a 54% de *Solución A* y 46% de *Solución B* y mantener durante 2 minutos más; después durante los siguientes 2 minutos cambiar a 34% de *Solución A* y 66% de *Solución B* y mantener durante 1 minuto; después durante los siguientes 0,3 minutos cambiar a 20% de *Solución A* y 80% de *Solución B* y mantener durante 2,6 minutos más; y finalmente durante 0,6 minutos cambiar a 92% de *Solución A* y 8% de *Solución B* y mantener durante 0,6 minutos más.

Procedimiento—Injectar aproximadamente 0,02 nmol de cada derivado aminoácido-OPA en análisis en el cromatógrafo y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

MÉTODO 6—DERIVATIZACIÓN POSTCOLUMNA CON DABS-CL

Se usa derivatización precolumna de aminoácidos con cloruro de (dimetilamino)azobencenosulfonilo (DABS-Cl) y luego se separan por HPLC en fase reversa con detección en la región de luz visible.

El DABS-Cl es un reactivo cromofórico empleado para marcar aminoácidos. Los aminoácidos marcados con DABS-Cl (aminoácidos-DABS) son muy estables y muestran la máxima absorción a 436 nm.

Los aminoácidos-DABS, los 19 derivados de aminoácidos naturales, se pueden separar en una columna ODS de HPLC en fase reversa empleando sistemas de gradientes constituidos por una mezcla de acetonitrilo y una solución amortiguadora acuosa. Los aminoácidos-DABS separados que eluyen de la columna se detectan a 436 nm en la región visible.

Este método puede analizar los iminoácidos, como por ejemplo la prolina, junto con los aminoácidos, con igual sensibilidad. El método de derivatización con DABS-Cl permite la cuantificación simultánea de residuos de triptófano mediante hidrólisis previa de la proteína o péptido con ácidos sulfónicos, como por ejemplo ácido mercaptoetanosulfónico, ácido *p*-toluensulfónico o ácido metanosulfónico, descritos en el *Método 2* en *Hidrólisis de Proteínas en Análisis de Aminoácidos*. Los otros residuos ácidos inestables, asparagina y glutamina, también se pueden analizar mediante la conversión previa en ácido diaminopropiónico y ácido diaminobutírico, respectivamente, tratando la proteína o péptido con BTI, descrito en el *Método 11* en *Hidrólisis de Proteínas en Análisis de Aminoácidos*.

El aminoácido de origen no proteico, norleucina, no se puede usar como un estándar interno en este método ya que eluye en una región cromatográfica abundante en picos de aminoácidos primarios. La nitrotirosina se puede usar como estándar interno ya que eluye en una región despejada.

El límite de detección de aminoácidos-DABS es aproximadamente 1 pmol. Se pueden analizar cuantitativamente de 2 a 5 pmol de cada aminoácido-DABS con confiabilidad y sólo se necesitan entre 10 ng y 30 ng del hidrolizado proteico tratado con DABS para cada análisis.

Más adelante se muestra un método de derivatización precolumna con DABS-Cl.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A: acetato de sodio 25 mM (pH 6,5) que contenga 4% de dimetilformamida.

Solución B: acetonitrilo.

*Fase móvil—*Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Preparación del Reactivo de Derivatización—

Solución Amortiguadora de Muestra: bicarbonato de sodio 50 mM ajustado hasta un pH de 8,1.

Reactivo de Derivatización—Disolver 1,3 mg de DABS-Cl en 1 mL de acetonitrilo. [NOTA—Este reactivo se prepara poco antes del paso de derivatización.]

*Solución Amortiguadora de Dilución de la Muestra—*Preparar una mezcla de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) y alcohol (1:1).

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Disolver la muestra de prueba en 20 µL de *Solución Amortiguadora de Muestra*, agregar 40 µL de *Reactivo de Derivatización* y mezclar. Sellar el recipiente de la muestra con un tapón de goma de silicona y calentar a 70° durante 10 minutos. Mientras se calienta la muestra, la mezcla se disuelve. Después de la derivatización, diluir la muestra de prueba con una cantidad adecuada de *Solución Amortiguadora de Dilución de la Muestra*.

Sistema Cromatográfico—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 436 nm y una columna de 4,6 mm × 250 mm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 40°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con 85% de *Solución A* y 15% de *Solución B*; durante los siguientes 20 minutos, cambiar la composición de la *Fase Móvil* a 60% de *Solución A* y 40% de *Solución B*; durante los siguientes 12 minutos, cambiar la composición a 30% de *Solución A* y 70% de *Solución B* y mantener durante 2 minutos más.

Procedimiento—Injectar en el cromatógrafo aproximadamente 0,05 nmol de los aminoácidos-DABS y proceder según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

MÉTODO 7—DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA CON FMOC-CL

Se usa derivatización precolumna de aminoácidos con 9-fluorenilmetil cloroformiato (FMOC-Cl) y luego se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica.

El FMOC-Cl reacciona con aminoácidos primarios y secundarios para formar productos altamente fluorescentes. La reacción del FMOC-Cl con aminoácidos se realiza bajo condiciones moderadas, en solución acuosa y se completa en 30 segundos. Los derivados son estables y sólo el derivado de histidina muestra descomposición. Si bien el FMOC-Cl es fluorescente por sí mismo, el exceso de reactivo y los subproductos fluorescentes se pueden eliminar sin pérdida de aminoácidos-FMOC.

Los aminoácidos FMOC se separan por HPLC en fase reversa usando una columna ODS. La separación se lleva a cabo mediante elución por gradiente que varía linealmente de una mezcla de solución amortiguadora de ácido acético, metanol y acetonitrilo (50:40:10) a una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora de ácido acético (50:50). En estas condiciones, se separan 20 derivados de aminoácidos en 20 minutos. Cada derivado que eluye de la columna se controla a través de un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 260 nm y una longitud de onda de emisión de 313 nm.

El límite de detección se encuentra en el intervalo inferior de fmol. Para la mayoría de los aminoácidos la respuesta es lineal entre 0,1 µM y 50 µM.

A continuación se muestra un método de derivatización precolumna con FMOC-Cl.

Preparación de Fase Móvil—

Solución Amortiguadora de Ácido Acético—Transferir 3 mL de ácido acético glacial y 1 mL de trietilamina a un matraz volumétrico de 1 litro y diluir a volumen con agua de grado HPLC. Ajustar con hidróxido de sodio hasta un pH de 4,20.

Solución A: una mezcla de *Solución Amortiguadora de Ácido Acético*, metanol y acetonitrilo (50:40:10).

Solución B: una mezcla de acetonitrilo y *Solución Amortiguadora de Ácido Acético* (50:50).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en el *Sistema Cromatográfico*.

Preparación del Reactivo de Derivatización—

Solución Amortiguadora de Borato—Preparar una solución de ácido bórico 1 M y ajustar con hidróxido de sodio hasta un pH de 6,2.

Reactivo FMOC-Cl—Disolver 155 mg de 9-fluorenilmetil cloroformiato en 40 mL de acetona y mezclar.

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Agregar 0,1 mL de *Solución Amortiguadora de Borato* y 0,5 mL de *Reactivo FMOC-Cl* a 0,4 mL de la muestra de prueba. Después de aproximadamente 40 segundos, extraer la mezcla con 2 mL de pentano y luego extraer una vez más con otra porción de pentano. La solución acuosa con los derivados de aminoácidos queda lista para la inyección.

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 260 nm y una longitud de onda de emisión de 313 nm y con una columna de 4,6 mm × 125 mm rellena con material L1 de 3 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente de 1,3 mL por minuto. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con *Solución A* y mantener esta composición durante 3 minutos; durante los siguientes 9 minutos, cambiar a 100% de *Solución B*; durante los siguientes 0,5 minutos, aumentar la velocidad de flujo a 2 mL por minuto y mantenerla hasta que el último aminoácido-FMOC eluya de la columna. El tiempo total de la corrida es de aproximadamente 20 minutos.

Procedimiento—Injectar en el cromatógrafo no menos de 0,01 nmol de cada aminoácido-FMOC en análisis y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*. El derivado histidina-FMOC por lo general dará una respuesta menor que los demás derivados.

MÉTODO 8—DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA CON NBD-F

Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) y después se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica.

El 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) reacciona con aminoácidos primarios y secundarios para formar productos altamente fluorescentes. Los aminoácidos se derivatizan con NBD-F calentándolos a 60° durante 5 minutos.

Los derivados aminoácidos-NBD se separan en una columna ODS de HPLC en fase reversa empleando un sistema de elución por gradiente constituido por una mezcla de acetonitrilo y una solución amortiguadora acuosa. En estas condiciones se separan 17 derivados de aminoácidos en 35 minutos. Se puede usar el ácido *E*-aminocaproico como estándar interno ya que eluye en una región cromatográfica despejada. Cada derivado que eluye de la columna se controla mediante un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

La sensibilidad de este método es casi igual que la del método de derivatización precolumna con OPA (*Método 5*), excluyendo la prolina, que no reacciona con el OPA. Esto puede ser una ventaja del NBD-F con respecto al OPA.

El límite de detección para cada aminoácido es aproximadamente 10 fmol. El análisis de perfil se logró con aproximadamente 1,5 mg de hidrolizado proteico en la mezcla final de reacción para HPLC.

A continuación se muestra un método de derivatización precolumna con NBD-F.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A: una solución de citrato de sodio 10 mM que contenga perclorato de sodio 75 mM, ajustada con ácido clorhídrico hasta un pH de 6,2.

Solución B: una mezcla de acetonitrilo y agua (50:50).

Preparación del Reactivo de Derivatización—

Solución Amortiguadora de Muestra: una solución de ácido bórico 0,1 M ajustada con hidróxido de sodio a un pH de 9,2.

Reactivo de Derivatización—Disolver 5 mg de NBD-F en 1,0 mL de alcohol y mezclar.

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Disolver la muestra de prueba en 20 µL de *Solución Amortiguadora de Muestra*, agregar 10 µL de *Reactivo de Derivatización* y mezclar. Calentar el recipiente de la muestra a 60° durante 5 minutos. Después de la derivatización, diluir la muestra de prueba con 300 µL de la *Solución A*.

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm y una columna de 4,6 mm × 150 mm rellena con sílice ODS con un tamaño de partícula de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 40°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con 94% de *Solución A* y 6% de *Solución B*; durante los siguientes 16 minutos, cambiar linealmente la composición a 63% de *Solución A* y 37% de *Solución B*; durante los siguientes 5 minutos, cambiar linealmente la composición a 62% de *Solución A* y 38% de *Solución B*; durante los siguientes 9 minutos, cambiar linealmente la composición a 100% de *Solución B* y mantener durante otros 5 minutos; finalmente durante 2 minutos, cambiar linealmente la composición a 94% de *Solución A* y 6% de *Solución B* y luego dejar equilibrar la columna antes de la siguiente inyección.

Procedimiento—Injectar en el cromatógrafo aproximadamente 15 pmol de cada aminoácido-NBD en análisis y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Cálculo y Análisis de los Datos

Cuando se determina el contenido de aminoácidos de un hidrolizado de proteína o péptido, se debe tener en cuenta que el paso de hidrólisis ácida destruye el triptófano y la cisteína. La serina y la treonina se destruyen parcialmente con la hidrólisis ácida, mientras que la isoleucina y la valina podrían escindir-se sólo parcialmente. La metionina puede oxidarse durante la hidrólisis

ácida y algunos aminoácidos (por ejemplo, glicina y serina) son contaminantes comunes. La aplicación de un vacío adecuado (menos de 200 μm de mercurio o 26,7 Pa) o la introducción de un gas inerte (argón) en la cámara gaseosa del recipiente de reacción durante la hidrólisis en fase de vapor puede reducir la destrucción oxidativa. Por lo tanto, los resultados cuantitativos obtenidos para cisteína, triptófano, treonina, isoleucina, valina, metionina, glicina y serina de un hidrolizado de proteínas o péptidos pueden variar y pueden requerir posterior investigación y consideración.

CÁLCULOS

Porcentaje Molar de los Aminoácidos—Es el número de residuos de cada aminoácido por cada 100 residuos en una proteína. Este resultado puede ser útil para evaluar los datos de análisis de aminoácidos cuando se desconoce el peso molecular de la proteína o péptido a investigar. Esta información se puede usar para corroborar la identidad de una proteína y tiene otras aplicaciones. Identificar e integrar cuidadosamente los picos obtenidos como se indica para cada *Procedimiento*. Calcular el porcentaje molar de cada aminoácido presente en la muestra de prueba, por la fórmula:

$$100r_U/r$$

en donde r_U es la respuesta correspondiente al pico, en nmol, del aminoácido de prueba y r es la suma de respuestas correspondientes a los picos, en nmol, de todos los aminoácidos presentes en la muestra de prueba. La comparación entre el porcentaje molar de aminoácidos de prueba y los datos de proteínas conocidas puede ayudar a establecer o corroborar la identidad de la proteína de muestra.

Muestras de Proteínas Desconocidas—Esta técnica de análisis de datos se puede usar para estimar la concentración proteica de una muestra de proteína desconocida usando los datos de análisis de aminoácidos. Calcular la masa, en μg , de cada aminoácido recuperado, por la fórmula:

$$mM_{\text{pp}}/1000$$

en donde m es la cantidad recuperada, en nmoles, del aminoácido en análisis; y M_{pp} es el peso molecular promedio, en mg, para ese aminoácido, corregido por el peso de la molécula de agua que se eliminó durante la formación de la unión peptídica. La suma de las masas de los aminoácidos recuperados permite estimar la masa total de la proteína analizada después de corregir adecuadamente por los aminoácidos destruidos parcial o completamente. Si está disponible el peso molecular de la proteína desconocida (es decir, por análisis SDS-PAGE o espectrometría de masas), se puede predecir la composición de aminoácidos de la proteína desconocida. Calcular el número de residuos de cada aminoácido por la fórmula:

$$m/(1000M/M_{\text{pp}})$$

en donde m es la cantidad recuperada, en nmol, del aminoácido en análisis; M es la masa total, en μg , de la proteína; y M_{pp} es el peso molecular, en mg, de la proteína desconocida.

Muestras de Proteínas Conocidas—Esta técnica de análisis de datos se puede usar para investigar la composición de aminoácidos y la concentración proteica de una muestra de proteína de peso molecular y composición aminoacídica conocidos usando los datos de análisis de aminoácidos. Cuando se conoce la composición de la proteína que se está analizando, se puede aprovechar el hecho de que algunos aminoácidos se recuperan bien, mientras que la recuperación de otros aminoácidos puede verse comprometida debido a la destrucción total o parcial (por ejemplo, triptófano, cisteína, treonina, serina, metionina), la escisión incompleta de uniones (es decir, para isoleucina y valina) y la contaminación por aminoácidos libres (es decir, por glicina y serina).

Los aminoácidos que se recuperan mejor representan a la proteína y se eligen para cuantificarla. Los aminoácidos que se recuperan bien son, típicamente, aspartato-asparagina, glutamato-glutamina, alanina, leucina, fenilalanina, lisina y arginina. Esta lista se puede modificar según la experiencia con el sistema de análisis utilizado. Dividir la cantidad, en nmol, de cada uno de los aminoácidos bien recuperados por el número esperado de residuos de ese aminoácido con el fin de obtener el contenido proteico basado en cada

aminoácido bien recuperado. Promediar los resultados de contenido proteico calculados. El contenido proteico determinado para cada uno de los aminoácidos bien recuperados se debe distribuir uniformemente en torno a la media. Descartar los valores de contenido proteico para esos aminoácidos que se alejan demasiado de la media. Típicamente, una variación mayor de 5% con respecto a la media se considera inaceptable, pero esto es arbitrario. Recalcular la media del contenido proteico de los valores restantes para obtener el contenido proteico de la muestra. Dividir el contenido de cada aminoácido por el contenido proteico medio calculado para determinar la composición de aminoácidos de la muestra.

Calcular el error relativo de composición, en porcentaje, por la fórmula:

$$100m/m_s$$

en donde m es la cantidad determinada experimentalmente, en nmol por residuo aminoacídico, del aminoácido en análisis; y m_s es el valor conocido para los residuos de ese aminoácido. El error relativo promedio de composición es el promedio de los valores absolutos de los errores relativos de composición de los aminoácidos individuales, excluyendo típicamente el triptófano y la cisteína de este cálculo. El error relativo promedio de composición puede proporcionar información importante acerca de la estabilidad de los análisis en función del tiempo. La coincidencia en la composición aminoacídica entre la muestra de proteína y la composición conocida se puede usar para corroborar la identidad y pureza de la proteína en la muestra.

ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar es un método físico de análisis basado en la migración, dentro de un capilar, de analitos cargados disueltos en una solución de electrolito, bajo la influencia de un campo eléctrico de corriente continua. En esta sección se describen cuatro métodos de electroforesis capilar, *Electroforesis Capilar en Solución Libre*, *Electroforesis Capilar en Gel*, *Isoelectroenfoque Capilar* y *Cromatografía Electrocinética Micelar*.

Principio General

La velocidad de migración del analito en un campo eléctrico de intensidad, E , está determinada por la movilidad electroforética del analito y la movilidad electroosmótica de la solución amortiguadora dentro del capilar. La movilidad electroforética de un soluto (μ_{ep}) depende de las características del soluto (carga eléctrica, tamaño molecular y forma) y de las características de la solución amortiguadora en donde ocurre la migración (tipo y fuerza iónica del electrolito, pH, viscosidad y aditivos). La velocidad electroforética (V_{ep}) de un soluto, suponiendo una forma esférica, es la siguiente:

$$V_{ep} = \mu_{ep}E = \left(\frac{q}{6\pi\eta r}\right)\left(\frac{V}{L}\right),$$

en donde q es la carga efectiva de la partícula, η es la viscosidad de la solución amortiguadora, r es el tamaño del ión soluto, V es el voltaje aplicado y L es el largo total del capilar.

Cuando se aplica un campo eléctrico a través del capilar lleno con solución amortiguadora, se genera un flujo de disolvente dentro del capilar que se denomina flujo electroosmótico. Su velocidad depende de la movilidad electroosmótica (μ_{eo}) que a su vez depende de la

densidad de la carga en la pared interna del capilar y de las características de la solución amortiguadora. La velocidad electroosmótica (V_{eo}) es la siguiente:

$$V_{eo} = \mu_{eo} E = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) \left(\frac{V}{L} \right),$$

en donde ϵ es la constante dieléctrica de la solución amortiguadora, ζ es el potencial zeta de la superficie del capilar y los otros términos son los definidos anteriormente.

Las movilidades electroforética y electroosmótica del analito pueden tener el mismo sentido o sentido opuesto, según la carga (positiva o negativa) del soluto, siendo la velocidad del soluto (v) la siguiente:

$$V = V_{ep} \pm V_{eo}$$

Se usa la suma o la diferencia entre las dos velocidades (V_{ep} y V_{eo}) dependiendo de si las movilidades tienen el mismo sentido o sentido opuesto. En condiciones de una V_{eo} rápida, con respecto a la V_{ep} de los solutos, se pueden separar analitos cargados tanto negativa como positivamente en la misma corrida. El tiempo (t) que tarda el soluto en migrar la distancia (l) del extremo de inyección del capilar al punto de detección (largo efectivo del capilar) es el siguiente:

$$t = \frac{l}{V_{ep} \pm V_{eo}} = \frac{l(L)}{V(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})},$$

en donde los otros términos son los definidos anteriormente.

En general, los capilares de sílice fundida usados en electroforesis tienen cargas negativas en la pared interna, produciendo un flujo electroosmótico hacia el cátodo. El flujo electroosmótico tiene que mantenerse constante de corrida a corrida para obtener una buena reproducibilidad en la velocidad de migración de los solutos. Para algunas aplicaciones, puede ser necesario reducir o suprimir el flujo electroosmótico modificando la pared interna del capilar o cambiando el pH de la solución amortiguadora.

Cuando la muestra se introduce en el capilar, cada ión del analito de la muestra migra dentro del electrolito de fondo como una zona independiente de acuerdo con su movilidad electroforética. El extendido de cada banda de soluto (zona de dispersión) es el resultado de un fenómeno diferente. En condiciones ideales, el ensanchamiento de la zona del soluto se debe solamente a la difusión molecular del soluto a lo largo del capilar (difusión longitudinal). En este caso, la eficiencia de la zona se expresa como el número de platos teóricos (N), del siguiente modo:

$$N = \frac{(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})(Vt)}{2DL},$$

en donde D es la difusión molecular del soluto en la solución amortiguadora y los otros términos son los definidos anteriormente.

Desde un punto de vista práctico, otros fenómenos como por ejemplo la disipación de calor, la adsorción de la muestra en la pared del capilar, la conductividad no coincidente entre la muestra y la solución amortiguadora, el largo del tapón de inyección, el tamaño de celda del detector y los recipientes no nivelados de solución amortiguadora pueden contribuir significativamente a la dispersión de banda. La separación entre dos bandas (expresada por la resolución, R_s) se puede lograr modificando la movilidad electro-

forética de los analitos, por la movilidad electroosmótica inducida por el capilar y aumentando la eficiencia para la banda de cada analito del siguiente modo:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})},$$

en donde μ_{epa} y μ_{epb} son las movilidades electroforéticas de los dos compuestos a separar; μ_{ep} es la movilidad electroforética promedio de los dos solutos calculada como:

$$\bar{\mu}_{ep} = 1/2 (\mu_{epb} + \mu_{epa})$$

y los demás términos son los definidos anteriormente.

Aparato

Un aparato de electroforesis capilar se compone de una fuente de alimentación controlada de alto voltaje; dos recipientes de soluciones amortiguadoras que se mantienen en el mismo nivel y que contienen soluciones anódicas y catódicas especificadas; dos electrodos (cátodo y ánodo) sumergidos en los recipientes de las soluciones amortiguadoras y conectados a la fuente de alimentación; un capilar de separación, generalmente de sílice fundido, a veces con una ventana de visualización óptica alineada con el detector, dependiendo del detector, con los extremos del capilar ubicados en los recipientes de las soluciones amortiguadoras y el capilar lleno con una solución que se especifica en la monografía correspondiente; un sistema de inyección adecuado; un detector capaz de controlar la cantidad de sustancia de interés que pasa a través de un segmento del capilar de separación en un tiempo dado, generalmente basado en la espectrofotometría de absorción (UV y visible), fluorometría, o detección conductimétrica, amperométrica o espectrométrica de masas, dependiendo de las aplicaciones específicas, o incluso la detección indirecta para detectar compuestos no fluorescentes y que no absorben luz UV y un sistema termostático capaz de mantener la temperatura dentro del capilar.

El método de inyección de muestras y su automatización son críticos para realizar análisis cuantitativos precisos. Los métodos de inyección incluyen la gravedad, la presión o vacío o la inyección electrocinética. La cantidad de cada componente de muestra introducida electrocinéticamente depende de su movilidad electroforética, introduciendo un posible sesgo en los resultados.

Se espera que el capilar, los recipientes de las soluciones amortiguadoras, el método de precondicionamiento, la solución de muestra y las condiciones de migración estén especificadas en la monografía correspondiente. La solución electrolítica empleada se puede filtrar para eliminar partículas y desgasificar para evitar la formación de burbujas que pueden interferir con el sistema de detección. Para lograr un tiempo de migración reproducible de los solutos, es necesario crear, para cada método analítico, una rutina de enjuague riguroso después de cada inyección.

Electroforesis Capilar en Solución Libre

En la electroforesis capilar en solución libre, los analitos se separan en un capilar que contiene únicamente una solución amortiguadora sin ningún medio anticonvectivo. En esta técnica, la separación ocurre debido a que los distintos componentes de la muestra migran como bandas discretas con velocidades diferentes. La velocidad de cada banda depende de la movilidad electroforética del soluto y del flujo electroosmótico en el capilar. Se pueden usar capilares recubiertos, con flujo electroosmótico reducido, para aumentar la capacidad de separación de las sustancias que se absorben en las superficies de sílice fundido.

Este método de electroforesis capilar es apropiado para el análisis de moléculas pequeñas ($PM < 2000$) y grandes ($2000 < PM < 100\,000$). Debido a la alta eficiencia lograda, se pueden separar moléculas que presenten diferencias diminutas en su relación carga-masa. Este método también permite la separación de compuestos quirales al agregar selectores quirales a la solución

amortiguadora de separación. Para lograr una separación óptima hay que tener en cuenta varios parámetros instrumentales y de la solución electrolítica.

PARÁMETROS INSTRUMENTALES

Voltaje—El tiempo de separación es universalmente proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo, un aumento en el voltaje empleado puede producir calor excesivo, aumentando los gradientes de temperatura y viscosidad en la solución amortiguadora dentro del capilar, lo cual ensancha la banda y disminuye la resolución.

Temperatura—El principal efecto de la temperatura se observa en la viscosidad y conductividad eléctrica del amortiguador del pH, por lo tanto afecta la velocidad de migración. En algunos casos, un aumento en la temperatura del capilar puede alterar la conformación de algunas proteínas, modificando su tiempo de migración y eficiencia de separación.

Capilar—El largo y diámetro interno del capilar afectan el tiempo de análisis, la eficiencia de las separaciones y la capacidad. El aumento del largo efectivo y del largo total permiten disminuir los campos eléctricos, a un voltaje constante, lo cual aumenta el tiempo de migración. Para una solución amortiguadora y un campo eléctrico dados, la disipación de calor (por lo tanto el ensanchamiento de banda de la muestra) depende del diámetro interno del capilar. Este último también afecta el límite de detección, dependiendo del volumen de muestra inyectado en el capilar y del sistema de detección usado.

La adsorción de los componentes de la muestra en la pared del capilar limita la eficiencia; por lo tanto, hay que considerar métodos para evitar estas interacciones cuando se desarrolla un método de separación. Esto es crítico en muestras que contienen proteínas. Se han diseñado estrategias para evitar la adsorción de proteínas en la pared del capilar. Estas estrategias incluyen el uso de un pH extremo y la absorción de aditivos de amortiguadores de pH con carga positiva que sólo necesitan la modificación de la composición del amortiguador del pH. Otras estrategias incluyen el recubrimiento de la pared interna del capilar con un polímero unido por enlace covalente a la sílice lo cual evita la interacción entre las proteínas y la superficie de la sílice negativamente cargada. Capilares con recubrimiento de polímeros hidrófilos neutros, catiónicos y aniónicos están disponibles comercialmente.

PARÁMETROS DE LA SOLUCIÓN ELECTROLÍTICA

Tipo de Solución Amortiguadora y Concentraciones—Las soluciones amortiguadoras apropiadas para la electroforesis capilar tienen una capacidad amortiguadora adecuada en el intervalo de pH de elección y baja movilidad para minimizar la generación de corriente.

Para minimizar la distorsión del pico, es importante hacer coincidir la movilidad de los iones en la solución amortiguadora con la movilidad del soluto, siempre que sea posible. Es importante el tipo de disolvente de la muestra empleado para lograr el enfoque de la muestra en la columna, lo que aumenta la eficiencia de separación y mejora la detección. Además, el aumento en la concentración de las soluciones amortiguadoras hasta un pH dado disminuye el flujo electroosmótico y la velocidad del soluto.

pH de la Solución Amortiguadora—El pH de la solución amortiguadora puede afectar la separación al modificar la carga del analito o de otros aditivos y al cambiar el flujo electroosmótico. Para la separación de proteínas y péptidos, un cambio en el pH de la solución amortiguadora desde por encima del punto isoelectrico hasta por debajo del punto isoelectrico cambia la carga neta del soluto de negativo a positivo. Un aumento en el pH de la solución amortiguadora generalmente aumenta el flujo electroosmótico.

Disolventes Orgánicos—Los modificadores orgánicos, como por ejemplo el metanol, el acetonitrilo y otros, se agregan a la solución amortiguadora acuosa para aumentar la solubilidad del soluto o de otros aditivos o para afectar la ionización de los componentes de la muestra. Estos modificadores orgánicos agregados a la solución amortiguadora suelen disminuir el flujo electroosmótico.

Aditivos para Separaciones Quirales—Para separar isómeros ópticos, se agrega un selector quiral a la solución amortiguadora de separación. Los selectores quirales más comúnmente usados son las ciclodextrinas, aunque en algunos casos se pueden usar éteres corona, algunos polisacáridos o incluso proteínas. Como el reconocimiento quiral depende de las distintas interacciones entre el selector quiral y cada uno de los enantiómeros, la resolución lograda para los compuestos quirales depende en gran medida del tipo de selector quiral usado. Mientras se desarrolla una separación dada, puede ser útil analizar las ciclodextrinas que tengan distintos tamaños de cavidad (α , β o Γ -ciclodextrina) o ciclodextrinas modificadas con grupos neutros (metilo, etilo, hidroxialquilo, etc.) o ionizables (aminometilo, carboximetilo, sulfobutíler, etc.). La resolución de separaciones quirales también está controlada por la concentración del selector quiral, la composición y el pH de la solución amortiguadora y la temperatura de separación. Los aditivos orgánicos, como por ejemplo el metanol o la urea, también pueden afectar la resolución de la separación.

Electroforesis Capilar en Gel

La separación ocurre dentro de un capilar lleno con un polímero que actúa como tamiz molecular. Los componentes más pequeños en la muestra se mueven más rápidamente por el capilar que los componentes más grandes. Se puede usar este método para la separación de biopolímeros-proteínas y fragmentos de ADN, según sus masas moleculares.

CARACTERÍSTICAS DE GELES QUÍMICOS Y FÍSICOS

Geles Químicos—Los geles químicos se preparan dentro del capilar por reacción de monómeros. Un ejemplo de dicho gel es una poliácridamida entrecruzada. Este tipo de gel está unido a la pared de sílice fundida y no se puede eliminar sin destruir el capilar. Para el análisis de proteínas, la solución amortiguadora de separación contiene dodecilsulfato de sodio y la muestra se desnaturaliza por calor en una mezcla de dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol o ditiotreitol antes de la inyección. La optimización de la separación en un gel entrecruzado se obtiene modificando la solución amortiguadora de separación (ver *Electroforesis Capilar en Solución Libre*) y controlando la porosidad del gel cuando se prepara. Para un gel de poliácridamida entrecruzada, la porosidad se puede modificar cambiando la concentración de acrilamida o la relación del agente de entrecruzamiento. Como regla, al disminuir la porosidad del gel se reduce la movilidad de los solutos. Debido a la rigidez de este tipo de gel, sólo se puede usar la inyección electrocinética.

Geles Físicos—Los geles físicos son polímeros hidrófilos (es decir, poliácridamida lineal, derivados de celulosa, dextrano, etc.) que se pueden disolver en soluciones amortiguadoras acuosas de separación, dando lugar a un medio de separación que también actúa como tamiz molecular. Estos medios de separación poliméricos son más fáciles de preparar que los polímeros entrecruzados. Se pueden preparar en un vial y llenar por presión un capilar de pared recubierta sin flujo electroosmótico. Si se reemplaza el gel antes de cada inyección generalmente mejora la reproducibilidad de la separación. La porosidad de los geles físicos se puede aumentar usando polímeros de un peso molecular mayor (a una concentración de polímero dada) o disminuyendo la concentración de polímero (para un peso molecular de polímero dado). Al disminuir la porosidad del gel se reduce la movilidad del soluto para la misma solución amortiguadora. Se pueden usar técnicas de inyección hidrodinámica y de electromigración ya que la disolución de estos polímeros en la solución amortiguadora produce soluciones poco viscosas.

Isoelectroenfoque Capilar

Las moléculas migran bajo la influencia del campo eléctrico, siempre y cuando estén cargadas, en un gradiente de pH generado por anfólitos que tienen una amplia gama de valores de pI (ácidos

poli-aminocarboxílicos) disueltos en la solución amortiguadora de separación. Los tres pasos básicos en el isoelectroenfoque capilar son la carga de la muestra, el enfoque y la movilización.

Carga—

Carga en un Solo Paso—La muestra se mezcla con anfolitos y se introduce en el capilar por presión o vacío.

Carga Secuencial—Se introducen en el capilar una solución amortiguadora inicial, luego los anfolitos, luego la muestra mezclada con anfolitos, otra vez los anfolitos solos y finalmente la solución amortiguadora final. El volumen de la muestra debe ser suficientemente pequeño como para no modificar el gradiente de pH.

Enfoque—Cuando se aplica voltaje, los anfolitos migran hacia el cátodo o el ánodo según su carga neta, creando un gradiente de pH desde el ánodo (menor pH) al cátodo (mayor pH). Los componentes a separar migran hasta que alcanzan el pH correspondiente a su punto isoelectrónico y la corriente cae a valores muy bajos.

Movilización—Las bandas de los componentes separados migran más allá del detector mediante uno de los siguientes tres métodos.

Método 1—Durante el *Enfoque*, bajo la influencia del flujo electroosmótico cuando este flujo es suficientemente pequeño para permitir el enfoque de los componentes.

Método 2—Por aplicación de presión positiva después del *Enfoque*.

Método 3—Después del *Enfoque*, agregando sales en el recipiente del cátodo o del ánodo (dependiendo del sentido elegido para la movilización), a fin de alterar el pH en el capilar cuando se aplica voltaje. Al cambiar el pH, las proteínas y anfolitos se movilizan hacia el recipiente que contiene las sales agregadas y pasan por el detector.

La separación lograda se expresa como ΔpI y depende del gradiente de pH (dpH), el número de anfolitos que tienen valores de pI diferentes, el coeficiente de difusión (D), la intensidad del campo eléctrico (E) y la variación de la movilidad electroforética del analito en función del pH y es la siguiente:

$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

en donde dpH/dx es el gradiente de pH; y $-d\mu/dpH$ es la variación de la movilidad de la solución en función del pH en la región cercana a pI .

Parámetros de Optimización—Los principales parámetros que se deben considerar en el desarrollo de las separaciones son el voltaje, el capilar y los solutos.

Voltaje—Uso de campos altos desde 300 V/cm a 1000 V/cm durante el *Enfoque*.

Capilar—Según la estrategia de *Movilización* seleccionada (ver más arriba), el flujo electroosmótico se debe reducir o eliminar. Los capilares recubiertos tienden a reducir el flujo electroosmótico.

Soluciones—El recipiente con el amortiguador del pH correspondiente al ánodo está lleno de una solución de pH más bajo que el pI del anfolito más ácido y el recipiente del cátodo está lleno con una solución que tiene un pH más alto que el pI del anfolito más básico. Frecuentemente se usa ácido fosfórico para el ánodo e hidróxido de sodio para el cátodo.

La adición de un polímero, como la metilcelulosa, a la solución del anfolito tiende a suprimir las fuerzas convectivas (si las hubiese) y el flujo electroosmótico por aumento de la viscosidad. Hay disponibles comercialmente anfolitos en muchos intervalos de pH que se pueden mezclar para obtener un intervalo de pH ampliado. Los intervalos de pH más amplios se usan para estimar el punto isoelectrónico mientras que los más estrechos se emplean para mejorar la exactitud. La calibración se puede llevar a cabo relacionando el tiempo de migración con el punto isoelectrónico de una serie de marcadores estándar de proteínas. Durante el *Enfoque*, se puede evitar la precipitación de proteínas en su punto isoelectrónico, si fuera necesario, usando aditivos de amortiguadores de pH como por ejemplo glicerol, agentes tensoactivos, urea o amortiguadores de pH zwitteriónicos. Sin embargo, según las concentraciones, la urea puede desnaturar las proteínas.

Cromatografía Electrocinética Micelar (CECM)

La separación se efectúa en una solución electrolítica que contiene un agente tensoactivo, generalmente iónico, en una concentración por encima de la concentración micelar crítica. Las moléculas de soluto se distribuyen entre la solución amortiguadora acuosa y la fase pseudo-estacionaria compuesta por las micelas según el coeficiente de partición del soluto. La técnica se puede considerar un híbrido de electroforesis y cromatografía. Es una técnica electroforética que se puede usar para la separación de solutos neutros o cargados manteniendo la eficiencia, la velocidad y la aptitud del instrumento de electroforesis capilar. Uno de los agentes tensoactivos más ampliamente usados es el dodecilsulfato de sodio, aunque también se han usado otros agentes tensoactivos aniónicos y catiónicos, como por ejemplo sales de cetiltrimetilamonio.

A un pH neutro y alcalino, se genera un flujo electroosmótico fuerte que mueve los iones de la solución amortiguadora de separación hacia el cátodo. Si se usa dodecilsulfato de sodio como agente tensoactivo, la migración electroforética de la micela aniónica se produce en el sentido opuesto, hacia el ánodo. Como resultado, la velocidad general de migración de las micelas disminuye en comparación con el flujo en masa de la solución electrolítica. En el caso de solutos neutros, como el analito se puede repartir entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y no tiene movilidad electroforética, la velocidad de migración del analito dependerá únicamente del coeficiente de partición entre la micela y la solución amortiguadora acuosa. En el electroforograma, el pico correspondiente a cada soluto sin carga siempre se encuentra entre el del marcador del flujo electroosmótico y el de la micela y el tiempo transcurrido entre estos dos picos se denomina ventana de separación. Para los solutos con carga eléctrica, la velocidad de migración depende del coeficiente de partición del soluto entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y de la movilidad electroforética del soluto en ausencia de micelas.

El mecanismo de separación es esencialmente cromatográfico y la migración del soluto y la resolución se pueden expresar en función del factor de capacidad del soluto (K'), que es la relación entre el número total de moles de soluto en la micela y los moles en la fase móvil. Para un compuesto neutro, K' es del siguiente modo:

$$K' = \frac{t_r - t_o}{t_o(1 - t_r/t_m)} = K \left(\frac{V_s}{V_m} \right),$$

en donde t_r es el tiempo de migración del soluto; t_o es el tiempo de análisis del soluto no retenido obtenido al inyectar un marcador de flujo electroosmótico que no entra a la micela (por ejemplo, metanol); t_m es el tiempo de migración de la micela medido al inyectar un marcador de micela, como por ejemplo Sudán III, que migra continuamente asociado con la micela; K es el coeficiente de partición del soluto; V_s es el volumen de la fase de las micelas; y V_m es el volumen de la fase móvil.

La resolución entre dos compuestos que migran cerca (R_s) es la siguiente:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K'_b}{K'_a} \right) \left(\frac{1 - (t_o - t_m)}{r + (t_o/t_m)K'_a} \right),$$

en donde N es el número de platos teóricos para uno de los compuestos; α es la selectividad obtenida; K'_a y K'_b son los factores de capacidad para ambos componentes; y los otros términos son los definidos anteriormente.

Ecuaciones similares, aunque no idénticas, dan valores de K' y R_s para compuestos con carga eléctrica.

Parámetros de Optimización—Los principales parámetros a considerar en el desarrollo de separaciones por CECM son los parámetros instrumentales y de la solución electrolítica.

PARÁMETROS INSTRUMENTALES

Voltaje—El tiempo de separación es inversamente proporcional al voltaje aplicado. Un aumento en el voltaje podría generar calor excesivo, aumentando los gradientes de temperatura y de viscosidad de la solución amortiguadora en la sección transversal del capilar. Este efecto puede ser significativo con amortiguadores del pH de alta conductividad, como por ejemplo aquellos que contienen micelas. La disipación insuficiente del calor ensancha la banda y disminuye la resolución.

Temperatura—Las variaciones en la temperatura del capilar afectan el coeficiente de partición del soluto entre la solución amortiguadora y la micela, la concentración crítica de micelas y la viscosidad de la solución amortiguadora. Estos parámetros contribuyen al tiempo de migración de los solutos.

Capilar—El largo y el diámetro interno contribuyen al tiempo de análisis y a la eficiencia de las separaciones. El aumento del largo efectivo y del largo total puede disminuir los campos eléctricos, trabajando a un voltaje constante, aumenta el tiempo de migración y mejora la eficiencia de la separación. El diámetro interno controla la disipación de calor, con un amortiguador del pH dado y a un campo eléctrico dado y ensancha la banda de la muestra.

PARÁMETROS DE LA SOLUCIÓN ELECTROLÍTICA

Tipo y Concentración del Agente Tensoactivo—El tipo de agente tensoactivo, al igual que la fase estacionaria en cromatografía, afecta la resolución ya que modifica la selectividad de la separación. El logaritmo de K' de un compuesto neutro aumenta linealmente con la concentración de detergente en la fase móvil. La resolución en CECM alcanza un máximo cuando K' se acerca al valor de

$$\sqrt{t_m/t_a},$$

la modificación de la concentración del agente tensoactivo en la fase móvil cambia la resolución.

pH de la Solución Amortiguadora—El pH no modifica el coeficiente de partición de solutos no ionizados, pero puede modificar el flujo electroosmótico en capilares sin recubrimiento. Una disminución en el pH de la solución amortiguadora disminuye el flujo electroosmótico y por lo tanto aumenta la resolución de los solutos neutros, aumentando el tiempo de análisis.

Disolventes Orgánicos—Se pueden agregar modificadores orgánicos (metanol, propanol, acetonitrilo, etc.) a la solución electrolítica de separación para mejorar la separación de compuestos hidrófobos. La adición de estos modificadores generalmente disminuye el tiempo de migración y la selectividad de la separación. La adición de modificadores orgánicos afecta la formación de micelas, por lo tanto sólo se puede usar una concentración dada de un agente tensoactivo con un cierto porcentaje de un modificador orgánico antes de eliminar o alterar el equilibrio de micelización, con lo cual desaparecen las micelas y desaparece el mecanismo de partición de la CECM. La eliminación de micelas en presencia de un alto contenido de disolvente orgánico no siempre significa que la separación ya no será posible, dado que en ciertos casos, la interacción hidrófoba entre el monómero tensoactivo iónico y los solutos neutros forman complejos solvofobos que se pueden separar electroforéticamente.

Aditivos para Separaciones Quirales—Se incluye un selector quiral en el sistema micelar ya unido al agente tensoactivo por enlace covalente o agregado al electrolito de separación micelar. Las micelas que tienen un grupo con propiedades de discriminación quiral incluyen sales, ácidos *N*-dodecanoil-L-aminoácidos, sales biliares, etc. La resolución quiral también se puede lograr usando discriminadores quirales, como por ejemplo ciclodextrinas agregadas a las soluciones electrolíticas que contienen agentes tensoactivos aquirales micelizados.

Otros Aditivos—La selectividad se puede modificar agregando productos químicos al amortiguador del pH. También se emplea la adición de varios tipos de ciclodextrinas al amortiguador del pH para reducir la interacción de solutos hidrófobos con la micela, aumentando la selectividad para este tipo de compuesto. La adición de sustancias modificadoras de las interacciones soluto-micela por

adsorción en las micelas, se ha usado para mejorar la selectividad de las separaciones en CECM. Estos aditivos pueden ser un segundo agente tensoactivo (iónico o no iónico) que da lugar a la formación de micelas mixtas, o cationes metálicos que se disuelven en la micela y forman complejos de coordinación con los solutos.

ANÁLISIS CUANTITATIVO

Las áreas de los picos se dividen por el tiempo de migración correspondiente para obtener el área corregida a fin de compensar el cambio en el tiempo de migración de corrida a corrida, reduciendo la variación de la respuesta. También compensa las distintas respuestas de los constituyentes de la muestra que tienen diferentes tiempos de migración. Cuando se usa un estándar interno, hay que verificar que no enmascare ninguno de los picos de la sustancia a examinar.

Cálculos—A partir de los valores obtenidos, calcular el contenido del componente o componentes que se están determinando. Cuando se indique, se calcula el porcentaje de uno o más componentes de la muestra a examinar determinando las áreas del pico o picos como porcentaje de las áreas totales corregidas de todos los picos, excluyendo aquellos debidos a disolventes o reactivos agregados. Se recomienda usar un sistema de integración automático (sistema integrador o de adquisición y procesamiento de datos).

Aptitud del Sistema de Electroforesis Capilar

La elección de los parámetros de aptitud a usar depende del tipo de electroforesis capilar. Estos parámetros son el factor de capacidad (K') usado únicamente para la *Electroforesis Electrocínética Micelar*, el número de platos teóricos (n), el factor de simetría (A_s) y la resolución (R_s). Es de destacar que las expresiones teóricas para n y R_s se han descrito en las secciones anteriores, pero las ecuaciones más prácticas que permiten la determinación de estos parámetros de aptitud usando electroforetogramas se describen a continuación.

El número de platos teóricos (n) se puede calcular a partir de la fórmula:

$$n = 5,54 (t/b_{0,5})^2$$

en donde t es la distancia, en mm, a lo largo de la línea base entre el punto de inyección y la perpendicular trazada desde el máximo del pico en cuestión; y $b_{0,5}$ es el ancho del pico, en mm, a la mitad de su altura.

La resolución (R_s) se puede calcular a partir de la fórmula:

$$R_s = 1,18(t_b - t_a/b_{0,5b} + b_{0,5a})$$

en donde t_b y t_a son las distancias, en mm, a lo largo de la línea base, entre el punto de inyección y la perpendicular trazada desde el máximo de los dos picos adyacentes ($t_b > t_a$); y $b_{0,5b}$ y $b_{0,5a}$ son los anchos de los picos, en mm, a la mitad de su altura.

La resolución (R_s) también se puede calcular midiendo la altura del valle (c) entre dos picos parcialmente resueltos en una preparación estándar, la altura del pico más pequeño (d) y especificando que $(c/d) \leq x$, en donde x es el límite indicado en la monografía correspondiente.

El factor de simetría de un pico (A_s) se puede calcular usando la fórmula:

$$A_s = b_{0,05}/2A$$

en donde $b_{0,05}$ es el ancho del pico a una vigésima parte de la altura del pico; y A es la distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el borde frontal del pico a una vigésima parte de la altura del pico.

Otros parámetros de aptitud del sistema incluyen pruebas para la repetibilidad del área (es decir, la desviación estándar de las áreas o del área/tiempo de migración) y pruebas para la repetibilidad del tiempo de migración (es decir, la desviación estándar del tiempo de migración). Para la repetibilidad del tiempo de migración, es necesario usar una prueba para medir la aptitud de los procedimientos de lavado del capilar. Para evitar tiempos de migración no repetibles, una práctica alternativa es usar un tiempo de migración relativo al estándar interno.

Una prueba para verificar la relación señal-ruido de una preparación estándar o para determinar el límite de cuantificación es un parámetro útil para medir la aptitud del sistema. El límite de detección y el límite de cuantificación corresponden a una relación señal-ruido mayor que 3 y 10, respectivamente. La relación señal-ruido (S/N) se calcula del siguiente modo:

$$S/N = 2H/h_n$$

en donde H es la altura del pico correspondiente en el electroforetograma obtenido con la solución de referencia especificada; y h_n es el valor absoluto de la máxima fluctuación de ruido desde la línea base en un electroforetograma obtenido después de inyectar un blanco y observado sobre una distancia igual a veinte veces el ancho a la mitad de la altura del pico en el electroforetograma obtenido con la solución de referencia y situado equitativamente alrededor del lugar donde se encontraría este pico.

ISOELECTROENFOQUE

El isoelectroenfoque (IEF, por su sigla en inglés) es un método de electroforesis que separa proteínas según sus puntos isoelectrónicos. La separación se lleva a cabo en una capa gruesa de gel de poliacrilamida o agarosa que contiene una mezcla de electrólitos anfotéricos (anfolitos). Cuando se aplica un campo eléctrico, los anfolitos migran en el gel, creando un gradiente de pH. En algunos casos, se usan geles que contienen un gradiente de pH inmovilizado, preparado por incorporación de ácidos y bases débiles en regiones específicas de la red de gel durante su preparación. Cuando las proteínas aplicadas alcanzan la zona del gel que tiene un pH igual a su punto isoelectrónico, su carga se neutraliza y la migración cesa. Los gradientes se pueden formar en diversos intervalos de pH, según la mezcla de anfolitos elegida.

Principios Generales

Cuando una proteína está en la posición de su punto isoelectrónico, no tiene carga neta y el campo eléctrico no la puede mover en una matriz de gel. Sin embargo, se puede mover de dicha posición por difusión. El gradiente de pH obliga a la proteína a mantenerse en la posición de su punto isoelectrónico, concentrándola, este efecto de concentración se denomina "enfoco". Al aumentar el voltaje aplicado o reducir la carga de la muestra, hay una mejor resolución de las bandas. El voltaje aplicado está limitado por el calor generado, que necesita ser disipado. El uso de geles delgados y una placa de enfriamiento eficiente que esté controlada por un circulador termostático evita que el gel se queme y permite un enfoque nítido. La separación se estima mediante la diferencia de pI mínima que es necesaria para separar dos bandas vecinas, del siguiente modo:

$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

en donde D es el coeficiente de difusión de la proteína; dpH/dx es el gradiente de pH; E es la intensidad del campo eléctrico, en voltios por centímetro y $-d\mu/dpH$ es la variación de la movilidad del soluto en función del pH en la región cercana al pI . Como no se pueden alterar D y $-d\mu/dpH$ para una proteína dada, la separación se puede mejorar usando un intervalo de pH más estrecho y aumentando la intensidad del campo eléctrico.

Desde un punto de vista operativo, se debe prestar especial atención a las características de la muestra o a su preparación. La sal en una muestra puede ser un problema y en lo posible es mejor preparar la muestra en agua desionizada o anfolitos al 2% usando diálisis o filtración con gel si fuera necesario. Se han usado potenciales de 2500 voltios y se consideran óptimos en ciertas condiciones. Se pueden aplicar hasta 30 vatios de potencia constante y generalmente se produce una separación completa en 1,5 a 3,0 horas. El tiempo necesario para completar el enfoco en capas delgadas de gel de poliacrilamida se determina colocando una

proteína coloreada (p. ejemplo: hemoglobina) en distintas posiciones en la superficie del gel y aplicando el campo eléctrico: el estado estacionario se alcanza cuando todas las aplicaciones dan un patrón de banda idéntico. En algunos procedimientos, se determina que el enfoque está completo según el tiempo transcurrido después de la aplicación de la muestra.

La resolución entre las bandas de proteínas en un gel de IEF preparado con anfolitos transportadores puede ser muy buena. Se puede lograr una mejor resolución usando gradientes de pH inmovilizados donde las sustancias amortiguadoras, que son análogas a los anfolitos transportadores, se copolimerizan dentro de la matriz de gel. Las proteínas que muestran pI que difieren tan sólo en 0,02 unidades de pH se pueden resolver usando un gel preparado con anfolitos transportadores, mientras que los gradientes de pH inmovilizados pueden resolver proteínas que difieran en aproximadamente 0,001 unidades de pH.

El gel de IEF se puede usar como prueba de identidad cuando la migración en el gel se compara con una preparación estándar y proteínas de calibración de IEF; el gel de IEF se puede usar como prueba de límite cuando la densidad de una banda en el IEF se compara subjetivamente con la densidad de las bandas que aparecen en una preparación estándar, o se puede usar como prueba semicuantitativa cuando la densidad se mide usando un densitómetro o instrumental similar para determinar la concentración relativa de proteína en las bandas.

Aparato

Un aparato para isoelectroenfoque consiste en un generador de corriente continua controlable, de salida estabilizada; una cámara plástica rígida de isoelectroenfoque que contienen una placa enfriada de un material adecuado para sostener el gel; y una cubierta plástica con electrodos de platino que se conectan al gel por medio de papel absorbente de largo, ancho y grosor adecuados, impregnado con soluciones de electrólitos anódicos y catódicos.

Procedimiento

A menos que se indique lo contrario en una monografía dada, se usará el procedimiento siguiente en geles de poliacrilamida en capa gruesa.

Preparación de los Geles—

Montaje—Está compuesto de una placa de vidrio (A) sobre la cual se coloca la película de poliéster (B) para facilitar la manipulación del gel, uno o más espaciadores (C), una segunda placa de vidrio (D) y pinzas para mantener unida la estructura (ver *Figura 1*).

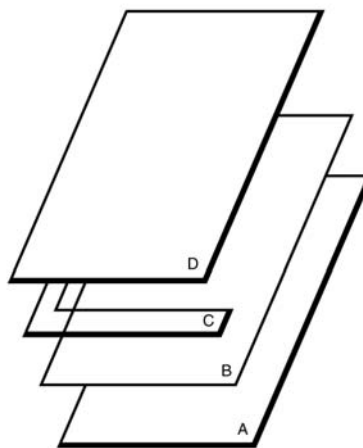


Fig. 1 Molde

Gel de Poliacrilamida al 7,5%—Disolver 29,1 g de acrilamida y 0,9 g de metilbisacrilamida en 100 mL de agua. Agregar la mezcla de anfolitos especificada en la monografía individual a 2,5 volúmenes de esta solución y llevar hasta 10 volúmenes con agua. Mezclar cuidadosamente y desgasificar la solución.

Preparación del Montaje—Colocar la película de poliéster sobre la placa de vidrio inferior, aplicar el espaciador, colocar la segunda placa de vidrio y las pinzas. Antes de usar, colocar la mezcla en un agitador magnético y agregar 0,25 volúmenes de una solución de persulfato de amonio al 10% y 0,25 volúmenes de tetrametilendiamina. Llenar inmediatamente con el gel el espacio entre las placas de vidrio del montaje.

Solución Fijadora para Gel de Poliacrilamida de Isoelectroenfoque—Mezclar 35 g de ácido sulfosalicílico y 100 g de ácido tricloroacético en 1000 mL de agua.

Solución de Tinción Coomassie y Solución de Decoloración—Usar las mismas soluciones indicadas en *Electroforesis en Gel de Poliacrilamida*.

Procedimiento—Desarmar el montaje y usando la película de poliéster, transferir el gel al soporte enfriado humedecido con unos pocos mililitros de un líquido adecuado, procurando evitar que se formen burbujas de aire. Preparar las soluciones de prueba y las soluciones de referencia según se especifica en la monografía individual. Colocar sobre el gel las tiras de papel para la aplicación de muestras, de aproximadamente 10 mm × 5 mm, e impregnar cada una con las cantidades prescritas de las soluciones de prueba y de referencia. Si la concentración proteica de la solución es demasiado baja, se pueden superponer varias tiras (hasta cuatro). Aplicar también la cantidad descrita de una solución de proteínas con puntos isoelectrónicos conocidos como marcadores de pH para calibrar el gel. En algunos procedimientos, el gel tiene ranuras moldeadas previamente donde se aplica la solución de la muestra, en lugar de usar tiras de papel impregnadas. Cortar dos tiras de papel del tamaño del gel e impregnarlas con las soluciones de los electrolitos: ácida para el ánodo y alcalina para el cátodo. Las composiciones de las soluciones del ánodo y el cátodo se proporcionan en cada monografía. Aplicar estos papeles absorbentes a cada lado del gel a varios milímetros del borde. Colocar la cubierta de modo que los electrodos estén en contacto con los papeles absorbentes (con respecto a los polos anódico y catódico). Proceder con el isoelectroenfoque aplicando los parámetros descritos en la monografía individual. Cortar la corriente cuando la migración de la mezcla de las proteínas estándar se haya estabilizado. Usando pinzas, retirar las tiras de aplicación de la muestra y los dos papeles absorbentes de los electrodos. Sumergir el gel en la *Solución Fijadora para Gel de Poliacrilamida de Isoelectroenfoque*. Incubar con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 minutos. Escurrir la solución y agregar 200 mL de la *Solución de Decoloración*. Incubar con agitación durante 1 hora. Escurrir el gel y agregar la *Solución de Tinción Coomassie*. Incubar durante 30 minutos. Desteñir el gel por difusión pasiva con la *Solución de Decoloración* hasta que las bandas se vean bien contra un fondo transparente. Ubicar la posición e intensidad de las bandas en el electroferograma como se prescribe en cada monografía.

Procedimiento Alternativo—Cuando una monografía hace referencia al método general para el isoelectroenfoque antes descrito, se pueden usar variaciones en la metodología o el procedimiento, sujetas a validación. Estas variaciones incluyen el uso de geles previamente moldeados disponibles comercialmente; el uso de gradientes de pH inmovilizados; el uso de varillas de gel; y el uso de cartuchos de distintas dimensiones, incluyendo geles ultra delgados (0,2 mm); las variaciones en el procedimiento de aplicación de la muestra, incluyendo distintos volúmenes de muestra o el uso de máscaras de aplicación de la muestra o tiras absorbentes que no sean de papel; el uso de distintas condiciones de corrida, incluyendo variaciones en el campo eléctrico dependiendo de las dimensiones del gel y el equipo y el uso de tiempos de migración fijos en lugar de la interpretación subjetiva de la estabilidad de la banda; la inclusión de un paso previo al enfoque; el uso de instrumentación automatizada; y el uso de geles de agarosa.

Validación del Procedimiento

Cuando se emplean métodos alternativos al método general, es necesario validarlos. Se pueden usar los siguientes criterios para validar la separación: la formación de un gradiente de pH estable de las características deseadas, evaluado usando marcadores de pH coloreados con puntos isoelectrónicos conocidos; la comparación con el electroferograma suministrado con la sustancia química de referencia para la preparación a examinar; y cualquier otro criterio de validación prescrito en la monografía individual.

Variaciones Especificadas del Método General

Las variaciones del método general necesarias para el análisis de sustancias específicas pueden estar especificadas en detalle en cada monografía. Las variaciones pueden incluir el agregado de urea en el gel de corrida (una concentración 3 M a menudo es satisfactoria para mantener la proteína en solución pero se puede usar hasta 8 M). Algunas proteínas precipitan en su punto isoelectrónico. En este caso, se incluye la urea en la formulación del gel para mantener la proteína en solución. Si se usa urea, pueden usarse solamente soluciones recién preparadas para evitar la carbamilación de la proteína. Otras variaciones incluyen el uso de otros métodos de tinción y el uso de aditivos de geles tales como detergentes no iónicos (por ejemplo: octilglucósido) o detergentes zwitteriónicos (por ejemplo: CHAPS o CHAPSO) para evitar la aglomeración o precipitación de las proteínas.

NOTA—Las siguientes son medidas preventivas generales que se pueden usar para mejorar el método. Las muestras se pueden aplicar a cualquier zona del gel, pero en general, se deben aplicar en zonas donde se espera que se enfoquen. Para proteger las proteínas de ambientes de pH extremo, las muestras no se pueden aplicar cerca de ninguno de los electrodos. Durante el desarrollo del método, el analista puede intentar aplicar la proteína en tres posiciones del gel (por ejemplo: en el medio y en ambos extremos); el patrón de una proteína aplicada en los extremos opuestos del gel puede no ser idéntico. Si un gel se enfoca por mucho tiempo, puede ocurrir un fenómeno conocido como migración catódica, donde el gradiente de pH disminuye con el tiempo. Aunque no se entiende bien, la electroendosmosis y la absorción de dióxido de carbono son factores que pueden favorecer la migración catódica. La migración catódica se observa cuando la proteína enfocada migra desde el extremo catódico del gel. Se pueden usar gradientes de pH inmovilizados para resolver este problema. Es importante un enfriamiento eficiente (aproximadamente 4°C) del lecho donde se encuentra el gel durante el enfoque. Las fuerzas de campo elevadas usadas durante el isoelectroenfoque pueden producir recalentamiento y afectar la calidad del gel enfocado.

MAPEO DE PÉPTIDOS

Propósito y Alcance

El mapeo de péptidos es una prueba de identidad para proteínas, especialmente para aquellas obtenidas por tecnología de ADN-r. Implica el tratamiento químico o enzimático de una proteína, con la formación de fragmentos peptídicos y seguido de la separación e identificación de los fragmentos en una manera reproducible. Es una prueba potente capaz de identificar cambios en aminoácidos individuales como resultado de acontecimientos tales como errores en la lectura de las secuencias de ADN complementario (ADNc) o mutaciones puntuales. El mapeo de péptidos es un procedimiento comparativo ya que la información obtenida, comparada con un estándar de referencia o material de referencia tratado de manera similar, confirma la estructura primaria de la proteína, es capaz de detectar si ha habido alguna alteración en la estructura y demuestra la uniformidad del proceso y la estabilidad genética. Cada proteína presenta características exclusivas que se deben entender bien para que el enfoque científico y analítico permita el desarrollo validado de un mapa peptídico que suministre suficiente especificidad.

Esta sección proporciona asistencia detallada para la aplicación del mapeo de péptidos y su validación para caracterizar el producto proteico deseado, con el fin de evaluar la estabilidad de la construcción de expresión de células usadas para productos de

ADN recombinante; para evaluar la uniformidad del proceso global; y para evaluar la estabilidad del producto, además de asegurar la identidad del producto proteico, o de detectar la presencia de una variante de la proteína. El esquema presentado establece diferencias entre la validación del método en una etapa temprana del proceso reglamentario, a nivel de Nuevo Fármaco en Investigación (IND, por sus siglas en inglés) y la validación completa para apoyar una Solicitud de Nuevo Fármaco (NDA, por sus siglas en inglés), Solicitud de Licencia de Producto (PLA, por sus siglas en inglés), o Solicitud de Autorización para Comercialización (MAA, por sus siglas en inglés). Los conceptos de validación descritos concuerdan con el capítulo de información general *Validación de Métodos Farmacopeicos* (1225) y con el documento de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) sobre *Validación de Métodos Analíticos*.

El Mapa Peptídico

El mapeo de péptidos no es un método general, pero implica el desarrollo de mapas específicos para cada proteína única. Si bien la tecnología evoluciona rápidamente, existen ciertos métodos que están generalmente aceptados. Las variaciones de estos métodos se indican, cuando corresponda, en las monografías específicas.

Un mapa peptídico se puede considerar como la huella digital de una proteína y es el producto final de varios procesos químicos que permiten una amplia comprensión de la proteína analizada. Se necesitan cuatro pasos principales para el desarrollo del procedimiento: aislamiento y purificación de la proteína, si la proteína es parte de una formulación; escisión selectiva de los enlaces peptídicos; separación cromatográfica de los péptidos; y análisis e identificación de los péptidos. Una muestra de prueba se digiere y valora en paralelo con un estándar de referencia o material de referencia. La escisión completa es más factible con enzimas tales como endoproteasas (por ejemplo: tripsina) en lugar de reactivos de escisión química. Un mapa debe contener suficientes péptidos para ser significativo. Por otro lado, si hay demasiados fragmentos, el mapa puede perder especificidad ya que de este modo es posible que muchas proteínas tengan los mismos perfiles.

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

El aislamiento y la purificación son necesarios para el análisis de fármacos a granel o en formas farmacéuticas que contienen excipientes y proteínas transportadoras que interfieren y, cuando sea necesario, se especifica en la monografía. Se debe validar la recuperación cuantitativa de proteínas de la forma farmacéutica.

ESCISIÓN SELECTIVA DE UNIONES PEPTÍDICAS

La selección del enfoque usado para la ruptura de uniones peptídicas depende de la proteína que se está analizando. Este proceso de selección involucra la determinación del tipo de escisión a emplear—enzimática o química—y el tipo de agente de escisión dentro de la categoría elegida. En la *Tabla 1* se muestran varios agentes de escisión y su especificidad. Esta no es una lista completa y se ampliará a medida que se identifiquen otros agentes de escisión.

Tratamiento Previo de la Muestra—Según el tamaño o la configuración de la proteína, se pueden usar distintos enfoques en el tratamiento previo de las muestras. Para los anticuerpos monoclonales, es necesario separar las cadenas pesadas y livianas antes del mapeo. Si se usa tripsina como agente de escisión para las proteínas que tengan una masa molecular mayor que 100 000 Da, se deben proteger los residuos lisina por citraconilación o maleilación; de lo contrario, se generan demasiados péptidos.

Tratamiento Previo del Agente de Escisión—Podría ser necesario el tratamiento previo de purificación de los agentes de escisión—especialmente los agentes enzimáticos— con el fin de asegurar la reproducibilidad del mapa. Por ejemplo, la tripsina usada como agente de escisión debe tratarse con tosil-L-fenilalanina clorometilcetona para inactivar la quimotripsina. Otros métodos,

tales como la purificación de la tripsina por HPLC o la inmovilización de enzimas en un soporte de gel, han resultado eficaces cuando sólo hay disponible una pequeña cantidad de proteína.

Tratamiento Previo de la Proteína—Bajo ciertas condiciones, podría ser necesario concentrar la muestra o separar la proteína de sustancias y estabilizadores agregados a la formulación del producto, si éstos interfieren con el procedimiento de mapeo. Los procedimientos físicos usados para el tratamiento previo pueden incluir la ultrafiltración, la cromatografía de columna y la liofilización.

Otros tratamientos previos, tales como el agregado de agentes caotrópicos (por ejemplo, urea), se pueden usar para desplegar la proteína antes del mapeo. Para permitir que la enzima tenga acceso total a los sitios de escisión y que la proteína sufra algún grado de desplegamiento, a menudo es necesario reducir y someter las uniones disulfuro a alquilación antes de la digestión.

La digestión con tripsina puede introducir ambigüedades en el mapa triptico debido a reacciones secundarias durante la digestión, tales como escisión no específica, desamidación, isomerización de disulfuros, oxidación de residuos de metionina, o formación de grupos piroglutámicos creados por desamidación de glutamina en el extremo *N*-terminal de un péptido. Además, se pueden producir picos por autohidrólisis de la tripsina. Sus intensidades dependen de la relación de la tripsina con respecto a la proteína. Para evitar la autohidrólisis, se pueden preparar soluciones de proteasas a un pH que no sea óptimo (por ejemplo, pH 5 para la tripsina), lo cual significa que la enzima sólo se activa cuando se diluye con el amortiguador del pH de digestión.

Establecimiento de las Condiciones Óptimas de Digestión—Los factores que afectan la integridad y eficacia de la digestión de las proteínas son aquellos que podrían afectar a cualquier reacción química o enzimática.

pH—El pH de la mezcla de digestión se determina empíricamente para asegurar el desempeño óptimo de un agente de escisión dado. Por ejemplo, cuando se usa bromuro de cianógeno como agente de escisión, es necesario un ambiente altamente ácido (por ejemplo: pH 2, ácido fórmico); sin embargo, al usar tripsina como agente de escisión, un ambiente levemente alcalino (pH 8) es óptimo. Como regla general, el pH del entorno de la reacción no debe alterar la integridad química de la proteína durante la digestión y no debe cambiar durante el transcurso de la reacción de fragmentación.

Temperatura—Una temperatura entre 25° y 37° es adecuada para la mayoría de las digestiones. La temperatura empleada está prevista para minimizar las reacciones químicas secundarias. El tipo de proteína en análisis dictará la temperatura del entorno de reacción ya que algunas proteínas son más susceptibles a la desnaturalización a medida que aumenta la temperatura de la reacción. Por ejemplo, la digestión de somatropina bovina recombinante se realiza a 4° ya que a temperaturas más altas precipita durante la digestión.

Tiempo—Si se dispone de suficiente muestra, se considera un estudio en función del tiempo a fin de determinar el tiempo óptimo para obtener un mapa reproducible y evitar una digestión incompleta. El tiempo de digestión varía de 2 a 30 horas. La reacción se detiene al agregar un ácido que no interfiera en el mapa triptico, o por congelación.

Cantidad de Agente de Escisión—Si bien se usan cantidades excesivas de agente de escisión para lograr tiempos de digestión razonablemente rápidos (es decir, 6 a 20 horas), la cantidad se minimiza para que no contribuya al patrón del mapa cromatográfico. Generalmente se usa una relación proteína-proteasa entre 20:1 y 200:1. Se recomienda agregar el agente de escisión en dos o más etapas para optimizar la escisión. Sin embargo, el volumen final de la reacción se mantiene lo suficientemente pequeño para facilitar el siguiente paso en el mapeo de péptidos—el paso de separación. Para elucidar los artefactos de digestión que podrían interferir con los análisis siguientes, se realiza una determinación con un blanco, usando un control de digestión con todos los reactivos, excepto la proteína en análisis.

Tabla 1. Ejemplos de Agentes de Escisión

Tipo	Agente	Especificidad
Enzimático	Tripsina (EC 3.4.21.4)	Extremo C-terminal de Arg y Lys
	Quimotripsina (EC 3.4.21.1)	Extremo C-terminal de residuos hidrófobos (por ej., Leu, Met, Ala, aromáticos)
	Pepsina (EC 3.4.23.1)	Digestión no específica
	Lisil endopeptidasa (Endopeptidasa Lys-C) (EC 3.4.21.50)	Extremo C-terminal de Lys
	Glutamil endopeptidasa (de la cepa <i>S. aureus</i> V8) (EC 3.4.21.19)	Extremo C-terminal de Glu y Asp
	Peptidil-Asp metaploendopeptidasa (Endoproteinasa Asp-N) (EC 3.4.24.33)	Extremo N-terminal de Asp
	(Clostripain)	
	(EC 3.4.22.8)	Extremo C-terminal de Arg
	Bromuro de cianógeno	Extremo C-terminal de Met
	Ácido 2-nitro-5-tio-ciano-benzoico	Extremo N-terminal de Cys
Químico	Ácido <i>O</i> -yodosobenzoico	Extremo C-terminal de Trp y Tyr
	Ácido diluido	Asp y Pro
	BNPS-Escatol	Trp

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Se usan muchas técnicas para separar péptidos para mapeos. La elección de la técnica depende de la proteína estudiada. Las técnicas eficaces para la separación de péptidos se muestran en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Técnicas Usadas para la Separación de Péptidos

Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC)
Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC)
Cromatografía de Interacción Hidrófoba (HIC)
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE), sin desnaturalización
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE)
Electroforesis Capilar (CE)
Cromatografía en Papel
Electroforesis de Alto Voltaje en Papel (HVPE)

En esta sección, se describe un método de HPLC en fase reversa (RP-HPLC) ampliamente usado en la separación cromatográfica.

La pureza de los disolventes y de las fases móviles es un factor crítico en la separación por HPLC. Se recomienda usar agua y disolventes de grado HPLC, disponibles comercialmente, para la RP-HPLC. Los gases disueltos presentan un problema en los sistemas de gradientes donde la solubilidad del gas en un disolvente puede ser menor en una mezcla que en un disolvente solo. La desgasificación al vacío y la agitación por ultrasonido suelen ser útiles para la desgasificación. Si hay partículas sólidas presentes en los disolventes, se introducen en el sistema HPLC y pueden dañar los sellos de las válvulas de las bombas u obstruir la parte superior de la columna cromatográfica. Se recomienda filtrar antes y después de la bomba.

Columna Cromatográfica—La selección de una columna cromatográfica se determina empíricamente para cada proteína. Las columnas con tamaño de poro de 100Å o 300Å con soporte de sílice pueden proporcionar una separación óptima. Para péptidos más pequeños, los rellenos de columna como el octilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 a 10 µm de diámetro (L7) y el octadecilsilano unido químicamente a micropartículas porosas de sílice o cerámica, de 3 a 10 µm de diámetro (L1) son más eficientes que el relleno de silano de butilo unido químicamente a partículas totalmente porosas de sílice, de 5 a 10 µm de diámetro (L26).

Disolvente—El disolvente más comúnmente usado es agua con acetonitrilo como modificador orgánico al cual se le agrega menos de 0,1% de ácido trifluoroacético. Si fuera necesario, agregar alcohol isopropílico o alcohol *n*-propílico para solubilizar los componentes de digestión, siempre que el agregado no aumente excesivamente la viscosidad de los componentes.

Fase Móvil—Se usan fases amortiguadas que contienen fosfato para flexibilizar la selección de las condiciones de pH ya que los cambios en el pH en el intervalo de 3,0 a 5,0 mejoran la separación de los péptidos que contienen residuos ácidos (por ejemplo, ácido glutámico y ácido aspártico). También se han usado fosfatos de sodio o potasio, acetato de amonio, ácido fosfórico y un pH entre 2 y 7 (o superior para soportes de polímeros) con gradientes de acetonitrilo. También se usa a menudo ácido trifluoroacético que contiene acetonitrilo.

Selección del Gradiente—Los gradientes pueden ser lineales, no lineales o incluir funciones escalonadas. Se recomienda un gradiente gradual a fin de separar la mezclas complejas. Los gradientes se optimizan para resolver claramente uno o dos picos que serán los picos “marcadores” de la prueba.

Selección Isocrática—Los sistemas isocráticos de HPLC que usan una única fase móvil se emplean por su conveniencia de uso y las respuestas mejoradas del detector. A menudo es difícil de establecer la composición óptima de una fase móvil para obtener una resolución clara de cada pico. En sistemas isocráticos de HPLC no deben usarse fases móviles donde un cambio leve en la relación de sus componentes o en el pH tenga un efecto importante en los tiempos de retención de los picos del mapa peptídico.

Otros Parámetros—Generalmente es necesario controlar la temperatura de la columna para lograr una buena reproducibilidad. Las velocidades de flujo para las fases móviles varían de 0,1 a 2,0 mL por minuto y la detección de péptidos se realiza con un detector UV entre 200 nm y 230 nm. Se han usado otros métodos de detección (por ejemplo: derivatización postcolumna), pero no son tan robustos ni tan versátiles como la detección UV.

Aptitud del Sistema—El apartado *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621) suministra un medio experimental para medir el desempeño global del método de prueba. El criterio de aceptación para la aptitud del sistema depende de la identificación de los parámetros críticos de prueba que afectan la interpretación y aceptación de los datos. Estos parámetros críticos también son criterios que controlan la digestión y el análisis de péptidos. Un indicador de que se logró el punto final de digestión deseado es la comparación con un estándar de referencia o un material de referencia, el cual se trata exactamente como el artículo en análisis. El uso de un Estándar de Referencia USP paralelamente con la proteína en análisis es crítico en el desarrollo y establecimiento de los límites de aptitud del sistema. Además, se debe incluir un cromatograma de muestra con el Estándar de Referencia USP o material de referencia a los efectos de la comparación. Otros indicadores pueden incluir la inspección visual de la solubilidad de la proteína o el péptido, la ausencia de proteínas intactas, o la medición de respuestas de un péptido dependiente de la digestión. Los parámetros críticos de aptitud del sistema para el análisis de péptidos dependerá de cada modo de separación y detección de péptidos y de los requisitos de análisis de datos.

Cuando se usa el mapeo de péptidos como prueba de identificación, los requisitos de aptitud del sistema para los péptidos identificados incluyen la selectividad y la precisión. En este caso, al igual que cuando se realiza la identificación de variantes de proteínas, la identificación de la estructura primaria de los fragmentos peptídicos en el mapa peptídico suministra una verificación de la estructura primaria conocida y la identificación de las variantes de las proteínas por comparación con el mapa peptídico del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína especificada. El uso de un material de referencia o Estándar de Referencia USP digerido para una proteína dada en la determinación de la resolución peptídica es el método de elección. Para el análisis de una variante de una proteína, se puede usar una mezcla caracterizada de una variante y un estándar de referencia, especialmente si la variante del péptido se encuentra en una región menos resuelta del mapa. El índice de uniformidad del patrón puede ser simplemente el número de péptidos principales detectados. La uniformidad del patrón de péptidos se puede definir mejor por resolución de los picos de los péptidos. Los parámetros cromatográficos —tales como la resolución pico a pico, el ancho máximo de picos, factores de asimetría de los picos y la eficiencia de la columna— se pueden usar para definir la resolución peptídica. Dependiendo de la proteína en análisis y el método de separación que se use, pueden ser necesarios requisitos de resolución de un solo péptido o de múltiples péptidos.

El análisis repetido del digerido del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína en análisis produce medidas de precisión y recuperación cuantitativa. La recuperación de los péptidos identificados generalmente se puede determinar por el uso de estándares peptídicos internos o externos. La precisión se expresa como la desviación estándar relativa (RSD). Es de esperar diferencias en la recuperación y precisión de los péptidos identificados; por lo tanto, hay que establecer los límites de aptitud del sistema tanto para la recuperación como para la precisión de los péptidos identificados. Estos límites son exclusivos para cada proteína y se especificarán en las monografías individuales.

La comparación visual de los tiempos de retención relativos, las respuestas de los picos, el número de picos y el patrón de elución global se completa inicialmente. Luego se complementa y respalda con el análisis matemático de los cocientes de respuesta de los picos y el perfil cromatográfico de una mezcla 1 : 1 (v/v) de la muestra y el digerido del Estándar de Referencia USP o material de referencia. Si todos los picos en el digerido de la muestra y en el digerido del Estándar de Referencia USP o material de referencia tienen los mismos tiempos de retención relativos y cocientes de respuesta de los picos, se confirma la identidad de la muestra en análisis.

Si los picos que inicialmente eluyeron con tiempos de retención relativos significativamente diferentes luego se observan como picos únicos en la mezcla 1 : 1, la diferencia inicial sería una indicación de la variabilidad del sistema. Sin embargo, si se observan picos separados en la mezcla 1 : 1, esto indicaría la no equivalencia de los péptidos en cada pico. Si un pico en la mezcla 1 : 1 es significativamente más ancho que el pico correspondiente en la muestra y el digerido del Estándar de Referencia USP o material de referencia, podría indicar la presencia de péptidos diferentes. Se ha propuesto y aplicado un software de reconocimiento de patrones para el análisis de los datos del mapeo de péptidos, pero los problemas relacionados con la validación del software impiden que pueda usarse en una prueba farmacopeica en el futuro cercano. Se han usado otros enfoques automatizados que emplean fórmulas matemáticas, modelos y reconocimiento de patrones. Se han propuesto enfoques tales como, por ejemplo, la identificación automatizada de compuestos por espectroscopia IR y la aplicación de análisis espectral UV con arreglo de diodos para la identificación de péptidos. Estos métodos tienen limitaciones debido a resoluciones inadecuadas, elución conjunta de fragmentos o diferencias en las respuestas absolutas de los picos entre el Estándar de Referencia USP o material de referencia y los fragmentos de la muestra.

La comparación numérica de los tiempos de retención y áreas o alturas de los picos se puede realizar para un grupo seleccionado de picos relevantes correctamente identificados en los mapas peptídicos. Las áreas de los picos se pueden calcular usando un pico como referencia interna con relativamente poca variación, teniendo en cuenta que la integración del área del pico es sensible a la variación de la línea base y posiblemente introduzca un error en el análisis. De modo alternativo, se puede calcular la altura porcentual del pico de

cada péptido con respecto a la suma de todas las alturas de los picos para la muestra de prueba. El porcentaje se compara luego con el del pico correspondiente del Estándar de Referencia USP o material de referencia. La posibilidad de autohidrólisis de la tripsina se controla mediante la producción de un mapa peptídico blanco que es el mapa obtenido cuando la solución blanco se trata con tripsina.

El requisito mínimo para la cuantificación de un mapeo de péptidos es un procedimiento de prueba aprobado que incluye la aptitud del sistema como control de prueba. En general, para un IND, basta con la calificación del mapeo de péptidos para una proteína. A medida que avanza el proceso de aprobación reglamentario de la proteína, calificaciones adicionales de la prueba pueden incluir una validación parcial del procedimiento analítico con el fin de asegurar que el método funciona en la forma planeada en el desarrollo del mapa peptídico para la proteína especificada.

ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS

Esta sección es una guía para el uso del mapeo de péptidos durante la investigación que respalda las solicitudes reglamentarias.

El uso de un mapa peptídico como herramienta cualitativa no exige la caracterización completa de los picos de péptidos individuales. Sin embargo, la validación del mapeo de péptidos en respaldo de las solicitudes reglamentarias exige la caracterización rigurosa de cada pico en el mapa peptídico. Los métodos para caracterizar picos varían desde la secuenciación *N*-terminal de cada pico seguida por un análisis de aminoácidos hasta el uso de espectroscopia de masas (MS, por sus siglas en inglés).

A los efectos de la caracterización, cuando se usan la secuenciación *N*-terminal y el análisis de aminoácidos, la separación analítica se aumenta en escala. Ya que el aumento en escala puede afectar la resolución de los picos de péptidos, es necesario asegurar con datos empíricos que no haya pérdida de resolución debida al aumento en escala. Se recogen los eluatos correspondientes a picos de péptidos específicos, se concentran al vacío y se cromatografían nuevamente, según sea necesario. El análisis de aminoácidos de los fragmentos puede estar limitado por el tamaño del péptido. Si el *N*-terminal está bloqueado, puede ser necesario desbloquearlo antes de la secuenciación. También se puede usar la secuenciación del *C*-terminal de las proteínas con carboxipeptidasa y MALDITOF-MS para su caracterización.

El uso de MS para la caracterización de fragmentos peptídicos se hace por infusión directa de péptidos aislados o por LC-MS en línea para el análisis estructural. En general, incluye el electrospray y la ionización por desorción láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDITOF, por sus siglas en inglés) así como también el bombardeo atómico rápido (FAB, por sus siglas en inglés). También se ha usado la MS en serie para secuenciar una proteína modificada y para determinar la modificación aminoacídica producida. La comparación de los espectros de masas de los digeridos antes y después de la reducción proporciona un método para asignar las uniones disulfuro a los diferentes péptidos que contienen sulfhidrilos.

Si hay regiones de la estructura primaria que no se demuestran claramente en el mapa peptídico, podría ser necesario realizar un mapa peptídico secundario. El objetivo de un método validado de caracterización de una proteína a través del mapeo de péptidos es conciliar y explicar al menos el 95% de la composición teórica de la estructura de la proteína.

El Uso del Mapeo de Péptidos para la Evaluación de Estabilidad Genética

Se puede usar un mapa peptídico validado para evaluar la integridad de la secuencia primaria prevista de un producto proteico (es decir, su estabilidad genética). También se puede usar para determinar la uniformidad lote a lote de productos biotecnológicos. Además, la expresión de la proteína en el sistema de producción se evalúa mejor a través del mapeo de péptidos de la proteína expresada. Los mapas peptídicos de proteínas producidos en diversas etapas de la expresión de la proteína, incluyendo un punto más allá del tiempo normal de expresión de la proteína, comparados con

los de un Estándar de Referencia USP o material de referencia, sirven para evaluar la estabilidad genética del sistema de expresión en función del tiempo.

Pueden surgir variantes de las secuencias de las proteínas a partir de una variación genética en el ADN (mutación puntual) o como un error en la traducción. El mejor enfoque es un mapa peptídico validado para la detección de variantes de proteínas. Sin embargo, se deben considerar las limitaciones inherentes del mapeo de péptidos. La detección de una variante estructurada es posible únicamente si el péptido variante correspondiente es fácil de aislar y caracterizar. Para establecer la estabilidad genética es necesario usar una batería de métodos bioquímicos, siempre que las variantes tengan propiedades distintas de las de la proteína “normal”.

Validación

FACTORES CRÍTICOS

La validación del mapeo de péptidos exige el diseño de un protocolo que describa detalladamente el experimento a realizar y los criterios para la aceptación del mapa. Los criterios para la aceptación del mapeo incluyen límites de detección, especificidad, linealidad, rango, exactitud, precisión y estabilidad de los reactivos. La reproducibilidad del mapa peptídico es un elemento crítico en su utilización como prueba de identidad y para confirmar la estabilidad genética. Se analizarán aquellos aspectos técnicos del mapeo de péptidos que influyen la reproducibilidad del mapa.

El ajuste de los límites, con respecto a la cuantificación (área o altura del pico) e identificación (tiempos de retención) para el grupo seleccionado de picos relevantes se basa en observaciones empíricas. Estos límites detectan diferencias significativas entre la muestra y el Estándar de Referencia USP o material de referencia dentro de una serie de análisis.

Otro problema crítico es la recuperación de péptidos y su efecto sobre la determinación y reproducibilidad de las áreas de los picos y en el establecimiento de criterios de aceptación. Los criterios de recuperación tratan todos los aspectos de metodología de la prueba, desde la digestión hasta las condiciones cromatográficas. La determinación de la recuperación de péptidos incluye el análisis cuantitativo de aminoácidos, el agregado de cantidades conocidas, el marcado radioactivo y la sumatoria UV. Una recuperación general de aproximadamente el 80% se considera satisfactoria. La recuperación de péptidos individuales es más problemática y se maneja caso por caso. Los factores críticos de la validación de un mapa peptídico son los siguientes.

Procedimientos de Prueba Documentados por Escrito—Estos procedimientos incluyen una descripción detallada del método analítico en donde se definen los reactivos, equipos, preparación de la muestra, método de análisis y análisis de los datos.

Protocolo de Validación—Se prepara un protocolo que incluye un procedimiento para la validación de la prueba.

Criterio de Aceptación—El criterio puede ser mínimo en las primeras etapas, pero debe definirse mejor a medida que progresan los estudios de validación.

Informe de los Resultados—En los resultados del estudio de validación se documentan los parámetros analíticos indicados en el protocolo de validación.

Revalidación del Procedimiento de la Prueba—Si el método empleado exige alteraciones que podrían afectar los parámetros analíticos previamente evaluados en la validación, es necesario volver a validar el procedimiento de la prueba. Si hay cambios significativos en el procesamiento del artículo, en los laboratorios que realizan el análisis, en la formulación de los productos a granel o terminados y en cualquier otro parámetro importante, se exigirá la revalidación de los métodos.

REQUISITOS

Precisión—

Precisión Intra Prueba—Es una medida de la reproducibilidad del mapeo de péptidos. Los dos pasos críticos en el mapeo de péptidos son la fragmentación (es decir, digestión) y la separación de

péptidos. La precisión es aceptable cuando los tiempos de retención absolutos y las áreas de los picos relativos son constantes de corrida a corrida y la variación promedio en el tiempo de retención es pequeña en relación con la del pico de referencia interno seleccionado. La reproducibilidad del mapa se puede mejorar si se usa un horno de columna con control de temperatura, si se equilibra exhaustivamente el sistema antes de comenzar la prueba, si primero se realiza una determinación con un blanco (mezcla de digerido control sin proteína) para minimizar los “efectos de la primera corrida” y si se intercala periódicamente un digerido del material de referencia o del Estándar de Referencia USP con las muestras de prueba para evaluar la variación sistemática de la cromatografía.

Los criterios para validar el paso de fragmentación son similares a los descritos a continuación para la separación de péptidos, pero se cumplen para pruebas consecutivas de una serie de digeridos preparados por separado de la proteína en análisis.

Los criterios para la validación del paso de separación de péptidos incluyen lo siguiente:

1. La desviación estándar promedio de los tiempos de retención absolutos de todos los picos principales para un conjunto de pruebas consecutivas del mismo digerido no excede un criterio de aceptación especificado.
2. La desviación estándar promedio del área de pico absoluta para todos los picos principales totalmente resueltos no excede un porcentaje especificado.

Precisión Inter Pruebas—Esta es una medida de la reproducibilidad del mapeo de péptidos cuando la prueba se realiza en distintos días, por distintos analistas, en distintos laboratorios, con reactivos o enzimas de distintos proveedores o con distintos lotes del mismo proveedor, con instrumental diferente, en columnas de fabricación distinta o columnas de igual fabricación pero de lotes distintos y en columnas individuales de la misma fabricación y el mismo lote. Si bien sería preferible, desde una perspectiva científica, validar el efecto de todas estas variables sobre la precisión, un enfoque práctico es validar la prueba usando aquellas variables que sean más probables de encontrar en condiciones operativas. Se pueden incluir variables adicionales cuando sea necesario.

El diseño experimental permite al analista realizar comparaciones usando tiempos de retención de picos y áreas de picos que se expresen con relación a un pico de referencia interno altamente reproducible dentro del mismo cromatograma. El área de pico relativa se expresa como el cociente entre el área del pico y el área del pico de referencia interna. El tiempo de retención relativo se puede expresar como la diferencia entre el tiempo de retención absoluto y el tiempo de retención del pico de referencia. El uso de valores relativos elimina la necesidad de realizar correcciones separadas por diferencias de volumen de un inyector a otro, por unidades de medición de las áreas de los picos, por dimensiones de la columna y por volúmenes de espacio muerto de los instrumentos. Se espera que la variabilidad en los tiempos de retención y en las áreas de los picos para los experimentos de *Precisión Inter Pruebas* sea ligeramente mayor que la variabilidad observada para la *Precisión Intra Prueba*.

Robustez—La composición de la *Fase Móvil*, la calidad de la proteasa o la pureza de los reactivos químicos, la variación y edad de una columna y la estabilidad del digerido son todos factores que podrían afectar el desempeño general de la prueba y su reproducibilidad. Se evalúan las tolerancias para cada parámetro clave y se establecen los límites de la línea base en caso de que la prueba se use para la liberación rutinaria de lotes.

Fase Móvil—La composición de la *Fase Móvil* se optimizará para obtener la máxima resolución de péptidos en todo el perfil de elución. Se prefiere un equilibrio entre la resolución óptima y la reproducibilidad general. Un pH menor podría mejorar la separación entre los picos pero podría acortar la vida de la columna, dando como resultado una falta de reproducibilidad. Los mapas peptídicos a un pH por encima o por debajo del pH del procedimiento se comparan con el mapa peptídico obtenido al pH del procedimiento y se observa si hay diferencias significativas; también se revisan con respecto a los criterios de aceptación establecidos en el protocolo de validación.

Calidad de la Proteasa o Pureza de los Reactivos Químicos—Se prepara y digiere una muestra del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína en análisis con distintos lotes del agente de escisión. En los cromatogramas para cada

digerido se comparan las áreas de los picos, su forma y el número de picos. Se puede aplicar el mismo procedimiento a otras sustancias químicas o tratamientos previos usados durante la preparación de la muestra, como por ejemplo los reactivos reductores y de carboximetilación.

Consideraciones de la Columna—La variabilidad entre una columna y otra, incluso dentro de un mismo lote, puede afectar el desempeño de la columna en el desarrollo de mapas peptídicos. El tamaño de la columna también puede producir diferencias significativas. Se digiere un Estándar de Referencia USP o material de referencia de la proteína de prueba y el digerido se cromatografía en distintos lotes de columna de un mismo fabricante. Luego se evalúa el perfil de elución general, los tiempos de retención, la resolución de selectividad y la recuperación de los mapas. Para evaluar la robustez de la columna durante toda su vida útil, se debe realizar una prueba de mapeo de péptidos en distintas columnas y variar significativamente el número de inyecciones (por ejemplo, de 10 inyecciones a 250 inyecciones). Los mapas resultantes se comparan buscando diferencias significativas en el ensanchamiento de los picos, área de los picos y resolución general. A medida que la columna envejece, podría observarse un aumento en la contrapresión que podría afectar los mapas peptídicos.

Una precaución razonable en el uso de columnas de mapeo de péptidos es seleccionar columnas alternativas, en caso de que las columnas originales no estén disponibles o dejen de fabricarse. Realizar una prueba de mapeo de péptidos usando columnas equivalentes de distintos fabricantes y examinar los mapas. Las diferencias en la forma y el tamaño de las partículas, el tamaño y volumen de los poros, la carga de carbono y el recubrimiento terminal pueden dar lugar a diferencias significativas en los tiempos de retención, la selectividad del perfil de elución, la resolución y la recuperación. Podría ser necesario hacer ligeras modificaciones en el perfil del gradiente para lograr mapas equivalentes cuando se usen columnas de distintos fabricantes. [NOTA—Debe considerarse la equivalencia entre la instrumentación usada para la validación de la prueba y para la prueba de control de calidad de rutina. Podría ser preferible usar el mismo sistema HPLC para todas las aplicaciones. De lo contrario, se determina la equivalencia del sistema, lo cual puede exigir algunos cambios en las condiciones de la prueba cromatográfica.]

Estabilidad del Digerido—Se evalúa el tiempo de almacenamiento de un digerido y las condiciones de almacenamiento antes de la cromatografía. Se almacenan varias alícuotas de un mismo digerido en distintas condiciones de almacenamiento y se cromatografían. Estos mapas luego se evalúan para buscar diferencias significativas.

Reproducibilidad—Se repite la determinación de varios de los parámetros indicados anteriormente usando el mismo Estándar de Referencia USP o material de referencia y la misma muestra de la prueba en al menos dos laboratorios distintos y por dos analistas, equipados con sistemas HPLC similares. Luego se evalúan los mapas peptídicos generados para ver si existen diferencias significativas.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se usa para la caracterización cualitativa de proteínas en preparaciones biológicas, para control de pureza y para determinaciones cuantitativas. Este procedimiento se limita al análisis de proteínas con un peso entre 14 000 y 100 000 Da. Es posible ampliar la extensión de pesos de una electroforesis en gel con diversas técnicas (por ejemplo, geles de gradiente o ciertos sistemas amortiguadores de pH), pero dichas técnicas no se tratarán en este capítulo. La electroforesis en gel analítica es un método adecuado para identificar y evaluar la homogeneidad de las proteínas en los fármacos. Estos métodos se usan de forma rutinaria para estimar los pesos moleculares de subunidades proteicas y para determinar las composiciones de subunidades proteicas purificadas.

Hay geles y reactivos listos para usar disponibles comercialmente, que pueden usarse en lugar de los que se describen en este capítulo, siempre que proporcionen resultados equivalentes y que cumplan con los requisitos de validación.

Principio General de la Electroforesis

Bajo la influencia de un campo eléctrico, las partículas cargadas migran en la dirección del electrodo que tiene polaridad opuesta. En la electroforesis en gel, los movimientos de las partículas se retrasan por interacciones con la matriz de gel que las rodea, la cual actúa como un tamiz molecular. Las interacciones opuestas de la fuerza eléctrica y del tamiz molecular dan como resultado velocidades de migración diferenciales, de acuerdo a los tamaños, formas y cargas de las partículas. Debido a sus diferentes propiedades fisicoquímicas, las distintas macromoléculas de una mezcla migran a distintas velocidades durante la electroforesis y así se separan, formando fracciones discretas. Las separaciones electroforéticas pueden realizarse en sistemas sin fases de soporte (por ejemplo, separación por electroforesis capilar en solución libre) y en medios estabilizadores, tales como placas de capa delgada, películas o geles.

Características de Geles de Poliacrilamida para Electroforesis de Proteínas

Las propiedades de tamizado de los geles de poliacrilamida se establecen mediante la red tridimensional de fibras y poros formada cuando la bisacrilamida bifuncional se entrecruza en forma adyacente a las cadenas de poliacrilamida. La polimerización se cataliza con un sistema generador de radicales libres compuesto de persulfato de amonio y N,N,N',N' -tetrametiletildiamina (TEMED).

A medida que aumenta la concentración de acrilamida de un gel, disminuye el tamaño efectivo de sus poros. El tamaño efectivo del poro de un gel se define operacionalmente por sus propiedades de tamizado, es decir, por la resistencia que imparte a la migración de macromoléculas. Existen límites con respecto a las concentraciones de acrilamida que se pueden usar. En concentraciones altas de acrilamida, los geles se rompen con mucha más facilidad y son difíciles de manipular. A medida que disminuye el tamaño del poro de un gel, disminuye la velocidad de migración de una proteína a través del gel. Al ajustar el tamaño de poro de un gel, mediante la modificación de la concentración de acrilamida, se puede optimizar la resolución del método para un producto proteico dado. Por lo tanto, un gel se caracteriza físicamente por su composición de acrilamida y bisacrilamida.

Además de la composición del gel, el estado de la proteína es un factor importante para la movilidad electroforética. En el caso de las proteínas, la movilidad electroforética depende del valor pK de los grupos cargados y del tamaño de la molécula. Está influenciada por el tipo, la concentración y el pH del amortiguador, por la temperatura y la fuerza del campo y por la naturaleza del material de soporte.

Desnaturalización con Dodecilsulfato de Sodio

La desnaturalización de PAGE con dodecilsulfato de sodio (SDS) es el modo más común de electroforesis para evaluar la calidad farmacéutica de productos proteicos. Típicamente, la electroforesis analítica de proteínas se realiza bajo condiciones que aseguran la disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas individuales y que minimizan la aglomeración de estas subunidades. El detergente Dodecil Sulfato de Sodio fuertemente aniónico se usa combinado con calor para disociar las proteínas antes de que se coloquen en el gel. Los polipéptidos desnaturalizados se unen al SDS, adquieren carga negativa y exhiben una relación carga-peso estable, sin importar el tipo de proteína. Como la cantidad de SDS unido casi siempre es proporcional al peso molecular del polipéptido y es típicamente independiente de su secuencia, los complejos SDS-polipéptido migran a través de los geles de poliacrilamida en forma razonablemente proporcional al tamaño del polipéptido.

Las movilidades electroforéticas de todos los complejos detergente-polipéptido resultantes adoptan la misma relación funcional con los pesos moleculares de los polipéptidos. La migración de los derivados SDS es hacia el ánodo de un modo predecible, observándose que los complejos de bajo peso molecular migran más rápido que los complejos más grandes. Esto significa que el peso molecular de una proteína se puede estimar por su movilidad relativa en SDS-PAGE calibrada y que una banda única en un gel de este tipo es un indicador de pureza.

Sin embargo, las modificaciones de la cadena principal, tales como la *N*-glicosilación o la *O*-glicosilación, tienen un efecto significativo sobre el peso molecular aparente de una proteína. Esto se debe a que el SDS no se une a los grupos carbohidrato de la misma manera que a los polipéptidos. Por lo tanto, no se mantiene una relación estable carga-peso. El peso molecular aparente de proteínas con modificaciones postraduccionales no refleja con exactitud el peso de la cadena polipeptídica.

CONDICIONES REDUCTORAS

Las subunidades de polipéptidos y su estructura tridimensional se mantienen en las proteínas mediante uniones disulfuro. Un objetivo del análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras es romper esta estructura por reducción de las uniones disulfuro. La desnaturalización y disociación completa de proteínas por tratamiento con 2-mercaptoetanol o ditioneitol (DTT) despliega el esqueleto polipeptídico, formándose luego un complejo con SDS. En estas condiciones, el peso molecular de las subunidades de polipéptidos se puede calcular por regresión lineal, en presencia de estándares adecuados de peso molecular.

CONDICIONES NO REDUCTORAS

Para algunos análisis, no es conveniente la disociación completa de la proteína en subunidades peptídicas. En ausencia de tratamiento con agentes reductores, los enlaces disulfuro covalentes permanecen intactos, preservando la forma oligomérica de la proteína. Los complejos de SDS-proteína oligomérica migran más lentamente que sus subunidades SDS-polipéptido. Además, las proteínas no reducidas no se pueden saturar por completo con SDS y, por lo tanto, no pueden unirse al detergente en una relación de peso constante. Esto hace que las determinaciones de peso molecular de estas moléculas sean menos sencillas que los análisis de polipéptidos completamente desnaturalizados, porque es necesario que las proteínas estándar y las proteínas desconocidas tengan configuraciones similares para que las comparaciones sean válidas. Sin embargo, la tinción de una única banda en un gel de este tipo es un indicador de pureza.

CARACTERÍSTICAS DE UN SISTEMA AMORTIGUADOR DE PH DISCONTINUO

El método electroforético más popular para la caracterización de una mezcla compleja de proteínas usa un sistema amortiguador de pH discontinuo compuesto por dos geles contiguos pero diferenciados: un gel de resolución o separador (inferior) y un gel concentrador (superior). Los dos geles están conformados con diferentes porosidades, pH y fuerzas iónicas. Además, se usan distintos iones móviles en el gel y en los amortiguadores de pH de los electrodos. La discontinuidad del amortiguador del pH concentra grandes volúmenes de muestra en el gel concentrador, mejorando así la resolución. Cuando se aplica electricidad, se produce una caída de voltaje a través de la solución de muestra que conduce a las proteínas hacia el gel concentrador. Los iones de glicinato del amortiguador de pH de los electrodos siguen a las proteínas hacia el gel concentrador. Se forma rápidamente un frente móvil con los iones de cloruro de alta movilidad adelante y los iones relativamente lentos de glicinato atrás. Se forma un gradiente de alto voltaje localizado entre los frentes de iones delanteros y traseros, haciendo que los complejos SDS-proteína se acumulen en una zona delgada (concentrado) y migren entre las fases de cloruro y glicinato. Dentro de un amplio límite, sin importar la altura de la muestra aplicada, todos los SDS-proteínas se condensan en una región muy estrecha e ingresan al gel separador como una zona delgada, bien definida, de alta densidad proteica. El gel concentrador, de grandes poros, no retrasa la migración de la mayoría de las proteínas y sirve principalmente como un medio anticonvectivo. En la interfase entre el gel concentrador y el gel separador, las proteínas sufren un marcado retardo, debido al tamaño de poro restrictivo del gel separador. Una vez en el gel separador, las proteínas continúan siendo ralentizadas por el tamizado de la matriz. Los iones de glicinato sobrepasan a las

proteínas, que se mueven entonces en un espacio de pH uniforme formado por TRIS y glicina. El tamizado molecular hace que los complejos SDS-polipéptido se separen según sus pesos moleculares.

PREPARACIÓN DE GELES

En una solución amortiguadora discontinua de gel de SDS-poliacrilamida, es importante verter el gel separador, dejarlo solidificar y verter luego el gel concentrador, porque los geles tienen diferente composición de acrilamida-bisacrilamida, solución amortiguadora y pH.

Soluciones Madre de Gel—

Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30%—Preparar una solución que contenga 290 g de acrilamida y 10 g de metilén-bisacrilamida por L de agua tibia y filtrar. [NOTA—La acrilamida y la metilén-bisacrilamida se convierten, lentamente, durante el almacenamiento, en ácido acrílico y ácido bisacrílico respectivamente. Esta reacción de desamidación es catalizada por la luz y los álcalis. El pH de la solución debe ser de 7,0 o inferior. Almacenar la solución en frascos oscuros, a temperatura ambiente. Preparar todos los meses soluciones nuevas.]

Solución de Persulfato de Amonio—Preparar una pequeña cantidad de solución, con una concentración de 100 g de persulfato de amonio por L y almacenar a 4°. [NOTA—El persulfato de amonio proporciona los radicales libres que impulsan la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida. El persulfato de amonio se descompone lentamente; por lo tanto, se deben preparar soluciones nuevas semanalmente.]

TEMED—Usar un reactivo de grado electroforético. [NOTA—El TEMED acelera la polimerización de acrilamida y bisacrilamida, catalizando la formación de radicales libres a partir del persulfato de amonio. Como el TEMED sólo funciona cuando es una base libre, a un pH bajo la polimerización se inhibe.]

Solución de SDS—Usar un reactivo de grado electroforético. Preparar una solución con una concentración de aproximadamente 100 g de SDS por L y almacenar a temperatura ambiente.

Solución Amortiguadora 1,5 M—Transferir aproximadamente 90,8 g de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) a un matraz de 500 mL, disolver en 400 mL de agua, ajustar con ácido clorhídrico hasta un pH de 8,8, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución amortiguadora 1 M—Transferir aproximadamente 60,6 g de TRIS a un matraz de 500 mL, agregar 400 mL de agua, ajustar con ácido clorhídrico hasta un pH de 6,8, diluir a volumen con agua y mezclar.

Preparación de las Placas—Limpiar dos placas de vidrio (10 cm × 8 cm), el peine de teflón, los dos espaciadores y la tubería de goma de silicona (0,6 mm × 35 cm) con detergente suave, enjuagar bien con agua y secar con un material absorbente.

Lubricar los espaciadores y la tubería con grasa no siliconada. Aplicar los espaciadores a lo largo de los dos lados cortos de la placa de vidrio, a 2 mm de los bordes y a 2 mm del lado largo correspondiente a la parte inferior del gel.

Comenzar a colocar las tuberías sobre la placa de vidrio, utilizando un espaciador como guía. Cuidadosamente doblar la tubería por debajo del espaciador y seguir el lado largo de la placa de vidrio. Mientras se sostiene la tubería con un dedo por el lado largo, doblar nuevamente la tubería y colocarla sobre el segundo lado corto de la placa de vidrio, usando el espaciador como guía.

Colocar la segunda placa de vidrio perfectamente alineada y sostener el molde unido haciendo presión con la mano. Aplicar dos pinzas en cada uno de los dos lados cortos del molde. Aplicar cuidadosamente cuatro pinzas sobre el lado largo del molde de gel, formando así la parte inferior del molde de gel. Verificar que la tubería corra a lo largo del borde de las placas de vidrio y que no se haya salido al colocar las pinzas. El molde está ahora listo para recibir el gel.

Gel Separador—En un matraz Erlenmeyer, preparar el volumen adecuado de solución que contenga la concentración deseada de acrilamida, según se indica en la *Tabla 3*. Mezclar los componentes en el orden que se muestra. Antes de agregar la *Solución de Persulfato de Amonio* y el TEMED, verter la solución en una unidad de filtración desechable equipada con un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm y aplicar vacío. Desgasificar la

solución por rotación moderada de la unidad de filtración y desconectar el vacío cuando ya no se formen más burbujas en la solución. Agregar cantidades adecuadas de *Solución de Persulfato de Amonio* y de *TEMED*, según las instrucciones de la *Tabla 3*, agitar por rotación moderada y verter inmediatamente en el espacio entre las dos placas de vidrio del molde. Dejar espacio suficiente para el gel concentrador (el largo de los dientes del peine más 1 cm). Con una pipeta, cubrir cuidadosamente la solución con alcohol isobutílico saturado con agua. Dejar el gel en posición vertical, a temperatura ambiente, para su polimerización.

Una vez finalizada la polimerización (aproximadamente 30 minutos después), verter la capa superior y lavar la superficie del gel varias veces con agua, para quitar la capa de alcohol isobutílico y toda la acrilamida no polimerizada. Drenar tanto líquido como sea posible de la parte superior del gel y luego quitar el agua remanente usando el borde de una toalla de papel.

Gel Concentrador—En un matraz Erlenmeyer, preparar el volumen adecuado de solución con la concentración deseada de acrilamida, según se indica en la *Tabla 4*. Mezclar los componentes en el orden que se muestra. Antes de agregar la *Solución de Persulfato de Amonio* y el *TEMED*, verter la solución en una unidad de filtración desechable equipada con un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 μm y aplicar vacío. Desgasificar la solución por rotación moderada de la unidad de filtración y desconectar el vacío cuando ya no se formen más burbujas en la solución. Agregar cantidades adecuadas de *Solución de Persulfato de Amonio* y de *TEMED*, según se indica en la *Tabla 4*, agitar por rotación moderada y verter inmediatamente en el espacio entre las dos placas de vidrio del molde, directamente sobre la superficie del Gel Separador polimerizado. Introducir inmediatamente un peine de teflón limpio en la solución de gel concentrador, con cuidado para no atrapar burbujas de aire. Agregar más solución de gel concentrador

Tabla 3. Preparación de Gel Separador

Componentes de la Solución	Volúmenes (mL) de Componentes por Volumen de Molde de Gel Indicado Debajo							
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Acrilamida al 6%								
Agua	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
<i>Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30%</i>	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
<i>Solución Amortiguadora 1,5 M</i>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
<i>Solución de SDS</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>Solución de Persulfato de Amonio</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>TEMED</i>	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
Acrilamida al 8%								
Agua	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
<i>Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30%</i>	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
<i>Solución Amortiguadora 1,5 M</i>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
<i>Solución de SDS</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>Solución de Persulfato de Amonio</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>TEMED</i>	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
Acrilamida al 10%								
Agua	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
<i>Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30%</i>	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
<i>Solución Amortiguadora 1,5 M</i>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
<i>Solución de SDS</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>Solución de Persulfato de Amonio</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>TEMED</i>	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
Acrilamida al 12%								
Agua	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
<i>Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30%</i>	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
<i>Solución Amortiguadora 1,5 M</i>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
<i>Solución de SDS</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>Solución de Persulfato de Amonio</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>TEMED</i>	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
Acrilamida al 14%								
Agua	1,4	2,7	3,9	5,3	6,6	8,0	10,6	13,8
<i>Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30%</i>	2,3	4,6	7,0	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
<i>Solución Amortiguadora 1,5 M</i>	1,2	2,5	3,6	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
<i>Solución de SDS</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>Solución de Persulfato de Amonio</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>TEMED</i>	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
Acrilamida al 15%								
Agua	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
<i>Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30%</i>	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
<i>Solución Amortiguadora 1,5 M</i>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
<i>Solución de SDS</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>Solución de Persulfato de Amonio</i>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
<i>TEMED</i>	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

para llenar completamente los espacios del peine. Dejar el gel en posición vertical y dejar polimerizar a temperatura ambiente. Una vez completada la polimerización (aproximadamente 30 minutos después), retirar cuidadosamente el peine de teflón y proceder según se indica a continuación.

SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

Solución Amortiguadora de Muestra 1—Disolver 1,89 g de TRIS, 5,0 g de SDS, 50 mg azul de bromofenol y 25,0 mL de glicerol en 100 mL de agua. Ajustar con ácido clorhídrico hasta un pH de 6,8 y diluir con agua a 125 mL. Antes de usar, diluir con un volumen igual de agua o muestra y mezclar.

Solución Amortiguadora de Muestra 2 (para condiciones reductoras)—Preparar según se indica en la *Solución Amortiguadora de Muestra 1* con la excepción de agregar 12,5 mL de 2-mercaptoetanol antes de ajustar el pH. Alternativamente, preparar según se indica para *Solución Amortiguadora de Muestra 1* excepto que se debe comenzar con aproximadamente 1,93 g de TRIS y se debe agregar una cantidad adecuada de DTT para obtener una concentración final de DTT 100 μ M.

Solución Amortiguadora de Corrida—Disolver 151,4 g de TRIS, 721,0 g de ácido aminoacético y 50,0 g de SDS en agua, diluir con agua a 5000 mL y mezclar hasta obtener una solución madre. Inmediatamente antes de usar, diluir esta solución madre con agua a 10 veces su volumen, mezclar y ajustar a un pH entre 8,1 y 8,8.

Procedimiento—Enjuagar inmediatamente los pocillos con agua o con la *Solución Amortiguadora de Corrida* para eliminar toda la acrilamida no polimerizada. (Si fuera necesario, enderezar los dientes del *Gel Concentrador* con una aguja hipodérmica roma conectada a una jeringa.) Quitar las pinzas de uno de los lados cortos, retirar cuidadosamente la tubería y volver a colocar las pinzas. Proceder de manera similar con el otro lado corto. Quitar la tubería de la parte inferior del gel.

Montar el gel preparado en el aparato de electroforesis. Agregar las soluciones amortiguadoras de electroforesis a los recipientes superior e inferior. Quitar cualquier burbuja que haya quedado atrapada en el fondo del gel, entre las placas de vidrio. [NOTAS—Esto se realiza mejor con una aguja hipodérmica roma conectada a una jeringa. Nunca se debe correr previamente el gel antes de cargar las muestras, porque esto destruiría la discontinuidad de los sistemas amortiguadores de pH. Antes de cargar la muestra, enjuagar cuidadosamente la ranura con *Solución Amortiguadora de Corrida*.]

Preparar las soluciones de prueba y estándar en la *Solución Amortiguadora de Muestra* recomendada y tratar según se indica en la monografía individual. Aplicar el volumen adecuado de cada solución a los pocillos de *Gel Concentrador*.

Comenzar la electroforesis usando las condiciones recomendadas por el fabricante del equipo. Puede ser necesario variar el tiempo de corrida de la electroforesis y la corriente o el voltaje a fin de lograr una separación óptima. Verificar que el frente de tinción se mueva hacia el gel separador. Detener la electroforesis cuando la tinción haya llegado al fondo del gel. Retirar el montaje de gel del aparato y separar las placas de vidrio. Quitar los espaciadores, cortar y desechar el *Gel Concentrador* y proceder de inmediato con la tinción.

DETECCION DE PROTEÍNAS EN GELES

La tinción de Coomassie es el método de tinción de proteínas más común, con un nivel de detección en el orden de 1 μ g a 10 μ g de proteína por banda. La tinción con plata es el método más sensible para teñir proteínas en geles ya que es posible detectar una banda que contenga entre 10 ng a 100 ng, pero el método es más difícil y menos robusto. Todos los pasos en la tinción de gel se realizan a temperatura ambiente con agitación suave (por ejemplo, sobre un agitador de plataforma oscilante, o equivalente). Hay que usar guantes cuando se tiñen los geles, para evitar la tinción de residuos dejados por las huellas digitales.

Reactivos—

Solución de Tinción Coomassie—Preparar una solución de azul brillante Coomassie R-250, con una concentración de 1,25 g por L en una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (5:4:1). Filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

Solución de Decoloración—Preparar una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (5:4:1).

Solución Fijadora 1—Preparar una mezcla de agua, metanol y ácido tricloroacético (5:4:1).

Solución Fijadora 2—Transferir 250 mL de metanol a un matraz volumétrico de 500 mL, agregar 0,27 mL de formaldehído, diluir a volumen con agua y mezclar.

Reactivo de Nitrato de Plata—A una mezcla de 40 mL de hidróxido de sodio 1 M y 3 mL de hidróxido de amonio, agregar gota a gota 8 mL de una solución de nitrato de plata de 200 g por L, con agitación; diluir con agua a 200 mL y mezclar.

Solución de Desarrollo—Transferir 2,5 mL de solución de ácido cítrico (2 en 100) y 0,27 mL de formaldehído a un matraz volumétrico de 500 mL, diluir con agua a volumen y mezclar.

Solución de Detención—Preparar una solución de ácido acético al 10% (v/v).

Tinción Coomassie—Sumergir el gel en un exceso de *Solución de Tinción Coomassie* e incubar durante al menos 1 hora. Retirar la *Solución de Tinción Coomassie*. Desteñir el gel con un exceso de *Solución de Decoloración*. Cambiar la *Solución de Decoloración* varias veces, hasta que las bandas de proteína teñidas se distingan claramente sobre un fondo transparente. Cuanto más completamente se destiña el gel, menor será la cantidad de proteína detectable. La decoloración se puede acelerar incluyendo unos pocos gramos de resina de intercambio aniónico o una esponja pequeña en la *Solución de Decoloración*. [NOTA—Las soluciones alcohol ácido usadas en este procedimiento no fijan completamente las proteínas en el gel. Esto puede conducir a pérdidas de algunas proteínas de bajo peso molecular durante la tinción y decoloración de geles delgados. La fijación permanente se puede lograr por incubación del gel en *Solución Fijadora 1* durante 1 hora antes de sumergirla en la *Solución de Tinción Coomassie*.]

Tinción con Plata—Sumergir el gel en un exceso de *Solución Fijadora 2*, e incubar durante 1 hora. Retirar la *Solución Fijadora 2*, agregar *Solución Fijadora 2* recién preparada e incubar durante al menos 1 hora, o durante la noche si fuera conveniente. Desechar la *Solución Fijadora 2*, lavar el gel en un exceso de agua durante 1 hora. Empapar el gel durante 15 minutos en una solución de glutaraldehído al 1% (v/v). Lavar el gel dos veces, durante 15 minutos cada vez, con un exceso de agua. Empapar el gel en *Reactivo de Nitrato de Plata* recién preparado durante 15 minutos, en la oscuridad. Lavar el gel tres veces, durante 5 minutos cada vez, con un exceso de agua. Sumergir el gel durante aproximadamente

Tabla 4. Preparación de Gel Concentrador

Componentes de la Solución	Volúmenes (mL) de Componentes por Volumen de Molde de Gel Indicado Debajo							
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
Agua	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
<i>Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30%</i>	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
<i>Solución Amortiguadora 1,0 M</i>	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
<i>Solución de SDS</i>	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
<i>Solución de Persulfato de Amonio</i>	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
<i>TEMED</i>	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

1 minuto en la *Solución de Desarrollo* hasta obtener una tinción satisfactoria. Detener el desarrollo mediante incubación en la *Solución de Detención* durante 15 minutos; enjuagar luego el gel con agua y proceder con el secado según se indica a continuación.

SECADO DE GELES

Para la tinción de Coomassie, después del paso de decoloración, incubarlo el gel en una solución de glicerol (1 en 10) durante al menos 2 horas. Para la tinción con plata, agregar al paso final de enjuague una incubación de 5 minutos en una solución de glicerol (1 en 50).

Sumergir dos láminas de celofán poroso en agua, e incubarlo de 5 a 10 minutos. Colocar una de las láminas en un marco de secado. Levantar el gel cuidadosamente y colocarlo sobre la lámina de celofán. Eliminar todas las burbujas de aire atrapadas y verter algunos mL de agua alrededor de los bordes del gel. Colocar la segunda lámina por encima y eliminar todas las burbujas de aire atrapadas. Completar el montaje del marco de secado. Colocar en una estufa de secado, dejar a temperatura ambiente hasta que este seco, o usar un secador de gel comercial.

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

Los pesos moleculares de las proteínas se determinan por comparación de sus movilidades con las de varias proteínas marcadoras de peso molecular conocido. Para la calibración de geles, hay mezclas disponibles de proteínas con pesos moleculares conocidos con precisión, combinadas para una tinción uniforme. Están disponibles en diversos intervalos de pesos moleculares. Las soluciones madre concentradas de proteínas de peso molecular conocido se diluyen en un amortiguador del pH de muestra y se cargan en el mismo gel que la muestra de proteína a analizar.

Inmediatamente después de correr el gel, se marca la posición del colorante de rastreo de azul de bromofenol para identificar el borde frontal de iones electroforéticos. Esto se puede realizar cortando muescas en los bordes del gel, o insertando una aguja empapada en tinta china en el gel, en el frente de tinción. Después de la tinción, medir las distancias de migración de cada banda de proteína (marcadoras y desconocidas) desde la parte superior del *Gel Separador*. Dividir la distancia de migración de cada proteína por la distancia recorrida por el colorante de rastreo. Las distancias de migración normalizadas así obtenidas se denominan movilidades relativas de las proteínas (con respecto al frente de tinción) y se denominan convencionalmente R_F . Construir un gráfico (semilogarítmico) del logaritmo de los pesos moleculares (M_R) de los estándares de proteínas en función de los valores R_F . [NOTA—Las gráficas son levemente sigmoideas.] A partir de la gráfica así obtenida, estimar los pesos moleculares desconocidos, por análisis de regresión lineal o interpolación, siempre que las muestras desconocidas caigan en la parte lineal de la gráfica.

Si las proteínas del marcador de peso molecular no están distribuidas a lo largo del 80% de la extensión del gel y en el intervalo de separación requerido (es decir, el intervalo que cubre el producto y su dímero o los productos y sus impurezas relacionadas) y la separación obtenida para las bandas de proteína relevantes no muestra una relación lineal entre el logaritmo del peso molecular y el R_F , entonces la prueba no es válida.

CUANTIFICACIÓN DE IMPUREZAS

Cuando se especifica el límite de impurezas en la monografía individual, se prepara una solución de referencia correspondiente a ese nivel de impureza, diluyendo la solución de prueba. Por ejemplo, cuando el límite es 5,0%, la solución de referencia es una dilución 1 en 20 de la solución de prueba. Ninguna impureza —cualquier banda que no sea la banda principal— en el electroforetograma obtenido a partir de la solución de prueba es más intensa que la banda principal obtenida con la solución de referencia.

Bajo condiciones validadas y cuando se usa el procedimiento de tinción de Coomassie, las impurezas se pueden cuantificar por normalización con respecto a la banda principal usando un densitómetro de integración. En este caso, las respuestas deben ser validadas para linealidad.

VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Los siguientes procedimientos se proporcionan para ilustrar la determinación del contenido de proteínas totales en las preparaciones farmacopeicas. Otras técnicas, tales como HPLC, también son aceptables si se demuestra la recuperación total de proteínas. Muchos de los métodos de valoración de proteínas totales descritos a continuación se pueden realizar con equipos comerciales. [NOTA—Siempre que se necesite agua, usar agua destilada.]

Método 1

La proteína en solución absorbe la luz UV a una longitud de onda de 280 nm, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, principalmente tirosina y triptófano. Esta propiedad es el fundamento de este método. La determinación de proteínas a 280 nm es principalmente una función del contenido de tirosina y triptófano de la proteína. Si la solución amortiguadora usada para disolver la proteína tiene una absorbancia alta en relación a la del agua, hay una sustancia que interfiere en la solución amortiguadora. Esta interferencia se puede compensar cuando el espectrofotómetro se ajusta a cero con la solución amortiguadora. Si la interferencia da como resultado una gran absorbancia que desafía el límite de sensibilidad del espectrofotómetro, los resultados podrían ser erróneos. Además, en concentraciones bajas, la proteína puede ser absorbida en la cubeta, reduciendo así el contenido en solución. Esto puede evitarse preparando muestras más concentradas, o usando un detergente no iónico en la preparación. [NOTA—Mantener la *Solución de Prueba*, la *Solución Estándar* y la solución amortiguadora a la misma temperatura durante la prueba.]

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis en la solución amortiguadora adecuada para obtener una solución con una concentración de 0,2 a 2 mg por mL.

Solución Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, preparar una solución del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína en análisis en la misma solución amortiguadora y a la misma concentración que la *Solución de Prueba*.

Procedimiento—Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Solución Estándar* y de la *Solución de Prueba* en celdas de cuarzo a una longitud de onda de 280 nm, con un espectrofotómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando la solución amortiguadora como blanco. Para obtener resultados exactos, la respuesta debe ser lineal para el intervalo de concentraciones de proteína a ser valoradas.

Dispersión de Luz—La exactitud de la determinación espectroscópica UV de la proteína puede disminuir si la muestra dispersa la luz. Si las proteínas en la solución existen como partículas de tamaño comparable con la longitud de onda de la luz de medición (250 a 300 nm), la dispersión del haz de luz produce un aumento aparente en la absorbancia de la muestra. Para calcular la absorbancia a 280 nm causada por la dispersión de luz, hay que determinar las absorbancias de la *Solución de Prueba* a longitudes de onda de 320; 325; 330; 335; 340; 345 y 350 nm. Usando el método de regresión lineal, trazar la gráfica del logaritmo de la absorbancia observada en función del logaritmo de la longitud de onda y determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados. A partir de la gráfica así obtenida, extrapolar el valor de absorbancia causada por la dispersión de luz a 280 nm. Restar la absorbancia por dispersión de luz de la absorbancia total a 280 nm para obtener el valor de absorbancia de la proteína en la solución. Para reducir el efecto de la dispersión de luz, en especial si la solución está muy turbia, se puede pasar la solución por un filtro con un tamaño de poro de 0,2 μm o se puede clarificar por centrifugación.

Cálculos—Calcular la concentración, C_U , de la proteína en la muestra de la prueba, por la fórmula:

$$C_S(A_U/A_S)$$

en donde C_S es la concentración de la *Solución Estándar*; y A_U y A_S son las absorbancias corregidas de la *Solución de Prueba* y la *Solución Estándar*, respectivamente (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)).

Método 2

Este método, comúnmente conocido como la valoración de Lowry, se basa en la reducción mediante proteínas del cromógeno de la mezcla de ácido fosfomolibdico y ácido tungstico en el reactivo Folin-Ciocalteu para fenoles, que produce una absorbancia máxima a 750 nm. El reactivo Folin-Ciocalteu para fenoles reacciona principalmente con residuos tirosina en la proteína, lo cual puede conducir a una variación en la respuesta cuando se valoran diferentes proteínas. Como el método es sensible a sustancias de interferencia, se puede usar un procedimiento para precipitar la proteína de la muestra. Cuando sea necesaria la separación de las sustancias de interferencia de la proteína en la muestra de la prueba, proceder según se indica a continuación para *Sustancias de Interferencia* antes de la preparación de la *Solución de Prueba*. El efecto de las sustancias de interferencia se puede minimizar por dilución, siempre que la concentración de la proteína en análisis continúe siendo suficiente para una medición exacta.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, disolver el Estándar de Referencia USP o el material de referencia para la proteína en análisis, en la solución amortiguadora usada para preparar la *Solución de Prueba*. Diluir porciones de esta solución con la misma solución amortiguadora para obtener no menos de cinco *Soluciones Estándar* con concentraciones entre 5 y 100 µg de proteína por mL, y con concentraciones uniformemente espaciadas.

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis, en la solución amortiguadora adecuada para obtener una solución con una concentración comprendida dentro del intervalo de concentraciones de las *Soluciones Estándar*. Una solución amortiguadora adecuada producirá un pH entre 10,0 y 10,5.

Blanco—Usar la solución amortiguadora utilizada para la *Solución de Prueba* y las *Soluciones Estándar*.

Reactivos y Soluciones—

Reactivo de Sulfato de Cobre—Disolver 100 mg de sulfato cúprico y 200 mg de tartrato de sodio en agua, diluir con agua a 50 mL y mezclar. Disolver 10 g de carbonato de sodio en agua a un volumen final de 50 mL y mezclar. Verter lentamente la solución de carbonato de sodio en la solución de sulfato de cobre, mezclando. Preparar esta solución a diario.

Solución de SDS—Disolver 5 g de dodecilsulfato de sodio en agua y diluir con agua a 100 mL.

Solución de Hidróxido de Sodio—Disolver 3,2 g de hidróxido de sodio en agua, diluir con agua a 100 mL y mezclar.

Reactivo de Cobre Alcalino—Preparar una mezcla de *Reactivo de Sulfato de Cobre*, *Solución de SDS* y *Solución de Hidróxido de Sodio* (1 : 2 : 1). Este reactivo se puede almacenar a temperatura ambiente hasta 2 semanas.

Reactivo Folin-Ciocalteu para Fenoles Diluido—Mezclar 10 mL de Folin-Ciocalteu para Fenoles SR con 50 mL de agua. Almacenar en un frasco ámbar, a temperatura ambiente.

Procedimiento—Agregar a 1 mL de la *Solución Estándar*, a 1 mL de la *Solución de Prueba* y a 1 mL de *Blanco*, 1 mL de *Reactivo de Cobre Alcalino* y mezclar. Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Agregar 0,5 mL del *Reactivo Folin-Ciocalteu para Fenoles Diluido* a cada solución, mezclar inmediatamente cada tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Determinar las absorbancias de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* y la *Solución de Prueba* a la longitud de onda de absorbancia máxima a 750 nm, con un espectrofotómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando la solución del *Blanco* para ajustar el instrumento a cero.

Cálculos—[NOTA—La relación de absorbancia no es función lineal de concentración proteica; sin embargo, si el intervalo de concentración de la curva estándar es lo suficientemente pequeño, se aproxima a la linealidad.] Usando el método de regresión lineal, graficar las absorbancias de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* en función de las concentraciones de proteína y determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados. A partir de la curva estándar así obtenida y de la absorbancia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la *Solución de Prueba*.

SUSTANCIAS DE INTERFERENCIA

En el siguiente procedimiento, se agrega desoxicolato-ácido tricloroacético a una muestra, para eliminar las sustancias de interferencia por precipitación de proteínas antes de hacer la prueba. Esta técnica también puede usarse para concentrar proteínas de una solución diluida.

Reactivo de Desoxicolato de Sodio—Preparar una solución de desoxicolato de sodio en agua, con una concentración de 150 mg en 100 mL.

Reactivo de Ácido Tricloroacético—Preparar una solución de ácido tricloroacético en agua, con una concentración de 72 g en 100 mL.

Procedimiento—Agregar 0,1 mL de *Reactivo de Desoxicolato de Sodio* a 1 mL de una solución de la proteína en análisis. Mezclar en un mezclador por vórtice y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Agregar 0,1 mL de *Reactivo de Ácido Tricloroacético* y mezclar en un mezclador por vórtice. Centrifugar a 3000 × g durante 30 minutos, decantar el líquido y eliminar todo líquido residual con una pipeta. Volver a disolver el pellet de proteína en 1 mL de *Reactivo de Cobre Alcalino*. Proceder según se indica para la *Solución de Prueba*.

NOTA—El desarrollo del color alcanza un máximo en 20 a 30 minutos durante la incubación a temperatura ambiente, y después hay una pérdida gradual de color. La mayoría de las sustancias de interferencia reducen la intensidad del color; sin embargo, algunos detergentes causan un leve aumento del color. Una concentración alta de sal puede provocar la formación de un precipitado. Como las distintas especies de proteína pueden dar respuestas de color de distinta intensidad, la proteína estándar y la proteína de prueba deben ser la misma.

Método 3

Este método, comúnmente denominado ensayo de Bradford, se basa en el cambio de absorción de 470 nm a 595 nm que se observa cuando el colorante azul brillante G se une a la proteína. El colorante azul brillante G se une de inmediato a los residuos arginilo y lisilo en la proteína, que puede variar la respuesta de la valoración para diferentes proteínas.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, disolver el Estándar de Referencia USP o el material de referencia para la proteína en análisis en la solución amortiguadora usada para preparar la *Solución de Prueba*. Diluir porciones de esta solución con la misma solución amortiguadora para obtener no menos de cinco *Soluciones Estándar* que tengan concentraciones entre 100 µg y 1 mg de proteína por mL, con concentraciones uniformemente espaciadas.

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis en la solución amortiguadora adecuada para obtener una solución con una concentración comprendida dentro del intervalo de concentraciones de las *Soluciones Estándar*.

Blanco—Usar la solución amortiguadora utilizada para preparar la *Solución de Prueba* y las *Soluciones Estándar*.

Reactivo de Coomassie—Disolver 100 mg de azul brillante G³ en 50 mL de alcohol. [NOTA—No todos los colorantes tienen el mismo contenido de azul brillante G y distintos productos pueden dar resultados diferentes.] Agregar 100 mL de ácido fosfórico, diluir con agua a 1 L y mezclar. Pasar la solución a través de papel de filtro (Whatman N° 1 o equivalente) y almacenar el reactivo filtrado en un frasco ámbar a temperatura ambiente. [NOTA—El colorante precipita lentamente durante el almacenamiento del reactivo. Filtrar el reactivo antes de usarlo.]

Procedimiento—Agregar 5 mL del *Reactivo Coomassie* a 100 µL de cada una de las siguientes soluciones: *Solución Estándar*, *Solución de Prueba* y *Blanco*, y mezclar por inversión. Evitar la formación de espuma ya que altera la reproducibilidad. Determinar las absorbancias de las soluciones de las *Soluciones Estándar* y la *Solución de Prueba* a 595 nm, con un espectrofotómetro adecuado

³ La pureza del colorante es importante en la preparación del reactivo. Se pretende proponer un pie de página referente al reactivo, para indicar que Serva Blue G (Crescent Chemical Company, Hauppauge, NY) es un grado aceptable.

(ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando el *Blanco* para ajustar el instrumento a cero. [NOTA—No emplear celdas de cuarzo (sílice) en el espectrofotómetro: el colorante se une a este material. Como las distintas especies de proteína pueden dar respuestas de color de distinta intensidad, la proteína estándar y la proteína de prueba deben ser la misma.]

Hay relativamente pocas sustancias de interferencia, pero se deben evitar los detergentes y los anfolitos en la muestra de prueba. Las muestras muy alcalinas pueden interferir con el reactivo ácido.

Cálculos—[NOTA—La absorbancia no es función lineal de la concentración proteica; sin embargo, si el intervalo de concentración de la curva estándar es lo suficientemente pequeño, se aproxima a la linealidad.] Usando el método de regresión lineal, graficar las absorbancias de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* en función de las concentraciones de proteína y determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados. A partir de la curva estándar así obtenida y de la absorbancia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la *Solución de Prueba*.

Método 4

Este método, comúnmente denominado valoración con ácido bicinonínico o BCA, se basa en la reducción del ión cúprico (Cu^{2+}) a ión cuproso (Cu^{+}) por proteínas. El reactivo de ácido bicinonínico se usa para detectar el ión cuproso. El método tiene pocas sustancias de interferencia. Cuando hay sustancias de interferencia presentes, se puede minimizar su efecto mediante dilución, siempre que la concentración de la proteína en análisis sea suficiente para una medición exacta.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, disolver el Estándar de Referencia USP o el material de referencia para la proteína en análisis, en la solución amortiguadora usada para preparar la *Solución de Prueba*. Diluir porciones de esta solución con la misma solución amortiguadora para obtener no menos de cinco *Soluciones Estándar* con concentraciones entre 10 μg y 1200 μg de proteína por mL, con concentraciones uniformemente espaciadas.

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis en la solución amortiguadora adecuada para obtener una solución con una concentración comprendida dentro del intervalo de concentraciones de las *Soluciones Estándar*.

Blanco—Usar la solución amortiguadora utilizada para preparar la *Solución de Prueba* y las *Soluciones Estándar*.

Reactivos—

Reactivo BCA—Disolver aproximadamente 10 g de ácido bicinonínico, 20 g de carbonato de sodio monohidrato, 1,6 g de tartrato de sodio, 4 g de hidróxido de sodio y 9,5 g de bicarbonato de sodio en agua. Ajustar, si es necesario, hasta un pH de 11,25 con hidróxido de sodio o con bicarbonato de sodio. Diluir con agua a 1 L y mezclar.

Reactivo de Sulfato de Cobre—Disolver aproximadamente 2 g de sulfato cúprico en agua a un volumen final de 50 mL.

Reactivo Cobre-BCA—Mezclar 1 mL de *Reactivo de Sulfato de Cobre* y 50 mL de *Reactivo BCA*.

Procedimiento—A sendos tubos con 0,1 mL de la *Solución Estándar*, 0,1 mL de la *Solución de Prueba* y 0,1 mL del *Blanco*, agregar 2 mL de *Reactivo de Cobre-BCA* y mezclar. Incubar las soluciones a 37° durante 30 minutos, anotar el tiempo y dejar que lleguen a temperatura ambiente. Dentro de los 60 minutos siguientes a la incubación, determinar las absorbancias de las soluciones de las *Soluciones Estándar* y la *Solución de Prueba* en celdas de cuarzo a 562 nm, con un espectrofotómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando la solución *Blanco* para ajustar el instrumento a cero. Después de enfriar las soluciones a temperatura ambiente, la intensidad del color continúa aumentando gradualmente. Si hay presentes sustancias que causen interferencias en la prueba, proceder según se indica en *Sustancias de Interferencia* en el *Método 2*. Como las distintas especies de proteína pueden dar respuestas de color de distinta intensidad, la proteína estándar y la proteína de prueba deben ser la misma.

Cálculos—[NOTA—La absorbancia no es función lineal de la concentración proteica; sin embargo, si el intervalo de concentración de la curva estándar es lo suficientemente pequeño, se aproxima a la

linealidad.] Usando el método de regresión lineal, graficar las absorbancias de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* en función de las concentraciones de proteína y determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados. A partir de la curva estándar así obtenida y de la absorbancia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la *Solución de Prueba*.

Método 5

Este método, comúnmente denominado valoración de Biuret, se basa en la interacción del ión cúprico (Cu^{2+}) con la proteína en una solución alcalina y el desarrollo de absorbancia a 545 nm.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, preparar una solución de Albúmina Humana, para la cual se haya determinado previamente el contenido proteico por análisis de nitrógeno (usando un factor de conversión nitrógeno-proteína de 6,25) o del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína en análisis en solución de cloruro de sodio (9 en 1000). Diluir porciones de esta solución con solución de cloruro de sodio (9 en 1000) para obtener no menos de tres *Soluciones Estándar* con concentraciones entre 0,5 y 10 mg por mL, con concentraciones uniformemente espaciadas. [NOTA—Pueden observarse respuestas bajas si la muestra en análisis tiene un nivel de prolina significativamente diferente al de la Albúmina Humana. En dichos casos se puede emplear una proteína estándar diferente.]

Solución de Prueba—Preparar una solución de la proteína de prueba en solución de cloruro de sodio (9 en 1000), con una concentración comprendida dentro del intervalo de las concentraciones de las *Soluciones Estándar*.

Blanco—Usar solución de cloruro de sodio (9 en 1000).

Reactivo de Biuret—Disolver aproximadamente 3,46 g de sulfato cúprico en 10 mL de agua caliente y dejar enfriar (*Solución 1*). Disolver aproximadamente 34,6 g de citrato de sodio dihidrato y 20,0 g de carbonato de sodio en 80 mL de agua caliente y dejar enfriar (*Solución 2*). Mezclar la *Solución 1* y la *Solución 2* y diluir con agua a 200 mL. Este *Reactivo de Biuret* es estable a temperatura ambiente durante 6 meses. No usar el reactivo si aparece turbidez o contiene algún precipitado.

Procedimiento—A un volumen de una solución de la *Solución de prueba*, agregar un volumen igual de solución de hidróxido de sodio (6 en 100) y mezclar. Agregar inmediatamente un volumen de *Reactivo de Biuret* equivalente a un volumen de 0,4 de la *Solución de Prueba* y mezclar. Dejar en reposo a temperatura ambiente entre 15° y 25°, durante no menos de 15 minutos. Dentro de los 90 minutos siguientes a la adición del *Reactivo de Biuret*, determinar las absorbancias de las *Soluciones Estándar* y de la solución obtenida de la *Solución de Prueba* a la longitud de onda de absorbancia máxima a 545 nm, con un espectrofotómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando el *Blanco* para ajustar el instrumento a cero. [NOTA—Toda solución que desarrolle turbidez, o un precipitado, no es aceptable para el cálculo de la concentración proteica.]

Cálculos—Usando el método de regresión lineal de cuadrados mínimos, graficar las absorbancias de las *Soluciones Estándar* en función de las concentraciones de proteína, determinando la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados y calcular el coeficiente de correlación para la línea. [NOTA—Dentro del intervalo dado de los estándares, la relación entre la absorbancia y la concentración proteica es aproximadamente lineal.] Un sistema adecuado es aquel que produce una línea con un coeficiente de correlación de no menos de 0,99. A partir de la curva estándar y de la absorbancia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la muestra, haciendo las correcciones necesarias.

Sustancias de Interferencia—A fin de minimizar el efecto de las sustancias de interferencia, se puede precipitar la proteína en la muestra de prueba inicial, como se indica a continuación. Agregar 0,1 volumen de ácido tricloroacético al 50 por ciento a 1 volumen de una solución de la muestra de prueba, retirar la capa sobrenadante y disolver el precipitado en un volumen pequeño de hidróxido de sodio 0,5 N. Usar la solución así obtenida para preparar la *Solución de Prueba*.

Comentarios—Esta prueba muestra una diferencia mínima entre muestras de IgG y de albúmina equivalentes. La adición de hidróxido de sodio y del *Reactivo de Biuret* como reactivo combinado, la mezcla insuficiente después de la adición del hidróxido de sodio o un tiempo prolongado entre la adición de la solución de hidróxido de sodio y la adición del *Reactivo de Biuret* produce para las muestras de IgG una respuesta más alta que para las muestras de albúmina. El método de ácido tricloroacético usado para minimizar los efectos de sustancias de interferencia también se puede usar para determinar el contenido proteico en muestras de prueba con concentraciones por debajo de 500 µg por mL.

Método 6

Este método fluorométrico se basa en la derivatización de la proteína con *o*-ftalaldehído (OPA), que reacciona con las aminas primarias de la proteína (es decir, el aminoácido NH₂-terminal y el grupo ε-amino de los residuos lisina). La sensibilidad de la prueba puede aumentarse hidrolizando la proteína antes de realizar la prueba. Mediante hidrólisis los grupos α-amino de los aminoácidos constituyentes de la proteína quedan disponibles para reaccionar con el reactivo *o*-ftalaldehído. El método requiere cantidades muy pequeñas de la proteína.

Las aminas primarias, tales como el tris(hidroximetil)aminometano y las soluciones amortiguadoras de aminoácidos, reaccionan con el *o*-ftalaldehído y deben evitarse o eliminarse. El amoníaco en concentraciones altas reacciona también con el *o*-ftalaldehído. La fluorescencia obtenida cuando la amina reacciona con el *o*-ftalaldehído puede ser inestable. El uso de procedimientos automatizados para estandarizar este procedimiento puede mejorar la exactitud y la precisión de la prueba.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, disolver el Estándar de Referencia USP o el material de referencia para la proteína en análisis, en la solución amortiguadora usada para preparar la *Solución de Prueba*. Diluir porciones de esta solución con la misma solución amortiguadora para obtener no menos de cinco *Soluciones Estándar* con concentraciones entre 10 y 200 µg de proteína por mL, con concentraciones uniformemente espaciadas.

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis en la solución amortiguadora adecuada para obtener una solución con una concentración comprendida dentro del intervalo de concentraciones de las *Soluciones Estándar*.

Blanco—Usar la solución amortiguadora utilizada para preparar la *Solución de Prueba* y las *Soluciones Estándar*.

Reactivos—

Solución Amortiguadora de Borato—Disolver aproximadamente 61,83 g de ácido bórico en agua y ajustar con hidróxido de potasio, hasta un pH de 10,4. Diluir con agua a 1 L y mezclar.

Reactivo OPA Madre—Disolver aproximadamente 120 mg de *o*-ftalaldehído en 1,5 mL de metanol, agregar 100 mL de *Solución Amortiguadora de Borato* y mezclar. Agregar 0,6 mL de éter polietilenglicol (23) laurílico y mezclar. Esta solución es estable a temperatura ambiente durante al menos 3 semanas.

Reactivo OPA—A 5 mL de *Reactivo OPA Madre*, agregar 15 µL de 2-mercaptoetanol. Preparar al menos 30 minutos antes de usar. Este reactivo es estable durante un día.

Procedimiento—Ajustar cada una de las *Soluciones Estándar* y la *Solución de Prueba* a un pH entre 8 y 10,5. Mezclar 10 µL de la *Solución de Prueba* y cada una de las *Soluciones Estándar* con 100 µL de *Reactivo OPA* y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Agregar 3 mL de hidróxido de sodio 0,5 N y mezclar. Usando un fluorómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), determinar las intensidades de fluorescencia de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* y de la *Solución de Prueba* a una longitud de onda de excitación de 340 nm y a una longitud de onda de emisión entre 440 y 455 nm. [NOTA—La fluorescencia de una muestra individual se lee sólo una vez, porque la irradiación disminuye la intensidad de la fluorescencia.]

Cálculos—La fluorescencia es función lineal de la concentración proteica. Usando el método de regresión lineal, graficar las intensidades de fluorescencia de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* en función de las concentraciones de proteína y

determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados. A partir de la curva estándar así obtenida y de la intensidad de fluorescencia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la muestra.

Método 7

Este método se basa en el análisis de nitrógeno como un medio de determinación de proteína. La interferencia causada por la presencia de otras sustancias nitrogenadas en la muestra pueden afectar la determinación de proteína por este método. Las técnicas de análisis de nitrógeno destruyen la proteína en análisis, pero no se limitan a las proteínas en un medio acuoso.

Procedimiento 1—Determinar el contenido de nitrógeno de la proteína en análisis según se indica en *Determinación de Nitrógeno* (461). Hay instrumental disponible comercialmente para la valoración de nitrógeno por el método de Kjeldahl.

Procedimiento 2—Hay instrumental disponible comercialmente para análisis de nitrógeno. La mayoría de los instrumentos para análisis de nitrógeno emplean pirólisis (es decir, la combustión de la muestra en oxígeno a temperaturas cercanas a los 1000°), produciéndose óxido nítrico (NO) y óxidos de nitrógeno similares (NO_x) a partir del nitrógeno presente en la proteína de prueba. Algunos instrumentos convierten los óxidos nítricos en gas nitrógeno, que se cuantifica con un detector de conductividad térmica. Otros instrumentos mezclan el óxido nítrico (NO) con ozono (O₃) formándose dióxido de nitrógeno excitado (NO₂), que emite luz cuando se desintegra y se puede cuantificar con un detector de quimioluminiscencia. Se usa un material de referencia de proteína o un estándar de referencia que sea relativamente puro y similar en composición a las proteínas de la prueba para optimizar los parámetros de inyección y pirólisis y para evaluar la uniformidad en el análisis.

Cálculos—La concentración proteica se calcula dividiendo el contenido de nitrógeno de la muestra por el contenido conocido de nitrógeno de la proteína. El contenido conocido de nitrógeno de la proteína se puede determinar a partir de la composición química de la proteína, o por comparación con el contenido de nitrógeno del Estándar de Referencia USP o del material de referencia. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ {1052} ARTÍCULOS OBTENIDOS POR BIOTECNOLOGÍA—ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

Este capítulo proporciona guías y procedimientos utilizados para la caracterización de artículos obtenidos por biotecnología mediante análisis de aminoácidos. Se lo ha armonizado con los capítulos correspondientes en la *Farmacopea Japonesa (JP)* y la *Farmacopea Europea (EP)*. También se muestran otras pruebas de caracterización armonizadas en *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis Capilar* (1053), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Isoelectroenfoque* (1054), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Mapeo de Péptidos* (1055), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE)* (1056) y *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Valoración de Proteínas Totales* (1057).

INTRODUCCIÓN

El análisis de aminoácidos se refiere a la metodología usada para determinar la composición o el contenido de aminoácidos de proteínas, péptidos y otras preparaciones farmacéuticas. Las proteínas y los péptidos son macromoléculas formadas por aminoácidos unidos covalentemente organizados como polímeros

lineales. La secuencia de los aminoácidos en una proteína o un péptido determina las propiedades de la molécula. Las proteínas se consideran moléculas grandes que existen comúnmente como estructuras plegadas con una conformación específica, mientras que los péptidos son más pequeños y pueden estar formados por pocos aminoácidos. El análisis de aminoácidos se puede usar para cuantificar proteínas y péptidos, para determinar la identidad de proteínas o péptidos basándose en su composición de aminoácidos, para respaldar el análisis estructural de proteínas y péptidos, para evaluar estrategias de fragmentación para el mapeo de péptidos y para detectar aminoácidos atípicos presentes en una proteína o un péptido. Antes del análisis de aminoácidos, es necesario hidrolizar una proteína o péptido descomponiéndolo en sus aminoácidos constituyentes. Después de la hidrólisis de la proteína o el péptido, el procedimiento de análisis de aminoácidos puede ser igual al utilizado para aminoácidos libres en otras preparaciones farmacéuticas. Los aminoácidos constituyentes de la muestra de prueba normalmente se derivatizan para su análisis.

APARATOS

Los métodos usados para el análisis de aminoácidos por lo general se basan en una separación cromatográfica de los aminoácidos presentes en la muestra de prueba. Las técnicas actuales aprovechan la instrumentación cromatográfica automatizada diseñada para las metodologías analíticas. Un instrumento de análisis de aminoácidos típico es un cromatógrafo de líquidos de baja presión o de alta presión, capaz de generar gradientes de fase móvil que separan los aminoácidos en una columna cromatográfica. El instrumento debe tener la capacidad de derivatizar los aminoácidos después de pasar por la columna, a menos que la muestra se analice con derivatización anterior a la columna. El detector generalmente es de luz UV-visible o de fluorescencia, según el método de derivatización usado. Se usa un dispositivo de registro (por ejemplo, un integrador) para transformar la señal analógica del detector y para la cuantificación. Es preferible que los instrumentos utilizados para el análisis de aminoácidos se destinen específicamente a esos fines.

PRECAUCIONES GENERALES

La contaminación de fondo es siempre una preocupación en el análisis de aminoácidos. Se requieren reactivos de alta pureza (por ejemplo, el ácido clorhídrico de baja pureza puede contribuir a la contaminación con glicina). Los reactivos analíticos se cambian rutinariamente cada pocas semanas y se usan solamente disolventes para cromatografía de líquidos de alta presión (grado HPLC). La posible contaminación microbiana y los materiales extraños presentes en los disolventes se reducen por filtración antes de usarlos, cubriendo los recipientes y colocando el instrumental para análisis de aminoácidos alejado de la luz solar directa.

Las prácticas de laboratorio pueden determinar la calidad del análisis de aminoácidos. Colocar los instrumentos en una zona de poco tránsito del laboratorio. Mantener limpio el laboratorio. Hay que limpiar y calibrar las pipetas según un plan de mantenimiento. Mantener las puntas de las pipetas en una caja cubierta; los analistas no deben manipular las puntas de las pipetas con las manos. Los analistas pueden usar guantes de látex sin polvo o similares. Limitar la cantidad de veces que se abre y se cierra un vial de muestra ya que el polvo puede hacer que aparezcan niveles elevados de glicina, serina y alanina.

Se necesitan instrumentos bien mantenidos para que los resultados de los análisis de aminoácidos sean aceptables. Si el instrumento se usa de modo rutinario, se debe revisar diariamente para detectar pérdidas, verificar la estabilidad del detector y la lámpara y la capacidad de la columna para mantener la resolución de los aminoácidos individuales. Limpiar o reemplazar, de acuerdo a un plan de rutina, todos los filtros de los instrumentos y demás artículos de mantenimiento.

MATERIAL ESTÁNDAR DE REFERENCIA

Los estándares de aminoácidos aptos para este tipo de análisis están disponibles comercialmente* y consisten generalmente en una mezcla acuosa de aminoácidos. Cuando se determina la composición de aminoácidos, los estándares de proteínas o péptidos se analizan junto con el material de prueba como un control para demostrar la integridad de todo el procedimiento. Para este propósito, se ha usado seroalbúmina bovina altamente purificada como estándar de proteína.

CALIBRACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS

La calibración del instrumental para análisis de aminoácidos por lo general involucra el análisis de estándares de aminoácidos, que son una mezcla de aminoácidos de varias concentraciones, para determinar el factor de respuesta y el intervalo de análisis de cada aminoácido. Se conoce la concentración de cada aminoácido en el estándar. En el procedimiento de calibración, el analista diluye el estándar de aminoácidos para obtener distintos niveles de concentración de analito dentro del intervalo lineal esperado de la técnica de análisis de aminoácidos. Luego, se analizan repetidamente las diversas concentraciones de analito. Las áreas de los picos obtenidos para cada aminoácido se grafican en función de la concentración conocida para cada uno de los aminoácidos en la dilución estándar. Estos resultados permiten al analista determinar el intervalo de concentraciones de aminoácidos donde el área del pico de cada aminoácido es una función aproximadamente lineal de su concentración. Es importante que el analista prepare las muestras para el análisis de aminoácidos de manera que estén dentro de los límites analíticos (por ejemplo, intervalo de trabajo lineal) de la técnica empleada a fin de obtener resultados exactos y repetibles.

Se analizan de cuatro a seis concentraciones del estándar de aminoácidos para determinar un factor de respuesta para cada aminoácido. El factor de respuesta se calcula como el área del pico o la altura del pico promedio por nmol de aminoácido presente en el estándar. Para calcular la concentración de cada aminoácido presente en la muestra de prueba se prepara y se usa un registro de calibración con el factor de respuesta de cada aminoácido. En este cálculo se divide el área del pico de un aminoácido dado por su correspondiente factor de respuesta, y se obtienen así los nmol del aminoácido. Para los análisis de rutina, basta una calibración de un solo punto; sin embargo, el archivo de calibración se actualiza frecuentemente y se prueba por análisis de controles analíticos para asegurar su integridad.

REPETIBILIDAD

Los resultados uniformes y de alta calidad de los análisis de aminoácidos de un laboratorio analítico exigen prestar atención a la repetibilidad de la valoración. Durante el análisis de la separación cromatográfica de los aminoácidos o sus derivados, se pueden observar numerosos picos en el cromatograma que corresponden a los aminoácidos. El gran número de picos exige un sistema de análisis de aminoácidos que los pueda identificar repetidamente basándose en el tiempo de retención e integrar las áreas de los picos para la cuantificación. Una evaluación de repetibilidad típica involucra la preparación de una solución de aminoácidos estándar y el análisis de varias determinaciones repetidas (es decir, seis análisis o más) de la misma solución estándar. Se determina la desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) para el tiempo de retención y el área del pico integrada de cada aminoácido. La evaluación de la repetibilidad se amplía incluyendo múltiples valoraciones realizadas durante varios días por distintos analistas. Las múltiples valoraciones incluyen la preparación de diluciones estándar a partir de materiales iniciales para determinar la variación debida a la manipulación de la muestra. A menudo, la composición de aminoácidos de una proteína estándar (por ejemplo, seroalbúmina bovina) se analiza como parte de la evaluación de repetibilidad. La evaluación de la variación de determinaciones repetidas (es decir, la RSD) permite al laboratorio establecer límites analíticos para

* Los estándares adecuados se pueden obtener de NIST (Gaithersburg, MD), Beckman Instruments (Fullerton, CA), Sigma Chemical (St. Louis, MO), Pierce (Rockford, IL) o Agilent (Palo Alto, CA).

asegurar que sus análisis se encuentran bajo control. Es conveniente establecer los límites de variación mínimos practicables para asegurar los mejores resultados. Para disminuir la variabilidad del análisis de aminoácidos, conviene enfocarse en la preparación de la muestra, la elevada interferencia espectral de fondo debido a la calidad de los reactivos y/o a las prácticas del laboratorio, el funcionamiento y mantenimiento de los instrumentos, el análisis y la interpretación de los datos y el desempeño y los hábitos del analista. Todos los parámetros se investigan a fondo como parte del trabajo de validación.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La obtención de resultados exactos del análisis de aminoácidos exige muestras purificadas de proteínas y péptidos. Los componentes de las soluciones amortiguadoras (por ejemplo, sales, urea, detergentes) pueden interferir con el análisis de aminoácidos y se eliminan de la muestra antes del análisis. Los métodos que utilizan derivatización de aminoácidos postcolumna generalmente no se ven tan afectados por los componentes de la solución amortiguadora como se observa en los métodos de derivatización precolumna. Es conveniente limitar el número de las manipulaciones de las muestras con el fin de reducir la posible contaminación de fondo, para mejorar la recuperación de analitos y para reducir el trabajo. Las técnicas comunes empleadas para eliminar los componentes de las soluciones amortiguadoras del pH de las muestras de proteínas incluyen: (1) inyectar la muestra de proteína en un sistema HPLC en fase reversa, extrayendo la proteína con un disolvente volátil que contenga suficiente componente orgánico y secando la muestra en una centrifuga de vacío; (2) diálisis contra una solución amortiguadora del pH volátil o agua; (3) ultrafiltración centrífuga para el reemplazo de la solución amortiguadora del pH por una solución amortiguadora del pH volátil o agua; (4) precipitar la proteína de la solución amortiguadora del pH usando un disolvente orgánico (por ejemplo: acetona); y (5) filtración en gel.

ESTÁNDARES INTERNOS

Se recomienda usar un estándar interno para controlar las pérdidas y variaciones físicas y químicas durante el análisis de aminoácidos. Antes de la hidrólisis, se puede agregar a la solución de proteína una cantidad de estándar interno conocida con exactitud. La recuperación del estándar interno indica la recuperación general de los aminoácidos de la solución de proteína. Sin embargo, los aminoácidos libres no se comportan igual que los aminoácidos unidos a proteínas durante la hidrólisis ya que sus velocidades de liberación o destrucción son variables. Por lo tanto, el uso de un estándar interno para corregir las pérdidas durante la hidrólisis puede proporcionar resultados no confiables. Hay que tener en cuenta este punto cuando se interpretan los resultados. También se pueden agregar estándares internos a la mezcla de aminoácidos después de la hidrólisis para corregir por las diferencias en la aplicación de las muestras y los cambios en la estabilidad del reactivo y las velocidades de flujo. Idealmente, un estándar interno es un aminoácido primario que no se encuentra naturalmente y que esta disponible comercialmente a bajo precio. También debe ser estable durante la hidrólisis, su factor de respuesta debe ser función lineal de su concentración y debe eluir con un tiempo de retención único, sin superponerse con otros aminoácidos. Los estándares de aminoácidos comúnmente empleados incluyen la norleucina, la nitrotirosina y el ácido α -aminobutírico.

HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS

La hidrólisis de muestras de proteínas y péptidos es necesaria para el análisis de aminoácidos de estas moléculas. El material de vidrio usado para la hidrólisis debe estar muy limpio para evitar resultados erróneos. Los polvos para guantes y las huellas dactilares en los tubos de hidrólisis pueden causar contaminación. Para limpiar los tubos de vidrio para hidrólisis, hay que hervir los tubos durante 1 hora en ácido clorhídrico 1 N o sumergirlos en ácido nítrico concentrado o en una mezcla de ácido clorhídrico concentrado y ácido nítrico concentrado (1 : 1). Los tubos de hidrólisis limpios se

enjuagan con agua de alta pureza, seguido por un enjuague con metanol de grado HPLC, se secan de un día para el otro en una estufa y se almacenan cubiertos hasta su uso. Alternativamente, el material de vidrio limpio se puede someter a pirólisis a 500° durante 4 horas para eliminar la contaminación de los tubos para hidrólisis. También se puede usar material de laboratorio desechable adecuado.

La hidrólisis ácida es el método más común para hidrolizar una muestra de proteína antes del análisis de aminoácidos. La técnica de hidrólisis ácida puede aumentar la variabilidad del análisis debido a la destrucción completa o parcial de varios aminoácidos. El triptófano se destruye; la serina y la treonina se destruyen parcialmente; la metionina puede oxidarse; y la cisteína típicamente se recupera como cistina (pero la recuperación de la cistina suele ser mala debido a la destrucción o reducción parcial a cisteína). La aplicación de vacío adecuado (menos de 200 μ m de mercurio o 26,7 Pa) o la introducción de un gas inerte (argón) en la cámara gaseosa superior del recipiente de reacción puede reducir la destrucción oxidativa. En las uniones peptídicas que involucran isoleucina y valina, las uniones amida de Ile-Ile, Val-Val, Ile-Val y Val-Ile se escinden parcialmente; y la asparagina y la glutamina se desamidán, dando como resultado ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente. La pérdida de triptófano, asparagina y glutamina durante una hidrólisis ácida limita la cuantificación a 17 aminoácidos. Algunas de las técnicas de hidrólisis descritas se usan para tratar estos problemas. Algunas de las técnicas de hidrólisis descritas (es decir, los *Métodos 4–11*) pueden modificar otros aminoácidos. Por lo tanto, hay que considerar las ventajas de usar una técnica de hidrólisis en comparación con sus problemas; estas ventajas se analizan adecuadamente antes de emplear un método que no sea la hidrólisis ácida.

A menudo se emplea un estudio en función del tiempo (es decir, un análisis de aminoácidos con tiempos de hidrólisis ácida de 24, 48 y 72 horas) para analizar la concentración inicial de aminoácidos que se destruyen parcialmente o que se escinden lentamente. Al graficar la concentración observada de aminoácidos lábiles (es decir, serina y treonina) en función del tiempo de hidrólisis, se puede extrapolar la línea hasta su origen para determinar la concentración inicial de estos aminoácidos. Los estudios de hidrólisis en función del tiempo también se usan con aminoácidos que se escinden lentamente (por ejemplo, isoleucina y valina). Durante el transcurso del tiempo de hidrólisis, el analista observa una meseta en estos residuos. El nivel de esta meseta se considera la concentración de residuo. Si el tiempo de hidrólisis es demasiado largo, la concentración del residuo en la muestra comienza a disminuir, indicando una destrucción por las condiciones de hidrólisis.

Una alternativa aceptable al estudio en función del tiempo es someter un estándar de calibración de un aminoácido a las mismas condiciones de hidrólisis que la muestra de prueba. El aminoácido libre puede no ser totalmente representativo de la velocidad de destrucción de los aminoácidos lábiles dentro de un péptido o una proteína durante la hidrólisis. Esto es especialmente válido para las uniones peptídicas que se escinden lentamente (por ejemplo, uniones Ile-Val). Sin embargo, esta técnica permite al analista dar cuenta de cierta destrucción de residuos. Se ha empleado la hidrólisis ácida por microondas y ésta es rápida, pero exige equipo y precauciones especiales. Las condiciones óptimas para la hidrólisis por microondas se deben investigar para cada muestra de proteína o péptido. La técnica de hidrólisis por microondas típicamente toma sólo unos minutos, pero una desviación de 1 minuto puede proporcionar resultados inadecuados (por ejemplo, hidrólisis incompleta o destrucción de aminoácidos lábiles). Se ha empleado la proteólisis completa usando una mezcla de proteasas pero puede ser complicada, exige controles adecuados y, por lo general, se puede aplicar más a péptidos que a proteínas. [NOTA—Durante los análisis iniciales de

una proteína desconocida, se realizan experimentos con diferentes tiempos de hidrólisis y condiciones de temperatura para determinar las condiciones óptimas.]

Método 1

La hidrólisis ácida usando ácido clorhídrico que contenga fenol es el procedimiento más comúnmente usado para la hidrólisis de proteínas o péptidos antes del análisis de aminoácidos. La adición de fenol a la reacción evita la halogenación de la tirosina.

Solución de Hidrólisis: ácido clorhídrico 6N que contenga entre 0,1% y 1,0% de fenol.

Procedimiento—

Hidrólisis en Fase Líquida—Colocar la muestra de proteína o péptido en un tubo para hidrólisis y secar. [NOTA—La muestra se seca para que el agua de la muestra no diluya el ácido empleado para la hidrólisis.] Agregar 200 µL de la *Solución de Hidrólisis* por cada 500 µg de proteína liofilizada. Congelar el tubo de la muestra en un baño de hielo seco y acetona y sellar a la llama en vacío. Las muestras típicamente se hidrolizan a 110° durante 24 horas al vacío o en una atmósfera inerte para evitar la oxidación. Se investigan tiempos mayores de hidrólisis (por ejemplo, 48 y 72 horas) si existe la preocupación de que la proteína no esté totalmente hidrolizada.

Hidrólisis en Fase de Vapor—Éste es uno de los procedimientos de hidrólisis ácida más comunes y se prefiere para el microanálisis cuando sólo se dispone de pequeñas cantidades de muestra. La contaminación de la muestra por el reactivo ácido también se minimiza usando la hidrólisis en fase de vapor. Colocar los viales que contengan las muestras secas en un recipiente con un cantidad adecuada de la *Solución de Hidrólisis*. La *Solución de Hidrólisis* no entra en contacto con la muestra de prueba. Aplicar una atmósfera inerte o vacío (menos de 200 µm de mercurio o 26,7 Pa) a la cámara gaseosa del recipiente y calentar aproximadamente a 110° durante un tiempo de hidrólisis de 24 horas. El vapor ácido hidroliza la muestra seca. Minimizar toda condensación del ácido en los viales de la muestra. Después de la hidrólisis, secar la muestra al vacío para eliminar el ácido residual.

Método 2

La oxidación del triptófano durante la hidrólisis disminuye si se usa ácido mercaptoetanosulfónico (MESA) como ácido reductor.

Solución de Hidrólisis: solución de MESA 2,5 M.

Hidrólisis en Fase de Vapor—Secar aproximadamente de 1 a 100 µg de la proteína o péptido en análisis en un tubo de hidrólisis. Colocar el tubo de hidrólisis en un tubo más grande con aproximadamente 200 µL de la *Solución de Hidrólisis*. Sellar al vacío el tubo más grande (aproximadamente a 50 µm de mercurio o 6,7 Pa) para vaporizar la *Solución de Hidrólisis*. Calentar el tubo de hidrólisis entre 170° y 185° durante aproximadamente 12,5 minutos. Después de la hidrólisis, secar el tubo de hidrólisis al vacío durante 15 minutos para eliminar el ácido residual.

Método 3

La oxidación del triptófano durante la hidrólisis se evita usando ácido tioglicólico (TGA) como ácido reductor.

Solución de Hidrólisis: una solución que contenga ácido clorhídrico 7M, 10% de ácido trifluoroacético, 20% de ácido tioglicólico y 1% de fenol.

Hidrólisis en Fase de Vapor—Secar aproximadamente de 10 µg a 50 µg de la proteína o péptido en análisis en un tubo de muestra. Colocar el tubo de muestra en un tubo más grande con aproximadamente 200 µL de la *Solución de Hidrólisis*. Sellar el tubo más grande al vacío (aproximadamente a 50 µm de mercurio o 6,7 Pa) para vaporizar el TGA. Calentar el tubo de muestra a 166° durante aproximadamente 15 a 30 minutos. Después de la hidrólisis, secar el tubo de muestra al vacío durante 5 minutos para eliminar el ácido residual. La recuperación de triptófano por medio de este método puede depender de la cantidad de muestra presente.

Método 4

La oxidación de la cisteína-cistina y de la metionina se realiza con ácido per fórmico antes de la hidrólisis de la proteína.

Solución de Oxidación—Preparar ácido per fórmico en el momento de análisis mezclando ácido fórmico y peróxido de hidrógeno al 30% (9:1) e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Procedimiento—Disolver la muestra de proteína o péptido en 20 µL de ácido fórmico y calentar a 50° durante 5 minutos; agregar luego 100 µL de la *Solución de Oxidación*. En esta reacción, la cisteína se convierte en ácido cisteico y la metionina se convierte en metionina sulfona. Dejar que la oxidación continúe durante de 10 a 30 minutos. Eliminar el reactivo en exceso de la muestra en una centrifuga de vacío. Esta técnica puede modificar los residuos de tirosina en presencia de haluros. Luego se puede realizar una hidrólisis ácida de la proteína oxidada usando el *Método 1* o el *Método 2*.

Método 5

La oxidación de cisteína-cistina se logra durante la hidrólisis en fase líquida con azida de sodio.

Solución de Hidrólisis: agregar azida de sodio a ácido clorhídrico 6N que contenga 0,2 % de fenol, para obtener una concentración final de 0,2% (p/v). El fenol agregado evita la halogenación de la tirosina.

Hidrólisis en Fase Líquida—Realizar la hidrólisis de la proteína o péptido aproximadamente a 110° durante 24 horas. Durante la hidrólisis, la cisteína-cistina presente en la muestra se convierte en ácido cisteico mediante la azida de sodio presente en la *Solución de Hidrólisis*. Esta técnica permite una mejor recuperación de tirosina que el *Método 4*, pero no es cuantitativa para la metionina. La metionina se convierte en una mezcla de la metionina original y sus dos productos de oxidación, metionina sulfóxido y metionina sulfona.

Método 6

La oxidación de cisteína-cistina se logra con dimetil sulfóxido (DMSO).

Solución de Hidrólisis: agregar DMSO a ácido clorhídrico 6N que contenga de 0,1% a 1,0% de fenol, para obtener una concentración final de 2% (v/v).

Hidrólisis en Fase de Vapor—Realizar la hidrólisis de la proteína o péptido aproximadamente a 110° durante 24 horas. Durante la hidrólisis, la cisteína-cistina presente en la muestra se convierte en ácido cisteico por el DMSO presente en la *Solución de Hidrólisis*. Para reducir la variabilidad y compensar la destrucción parcial, se recomienda evaluar la recuperación de ácido cisteico de las hidrólisis oxidativas de proteínas estándar que contengan de 1 a 8 moles de cisteína. Los factores de respuesta del hidrolizado de proteínas o péptidos por lo general son aproximadamente 30% menores que los de los estándares de ácido cisteico no hidrolizado. Como la histidina, la metionina, la tirosina y el triptófano también se modifican, con esta técnica no se obtiene un análisis completo de la composición.

Método 7

La reducción y la alquilación de cisteína-cistina se logra a través de una reacción de piridiletilación en fase de vapor.

Solución Reductora—Transferir 83,3 µL de piridina, 16,7 µL de 4-vinilpiridina, 16,7 µL de tributilfosfina y 83,3 µL de agua a un recipiente adecuado y mezclar.

Procedimiento—Agregar la proteína o péptido (entre 1 y 100 µg) a un tubo de hidrólisis y colocar en un tubo más grande. Transferir la *Solución Reductora* al tubo más grande, sellar al vacío (aproximadamente a 50 µm de mercurio o 6,7 Pa), e incubar aproximadamente a 100° durante 5 minutos. Luego, retirar el tubo de hidrólisis interior y secarlo en un desecador de vacío durante 15 minutos para eliminar

los reactivos residuales. Después, se puede realizar una hidrólisis ácida de la proteína o péptido piridiletilados usando los procedimientos descritos previamente. La reacción de piridiletilación se realiza simultáneamente con una muestra de un estándar de proteína que contenga de 1 a 8 moles de cisteína, para mejorar la exactitud de la recuperación de piridiletil-cisteína. Mayores tiempos de incubación en la reacción de piridiletilación pueden modificar el grupo α -amino terminal y el grupo ϵ -amino de la lisina en la proteína.

Método 8

La reducción de cisteína-cistina y la alquilación se logran a través de una reacción de piridiletilación en fase líquida.

Soluciones Madre—Preparar y filtrar tres soluciones: clorhidrato de Tris 1 M (pH 8,5) que contenga edetato disódico 4 mM (*Solución Madre 1*), clorhidrato de guanidina 8 M (*Solución Madre 2*) y 2-mercaptoetanol al 10% en agua (*Solución Madre 3*).

Solución Reductora—Preparar una mezcla de la *Solución Madre 2* y la *Solución Madre 1* (3:1) para obtener una solución amortiguada de clorhidrato de guanidina 6 M en clorhidrato de Tris 0,25 M.

Procedimiento—Disolver aproximadamente 10 μ g de la muestra de prueba en 50 μ L de la *Solución Reductora* y agregar aproximadamente 2,5 μ L de la *Solución Madre 3*. Almacenar bajo nitrógeno o argón durante 2 horas a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Para lograr la reacción de piridiletilación, agregar aproximadamente 2 μ L de 4-vinilpiridina a la solución de proteína, e incubar durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente en un lugar oscuro. La proteína o péptido se desaliniza por recolección de la fracción de proteína o péptido luego de una separación por HPLC en fase reversa. La muestra recolectada se puede secar en una centrifuga de vacío antes de la hidrólisis ácida.

Método 9

La reducción de cisteína-cistina y la alquilación se logran a través de una reacción de carboximetilación en fase líquida.

Soluciones Madre—Preparar según se indica en el *Método 8*.

Solución de Carboximetilación—Preparar una solución que contenga 100 mg de yodoacetamida por mL de alcohol.

Solución Amortiguadora—Usar la *Solución Reductora*, preparada según se indica en el *Método 8*.

Procedimiento—Disolver la muestra de prueba en 50 μ L de la *Solución Amortiguadora* y agregar aproximadamente 2,5 μ L de la *Solución Madre 3*. Almacenar bajo nitrógeno o argón durante 2 horas a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Agregar la *Solución de Carboximetilación* en una relación de 1,5 veces el contenido teórico total de tioles, e incubar durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente en un lugar oscuro. [NOTA—Si el contenido de tioles de la proteína se desconoce, agregar 5 μ L de yodoacetamida 100 mM por cada 20 nmol de proteína presente.] La reacción se detiene agregando un exceso de 2-mercaptoetanol. La proteína o péptido se desaliniza por recolección de la fracción de proteína o péptido luego de una separación por HPLC en fase reversa. La muestra recolectada se puede secar en una centrifuga de vacío antes de la hidrólisis ácida. La *S*-carboxiamidometilcisteína formada se convierte en *S*-carboximetilcisteína durante la hidrólisis ácida.

Método 10

La cisteína-cistina se hace reaccionar con el ácido ditiodiglicólico o el ácido ditiodipropiónico para producir un disulfuro mixto. [NOTA—La elección del ácido ditiodiglicólico o del ácido ditiodipropiónico depende de la resolución requerida por el método de análisis de aminoácidos.]

Solución Reductora: una solución que contenga 10 mg de ácido ditiodiglicólico (o ácido ditiodipropiónico) por mL de hidróxido de sodio 0,2 M.

Procedimiento—Transferir aproximadamente 20 μ g de la muestra de prueba a un tubo de hidrólisis y agregar 5 μ L de la *Solución Reductora*. Agregar 10 μ L de alcohol isopropílico y luego eliminar todo el líquido de la muestra mediante centrifugación al vacío. Luego, hidrolizar la muestra usando el *Método 1*. La ventaja de este método es que no se derivatizan otros residuos aminoácidos por reacciones secundarias y no es necesario desalinizar la muestra antes de la hidrólisis.

Método 11

La asparagina y la glutamina se convierten en ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente, durante la hidrólisis ácida. Los residuos de asparagina y ácido aspártico se suman y se representan con *Asx*, y los residuos de glutamina y ácido glutámico se suman y se representan con *Glx*. Las proteínas o péptidos pueden hacerse reaccionar con bis(1,1-trifluoroacetoxi)iodobenceno (BTI) para convertir los residuos de asparagina y glutamina en residuos de ácido diaminopropiónico y ácido diaminobutírico, respectivamente, en la hidrólisis ácida. Estas conversiones permiten al analista determinar el contenido de asparagina y glutamina de una proteína o péptido en presencia de residuos de ácido aspártico y ácido glutámico.

Soluciones Reductoras—Preparar y filtrar tres soluciones: una solución de ácido trifluoroacético 10 mM (*Solución 1*), una solución de clorhidrato de guanidina 5 M y ácido trifluoroacético 10 mM (*Solución 2*) y una solución recién preparada de dimetilformamida que contenga 36 mg de BTI por mL (*Solución 3*).

Procedimiento—A un tubo de hidrólisis limpio, transferir aproximadamente 200 μ g de la muestra de prueba y agregar 2 mL de la *Solución 1* o la *Solución 2* y 2 mL de la *Solución 3*. Sellar el tubo de hidrólisis al vacío. Calentar la muestra a 60° durante cuatro horas en un lugar oscuro. Luego, dializar la muestra con agua para eliminar el exceso de reactivos. Extraer la muestra dializada tres veces con volúmenes iguales de acetato de *n*-butilo y luego liofilizar. Después, se puede realizar la hidrólisis ácida de la proteína usando los procedimientos descritos previamente. Los residuos de ácido α -, β -diaminopropiónico y ácido α -, γ -diaminobutírico típicamente no se resuelven de los residuos de lisina en la cromatografía de intercambio iónico basada en el análisis de aminoácidos. Por lo tanto, cuando se usa el intercambio iónico para separar los aminoácidos, el contenido de asparagina y glutamina es la diferencia cuantitativa entre el ácido aspártico y ácido glutámico determinados por hidrólisis ácida sin derivatizar y el contenido que se obtiene por derivatización con BTI. [NOTA—El contenido determinado para treonina, metionina, cisteína, tirosina e histidina puede cambiar por la derivatización con BTI; se debe realizar una hidrólisis sin BTI si el analista está interesado en el contenido de estos otros aminoácidos en proteínas o péptidos.]

METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

Existen muchas técnicas de análisis de aminoácidos y la elección de una de estas técnicas a menudo depende de la sensibilidad que requiera la valoración. En general, aproximadamente la mitad de las técnicas de análisis de aminoácidos empleadas se basan en la separación de los aminoácidos libres mediante cromatografía de intercambio iónico seguida por derivatización postcolumna (por ejemplo, con ninhidrina u *o*-ftalaldehído). Las técnicas de detección postcolumna se pueden utilizar con muestras que contienen pequeñas cantidades de los componentes de las soluciones amortiguadoras, tales como sales y urea, y por lo general necesitan entre 5 y 10 μ g de muestra de proteína por análisis. Las demás técnicas de aminoácidos generalmente involucran la derivatización precolumna de los aminoácidos libres (por ejemplo, isotiocianato de fenilo; carbonato de 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimido; cloruro de (dimetilamino)azobencensulfonilo; 9-fluorenil-metilcloroformiato; y 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) seguida de HPLC en fase reversa. Las técnicas de derivatización precolumna son muy sensibles y por lo general necesitan entre 0,5 y 1,0 μ g de la muestra de proteína por análisis, aunque pueden ser influenciadas por sales amortiguadoras presentes en las muestras. Las técnicas de deriva-

tización precolumna también pueden producir múltiples derivados de un aminoácido dado, lo cual complica la interpretación de los resultados. Las técnicas de derivatización postcolumna generalmente están menos influenciadas por variaciones en el desempeño de la valoración que las técnicas de derivatización precolumna.

Se pueden usar los siguientes *Métodos* para el análisis cuantitativo de aminoácidos. Los instrumentos y reactivos para estos procedimientos están disponibles comercialmente. Además, existen muchas modificaciones de estas metodologías con diferentes preparaciones de reactivos, procedimientos de reacción y sistemas cromatográficos. Los parámetros específicos pueden variar según los equipos y procedimientos usados. Muchos laboratorios usan más de una técnica de análisis de aminoácidos para aprovechar la ventajas de cada una. En cada uno de estos *Métodos*, la señal analógica se visualiza mediante un sistema de captación de datos y las áreas de los picos se integran con fines de cuantificación.

Método 1—Detección Postcolumna con Ninhidrina

La cromatografía de intercambio iónico con detección postcolumna con ninhidrina es uno de los métodos más comúnmente usados para el análisis cuantitativo de aminoácidos. Por lo general, se emplea un sistema de intercambio catiónico a base de Li para el análisis de muestras fisiológicas más complejas y un sistema de intercambio catiónico a base de Na, que es más rápido, para mezclas de aminoácidos más simples obtenidas de hidrolizados proteicos (que típicamente contienen 17 aminoácidos). La separación de los aminoácidos en una columna de intercambio iónico se logra a través de una combinación de cambios en el pH y en la fuerza catiónica. A menudo se emplea un gradiente de temperatura para mejorar la separación.

Cuando el aminoácido reacciona con la ninhidrina, el reactante adquiere un color púrpura o amarillo característico. Los aminoácidos, a excepción de los iminoácidos, dan un color púrpura y muestran máxima absorción a 570 nm. Los iminoácidos, como por ejemplo la prolina, dan un color amarillo y muestran una absorción máxima a 440 nm. La reacción postcolumna entre la ninhidrina y cada aminoácido eluido de la columna se controla a 440 nm y 570 nm y el cromatograma obtenido se usa para determinar la composición de aminoácidos.

Se considera que el límite de detección es 10 pmol para la mayoría de los derivados de aminoácidos, pero es 50 pmol para la prolina. Se obtiene una respuesta lineal entre 20 y 500 pmol con coeficientes de correlación superiores a 0,999. Para obtener buenos datos de composición, es mejor contar con muestras de más de 1 µg antes de la hidrólisis para este análisis de aminoácidos de proteínas o péptidos.

Más adelante se muestra un método para la detección postcolumna con ninhidrina. Existen muchos otros métodos, con instrumental y reactivos disponibles comercialmente.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A—Transferir aproximadamente 1,7 g de citrato de sodio anhidro y 1,5 mL de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. Ajustar, si fuera necesario, con ácido clorhídrico hasta un pH de 3,0.

Solución B—Transferir aproximadamente 1,7 g de citrato de sodio anhidro y 0,7 mL de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. Ajustar con ácido clorhídrico, si fuera necesario, hasta un pH de 4,3.

Solución C—Preparar una solución que contenga 5% de cloruro de sodio, 1,9% de citrato de sodio anhidro y 0,1% de fenol en agua y ajustar hasta un pH de 6.

Solución Regeneradora de la Columna—Preparar una solución que contenga 0,8% de hidróxido de sodio en agua y ajustar hasta un pH de 13.

Fase Móvil—Usar mezclas variables de *Solución A*, *Solución B* y *Solución C* como se indica en el *Sistema Cromatográfico*.

Reactivo Postcolumna—Transferir aproximadamente 18 g de ninhidrina y 0,7 g de hidrindantina a 900 mL de una solución que contenga 76,7% de dimetil sulfoxido, 0,7% de acetato de litio dihidrato y 0,1% de ácido acético y mezclar durante un mínimo de

3 horas bajo un gas inerte, como por ejemplo nitrógeno. [NOTA—Este reactivo es estable durante 30 días si se mantiene a una temperatura entre 2° y 8° bajo un gas inerte.]

Solución Amortiguadora—Preparar una solución que contenga 2% de citrato de sodio anhidro, 1% de ácido clorhídrico, 0,5% de tioglicol y 0,1% de ácido benzoico en agua y ajustar hasta un pH de 2.

Sistema Cromatográfico—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector con filtros de interferencia apropiados a 440; 570 o 690 nm y una columna de 4,0 mm × 120 mm rellena con copolímero sulfonado de estireno-divinilbenceno de 7,5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 14 mL por hora. Programar el sistema del siguiente modo. Inicialmente, equilibrar la columna con *Solución A*; a los 25 minutos, cambiar la composición de la *Fase Móvil* a 100% de *Solución B*; y a los 37 minutos, cambiar la composición al 100% de *Solución C*. A los 75 minutos de la corrida, eluye el último aminoácido de la columna y se regenera la columna con la *Solución Regeneradora de la Columna* durante 1 minuto. Equilibrar luego la columna con *Solución A* durante 11 minutos antes de la siguiente inyección. Programar la temperatura de la columna del siguiente modo. La temperatura inicial es 48°; después de 11,5 minutos, aumentar la temperatura a 65° a una velocidad de 3° por minuto; aproximadamente a los 35 minutos, aumentar la temperatura a 77° a una velocidad de 3° por minuto; y finalmente aproximadamente a los 52 minutos, disminuir la temperatura a 48° a una velocidad de 3° por minuto.

Procedimiento y Reacción Postcolumna—Reconstituir el hidrolizado proteico o péptido liofilizado en la *Solución Amortiguadora*, inyectar una cantidad adecuada en el cromatógrafo y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*. Cuando los aminoácidos eluyen de la columna, se mezclan con el *Reactivo Postcolumna*, que se suministra a una velocidad de flujo de 7 mL por hora, a través de una llave T. Después de mezclar, el efuente de la columna y el *Reactivo Postcolumna* pasan a través de un reactor tubular a una temperatura de 135°, donde se forma un color púrpura o amarillo característico. Desde el reactor, el líquido pasa a través de un colorímetro con una cubeta de flujo de 12 mm. La luz que emerge de la cubeta se divide en tres haces que son analizados por el detector con filtros de interferencia a 440; 570 ó 690 nm. La señal de 690 nm se puede restar electrónicamente de las otras señales para obtener mejores relaciones señal-ruido. Las señales de 440 nm (iminoácidos) y de 570 nm (aminoácidos) se pueden sumar para simplificar el manejo de datos.

Método 2—Derivatización Fluorométrica Postcolumna con OPA

Se usa la cromatografía de intercambio iónico con detección postcolumna fluorométrica con *o*-ftalaldehído (OPA). El procedimiento emplea una columna de intercambio iónico para la separación de aminoácidos libres seguida de una oxidación postcolumna con hipoclorito de sodio y derivatización usando OPA y *N*-acetil-L-cisteína. El paso de oxidación con hipoclorito de sodio permite a las aminas secundarias, como por ejemplo la prolina, reaccionar con el reactivo OPA.

El OPA reacciona con las aminas primarias en presencia de un tiol para formar productos de isoindol altamente fluorescentes. Esta reacción se utiliza para la derivatización postcolumna en el análisis de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico. La regla de separación es la misma que la del *Método 1*. Los instrumentos y reactivos para esta forma de análisis de aminoácidos están disponibles comercialmente. Existen muchas modificaciones de este método.

Si bien el OPA no reacciona con aminas secundarias (iminoácidos, como por ejemplo la prolina) para formar sustancias fluorescentes, la oxidación con hipoclorito de sodio permite que las aminas secundarias reaccionen con OPA. El procedimiento emplea una columna de intercambio catiónico fuertemente ácida para la separación de aminoácidos libres seguida de una oxidación postcolumna con hipoclorito de sodio y derivatización postcolumna usando OPA y un compuesto tiol, como por ejemplo *N*-acetil-L-cisteína y 2-mercaptoetanol. La derivatización de aminoácidos primarios no se altera perceptiblemente con el aporte continuo de hipoclorito de sodio.

La separación de los aminoácidos en una columna de intercambio iónico se logra a través de una combinación de cambios en el pH y en la fuerza catiónica. Después de la derivatización postcolumna con OPA de los aminoácidos eluidos, el reactante pasa a través de un detector fluorométrico. La intensidad de la fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con OPA se controla con una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm.

Se considera que el límite de detección es de unas pocas decenas de pmol para la mayoría de los derivados de aminoácidos. La respuesta es lineal entre unos pocos pmol y unas pocas decenas de nmol. Para obtener buenos datos de composición en este análisis de aminoácidos de proteínas o péptidos, es mejor contar con muestras de más de 500 ng antes de la hidrólisis.

A continuación se muestra un método para la detección postcolumna fluorométrica con OPA.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A—Preparar una solución de hidróxido de sodio, ácido cítrico y alcohol en agua de grado HPLC con una concentración de sodio 0,2 N y que contenga 7% de alcohol (p/v), ajustada hasta un pH de 3,2.

Solución B—Preparar una solución de hidróxido de sodio y ácido cítrico en agua de grado HPLC con una concentración de sodio 0,6 N, ajustada a un pH de 10,0.

Solución C: hidróxido de sodio 0,2 N.

Fase Móvil—Usar mezclas variables de *Solución A*, *Solución B* y *Solución C* como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Preparación de Reactivo Postcolumna—

Solución Amortiguadora Alcalina—Preparar una solución que contenga carbonato de sodio 384 mM, ácido bórico 216 mM y sulfato de potasio 108 mM y ajustar hasta un pH de 10,0.

Reactivo de Hipoclorito—Agregar 0,4 mL de una solución de hipoclorito de sodio (10% de cloro) a 1 L de la *Solución Amortiguadora Alcalina*. [NOTA—La solución de hipoclorito es estable durante 2 semanas.]

Reactivo OPA—Transferir 2 g de *N*-acetil-L-cisteína y 1,6 g de OPA a un matraz volumétrico de 15 mL, disolver con alcohol, diluir a volumen con alcohol y mezclar. Transferir esta solución y 4 mL de una solución acuosa al 10% de éter polioxietilén (23) laurílico a un matraz volumétrico de 1 L, diluir con 980 mL de *Solución Amortiguadora Alcalina* y mezclar.

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm y con una columna de 4,0 mm × 150 mm rellena con material L17 de 7,5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,3 mL por minuto y la temperatura de la columna se ajusta a 50°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con *Solución A*; durante los siguientes 20 minutos, cambiar linealmente la composición de la *Fase Móvil* a 85% de *Solución A* y 15% de *Solución B*; luego cambiar abruptamente a 40% de *Solución A* y 60% de *Solución B*; durante los siguientes 18 minutos, cambiar linealmente la composición a 100% de *Solución B* y mantenerla durante 7 minutos; luego cambiar abruptamente a 100% de *Solución C* y mantenerla durante 6 minutos; luego cambiar abruptamente a la *Solución A*, mantener esta composición durante los siguientes 8 minutos.

Procedimiento y Reacción Postcolumna—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 1,0 nmol de cada aminoácido en análisis y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*. Cuando el efuente deja la columna, se mezcla con el *Reactivo de Hipoclorito*. La mezcla pasa a través del primer reactor postcolumna que es un tubo de acero inoxidable de 0,5 mm × 2 m. Inmediatamente a continuación del primer reactor postcolumna se coloca un segundo reactor postcolumna de diseño similar que se usa para la reacción postcolumna con OPA. La velocidad de flujo tanto para el *Reactivo de Hipoclorito* como para el *Reactivo OPA* es 0,2 mL por minuto, dando como resultado una velocidad de flujo total (es decir, *Reactivo de Hipoclorito*, *Reactivo OPA* y el efuente de la columna) de 0,7 mL por minuto que sale de los reactores posteriores al paso por la columna. Las reacciones postcolumna se realizan a 55°. Esto produce un tiempo de permanencia de aproximadamente 33 segundos en el reactor postcolumna con OPA. Después de la derivatización postcolumna, el efuente pasa a través del detector fluorométrico.

Método 3—Determinación Precolumna

Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con fenilisotiocianato (PITC) seguida de una separación por HPLC en fase reversa con detección UV.

El PITC reacciona con los aminoácidos para formar derivados de feniltiocarbamilo (PTC) que se pueden detectar con alta sensibilidad a 254 nm. Por lo tanto, se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con PITC seguida por separación por HPLC en fase reversa con detección UV para analizar la composición de aminoácidos.

Después de eliminar el reactivo al vacío, los aminoácidos derivatizados se pueden almacenar secos y congelados durante varias semanas sin degradación significativa. Si la solución para inyección se mantiene fría, no hay pérdida perceptible en la respuesta cromatográfica después de tres días.

La separación de los aminoácidos-PTC por HPLC en fase reversa con una columna ODS se logra a través de una combinación de cambios en las concentraciones de acetonitrilo y en la fuerza iónica de la solución amortiguadora. Los aminoácidos-PTC eluidos de la columna se controlan a 254 nm.

Se considera que el límite de detección es 1 pmol para la mayoría de los derivados aminoacídicos. Se obtiene una respuesta lineal entre 20 y 500 pmol con coeficientes de correlación superiores a 0,999. Para obtener buenos datos de la composición, en este análisis de aminoácidos de proteínas o péptidos es mejor contar con una muestra de más de 500 ng de proteína o péptido antes de la hidrólisis.

Más adelante se describe un método de derivatización precolumna con PITC.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A: acetato de amonio 0,05 M, ajustado con ácido fosfórico a un pH de 6,8.

Solución B—Preparar acetato de amonio 0,1 M, ajustar con ácido fosfórico a un pH de 6,8 y luego preparar una mezcla de esta solución y acetonitrilo (1 : 1).

Solución C: una mezcla de acetonitrilo y agua (70 : 30).

Fase Móvil—Usar mezclas variables de la *Solución A*, *Solución B* y *Solución C* como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Preparación del Reactivo de Derivatización—

Solución Amortiguadora de Acoplamiento: una mezcla de acetonitrilo, piridina, trietilamina y agua (10 : 5 : 2 : 3).

Disolvente de la Muestra: una mezcla de agua y acetonitrilo (7 : 2).

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Disolver la muestra de prueba liofilizada en 100 µL de *Solución Amortiguadora de Acoplamiento* y luego secar en una centrifuga de vacío para eliminar todo el clorhidrato si se realizó un paso de hidrólisis de proteína. Disolver la muestra en 100 µL de *Solución Amortiguadora de Acoplamiento*, agregar 5 µL de PITC e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. La muestra de prueba se seca nuevamente en una centrifuga de vacío y se disuelve en 250 µL de *Disolvente de la Muestra*.

Sistema Cromatográfico—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 250 mm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 52°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con la *Solución A*; durante los siguientes 15 minutos, cambiar linealmente la composición de la *Fase Móvil* a 85% de *Solución A* y 15% de *Solución B*; durante los siguientes 15 minutos, cambiar linealmente la composición a 50% de *Solución A* y 50% de *Solución B*; luego cambiar abruptamente a 100% de *Solución C* y mantenerla durante 10 minutos; luego cambiar abruptamente a 100% de *Solución A* y dejar que la columna se equilibre antes de la siguiente inyección.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 1,0 nmol de cada aminoácido-PITC en análisis (10 µL de la muestra en el *Disolvente de la Muestra*) y proceder según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Método 4—Derivatización Precolumna con AQC

Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) y después se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica.

El AQC reacciona con los aminoácidos para formar derivados de urea estables, fluorescentes y no simétricos (aminoácidos AQC) que se pueden someter fácilmente al análisis por HPLC en fase reversa. Por lo tanto, se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con AQC seguida de la separación por HPLC en fase reversa para analizar la composición de aminoácidos.

La separación de los aminoácidos-AQC en una columna ODS se logra a través de una combinación de cambios en las concentraciones de acetonitrilo y sal. La detección de fluorescencia selectiva de los derivados con una longitud de onda de excitación de 250 nm y una longitud de onda de emisión de 395 nm permite la inyección directa de la mezcla de reacción sin ninguna interferencia significativa del único subproducto fluorescente importante del reactivo, la 6-aminoquinolina. El exceso de reactivo se hidroliza rápidamente ($t_{1/2} < 15$ segundos) para producir 6-aminoquinolina-*N*-hidroxisuccinimida y dióxido de carbono y después de 1 minuto no se puede producir ninguna otra derivatización.

Las áreas de los picos para los aminoácidos-AQC esencialmente no cambian durante al menos 1 semana a temperatura ambiente y los derivados tienen más que suficiente estabilidad para permitir el análisis cromatográfico automatizado durante la noche.

Se considera que el límite de detección está entre aproximadamente 40 fmol y 320 fmol para cada aminoácido, a excepción de la Cys. El límite de detección para la Cys es aproximadamente 800 fmol. Se obtiene una respuesta lineal entre 2,5 μ M y 200 μ M con coeficientes de correlación superiores a 0,999. Se pueden obtener buenos datos de composición a partir del análisis de hidrolizados proteicos derivatizados que contengan tan solo 30 ng de proteína o péptido.

Más adelante se muestra un método de derivatización precolumna con AQC.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A—Preparar una solución de acetato de sodio 140 mM y trietilamina 17 mM y ajustar con ácido fosfórico hasta un pH de 5,02.

Solución B: una mezcla de acetonitrilo y agua (60 : 40).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Disolver aproximadamente 2 μ g de la muestra de prueba en 20 μ L de ácido clorhídrico 15 mM y diluir con una solución amortiguadora de borato 0,2 M (pH 8,8) a 80 μ L. Iniciar la derivatización agregando 20 μ L de AQC 10 mM en acetonitrilo y dejar que prosiga durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 250 nm, una longitud de onda de emisión de 395 nm y con una columna de 3,9 mm \times 150 mm rellena con material L1 de 4 μ m. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 37°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con la *Solución A*; durante los siguientes 0,5 minutos, cambiar linealmente la composición de la *Fase Móvil* a 98% de *Solución A* y 2% de *Solución B*; luego durante los siguientes 14,5 minutos a 93% de *Solución A* y 7% de *Solución B*; durante los siguientes 4 minutos a 87% de *Solución A* y 13% de *Solución B*; durante los siguientes 14 minutos a 68% de *Solución A* y 32% de *Solución B*; luego cambiar abruptamente a 100% de *Solución B* para un lavado de 5 minutos; durante los siguientes 10 minutos, cambiar abruptamente a 100% de *Solución A* y dejar que la columna se equilibre antes de la siguiente inyección.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 0,05 nmol de cada aminoácido-AQC en análisis y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Método 5—Derivatización Precolumna con OPA

Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con OPA y luego se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica. Esta técnica no detecta los aminoácidos que existen como aminas secundarias (por ejemplo, prolina).

El OPA junto con un reactivo tiol reacciona con grupos amino primarios para formar productos isoindólicos altamente fluorescentes. Se puede usar 2-mercaptoetanol y ácido 3-mercaptopropiónico como tiol. El OPA por sí mismo no muestra fluorescencia y por lo tanto no produce picos que interfieren. Además, su solubilidad y estabilidad en soluciones acuosas, junto con la rápida cinética de reacción permiten la derivatización y análisis automatizados usando un muestreador automático para mezclar la muestra con el reactivo. Sin embargo, la falta de reactividad con aminoácidos secundarios ha sido una desventaja importante. Este método no detecta los aminoácidos que son aminas secundarias (por ejemplo, prolina). Para compensar esta desventaja, esta técnica se puede combinar con la técnica descrita en el *Método 7* o en el *Método 8*.

A la derivatización precolumna de aminoácidos con OPA le sigue la separación por HPLC en fase reversa. Debido a la inestabilidad de los derivados aminoácidos-OPA, la separación y el análisis por HPLC se realizan inmediatamente después de la derivatización. El cromatógrafo de líquidos está equipado con un detector fluorométrico para la detección de aminoácidos derivatizados. La intensidad de fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con OPA se controla con una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm.

Se ha informado de límites de detección de sólo 50 fmol a través de fluorescencia, aunque el límite práctico de análisis se mantiene en 1 pmol. A continuación se muestra un método de derivatización precolumna con OPA.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A: una mezcla de acetato de sodio 100 mM (pH 7,2), metanol y tetrahidrofurano (900 : 95 : 5).

Solución B: metanol.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Reactivo de Derivatización—Disolver 50 mg de OPA en 1,25 mL de metanol (apto para secuenciación de proteína). Agregar 50 μ L de 2-mercaptoetanol y 11,2 mL de borato de sodio 0,4 M (pH 9,5) y mezclar. [NOTA—El reactivo es estable durante 1 semana.]

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Transferir aproximadamente 5 μ L de la muestra de prueba a un recipiente adecuado, agregar 5 μ L del *Reactivo de Derivatización* y mezclar. Después de 1 minuto, agregar no menos de 20 μ L de acetato de sodio 0,1 M (pH 7,0). Usar 20 μ L de esta solución para el análisis. [NOTA—Se recomienda usar un estándar interno (por ejemplo, norleucina) para el análisis cuantitativo debido a variaciones potenciales en el volumen del reactivo en la derivatización de la muestra. La derivatización de la muestra se realiza de manera automatizada en línea. Debido a la inestabilidad de los derivados aminoácidos-OPA, la separación y análisis por HPLC se realizan inmediatamente después de la derivatización.]

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 348 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm y con una columna de 4,6 mm \times 75 mm rellena con material L3 de 3 μ m. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,7 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 37°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con 92% de *Solución A* y 8% de *Solución B*; durante los siguientes dos minutos, cambiar la composición de la *Fase Móvil* a 83% de *Solución A* y 17% de *Solución B* y mantener durante 3 minutos más; después durante los siguientes 5 minutos cambiar a 54% de *Solución A* y 46% de *Solución B* y mantener durante 2 minutos más; después durante los siguientes 2 minutos cambiar a 34% de *Solución A* y 66% de *Solución B* y mantener durante 1 minuto; después durante los siguientes 0,3 minutos cambiar a 20% de *Solución A* y 80% de *Solución B* y mantener durante 2,6 minutos más; y finalmente durante 0,6 minutos cambiar a 92% de *Solución A* y 8% de *Solución B* y mantener durante 0,6 minutos más.

Procedimiento—Inyectar aproximadamente 0,02 nmol de cada derivado aminoácido-OPA en análisis en el cromatógrafo y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Método 6—Derivatización Postcolumna con DABS-Cl

Se usa derivatización precolumna de aminoácidos con cloruro de (dimetilamino)azobencenosulfonilo (DABS-Cl) y luego se separan por HPLC en fase reversa con detección en la región de luz visible.

El DABS-Cl es un reactivo cromofórico empleado para marcar aminoácidos. Los aminoácidos marcados con DABS-Cl (aminoácidos-DABS) son muy estables y muestran la máxima absorción a 436 nm.

Los aminoácidos-DABS, los 19 derivados de aminoácidos naturales, se pueden separar en una columna ODS de HPLC en fase reversa empleando sistemas de gradientes constituidos por una mezcla de acetonitrilo y una solución amortiguadora acuosa. Los aminoácidos-DABS separados que eluyen de la columna se detectan a 436 nm en la región visible.

Este método puede analizar los iminoácidos, como por ejemplo la prolina, junto con los aminoácidos, con igual sensibilidad. El método de derivatización con DABS-Cl permite la cuantificación simultánea de residuos de triptófano mediante hidrólisis previa de la proteína o péptido con ácidos sulfónicos, como por ejemplo ácido mercaptoetanosulfónico, ácido *p*-toluensulfónico o ácido metanosulfónico, descritos en el *Método 2* en *Hidrólisis de Proteínas en Análisis de Aminoácidos*. Los otros residuos ácidos inestables, asparagina y glutamina, también se pueden analizar mediante la conversión previa en ácido diaminopropiónico y ácido diaminobutírico, respectivamente, tratando la proteína o péptido con BTI, descrito en el *Método 11* en *Hidrólisis de Proteínas en Análisis de Aminoácidos*.

El aminoácido no proteínogénico, norleucina, no se puede usar como un estándar interno en este método ya que eluye en una región cromatográfica abundante en picos de aminoácidos primarios. La nitrotirosina se puede usar como estándar interno ya que eluye en una región despejada.

El límite de detección de aminoácidos-DABS es aproximadamente 1 pmol. Se pueden analizar cuantitativamente de 2 a 5 pmol de cada aminoácido-DABS con confiabilidad y sólo se necesitan entre 10 ng y 30 ng del hidrolizado proteico tratado con DABS para cada análisis.

Más adelante se muestra un método de derivatización precolumna con DABS-Cl.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A: acetato de sodio 25 mM (pH 6,5) que contenga 4% de dimetilformamida.

Solución B: acetonitrilo.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Preparación del Reactivo de Derivatización—

Solución Amortiguadora de Muestra: bicarbonato de sodio 50 mM ajustado hasta un pH de 8,1.

Reactivo de Derivatización—Disolver 1,3 mg de DABS-Cl en 1 mL de acetonitrilo. [NOTA—Este reactivo se prepara poco antes del paso de derivatización.]

Solución Amortiguadora de Dilución de la Muestra—Preparar una mezcla de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) y alcohol (1 : 1).

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Disolver la muestra de prueba en 20 µL de *Solución Amortiguadora de Muestra*, agregar 40 µL de *Reactivo de Derivatización* y mezclar. Sellar el recipiente de la muestra con un tapón de goma de silicona y calentar a 70° durante 10 minutos. Mientras se calienta la muestra, la mezcla se disuelve completamente. Después de la derivatización, diluir la muestra de prueba con una cantidad adecuada de *Solución Amortiguadora de Dilución de la Muestra*.

Sistema Cromatográfico—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 436 nm y una columna de 4,6 mm × 250 mm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 40°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la

columna con 85% de *Solución A* y 15% de *Solución B*; durante los siguientes 20 minutos, cambiar la composición de la *Fase Móvil* a 60% de *Solución A* y 40% de *Solución B*; durante los siguientes 12 minutos, cambiar la composición a 30% de *Solución A* y 70% de *Solución B* y mantener durante 2 minutos más.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 0,05 nmol de los aminoácidos-DABS y proceder según se indica en *Sistema Cromatográfico*.

Método 7—Derivatización Precolumna con FMOC-Cl

Se usa derivatización precolumna de aminoácidos con cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl) y luego se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica.

El FMOC-Cl reacciona con aminoácidos primarios y secundarios para formar productos altamente fluorescentes. La reacción del FMOC-Cl con aminoácidos se realiza bajo condiciones suaves, en solución acuosa y se completa en 30 segundos. Los derivados son estables y sólo se degrada el derivado de histidina. Si bien el FMOC-Cl es fluorescente por sí mismo, el exceso de reactivo y los subproductos fluorescentes se pueden eliminar sin pérdida de aminoácidos-FMOC.

Los aminoácidos FMOC se separan por HPLC en fase reversa usando una columna ODS. La separación se lleva a cabo mediante elución por gradiente que varía linealmente de una mezcla de solución amortiguadora de ácido acético, metanol y acetonitrilo (50 : 40 : 10) a una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora de ácido acético (50 : 50). En estas condiciones, se separan 20 derivados de aminoácidos en 20 minutos. Cada derivado que eluye de la columna se controla a través de un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 260 nm y una longitud de onda de emisión de 313 nm.

El límite de detección se encuentra en el intervalo inferior de fmol. Para la mayoría de los aminoácidos la respuesta es lineal entre 0,1 µM y 50 µM.

A continuación se muestra un método de derivatización precolumna con FMOC-Cl.

Preparación de Fase Móvil—

Solución Amortiguadora de Ácido Acético—Transferir 3 mL de ácido acético glacial y 1 mL de trietilamina a un matraz volumétrico de 1 L y diluir a volumen con agua de grado HPLC. Ajustar con hidróxido de sodio hasta un pH de 4,20.

Solución A: una mezcla de *Solución Amortiguadora de Ácido Acético*, metanol y acetonitrilo (50 : 40 : 10).

Solución B: una mezcla de acetonitrilo y *Solución Amortiguadora de Ácido Acético* (50 : 50).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en el *Sistema Cromatográfico*.

Preparación del Reactivo de Derivatización—

Solución Amortiguadora de Borato—Preparar una solución de ácido bórico 1 M y ajustar con hidróxido de sodio hasta un pH de 6,2.

Reactivo FMOC-Cl—Disolver 155 mg de cloroformiato de 9-fluorenilmetilo en 40 mL de acetona y mezclar.

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Agregar 0,1 mL de *Solución Amortiguadora de Borato* y 0,5 mL de *Reactivo FMOC-Cl* a 0,4 mL de la muestra de prueba. Después de aproximadamente 40 segundos, extraer la mezcla con 2 mL de pentano y luego extraer una vez más con una nueva porción de pentano. La solución acuosa con los derivados de aminoácidos queda lista para la inyección.

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 260 nm y una longitud de onda de emisión de 313 nm y con una columna de 4,6 mm × 125 mm rellena con material L1 de 3 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente de 1,3 mL por minuto. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con *Solución A* y mantener esta composición durante 3 minutos; durante los siguientes 9 minutos, cambiar a 100% de *Solución B*; durante los siguientes 0,5 minutos, aumentar la

velocidad de flujo a 2 mL por minuto y mantenerla hasta que el último aminoácido-FMOC eluya de la columna. El tiempo total de la corrida es de aproximadamente 20 minutos.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo no menos de 0,01 nmol de cada aminoácido-FMOC en análisis y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*. El derivado histidina-FMOC por lo general dará una respuesta menor que los demás derivados.

Método 8—Derivatización Precolumna con NBD-F

Se usa la derivatización precolumna de aminoácidos con 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) y después se separan por HPLC en fase reversa con detección fluorométrica.

El 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) reacciona con aminoácidos primarios y secundarios para formar productos altamente fluorescentes. Los aminoácidos se derivatizan con NBD-F calentándolos a 60° durante 5 minutos.

Los derivados aminoácidos-NBD se separan en una columna ODS de HPLC en fase reversa empleando un sistema de elución por gradiente constituido por una mezcla de acetonitrilo y una solución amortiguadora acuosa. En estas condiciones se separan 17 derivados de aminoácidos en 35 minutos. Se puede usar el ácido *E*-aminocaproico como estándar interno ya que eluye en una región cromatográfica despejada. Cada derivado que eluye de la columna se controla mediante un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

La sensibilidad de este método es casi igual que la del método de derivatización precolumna con OPA (*Método 5*), excluyendo la prolina, que no reacciona con el OPA. Esto puede ser una ventaja del NBD-F con respecto al OPA.

El límite de detección para cada aminoácido es aproximadamente 10 fmol. El perfil analítico se logra con aproximadamente 1,5 mg de hidrolizado proteico en la mezcla final de reacción de marcación precolumna para HPLC.

A continuación se detalla un método de derivatización precolumna con NBD-F.

Preparación de la Fase Móvil—

Solución A: una solución de citrato de sodio 10 mM y perclorato de sodio 75 mM, ajustada con ácido clorhídrico hasta un pH de 6,2.

Solución B: una mezcla de acetonitrilo y agua (50 : 50).

Preparación del Reactivo de Derivatización—

Solución Amortiguadora de Muestra: una solución de ácido bórico 0,1 M ajustada con hidróxido de sodio a un pH de 9,2.

Reactivo de Derivatización—Disolver 5 mg de NBD-F en 1,0 mL de alcohol y mezclar.

Procedimiento de Derivatización de la Muestra—Disolver la muestra de prueba en 20 µL de *Solución Amortiguadora de Muestra*, agregar 10 µL de *Reactivo de Derivatización* y mezclar. Calentar el recipiente de la muestra a 60° durante 5 minutos. Después de la derivatización, diluir la muestra de prueba con 300 µL de la *Solución A*.

Sistema Cromatográfico—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector fluorométrico ajustado a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm y una columna de 4,6 mm × 150 mm rellena con sílice ODS con un tamaño de partícula de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto y la temperatura de la columna se mantiene a 40°. Programar el sistema del siguiente modo. Equilibrar la columna con 94% de *Solución A* y 6% de *Solución B*; durante los siguientes 16 minutos, cambiar linealmente la composición a 63% de *Solución A* y 37% de *Solución B*; durante los siguientes 5 minutos, cambiar linealmente la composición a 62% de *Solución A* y 38% de *Solución B*; durante los siguientes 9 minutos, cambiar linealmente la composición a 100% de *Solución B* y mantener durante otros 5 minutos; finalmente durante 2 minutos, cambiar linealmente la composición a 94% de *Solución A* y 6% de *Solución B* y luego dejar equilibrar la columna antes de la siguiente inyección.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 15 pmol de cada aminoácido-NBD en análisis y proceder como se indica en *Sistema Cromatográfico*.

CÁLCULO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Cuando se determina el contenido de aminoácidos de un hidrolizado de proteína o péptido, se debe tener en cuenta que el paso de hidrólisis ácida destruye el triptófano y la cisteína. La serina y la treonina se destruyen parcialmente con la hidrólisis ácida, mientras que la isoleucina y la valina podrían escindir-se sólo parcialmente. La metionina puede oxidarse durante la hidrólisis ácida y algunos aminoácidos (por ejemplo, glicina y serina) son contaminantes comunes. La aplicación de un vacío adecuado (menos de 200 µm de mercurio o 26,7 Pa) o la introducción de un gas inerte (argón) en la cámara gaseosa del recipiente de reacción durante la hidrólisis en fase de vapor puede reducir la destrucción oxidativa. Por lo tanto, los resultados cuantitativos obtenidos para cisteína, triptófano, treonina, isoleucina, valina, metionina, glicina y serina de un hidrolizado de proteínas o péptidos pueden variar y pueden requerir posterior investigación y consideración.

Cálculos

Porcentaje Molar de los Aminoácidos—Es el número de residuos de cada aminoácido por cada 100 residuos en una proteína. Este resultado puede ser útil para evaluar los datos de análisis de aminoácidos cuando se desconoce el peso molecular de la proteína o péptido a investigar. Esta información se puede usar para corroborar la identidad de una proteína y tiene otras aplicaciones. Identificar e integrar cuidadosamente los picos obtenidos como se indica para cada *Procedimiento*. Calcular el porcentaje molar de cada aminoácido presente en la muestra de prueba, por la fórmula:

$$100r_U/r$$

en donde r_U es la respuesta correspondiente al pico, en nmol, del aminoácido en análisis y r es la suma de respuestas correspondientes a los picos, en nmol, de todos los aminoácidos presentes en la muestra de prueba. La comparación entre el porcentaje molar de aminoácidos en análisis y los datos de proteínas conocidas puede ayudar a establecer o corroborar la identidad de la proteína de muestra.

Muestras de Proteínas Desconocidas—Esta técnica de análisis de datos se puede usar para estimar la concentración proteica de una muestra de proteína desconocida usando los datos de análisis de aminoácidos. Calcular la masa, en µg, de cada aminoácido recuperado, por la fórmula:

$$mM_W/1000$$

en donde m es la cantidad recuperada, en nmoles, del aminoácido en análisis; y M_W es el peso molecular promedio, en mg, para ese aminoácido, corregido por el peso de la molécula de agua que se eliminó durante la formación de la unión peptídica. La suma de las masas de los aminoácidos recuperados permite estimar la masa total de la proteína analizada después de corregir adecuadamente por los aminoácidos destruidos parcial o completamente. Si se dispone del peso molecular de la proteína desconocida (es decir, por análisis SDS-PAGE o espectrometría de masas), se puede predecir la composición de aminoácidos de la proteína desconocida. Calcular el número de residuos de cada aminoácido por la fórmula:

$$m/(1000M/M_{WT})$$

en donde m es la cantidad recuperada, en nmol, del aminoácido en análisis; M es la masa total, en µg, de la proteína; y M_{WT} es el peso molecular de la proteína desconocida.

Muestras de Proteínas Conocidas—Esta técnica de análisis de datos se puede usar para investigar la composición de aminoácidos y la concentración proteica de una muestra de proteína de peso molecular y composición aminoácídica conocidos usando los datos de análisis de aminoácidos. Cuando se conoce la composición de la proteína que se está analizando, se puede aprovechar el hecho de que algunos aminoácidos se recuperan bien, mientras que la recuperación de otros aminoácidos puede verse comprometida debido a la destrucción total o parcial (por ejemplo, triptófano, cisteína, treonina, serina, metionina), la escisión incompleta de uniones (es decir, para isoleucina y valina) y la contaminación por aminoácidos libres (es decir, por glicina y serina).

Los aminoácidos que se recuperan mejor representan a la proteína y se eligen para cuantificarla. Los aminoácidos que se recuperan bien son, típicamente, aspartato-asparagina, glutamato-glutamina, alanina, leucina, fenilalanina, lisina y arginina. Esta lista se puede modificar según la experiencia con el sistema de análisis utilizado. Dividir la cantidad, en nmol, de cada uno de los aminoácidos bien recuperados por el número esperado de residuos de ese aminoácido con el fin de obtener el contenido proteico basado en cada aminoácido bien recuperado. Promediar los resultados de contenido proteico calculados. El contenido proteico determinado para cada uno de los aminoácidos bien recuperados se debe distribuir uniformemente en torno a la media. Descartar los valores de contenido proteico para esos aminoácidos que se alejan demasiado de la media. Típicamente, una variación mayor de 5% con respecto a la media se considera inaceptable, pero esto es arbitrario. Recalcular la media del contenido proteico de los valores restantes para obtener el contenido proteico de la muestra. Dividir el contenido de cada aminoácido por el contenido proteico medio calculado para determinar la composición de aminoácidos de la muestra.

Calcular el error relativo de composición, en porcentaje, por la fórmula:

$$100m/m_s$$

en donde m es la cantidad determinada experimentalmente, en nmol por residuo aminoacídico, del aminoácido en análisis; y m_s es el valor conocido para los residuos de ese aminoácido. El error relativo composicional promedio es el promedio de los valores absolutos de los errores relativos composicionales de los aminoácidos individuales, excluyendo típicamente el triptófano y la cisteína de este cálculo. El error relativo composicional promedio puede proporcionar información importante acerca de la estabilidad de los análisis en función del tiempo. La coincidencia en la composición aminoacídica entre la muestra de proteína y la composición conocida se puede usar para corroborar la identidad y pureza de la proteína en la muestra. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ {1053} ARTÍCULOS OBTENIDOS POR BIOTECNOLOGÍA—ELECTROFORESIS CAPILAR

Este capítulo proporciona guías y procedimientos utilizados para la caracterización de artículos obtenidos por biotecnología mediante electroforesis capilar. Se lo ha armonizado con los capítulos correspondientes en *la Farmacopea Japonesa (JP)* y *la Farmacopea Europea (EP)*. También se muestran otras pruebas de caracterización armonizadas en *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos* {1052}, *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Isoelectroenfoco* {1054}, *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Mapeo de Péptidos* {1055}, *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poliacrilamida* {1056} y *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Valoración de Proteínas Totales* {1057}.

INTRODUCCIÓN

La electroforesis capilar es un método físico de análisis basado en la migración, dentro de un capilar, de analitos cargados disueltos en una solución de electrolito, bajo la influencia de un campo eléctrico de corriente continua. En esta sección se describen cuatro métodos de electroforesis capilar: *Electroforesis Capilar en Solución Libre*, *Electroforesis Capilar en Gel*, *Isoelectroenfoco Capilar* y *Cromatografía Electrocinética Micelar*.

PRINCIPIO GENERAL

La velocidad de migración del analito en un campo eléctrico de intensidad (E) está determinada por la movilidad electroforética del analito y la movilidad electroosmótica de la solución amortiguadora dentro del capilar. La movilidad electroforética de un soluto (μ_{ep}) depende de las características del soluto (carga eléctrica, tamaño molecular y forma) y de las características de la solución amortiguadora en donde ocurre la migración (tipo y fuerza iónica del electrolito, pH, viscosidad y aditivos). La velocidad electroforética (V_{ep}) de un soluto, suponiendo una forma esférica, es la siguiente:

$$V_{ep} = \mu_{ep} E = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right) \left(\frac{V}{L} \right)$$

en donde q es la carga efectiva de la partícula, η es la viscosidad de la solución amortiguadora, r es el tamaño del ión soluto, V es el voltaje aplicado y L es el largo total del capilar.

Cuando se aplica un campo eléctrico a través del capilar lleno con solución amortiguadora, se genera un flujo de disolvente dentro del capilar que se denomina flujo electroosmótico. Su velocidad depende de la movilidad electroosmótica (μ_{eo}) que a su vez depende de la densidad de la carga en la pared interna del capilar y de las características de la solución amortiguadora. La velocidad electroosmótica (V_{eo}) es la siguiente:

$$V_{eo} = \mu_{eo} E = \left(\frac{\epsilon\zeta}{\eta} \right) \left(\frac{V}{L} \right)$$

en donde ϵ es la constante dieléctrica de la solución amortiguadora, ζ es el potencial zeta de la superficie del capilar y los otros términos son los definidos anteriormente.

Las movilidades electroforética y electroosmótica del analito pueden tener el mismo sentido o sentido opuesto, según la carga (positiva o negativa) del soluto, siendo la velocidad del soluto (v) la siguiente:

$$V = V_{ep} \pm V_{eo}$$

Se usa la suma o la diferencia entre las dos velocidades (V_{ep} y V_{eo}) dependiendo de si las movilidades tienen el mismo sentido o sentido opuesto. En condiciones de una V_{eo} rápida, con respecto a la V_{ep} de los solutos, se pueden separar analitos cargados tanto negativa como positivamente en la misma corrida. El tiempo (t) que tarda el soluto en migrar la distancia (l) del extremo de inyección del capilar al punto de detección (largo efectivo del capilar) es el siguiente:

$$t = \frac{l}{V_{ep} \pm V_{eo}} = \frac{l(L)}{V(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})}$$

en donde los otros términos son los definidos anteriormente.

En general, los capilares de sílice fundida usados en electroforesis tienen cargas negativas en la pared interna, produciendo un flujo electroosmótico hacia el cátodo. El flujo electroosmótico tiene que mantenerse constante de corrida a corrida para obtener una buena reproducibilidad en la velocidad de migración de los solutos. Para algunas aplicaciones, puede ser necesario reducir o suprimir el flujo electroosmótico modificando la pared interna del capilar o cambiando el pH de la solución amortiguadora.

Cuando la muestra se introduce en el capilar, cada ión del analito de la muestra migra dentro del electrolito de fondo como una zona independiente de acuerdo con su movilidad electroforética. El extendido de cada banda de soluto (zona de dispersión) es el resultado de un fenómeno diferente. En condiciones ideales, el ensanchamiento de la zona del soluto se debe solamente a la difusión

molecular del soluto a lo largo del capilar (difusión longitudinal). En este caso, la eficiencia de la zona se expresa como el número de platos teóricos (N), del siguiente modo:

$$N = \frac{(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})(Vl)}{2DL}$$

en donde D es la difusión molecular del soluto en la solución amortiguadora y los otros términos son los definidos anteriormente.

Desde un punto de vista práctico, otros fenómenos, como por ejemplo la disipación de calor, la adsorción de la muestra en la pared del capilar, la conductividad no coincidente entre la muestra y la solución amortiguadora, la longitud de la zona de inyección, el tamaño de celda del detector y los recipientes no nivelados de solución amortiguadora, pueden contribuir significativamente a la dispersión de banda. La separación entre dos bandas (expresada por la resolución, R_s) se puede lograr modificando la movilidad electroforética de los analitos, por la movilidad electroosmótica inducida por el capilar y aumentando la eficiencia para la banda de cada analito del siguiente modo:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})}$$

en donde μ_{epa} y μ_{epb} son las movilidades electroforéticas de los dos compuestos a separar; μ_{ep} es la movilidad electroforética promedio de los dos solutos calculada como:

$$\bar{\mu}_{ep} = 1/2 (\mu_{epb} + \mu_{epa})$$

y los demás términos son los definidos anteriormente.

APARATO

Un aparato de electroforesis capilar se compone de una fuente de alimentación de alto voltaje controlable; dos recipientes para las soluciones amortiguadoras que se mantienen en el mismo nivel y que contienen las soluciones anódica y catódica especificadas; dos electrodos (cátodo y ánodo) sumergidos en los recipientes de las soluciones amortiguadoras y conectados a la fuente de alimentación; un capilar de separación, generalmente de sílice fundida, a veces con una ventana de visualización óptica alineada con el detector, dependiendo del detector, con los extremos del capilar ubicados en los recipientes de las soluciones amortiguadoras y el capilar lleno con una solución que se especifica en la monografía correspondiente; un sistema de inyección adecuado; un detector capaz de controlar la cantidad de sustancia de interés que pasa a través de un segmento del capilar de separación en un tiempo dado, generalmente basado en la espectrofotometría de absorción (UV y visible), fluorometría, o detección conductimétrica, amperométrica o espectrométrica de masas, dependiendo de las aplicaciones específicas, o incluso la detección indirecta para detectar compuestos no fluorescentes y que no absorben luz UV y un sistema termostático capaz de mantener la temperatura dentro del capilar.

El método de inyección de muestras y su automatización son críticos para realizar análisis cuantitativos precisos. Los métodos de inyección incluyen la gravedad, la presión o vacío o la inyección electrocinética. La cantidad de cada componente de muestra introducida electrocinéticamente depende de su movilidad electroforética, introduciendo un posible sesgo en los resultados.

Se espera que el capilar, los recipientes de las soluciones amortiguadoras, el método de precondicionamiento, la solución de muestra y las condiciones de migración estén especificadas en la monografía correspondiente. La solución electrolítica empleada se puede filtrar para eliminar partículas y desgasificar para evitar la formación de burbujas que pueden interferir con el sistema de detección. Para lograr un tiempo de migración reproducible de los solutos, es necesario crear, para cada método analítico, una rutina de enjuague riguroso después de cada inyección.

ELECTROFORESIS CAPILAR EN SOLUCIÓN LIBRE

En la electroforesis capilar en solución libre, los analitos se separan en un capilar que contiene únicamente una solución amortiguadora sin ningún medio anticonvectivo. En esta técnica, la separación ocurre debido a que los distintos componentes de la muestra migran como bandas discretas con velocidades diferentes. La velocidad de cada banda depende de la movilidad electroforética del soluto y del flujo electroosmótico en el capilar. Se pueden usar capilares recubiertos, con flujo electroosmótico reducido, para aumentar la capacidad de separación de las sustancias que se absorben en las superficies de sílice-fundido.

Este método de electroforesis capilar es apropiado para el análisis de moléculas pequeñas ($PM < 2000$) y grandes ($2000 < PM < 100\,000$). Debido a la alta eficiencia lograda, se pueden separar moléculas que presenten diferencias diminutas en su relación carga-masa. Este método también permite la separación de compuestos quirales al agregar selectores quirales a la solución amortiguadora de separación. Para lograr una separación óptima hay que tener en cuenta varios parámetros instrumentales y de la solución electrolítica.

Parámetros Instrumentales

Voltaje—El tiempo de separación es universalmente proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo, un aumento en el voltaje empleado puede producir calor excesivo, aumentando los gradientes de temperatura y viscosidad en la solución amortiguadora dentro del capilar, lo cual ensancha la banda y disminuye la resolución.

Temperatura—El principal efecto de la temperatura se observa en la viscosidad y conductividad eléctrica del amortiguador del pH, por lo tanto afecta la velocidad de migración. En algunos casos, un aumento en la temperatura del capilar puede alterar la conformación de algunas proteínas, modificando su tiempo de migración y eficiencia de separación.

Capilar—El largo y diámetro interno del capilar afectan el tiempo de análisis, la eficiencia de las separaciones y la capacidad. El aumento del largo efectivo y del largo total permiten disminuir los campos eléctricos, a un voltaje constante, lo cual aumenta el tiempo de migración. Para una solución amortiguadora y un campo eléctrico dados, la disipación de calor (por lo tanto, el ensanchamiento de banda de la muestra) depende del diámetro interno del capilar. Este último también afecta el límite de detección, dependiendo del volumen de muestra inyectado en el capilar y del sistema de detección usado.

La adsorción de los componentes de la muestra en la pared del capilar limita la eficiencia; por lo tanto, hay que considerar métodos para evitar estas interacciones cuando se desarrolla un método de separación. Esto es crítico en muestras que contienen proteínas. Se han diseñado estrategias para evitar la adsorción de proteínas en la pared del capilar. Estas estrategias incluyen el uso de un pH extremo y la absorción de amortiguadores de pH con carga positiva que sólo necesitan la modificación de la composición del amortiguador del pH. Otras estrategias incluyen el recubrimiento de la pared interna del capilar con un polímero unido covalentemente a la sílice lo cual evita la interacción entre las proteínas y la superficie de la sílice negativamente cargada. Capilares con recubrimiento de polímeros hidrófilos neutros, catiónicos y aniónicos están disponibles comercialmente.

Parámetros de la Solución Electrolítica

Tipo de Solución Amortiguadora y Concentraciones—Las soluciones amortiguadoras apropiadas para la electroforesis capilar tienen una capacidad amortiguadora adecuada en el intervalo de pH de elección y baja movilidad para minimizar la generación de corriente.

Para minimizar la distorsión del pico, es importante hacer coincidir la movilidad de los iones en la solución amortiguadora con la movilidad del soluto siempre que sea posible. Es importante el tipo de disolvente de la muestra empleado para lograr el enfoque de la muestra en la columna, lo que aumenta la eficiencia de separación

y mejora la detección. Además, el aumento en la concentración de las soluciones amortiguadoras hasta un pH dado disminuye el flujo electroosmótico y la velocidad del soluto.

pH de la Solución Amortiguadora—El pH de la solución amortiguadora puede afectar la separación al modificar la carga del analito o de otros aditivos y al cambiar el flujo electroosmótico. Para la separación de proteínas y péptidos, un cambio en el pH de la solución amortiguadora desde un valor superior al punto isoelectrónico a un valor inferior al punto isoelectrónico cambia la carga neta del soluto de negativa a positiva. Un aumento en el pH de la solución amortiguadora generalmente aumenta el flujo electroosmótico.

Disolventes Orgánicos—Los modificadores orgánicos, como por ejemplo el metanol, el acetonitrilo y otros, se agregan a la solución amortiguadora acuosa para aumentar la solubilidad del soluto o de otros aditivos o para afectar la ionización de los componentes de la muestra. Estos modificadores orgánicos agregados a la solución amortiguadora suelen disminuir el flujo electroosmótico.

Aditivos para Separaciones Quirales—Para separar isómeros ópticos, se agrega un selector quiral a la solución amortiguadora de separación. Los selectores quirales más comúnmente usados son las ciclodextrinas, aunque en algunos casos se pueden usar éteres corona, algunos polisacáridos o incluso proteínas. Como el reconocimiento quiral depende de las distintas interacciones entre el selector quiral y cada uno de los enantiómeros, la resolución lograda para los compuestos quirales depende en gran medida del tipo de selector quiral usado. Mientras se desarrolla una separación dada, puede ser útil analizar las ciclodextrinas que tengan distintos tamaños de cavidad (α , β o γ -ciclodextrina) o ciclodextrinas modificadas con grupos neutros (metilo, etilo, hidroxialquilo, etc.) o ionizables (aminometilo, carboximetilo, sulfobutíler, etc.). La resolución de compuestos quirales también está controlada por la concentración del selector quiral, la composición y el pH de la solución amortiguadora y la temperatura de separación. Los aditivos orgánicos, como por ejemplo el metanol o la urea, también pueden afectar la resolución de la separación.

ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL

La separación ocurre dentro de un capilar lleno con un polímero que actúa como tamiz molecular. Los componentes más pequeños en la muestra se mueven más rápidamente por el capilar que los componentes más grandes. Se puede usar este método para la separación de biopolímeros-proteínas y fragmentos de ADN, según sus masas moleculares.

Características de Geles Químicos y Físicos

Geles Químicos—Los geles químicos se preparan dentro del capilar por reacción de monómeros. Un ejemplo de dicho gel es una poliacrilamida entrecruzada. Este tipo de gel está unido a la pared de sílice fundida y no se puede eliminar sin destruir el capilar. Para el análisis de proteínas, la solución amortiguadora de separación contiene dodecilsulfato de sodio, y la muestra se desnaturaliza por calor en una mezcla de dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol o ditiotretol antes de la inyección. La optimización de la separación en un gel entrecruzado se obtiene modificando la solución amortiguadora de separación (ver *Electroforesis Capilar en Solución Libre*) y controlando la porosidad del gel cuando se prepara. Para un gel de poliacrilamida entrecruzada, la porosidad se puede modificar cambiando la concentración de acrilamida o la relación del agente de entrecruzamiento. Como regla, al disminuir la porosidad del gel se reduce la movilidad de los solutos. Debido a la rigidez de este tipo de gel, sólo se puede usar la inyección electrocinética.

Geles Físicos—Los geles físicos son polímeros hidrófilos (es decir, poliacrilamida lineal, derivados de celulosa, dextrano, etc.) que se pueden disolver en soluciones amortiguadoras acuosas de separación, dando lugar a un medio de separación que también actúa como tamiz molecular. Estos medios de separación poliméricos son más fáciles de preparar que los polímeros entrecruzados. Se pueden preparar en un vial y llenar por presión un capilar de pared recubierta sin flujo electroosmótico. Si se reemplaza el gel antes de cada inyección generalmente mejora la reproducibilidad de la separación. La porosidad de los geles físicos se puede aumentar usando

polímeros de un peso molecular mayor (a una concentración de polímero dada) o disminuyendo la concentración de polímero (para un peso molecular de polímero dado). Al disminuir la porosidad del gel se reduce la movilidad del soluto para la misma solución amortiguadora. Se pueden usar técnicas de inyección hidrodinámica y de electromigración ya que la disolución de estos polímeros en la solución amortiguadora produce soluciones poco viscosas.

ISOELECTROENFOQUE CAPILAR

Las moléculas migran bajo la influencia del campo eléctrico, siempre y cuando estén cargadas, en un gradiente de pH generado por anfólitos que tienen una amplia gama de valores de pI (ácidos poli-aminocarboxílicos) disueltos en la solución amortiguadora de separación. Los tres pasos básicos en el isoelectroenfoco capilar son la carga de la muestra, el enfoque y la movilización.

Carga—

Carga en un Solo Paso—La muestra se mezcla con anfólitos y se introduce en el capilar por presión o vacío.

Carga Secuencial—Se introducen en el capilar una solución amortiguadora inicial, luego los anfólitos, luego la muestra mezclada con anfólitos, otra vez los anfólitos solos y finalmente la solución amortiguadora final. El volumen de la muestra debe ser suficientemente pequeño como para no modificar el gradiente de pH.

Enfoque—Cuando se aplica voltaje, los anfólitos migran hacia el cátodo o el ánodo según su carga neta, creando un gradiente de pH desde el ánodo (menor pH) al cátodo (mayor pH). Los componentes a separar migran hasta que alcanzan el pH correspondiente a su punto isoelectrónico y la corriente cae a valores muy bajos.

Movilización—Las bandas de los componentes separados migran más allá del detector mediante uno de los siguientes tres métodos.

Método 1—Durante el *Enfoque*, bajo la influencia del flujo electroosmótico cuando este flujo es suficientemente pequeño para permitir el enfoque de los componentes.

Método 2—Por aplicación de presión positiva después del *Enfoque*.

Método 3—Después del *Enfoque*, agregando sales en el recipiente del cátodo o del ánodo, dependiendo del sentido elegido para la movilización, a fin de alterar el pH en el capilar cuando se aplica voltaje. Al cambiar el pH, las proteínas y anfólitos se movilizan hacia el recipiente que contiene las sales agregadas y pasan por el detector.

La separación lograda se expresa como ΔpI y depende del gradiente de pH (dpH), el número de anfólitos que tienen valores de pI diferentes, el coeficiente de difusión (D), la intensidad del campo eléctrico (E) y la variación de la movilidad electroforética del analito en función del pH y es la siguiente:

$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

en donde dpH/dx es el gradiente de pH; y $-d\mu/dpH$ es la variación de la movilidad de la solución en función del pH en la región cercana a pI .

Parámetros de Optimización—Los principales parámetros que se deben considerar en el desarrollo de las separaciones son el voltaje, el capilar y los solutos.

Voltaje: Emplear campos altos desde 300 V/cm a 1000 V/cm durante el *Enfoque*.

Capilar—Según la estrategia de *Movilización* seleccionada (ver más arriba), el flujo electroosmótico se debe reducir o eliminar. Los capilares recubiertos tienden a reducir el flujo electroosmótico.

Soluciones—El recipiente con el amortiguador del pH correspondiente al ánodo se llena con una solución de pH más bajo que el pI del anfólito más ácido y el recipiente del cátodo se llena con una solución que tiene un pH más alto que el pI del anfólito más básico. Frecuentemente se usa ácido fosfórico para el ánodo e hidróxido de sodio para el cátodo.

La adición de un polímero, como la metilcelulosa, a la solución del anfolito tiende a suprimir las fuerzas convectivas (si las hubiese) y el flujo electroosmótico por aumento de la viscosidad. Hay disponibles comercialmente anfolitos en muchos intervalos de pH que se pueden mezclar para obtener un intervalo de pH ampliado. Los intervalos de pH más amplios se usan para estimar el punto isoelectrico mientras que los más estrechos se emplean para mejorar la exactitud. La calibración se puede llevar a cabo relacionando el tiempo de migración con el punto isoelectrico de una serie de marcadores estándar de proteínas. Durante el *Enfoque*, se puede evitar la precipitación de proteínas en su punto isoelectrico, si fuera necesario, usando aditivos de amortiguadores de pH como por ejemplo glicerol, agentes tensoactivos, urea o amortiguadores de pH zwitteriónicos. Sin embargo, según las concentraciones, la urea puede desnaturar las proteínas.

CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA MICELAR (CECM)

La separación se efectúa en una solución electrolítica que contiene un agente tensoactivo, generalmente iónico, en una concentración por encima de la concentración micelar crítica. Las moléculas de soluto se distribuyen entre la solución amortiguadora acuosa y la fase pseudo-estacionaria compuesta por las micelas según el coeficiente de partición del soluto. La técnica se puede considerar un híbrido de electroforesis y cromatografía. Es una técnica electroforética que se puede usar para la separación de solutos neutros o cargados manteniendo la eficiencia, la velocidad y la aptitud del instrumento de electroforesis capilar. Uno de los agentes tensoactivos más ampliamente usados es el dodecilsulfato de sodio, aunque también se han usado otros agentes tensoactivos aniónicos y catiónicos, como por ejemplo sales de cetiltrimetilamonio.

A pH neutro y alcalino, se genera un flujo electroosmótico fuerte que mueve los iones de la solución amortiguadora de separación hacia el cátodo. Si se usa dodecilsulfato de sodio como agente tensoactivo, la migración electroforética de la micela aniónica se produce en el sentido opuesto, hacia el ánodo. Como resultado, la velocidad general de migración de las micelas disminuye en comparación con el flujo en masa de la solución electrolítica. En el caso de solutos neutros, como el analito se puede repartir entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y no tiene movilidad electroforética, la velocidad de migración del analito dependerá únicamente del coeficiente de partición entre la micela y la solución amortiguadora acuosa. En el electroforetograma, el pico correspondiente a cada soluto sin carga siempre se encuentra entre el del marcador del flujo electroosmótico y el de la micela; y el tiempo transcurrido entre estos dos picos se denomina ventana de separación. Para los solutos con carga eléctrica, la velocidad de migración depende del coeficiente de partición del soluto entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y de la movilidad electroforética del soluto en ausencia de micelas.

El mecanismo de separación es esencialmente cromatográfico y la migración del soluto y la resolución se pueden expresar en función del factor de capacidad del soluto (K'), que es la relación entre el número total de moles de soluto en la micela y los moles en la fase móvil. Para un compuesto neutro, K' es del siguiente modo:

$$K' = \frac{t_r - t_0}{t_0(1 - t_r/t_m)} = K \left(\frac{V_s}{V_m} \right)$$

en donde t_r es el tiempo de migración del soluto; t_0 es el tiempo de análisis del soluto no retenido obtenido al inyectar un marcador de flujo electroosmótico que no entra a la micela (por ejemplo, metanol); t_m es el tiempo de migración de la micela medido al inyectar un marcador de micela, como por ejemplo Sudán III, que migra continuamente asociado con la micela; K es el coeficiente de partición del soluto; V_s es el volumen de la fase de las micelas; y V_m es el volumen de la fase móvil.

La resolución entre dos compuestos que migran cerca (R_s) es la siguiente:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_b}{k_b + 1} \times \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_m} \right)}{1 + k_a \times \left(\frac{t_0}{t_m} \right)}$$

en donde N es el número de platos teóricos para uno de los compuestos; α es la selectividad obtenida; k_a y k_b son los factores de retención para ambos componentes, respectivamente ($k_b > k_a$); y los otros términos son los definidos anteriormente.

Ecuaciones similares, aunque no idénticas, dan valores de k y R_s para compuestos con carga eléctrica.

Parámetros de Optimización

Los principales parámetros a considerar en el desarrollo de separaciones por CECM son los parámetros instrumentales y de la solución electrolítica.

Parámetros Instrumentales—

Voltaje—El tiempo de separación es inversamente proporcional al voltaje aplicado. Un aumento en el voltaje podría generar calor excesivo, aumentando los gradientes de temperatura y de viscosidad de la solución amortiguadora en la sección transversal del capilar. Este efecto puede ser significativo con amortiguadores del pH de alta conductividad, como por ejemplo aquellos que contienen micelas. La disipación insuficiente del calor ensancha la banda y disminuye la resolución.

Temperatura—Las variaciones en la temperatura del capilar afectan el coeficiente de partición del soluto entre la solución amortiguadora y la micela, la concentración crítica de micelas y la viscosidad de la solución amortiguadora. Estos parámetros contribuyen al tiempo de migración de los solutos.

Capilar—El largo y el diámetro interno contribuyen al tiempo de análisis y a la eficiencia de las separaciones. El aumento del largo efectivo y del largo total puede disminuir los campos eléctricos, trabajando a un voltaje constante, aumenta el tiempo de migración y mejora la eficiencia de la separación. El diámetro interno controla la disipación de calor, con un amortiguador del pH dado y a un campo eléctrico dado y ensancha la banda de la muestra.

Parámetros de la Solución Electrolítica—

Tipo de Agente Tensoactivo y Concentración—El tipo de agente tensoactivo, al igual que la fase estacionaria en cromatografía, afecta la resolución ya que modifica la selectividad de la separación. El logaritmo de K' de un compuesto neutro aumenta linealmente con la concentración de detergente en la fase móvil. Cuando K' se acerca al valor de

$$\sqrt{t_m/t_a}$$

la resolución de la CECM alcanza su máximo. La modificación de la concentración del agente tensoactivo en la fase móvil cambia la resolución.

pH de la Solución Amortiguadora—El pH no modifica el coeficiente de partición de solutos no ionizados, pero puede modificar el flujo electroosmótico en capilares sin recubrimiento. Una disminución en el pH de la solución amortiguadora disminuye el flujo electroosmótico y por lo tanto aumenta la resolución de los solutos neutros, aumentando el tiempo de análisis.

Disolventes Orgánicos—Se pueden agregar modificadores orgánicos (metanol, propanol, acetonitrilo, etc.) a la solución electrolítica de separación para mejorar la separación de compuestos hidrófobos. La adición de estos modificadores generalmente disminuye el tiempo de migración y la selectividad de la separación. La adición de modificadores orgánicos afecta la formación de micelas, por lo tanto sólo se puede usar una concentración dada de un agente tensoactivo con un cierto porcentaje de un modificador

orgánico antes de eliminar o alterar el equilibrio de micelación, con lo cual desaparecen las micelas y desaparece el mecanismo de partición de la CECM. La eliminación de micelas en presencia de un alto contenido de disolvente orgánico no siempre significa que la separación ya no será posible, dado que en ciertos casos, la interacción hidrofóbica entre el monómero tensoactivo iónico y los solutos neutros forman complejos solvofóbicos que se pueden separar electroforéticamente.

Aditivos para Separaciones Quirales—Se incluye un selector quiral en el sistema micelar ya unido al agente tensoactivo por enlace covalente o agregado al electrolito de separación micelar. Las micelas que tienen un grupo con propiedades de discriminación quiral incluyen sales, ácidos *N*-dodecanoil-L-aminoácidos, sales biliares, etc. La resolución quiral también se puede lograr usando discriminadores quirales, como por ejemplo ciclodextrinas, agregados a las soluciones electrolíticas que contienen agentes tensoactivos acirales micelizados.

Otros Aditivos—La selectividad se puede modificar agregando productos químicos al amortiguador del pH. También se emplea la adición de varios tipos de ciclodextrinas al amortiguador del pH para reducir la interacción de solutos hidrofóbicos con la micela, aumentando la selectividad para este tipo de compuesto. La adición de sustancias modificadoras de las interacciones soluto-micela por adsorción en las micelas se ha usado para mejorar la selectividad de las separaciones en CECM. Estos aditivos pueden ser un segundo agente tensoactivo (iónico o no iónico) que da lugar a la formación de micelas mixtas, o cationes metálicos que se disuelven en la micela y forman complejos de coordinación con los solutos.

Análisis Cuantitativo

Las áreas de los picos se dividen por el tiempo de migración correspondiente para obtener el área corregida a fin de compensar el cambio en el tiempo de migración de corrida a corrida, reduciendo la variación de la respuesta. Dividiendo las áreas de los picos entre el tiempo de migración también compensa las distintas respuestas de los constituyentes de la muestra que tienen diferentes tiempos de migración. Cuando se usa un estándar interno, hay que verificar que no enmascare ninguno de los picos de la sustancia a examinar.

Cálculos—A partir de los valores obtenidos, calcular el contenido del componente o componentes que se están determinando. Cuando se indique, se calcula el porcentaje de uno o más componentes de la muestra a examinar determinando las áreas del pico o picos como porcentaje de las áreas totales corregidas de todos los picos, excluyendo aquellos debidos a disolventes o reactivos agregados. Se recomienda usar un sistema de integración automático (sistema integrador o de adquisición y procesamiento de datos).

APTITUD DEL SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR

La elección de los parámetros de aptitud a usar depende del tipo de electroforesis capilar. Estos parámetros son el factor de capacidad (K') usado únicamente para la *Electroforesis Electrocinética Micelar*, el número de platos teóricos (n), el factor de simetría (A_s) y la resolución (R_s). Es de destacar que las expresiones teóricas para n y R_s se han descrito en las secciones anteriores, pero las ecuaciones más prácticas que permiten la determinación de estos parámetros de aptitud usando electroforetogramas se describen a continuación.

El número de platos teóricos (n) se puede calcular a partir de la fórmula:

$$n = 5,54 (t/b_{0,5})^2$$

en donde t es la distancia, en mm, a lo largo de la línea base entre el punto de inyección y la perpendicular trazada desde el máximo del pico en cuestión; y $b_{0,5}$ es el ancho del pico, en mm, a la mitad de su altura.

La resolución (R_s) se puede calcular a partir de la fórmula:

$$R_s = 1,18(t_b - t_a/b_{0,5b} + b_{0,5a})$$

en donde t_b y t_a son las distancias, en mm, a lo largo de la línea base, entre el punto de inyección y la perpendicular trazada desde el

máximo de los dos picos adyacentes ($t_b > t_a$); y $b_{0,5b}$ y $b_{0,5a}$ son los anchos de los picos, en mm, a la mitad de su altura.

La resolución (R_s) también se puede calcular midiendo la altura del valle (c) entre dos picos parcialmente resueltos en una preparación estándar, la altura del pico más pequeño (d) y especificando que $(c/d) \leq x$, en donde x es el límite indicado en la monografía correspondiente.

El factor de simetría de un pico (A_s) se puede calcular usando la fórmula:

$$A_s = b_{0,05}/2A$$

en donde $b_{0,05}$ es el ancho del pico a una vigésima parte de la altura del pico; y A es la distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el borde frontal del pico a una vigésima parte de la altura del pico.

Otros parámetros de aptitud del sistema incluyen pruebas para la repetibilidad del área (es decir, la desviación estándar de las áreas o del área/tiempo de migración) y pruebas para la repetibilidad del tiempo de migración (es decir, la desviación estándar del tiempo de migración). Para la repetibilidad del tiempo de migración, es necesario usar una prueba para medir la aptitud de los procedimientos de lavado del capilar. Para evitar tiempos de migración no repetibles, una práctica alternativa es usar un tiempo de migración relativo al estándar interno.

Una prueba para verificar la relación señal-ruido de una preparación estándar o para determinar el límite de cuantificación es un parámetro útil para medir la aptitud del sistema. El límite de detección y el límite de cuantificación corresponden a una relación señal-ruido mayor que 3 y 10, respectivamente. La relación señal-ruido (S/N) se calcula del siguiente modo:

$$S/N = 2H/h_n$$

en donde H es la altura del pico correspondiente en el electroforetograma obtenido con la solución de referencia especificada; y h_n es el valor absoluto de la máxima fluctuación de ruido desde la línea base en un electroforetograma obtenido después de inyectar un blanco y observado sobre una distancia igual a veinte veces el ancho a la mitad de la altura del pico en el electroforetograma obtenido con la solución de referencia y situado equitativamente alrededor del lugar donde se encontraría este pico. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ {1054} ARTÍCULOS OBTENIDOS POR BIOTECNOLOGÍA—ISOELECTROENFOQUE

Este capítulo proporciona guías y procedimientos utilizados para la caracterización de artículos obtenidos por biotecnología mediante isoelectroenfoque. Se lo ha armonizado con los capítulos correspondientes en la *Farmacopea Japonesa (JP)* y la *Farmacopea Europea (EP)*. También se muestran otras pruebas de caracterización armonizadas en *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos* (1052), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis Capilar* (1053), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Mapeo de Péptidos* (1055), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poliacrilamida* (1056) y *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Valoración de Proteínas Totales* (1057).

INTRODUCCIÓN

El isoelectroenfoque (IEF, por su sigla en inglés) es un método de electroforesis que separa proteínas según sus puntos isoelectrónicos. La separación se lleva a cabo en una capa gruesa de gel de poliacrilamida o agarosa que contiene una mezcla de electrólitos

anfotéricos (anfolitos). Cuando se aplica un campo eléctrico, los anfolitos migran en el gel, creando un gradiente de pH. En algunos casos, se usan geles que contienen un gradiente de pH inmovilizado, preparado por incorporación de ácidos y bases débiles en regiones específicas de la red de gel durante su preparación. Cuando las proteínas aplicadas alcanzan la zona del gel que tiene un pH igual a su punto isoelectrónico, su carga se neutraliza y la migración cesa. Los gradientes se pueden formar en diversos intervalos de pH, según la mezcla de anfolitos elegida.

PRINCIPIOS GENERALES

Cuando una proteína está en la posición de su punto isoelectrónico, no tiene carga neta y el campo eléctrico no la puede mover en una matriz de gel. Sin embargo, se puede mover de dicha posición por difusión. El gradiente de pH obliga a la proteína a mantenerse en la posición de su punto isoelectrónico, concentrándola, este efecto de concentración se denomina "enfoco". Al aumentar el voltaje aplicado o reducir la carga de la muestra, hay una mejor resolución de las bandas. El voltaje aplicado está limitado por el calor generado, que necesita ser disipado. El uso de geles delgados y una placa de enfriamiento eficiente que esté controlada por un circulador termostático evita que el gel se queme y permite un enfoque nítido. La separación se estima mediante la diferencia de pI mínima que es necesaria para separar dos bandas vecinas, del siguiente modo:

$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

en donde D es el coeficiente de difusión de la proteína; dpH/dx es el gradiente de pH; E es la intensidad del campo eléctrico, en voltios por centímetro y $-d\mu/dpH$ es la variación de la movilidad del soluto en función del pH en la región cercana al pI . Como no se pueden alterar D y $-d\mu/dpH$ para una proteína dada, la separación se puede mejorar usando un intervalo de pH más estrecho y aumentando la intensidad del campo eléctrico.

Desde un punto de vista operativo, se debe prestar especial atención a las características de la muestra o a su preparación. La sal en una muestra puede ser un problema, y en lo posible es mejor preparar la muestra en agua desionizada o anfolitos al 2% usando diálisis o filtración con gel si fuera necesario. Se han usado potenciales de 2500 voltios y se consideran óptimos en ciertas condiciones. Se pueden aplicar hasta 30 vatios de potencia constante y generalmente se produce una separación completa en 1,5 a 3,0 horas. El tiempo necesario para completar el enfoque en capas delgadas de gel de poliacrilamida se determina colocando una proteína coloreada (p. ejemplo: hemoglobina) en distintas posiciones en la superficie del gel y aplicando el campo eléctrico: el estado estacionario se alcanza cuando todas las aplicaciones dan un patrón de banda idéntico. En algunos procedimientos, se determina que el enfoque está completo según el tiempo transcurrido después de la aplicación de la muestra.

La resolución entre las bandas de proteínas en un gel de IEF preparado con anfolitos transportadores puede ser muy buena. Se puede lograr una mejor resolución usando gradientes de pH inmovilizados donde las sustancias amortiguadoras, que son análogas a los anfolitos transportadores, se copolimerizan dentro de la matriz de gel. Las proteínas que muestran valores pI que difieren tan sólo en 0,02 unidades de pH se pueden resolver usando un gel preparado con anfolitos transportadores, mientras que los gradientes de pH inmovilizados pueden resolver proteínas que difieran en aproximadamente 0,001 unidades de pH.

El gel de IEF se puede usar como prueba de identidad cuando la migración en el gel se compara con una preparación estándar y proteínas de calibración de IEF; el gel de IEF se puede usar como prueba de límite cuando la densidad de una banda en IEF se compara subjetivamente con la densidad de las bandas que aparecen en una preparación estándar, o se puede usar como prueba semi-cuantitativa cuando la densidad se mide usando un densitómetro o instrumental similar para determinar la concentración relativa de proteína en las bandas.

APARATO

Un aparato para isoelectroenfoco consiste en un generador de corriente continua controlable, de salida estabilizada; una cámara plástica rígida de isoelectroenfoco que contienen una placa enfriada de un material adecuado para sostener el gel; y una cubierta plástica con electrodos de platino que se conectan al gel por medio de papel absorbente de largo, ancho y grosor adecuados, impregnado con soluciones de electrolitos anódicos y catódicos.

PROCEDIMIENTO

A menos que se indique lo contrario en una monografía dada, se usará el procedimiento siguiente en geles de poliacrilamida en capa gruesa.

Preparación de los Geles

Montaje—Está compuesto de una placa de vidrio (A) sobre la cual se coloca la película de poliéster (B) para facilitar la manipulación del gel, uno o más espaciadores (C), una segunda placa de vidrio (D) y pinzas para mantener unida la estructura (ver Figura 1).

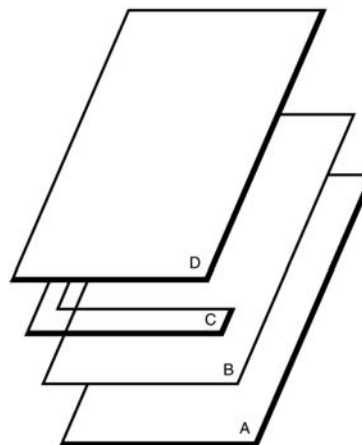


Fig. 1 Molde

Gel de Poliacrilamida al 7,5%—Disolver 29,1 g de acrilamida y 0,9 g de metilenbisacrilamida en 100 mL de agua. Agregar la mezcla de anfolitos especificada en la monografía individual a 2,5 volúmenes de esta solución y diluir hasta 10 volúmenes con agua. Mezclar cuidadosamente y desgasificar la solución.

Preparación del Montaje—Colocar la película de poliéster sobre la placa de vidrio inferior, aplicar el espaciador, colocar la segunda placa de vidrio y las pinzas. Antes de usar, colocar la mezcla en un agitador magnético y agregar 0,25 volúmenes de una solución de persulfato de amonio al 10% y 0,25 volúmenes de tetrametilendiamina. Llenar inmediatamente con el gel el espacio entre las placas de vidrio del montaje.

Solución Fijadora para Gel de Poliacrilamida de Isoelectroenfoco—Mezclar 35 g de ácido sulfosalicílico y 100 g de ácido tricloroacético en 1000 mL de agua.

Solución de Tinción Coomassie y Solución de Decoloración—Usar las mismas soluciones indicadas en el capítulo de información general *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poliacrilamida* (1056).

Procedimiento—Desarmar el montaje y usando la película de poliéster, transferir el gel al soporte enfriado humedecido con unos pocos mL de un líquido adecuado, procurando evitar que se formen

burbujas de aire. Preparar las soluciones de prueba y las soluciones de referencia según se especifica en la monografía individual. Colocar sobre el gel las tiras de papel para la aplicación de muestras, de aproximadamente 10 mm × 5 mm, e impregnar cada una con las cantidades prescritas de las soluciones de prueba y de referencia. Si la concentración proteica de la solución es demasiado baja, se pueden superponer varias tiras (hasta cuatro). Aplicar también la cantidad descrita de una solución de proteínas con puntos isoelectricos conocidos como marcadores de pH para calibrar el gel. En algunos procedimientos, el gel tiene ranuras moldeadas previamente donde se aplica la solución de la muestra, en lugar de usar tiras de papel impregnadas. Cortar dos tiras de papel de la longitud del gel e impregnarlas con las soluciones de los electrolitos: ácida para el ánodo y alcalina para el cátodo. Las composiciones de las soluciones del ánodo y el cátodo se proporcionan en cada monografía. Aplicar estos papeles absorbentes a cada lado del gel a varios mm del borde. Colocar la cubierta de modo que los electrodos estén en contacto con los papeles absorbentes (con respecto a los polos anódico y catódico). Proceder con el isoelectroenfoque aplicando los parámetros descritos en la monografía individual. Cortar la corriente cuando la migración de la mezcla de las proteínas estándar se haya estabilizado. Usando pinzas, retirar las tiras de aplicación de la muestra y los dos papeles absorbentes de los electrodos. Sumergir el gel en la *Solución Fijadora para Gel de Poliacrilamida de Isoelectroenfoque*. Incubar con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 minutos. Escurrir la solución y agregar 200 mL de la *Solución de Decoloración*. Incubar con agitación durante 1 hora. Escurrir el gel y agregar la *Solución de Tinción Coomassie*. Incubar durante 30 minutos. Decolorar el gel por difusión pasiva con la *Solución de Decoloración* hasta que las bandas se vean bien contra un fondo transparente. Ubicar la posición e intensidad de las bandas en el electroferograma, como se prescribe en cada monografía.

Procedimiento Alternativo—Cuando una monografía hace referencia al método general para el isoelectroenfoque antes descrito, se pueden usar variaciones en la metodología o el procedimiento, sujetas a validación. Estas variaciones incluyen el uso de geles previamente moldeados disponibles comercialmente; el uso de gradientes de pH inmovilizados; el uso de varillas de gel; y el uso de geles en placas de distintas dimensiones, incluyendo geles ultra delgados (0,2 mm); las variaciones en el procedimiento de aplicación de la muestra, incluyendo distintos volúmenes de muestra o el uso de máscaras de aplicación de la muestra o mechas absorbentes que no sean de papel; el uso de distintas condiciones de corrida, incluyendo variaciones en el campo eléctrico dependiendo de las dimensiones del gel y el equipo y el uso de tiempos de migración fijos en lugar de la interpretación subjetiva de la estabilidad de la banda; la inclusión de una etapa de pre-enfoque; el uso de instrumentación automatizada; y el uso de geles de agarosa.

Validación del Procedimiento

Cuando se emplean métodos alternativos al método general, es necesario validarlos. Se pueden usar los siguientes criterios para validar la separación: la formación de un gradiente de pH estable de las características deseadas, evaluado usando marcadores de pH coloreados con puntos isoelectricos conocidos; la comparación con el electroferograma suministrado con la sustancia química de referencia para la preparación a examinar; y cualquier otro criterio de validación prescrito en la monografía individual.

VARIACIONES ESPECIFICADAS DEL MÉTODO GENERAL

Las variaciones del método general necesarias para el análisis de sustancias específicas pueden estar especificadas en detalle en cada monografía. Las variaciones pueden incluir el agregado de urea en el gel de corrida (una concentración 3 M a menudo es satisfactoria para mantener la proteína en solución pero se puede usar hasta 8 M). Algunas proteínas precipitan en su punto isoelectrico. En este caso, se incluye la urea en la formulación del gel para mantener la proteína en solución. Si se usa urea, pueden usarse solamente soluciones recién preparadas para evitar la carbamilación de la proteína. Otras

variaciones incluyen el uso de otros métodos de tinción y el uso de aditivos de geles tales como detergentes no iónicos (por ejemplo: octilglucósido) o detergentes zwitteriónicos (por ejemplo: CHAPS o CHAPSO) para evitar la aglomeración o precipitación de las proteínas.

NOTA—Las siguientes son medidas preventivas generales que se pueden usar para mejorar el método.

- Las muestras se pueden aplicar a cualquier zona del gel, pero en general, se deben aplicar en zonas donde se espera que se enfoquen. Para proteger las proteínas de medios de pH extremo, las muestras no se deben aplicar cerca de ninguno de los electrodos. Durante el desarrollo del método, el analista puede intentar aplicar la proteína en tres posiciones del gel (por ejemplo: en el medio y en ambos extremos); el patrón de una proteína aplicada en los extremos opuestos del gel puede no ser idéntico.
- Si un gel se enfoca por mucho tiempo, puede ocurrir un fenómeno conocido como deriva catódica, donde el gradiente de pH disminuye con el tiempo. Aunque no se entiende bien, la electroendosmosis y la absorción de dióxido de carbono son factores que pueden favorecer la deriva catódica. La deriva catódica se observa cuando la proteína enfocada migra hacia el extremo catódico del gel. Se pueden usar gradientes de pH inmovilizados para resolver este problema.
- Es importante un enfriamiento eficiente (aproximadamente 4°) del lecho donde se encuentra el gel durante el enfoque. Las intensidades de campo elevadas usadas durante el isoelectroenfoque pueden producir recalentamiento y afectar la calidad del gel enfocado. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ (1055) ARTÍCULOS OBTENIDOS POR BIOTECNOLOGÍA—MAPEO DE PÉPTIDOS

Este capítulo proporciona guías y procedimientos utilizados para la caracterización de artículos obtenidos por biotecnología mediante mapeo de péptidos. Se lo ha armonizado con los capítulos correspondientes en la *Farmacopea Japonesa (JP)* y la *Farmacopea Europea (EP)*. También se muestran otras pruebas de caracterización armonizadas en *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos* (1052), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis Capilar* (1053), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Isoelectroenfoque* (1054), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poliacrilamida* (1056) y *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Valoración de Proteínas Totales* (1057).

INTRODUCCIÓN

El mapeo de péptidos es una prueba de identidad para proteínas, especialmente para aquellas obtenidas por tecnología de ADN-r. Implica el tratamiento químico o enzimático de una proteína, con la formación de fragmentos peptídicos y seguido de la separación e identificación de los fragmentos en una manera reproducible. Es una prueba de gran alcance capaz de identificar cambios en aminoácidos individuales como resultado de acontecimientos tales como errores en la lectura de las secuencias de ADN complementario (ADNc) o mutaciones puntuales. El mapeo de péptidos es un procedimiento comparativo ya que la información obtenida, comparada con un estándar de referencia o material de referencia tratado de manera similar, confirma la estructura primaria de la proteína, es capaz de detectar si ha habido alguna alteración en la estructura y demuestra la uniformidad del proceso y la estabilidad genética. Cada proteína presenta características exclusivas que se

deben entender bien para que el enfoque científico y analítico permita el desarrollo válido de un mapa peptídico que suministre suficiente especificidad.

Esta sección proporciona una ayuda detallada para la aplicación del mapeo de péptidos y su validación para caracterizar el producto proteico deseado, con el fin de evaluar la estabilidad de la construcción de expresión de las células usadas para productos de ADN recombinante; para evaluar la uniformidad del proceso global; y para evaluar la estabilidad del producto, además de asegurar la identidad del producto proteico o de detectar la presencia de una variante de la proteína. El esquema presentado establece diferencias entre la calificación del método en una etapa temprana del proceso reglamentario, al nivel de Nuevo Fármaco en Investigación (IND, por sus siglas en inglés) y la validación completa para apoyar una Solicitud de Nuevo Fármaco (NDA, por sus siglas en inglés), Solicitud de Licencia de Producto (PLA, por sus siglas en inglés), o Solicitud de Autorización para Comercialización (MAA, por sus siglas en inglés). Los conceptos de validación descritos concuerdan con el capítulo de información general *Validación de Procedimientos Farmacopeicos* (1225) y con el documento de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) sobre *Validación de Métodos Analíticos*.

EL MAPA PEPTÍDICO

El mapeo de péptidos no es un método general, pero implica el desarrollo de mapas específicos para cada proteína única. Si bien la tecnología evoluciona rápidamente, existen ciertos métodos que están generalmente aceptados. Las variaciones de estos métodos se indican, cuando corresponda, en las monografías específicas.

Un mapa peptídico se puede considerar como la huella digital de una proteína y es el producto final de varios procesos químicos que permiten una amplia comprensión de la proteína analizada. Se necesitan cuatro pasos principales para el desarrollo del procedimiento: aislamiento y purificación de la proteína, si la proteína es parte de una formulación; escisión selectiva de los enlaces peptídicos; separación cromatográfica de los péptidos; y análisis e identificación de los péptidos. Una muestra de prueba se digiere y valora en paralelo con un estándar de referencia o material de referencia. La escisión completa es más factible con enzimas tales como endoproteasas (por ejemplo: tripsina) en lugar de reactivos de escisión química. Un mapa debe contener suficientes péptidos para ser significativo. Por otro lado, si hay demasiados fragmentos, el mapa puede perder su especificidad ya que de este modo es posible que muchas proteínas tengan los mismos perfiles.

Aislamiento y Purificación

El aislamiento y la purificación son necesarios para el análisis de fármacos a granel o en formas farmacéuticas que contienen excipientes y proteínas transportadoras que interfieren y, cuando es necesario, se especifica en la monografía. Se debe validar la recuperación cuantitativa de proteínas de la forma farmacéutica.

Escisión Selectiva de Uniones Peptídicas

La selección del enfoque usado para la escisión de uniones peptídicas depende de la proteína que se está analizando. Este proceso de selección involucra la determinación del tipo de escisión a emplear—enzimática o química—y el tipo de agente de escisión dentro de la categoría elegida. En la *Tabla 1* se muestran varios agentes de escisión y su especificidad. Esta no es una lista completa y se ampliará a medida que se identifiquen otros agentes de escisión.

Tratamiento Previo de la Muestra—Según el tamaño o la configuración de la proteína, se pueden usar distintos enfoques en el tratamiento previo de las muestras. Para los anticuerpos monoclonales, es necesario separar las cadenas pesadas y livianas antes del mapeo. Si se usa tripsina como agente de escisión para las proteínas que tengan una masa molecular mayor que 100 000 Da, se deben proteger los residuos lisina por citraconilación o maleilación; de lo contrario, se generan demasiados péptidos.

Tratamiento Previo del Agente de Escisión—Podría ser necesario el tratamiento previo de purificación de los agentes de escisión, especialmente los agentes enzimáticos, con el fin de asegurar la reproducibilidad del mapa. Por ejemplo, la tripsina usada como agente de escisión debe tratarse con tosil-L-fenilalanina clorometilcetona para inactivar la quimotripsina. Otros métodos, tales como la purificación de la tripsina por HPLC o la inmovilización de enzimas en un soporte de gel, han resultado eficaces cuando sólo hay disponible una pequeña cantidad de proteína.

Tratamiento Previo de la Proteína—Bajo ciertas condiciones, podría ser necesario concentrar la muestra o separar la proteína de sustancias y estabilizadores usados en la formulación del producto, si éstos interfieren con el procedimiento de mapeo. Los procedimientos físicos usados para el tratamiento previo pueden incluir la ultrafiltración, la cromatografía en columna y la liofilización.

Otros tratamientos previos tales como el agregado de agentes caotrópicos (por ejemplo, urea) se pueden usar para desplegar la proteína antes del mapeo. Para permitir que la enzima tenga acceso total a los sitios de escisión y que la proteína sufra algún grado de desplegamiento, a menudo es necesario reducir y alquilar las uniones disulfuro antes de la digestión.

La digestión con tripsina puede introducir ambigüedades en el mapa triptico debido a reacciones secundarias durante la digestión, tales como escisión no específica, desamidación, isomerización de disulfuros, oxidación de residuos de metionina, o formación de grupos piroglutámicos creados por desamidación de glutamina en el extremo N-terminal de un péptido. Además, se pueden producir picos por autohidrólisis de la tripsina. Sus intensidades dependen de la relación de la tripsina con respecto a la proteína. Para evitar la autohidrólisis, se pueden preparar soluciones de proteasas a un pH que no sea óptimo (por ejemplo, pH 5 para la tripsina), lo cual significa que la enzima sólo se activa cuando se diluye con la solución amortiguadora de digestión.

Establecimiento de las Condiciones Óptimas de Digestión—Los factores que afectan la integridad y eficacia de la digestión de las proteínas son aquellos que podrían afectar a cualquier reacción química o enzimática.

pH—El pH de la mezcla de digestión se determina empíricamente para asegurar el desempeño óptimo de un agente de escisión dado. Por ejemplo, cuando se usa bromuro de cianógeno como agente de escisión, es necesario un ambiente altamente ácido (por ejemplo: pH 2, ácido fórmico); sin embargo, al usar tripsina como agente de escisión, un ambiente levemente alcalino (pH 8) es óptimo. Como regla general, el pH del entorno de la reacción no debe alterar la integridad química de la proteína durante la digestión y no debe cambiar durante el transcurso de la reacción de fragmentación.

Temperatura—Una temperatura entre 25° y 37° es adecuada para la mayoría de las digestiones. La temperatura empleada está prevista para minimizar las reacciones químicas secundarias. El tipo de proteína en análisis determinará la temperatura del medio de reacción ya que algunas proteínas son más susceptibles a la desnaturalización a medida que aumenta la temperatura de la reacción. Por ejemplo, la digestión de somatropina bovina recombinante se realiza a 4° ya que a temperaturas más altas precipita durante la digestión.

Tiempo—Si se dispone de suficiente muestra, se puede realizar un estudio en función del tiempo a fin de determinar el tiempo óptimo para obtener un mapa reproducible y evitar una digestión incompleta. El tiempo de digestión varía de 2 a 30 horas. La reacción se detiene al agregar un ácido que no interfiera en el mapa triptico, o por congelación.

Cantidad de Agente de Escisión—Si bien se usan cantidades de agente de escisión en exceso para lograr tiempos de digestión razonablemente rápidos (es decir, 6 a 20 horas), la cantidad se minimiza para evitar su contribución al perfil cromatográfico. Generalmente se usa una relación proteína-proteasa entre 20:1 y 200:1. Se recomienda agregar el agente de escisión en dos o más etapas para optimizar la escisión. Sin embargo, el volumen final de la reacción se mantiene lo suficientemente pequeño para facilitar el siguiente paso en el mapeo de péptidos—el paso de separación. Para determinar los artefactos de digestión que podrían interferir con los análisis siguientes, se realiza una determinación con un blanco usando un control de digestión con todos los reactivos excepto la proteína en análisis.

Tabla 1. Ejemplos de Agentes de Escisión

Tipo	Agente	Especificidad
Enzimático	Tripsina, EC 3.4.21.4	Extremo C-terminal de Arg y Lys
	Quimotripsina, EC 3.4.21.1	Extremo C-terminal de residuos hidrófobos (por ej., Leu, Met, Ala, aromáticos)
	Pepsina A (Pepsina), EC 3.4.23.1	Digestión no específica
	Lisil endopeptidasa (endopeptidasa Lys-C), EC 3.4.21.50	Extremo C-terminal de Lys
	Glutamil endopeptidasa (endoproteinasa Glu-C; V8 proteasa); (de la cepa <i>S. aureus</i> V8), EC 3.4.21.19	Extremo C-terminal de Glu y Asp
	Peptidil-Asp metaloendopeptidasa (endoproteinasa Asp-N), EC 3.4.24.33	Extremo N-terminal de Asp
Químico	Clostripain (endopeptidasa Arg-C), EC 3.4.22.8	Extremo C-terminal de Arg
	Bromuro de cianógeno	Extremo C-terminal de Met
	Ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico	Extremo N-terminal de Cys
	Ácido <i>O</i> -yodosobenzoico	Extremo C-terminal de Trp y Tyr
	Ácido diluido	Asp y Pro
	BNPS-Escatol	Trp

Separación Cromatográfica

Se usan muchas técnicas para separar péptidos para mapeos. La elección de la técnica depende de la proteína estudiada. Las técnicas eficaces para la separación de péptidos se muestran en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Técnicas Usadas para la Separación de Péptidos

Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC)
Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC)
Cromatografía de Interacción Hidrófoba (HIC)
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE), sin desnaturalización
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE)
Electroforesis Capilar (CE)
Cromatografía en Papel
Electroforesis de Alto Voltaje en Papel (HVPE)

En esta sección, se describe un método de HPLC en fase reversa (RP-HPLC) ampliamente usado en la separación cromatográfica.

La pureza de los disolventes y de las fases móviles es un factor crítico en la separación por HPLC. Se recomienda usar agua y disolventes de grado HPLC, disponibles comercialmente, para la RP-HPLC. Los gases disueltos presentan un problema en los sistemas de gradientes donde la solubilidad del gas en un disolvente puede ser menor en una mezcla que en un disolvente solo. La desgasificación al vacío y la agitación por ultrasonido suelen ser útiles para la desgasificación. Las partículas sólidas presentes en los disolventes se introducen en el sistema HPLC; pueden dañar los sellos de las válvulas de las bombas u obstruir la parte superior de la columna cromatográfica. Se recomienda filtrar antes y después de la bomba.

Columna Cromatográfica—La selección de una columna cromatográfica se determina empíricamente para cada proteína. Las columnas con tamaño de poro de 100 Å o 300 Å y soporte de sílice pueden proporcionar una separación óptima. Para péptidos más pequeños, los rellenos de columna como el octilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 a 10 µm de diámetro (L7) y el octadecilsilano unido químicamente a micropartículas porosas de sílice o cerámica, de 3 a 10 µm de diámetro (L1) son más eficientes que el relleno de silano de butilo unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 5 a 10 µm de diámetro (L26).

Disolvente—El disolvente más comúnmente usado es agua con acetonitrilo como modificador orgánico al cual se le agrega menos de 0,1% de ácido trifluoroacético. Si fuera necesario, agregar alcohol isopropílico o alcohol *n*-propílico para solubilizar los componentes de digestión, siempre que el agregado no aumente excesivamente la viscosidad de los componentes.

Fase Móvil—Se usan fases amortiguadas que contienen fosfato para flexibilizar la selección de las condiciones de pH ya que los cambios en el pH en el intervalo de 3,0 a 5,0 mejoran la separación de los péptidos que contienen residuos ácidos (por ejemplo, ácido glutámico y ácido aspártico). También se han usado fosfatos de sodio o potasio, acetato de amonio y ácido fosfórico, con un pH entre 2 y 7 (o superior para soportes a base de polímeros), con gradientes de acetonitrilo. También se usa a menudo ácido trifluoroacético que contiene acetonitrilo.

Selección del Gradiente—Los gradientes pueden ser lineales, no lineales o incluir funciones escalonadas. Se recomienda un gradiente gradual a fin de separar mezclas complejas. Los gradientes se optimizan para resolver claramente uno o dos picos que serán los picos “marcadores” de la prueba.

Selección Isocrática—Los sistemas isocráticos de HPLC que usan una única fase móvil se emplean por su conveniencia de uso y las respuestas mejoradas del detector. A menudo es difícil de establecer la composición óptima de una fase móvil para obtener una resolución clara de cada pico. En sistemas isocráticos de HPLC no deben usarse fases móviles donde un cambio leve en la relación de sus componentes o en el pH tenga un efecto importante en los tiempos de retención de los picos del mapa peptídico.

Otros Parámetros—Generalmente es necesario controlar la temperatura de la columna para lograr una buena reproducibilidad. Las velocidades de flujo para las fases móviles varían de 0,1 a 2,0 mL por minuto y la detección de péptidos se realiza con un detector UV entre 200 nm y 230 nm. Se han usado otros métodos de detección (por ejemplo: derivatización postcolumna), pero no son tan robustos ni tan versátiles como la detección UV.

Aptitud del Sistema—El apartado *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621) suministra un medio experimental para medir el desempeño global del método de prueba. El criterio de aceptación para la aptitud del sistema depende de la identificación de los parámetros críticos de prueba que afectan la interpretación y aceptación de los datos. Estos parámetros críticos también son criterios que controlan la digestión y el análisis de péptidos. Un indicador de que se alcanzó el punto final de digestión deseado es la comparación con un estándar de referencia o un material de referencia, el cual se trata exactamente como el artículo en análisis. El uso de un Estándar de Referencia USP paralelamente con la proteína en análisis es crítico en el desarrollo y establecimiento de los límites de aptitud del sistema. Además, se debe incluir el cromatograma de una muestra con el Estándar de Referencia USP o material de referencia a los efectos de la comparación. Otros indicadores pueden incluir la inspección visual de la solubilidad de la proteína o el péptido, la ausencia de proteína intacta, o la medición de respuestas de un péptido dependiente de la digestión. Los parámetros críticos de aptitud del sistema para el análisis de péptidos dependerá de cada modo de separación y detección de péptidos y de los requisitos de análisis de datos.

Cuando se usa el mapeo de péptidos como prueba de identificación, los requisitos de aptitud del sistema para los péptidos identificados incluyen la selectividad y la precisión. En este caso, al igual que cuando se realiza la identificación de variantes de proteínas, la identificación de la estructura primaria de los fragmentos peptídicos en el mapa peptídico suministra una verificación de la estructura primaria conocida y la identificación de las variantes de las proteínas por comparación con el mapa peptídico del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína especificada. El método de elección para la determinación de la resolución de péptidos, es el uso de un Estándar de Referencia USP o material de referencia digerido para una proteína dada. Para el análisis de una variante de una proteína, se puede usar una mezcla caracterizada de una variante y un estándar de referencia, especialmente si la variante del péptido se encuentra en una región menos resuelta del mapa. El índice de uniformidad del patrón puede ser simplemente el número de péptidos principales detectados. La uniformidad del patrón de péptidos se puede definir mejor por la resolución de los picos de los péptidos. Los parámetros cromatográficos —tales como la resolución pico a pico, el ancho máximo de picos, factores de asimetría de los picos y la eficiencia de la columna— se pueden usar para definir la resolución peptídica. Dependiendo de la proteína en análisis y el método de separación que se use, pueden ser necesarios requisitos de resolución de un solo péptido o de múltiples péptidos.

El análisis repetido del digerido del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína en análisis produce medidas de precisión y recuperación cuantitativa. La recuperación de los péptidos identificados generalmente se puede determinar por el uso de estándares peptídicos internos o externos. La precisión se expresa como la desviación estándar relativa (RSD). Es de esperar diferencias en la recuperación y precisión de los péptidos identificados; por lo tanto, hay que establecer los límites de aptitud del sistema tanto para la recuperación como para la precisión de los péptidos identificados. Estos límites son exclusivos para cada proteína y se especificarán en las monografías individuales.

La comparación visual de los tiempos de retención relativos, las respuestas de los picos, el número de picos y el patrón de elución global se completa inicialmente. Luego se complementa y respalda con el análisis matemático de los cocientes de respuesta de los picos y el perfil cromatográfico de una mezcla 1 : 1 (v/v) de la muestra y el digerido del Estándar de Referencia USP o material de referencia. Si todos los picos en el digerido de la muestra y en el digerido del Estándar de Referencia USP o material de referencia tienen los mismos tiempos de retención relativos y cocientes de respuesta de los picos, se confirma la identidad de la muestra en análisis.

Si los picos que inicialmente eluyeron con tiempos de retención relativos significativamente diferentes luego se observan como picos únicos en la mezcla 1 : 1, la diferencia inicial sería una indicación de la variabilidad del sistema. Sin embargo, si se observan picos separados en la mezcla 1 : 1, esto indicaría la no equivalencia de los péptidos en cada pico. Si un pico en la mezcla 1 : 1 es significativamente más ancho que el pico correspondiente en la muestra y el digerido del Estándar de Referencia USP o material de referencia, podría indicar la presencia de péptidos diferentes. Se ha propuesto y aplicado un software de reconocimiento de patrones para el análisis de los datos del mapeo de péptidos, pero los problemas relacionados con la validación del software impiden que pueda usarse en una prueba farmacopeica en el futuro cercano. Se han usado otros enfoques automatizados que emplean fórmulas matemáticas, modelos y reconocimiento de patrones. Se han propuesto enfoques tales como, por ejemplo, la identificación automatizada de compuestos por espectroscopia IR y la aplicación de análisis espectral UV con arreglo de diodos para la identificación de péptidos. Estos métodos tienen limitaciones debido a resoluciones inadecuadas, elución conjunta de fragmentos o diferencias absolutas en las respuestas de los picos entre el Estándar de Referencia USP o material de referencia y los fragmentos de la muestra.

La comparación numérica de los tiempos de retención y áreas o alturas de los picos se puede realizar para un grupo seleccionado de picos relevantes correctamente identificados en los mapas peptídicos. Las áreas de los picos se pueden calcular usando un pico como referencia interna con relativamente poca variación, teniendo en cuenta que la integración del área del pico es sensible a la variación de la línea base y posiblemente introduzca un error en el análisis. De modo alternativo, se puede calcular la altura porcentual del pico de

cada péptido con respecto a la suma de todas las alturas de los picos para la muestra de prueba. El porcentaje se compara luego con el del pico correspondiente del Estándar de Referencia USP o material de referencia. La posibilidad de autohidrólisis de la tripsina se controla mediante la producción de un mapa peptídico blanco que es el mapa obtenido cuando la solución blanco se trata con tripsina.

El requisito mínimo para la calificación de un mapeo de péptidos es un procedimiento de prueba aprobado que incluya la aptitud del sistema como control de prueba. En general, para un IND, basta con la calificación del mapeo de péptidos para una proteína. A medida que avanza el proceso de aprobación reglamentario de la proteína, calificaciones adicionales de la prueba pueden incluir una validación parcial del procedimiento analítico con el fin de asegurar que el método funciona en la forma planeada en el desarrollo del mapa peptídico para la proteína especificada.

Análisis e Identificación de Péptidos

Esta sección es una guía para el uso del mapeo de péptidos durante la investigación que respalda las solicitudes reglamentarias.

El uso de un mapa peptídico como herramienta cualitativa no exige la caracterización completa de los picos de péptidos individuales. Sin embargo, la validación del mapeo de péptidos en respaldo de las solicitudes reglamentarias exige la caracterización rigurosa de cada pico en el mapa peptídico. Los métodos para caracterizar picos varían desde la secuenciación *N*-terminal de cada pico seguida por un análisis de aminoácidos hasta el uso de espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés).

A los efectos de la caracterización, cuando se usan la secuenciación *N*-terminal y el análisis de aminoácidos, la separación analítica se realiza a mayor escala. Ya que el aumento en escala puede afectar la resolución de los picos de péptidos, es necesario asegurar con datos empíricos que no haya pérdida de resolución debida al aumento en escala. Se recogen los eluatos correspondientes a picos de péptidos específicos, se concentran al vacío y se cromatografían nuevamente, según sea necesario. El análisis de aminoácidos de los fragmentos puede estar limitado por el tamaño del péptido. Si el *N*-terminal está bloqueado, puede ser necesario desbloquearlo antes de la secuenciación. También se puede usar la secuenciación del *C*-terminal de las proteínas o una combinación de digestión por carboxipeptidasa y espectrometría de masas por tiempo de vuelo con ionización por desorción láser asistida por matrices (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés) para su caracterización.

El uso de MS para la caracterización de fragmentos peptídicos se hace por infusión directa de péptidos aislados o por el uso en línea de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS, por sus siglas en inglés) para el análisis estructural. En general, incluye el electrospray y analizadores MALDI-TOF así como también el bombardeo atómico rápido (FAB, por sus siglas en inglés). También se ha usado la MS en serie para secuenciar una proteína modificada y para determinar la modificación aminoácida producida. La comparación de los espectros de masas de los digeridos antes y después de la reducción proporciona un método para asignar las uniones disulfuro a los diferentes péptidos que contienen sulfhidrilos.

Si hay regiones de la estructura primaria que no se demuestran claramente en el mapa peptídico, podría sea necesario realizar un mapa peptídico secundario. El objetivo de un método validado de caracterización de una proteína a través del mapeo de péptidos es conciliar y explicar al menos el 95% de la composición teórica de la estructura de la proteína.

EL USO DEL MAPEO DE PÉPTIDOS PARA LA EVALUACIÓN DE ESTABILIDAD GENÉTICA

Se puede usar un mapa peptídico validado para evaluar la integridad de la secuencia primaria prevista de un producto proteico (es decir, su estabilidad genética). También se puede usar para determinar la uniformidad lote a lote del proceso de productos biotecnológicos. Además, el desempeño de la expresión de la proteína en el sistema de producción se evalúa mejor a través del mapeo de péptidos de la proteína expresada. Los mapas peptídicos de proteínas producidos en diversas etapas de la expresión de la proteína, incluyendo un punto más allá del tiempo normal de

expresión de la proteína, comparados con los de un Estándar de Referencia USP o material de referencia, sirven para evaluar la estabilidad genética del sistema de expresión en función del tiempo.

Pueden surgir variantes de las secuencias de las proteínas a partir de una variación genética en el ADN (mutación puntual) o como un error en la traducción. El mejor enfoque es un mapa peptídico validado para la detección de variantes de proteínas. Sin embargo, se deben considerar las limitaciones inherentes del mapeo de péptidos. La detección de una variante estructurada es posible únicamente si la variante peptídica correspondiente es fácil de aislar y caracterizar. Para establecer estabilidad genética es necesario usar una batería de métodos bioquímicos, siempre que las variantes tengan propiedades distintas de las de la proteína “normal”.

VALIDACIÓN

Factores Críticos

La validación del mapeo de péptidos exige el diseño de un protocolo que describa detalladamente el experimento a realizar y los criterios para la aceptación del mapa. Los criterios para la aceptación del mapeo incluyen límites de detección, especificidad, linealidad, rango, exactitud, precisión y estabilidad de los reactivos. La reproducibilidad del mapa peptídico es un elemento crítico en su utilización como prueba de identidad y para confirmar la estabilidad genética. Se analizarán aquellos aspectos técnicos del mapeo de péptidos que influyen la reproducibilidad del mapa.

El ajuste de los límites, con respecto a la cuantificación (área o altura del pico) e identificación (tiempos de retención) para el grupo seleccionado de picos relevantes se basa en observaciones empíricas. Estos límites detectan diferencias significativas entre la muestra y el Estándar de Referencia USP o material de referencia dentro de una serie de análisis.

Otro problema crítico es la recuperación de péptidos y su efecto sobre la determinación y reproducibilidad de las áreas de los picos y en el establecimiento de criterios de aceptación. Los criterios de recuperación tratan todos los aspectos de metodología de la prueba, desde la digestión hasta las condiciones cromatográficas. La determinación de la recuperación de péptidos incluye el análisis cuantitativo de aminoácidos, el agregado de cantidades conocidas, el marcado radioactivo y la sumatoria UV. Una recuperación general de aproximadamente el 80% se considera satisfactoria. La recuperación de péptidos individuales es más problemática y se maneja caso por caso. Los factores críticos de la validación de un mapa peptídico son los siguientes.

Procedimientos de Prueba Documentados por Escrito—Estos procedimientos incluyen una descripción detallada del método analítico en donde se definen los reactivos, equipos, preparación de la muestra, método de análisis y análisis de los datos.

Protocolo de Validación—Se prepara un protocolo que incluye un procedimiento para la validación de la prueba.

Criterio de Aceptación—El criterio puede ser mínimo en las primeras etapas, pero debe definirse mejor a medida que progresan los estudios de validación.

Informe de los Resultados—En los resultados del estudio de validación se documentan los parámetros analíticos indicados en el protocolo de validación.

Revalidación del Procedimiento de la Prueba—Si el método empleado requiere alteraciones que podrían afectar los parámetros analíticos previamente evaluados en la validación, es necesario volver a validar el procedimiento de la prueba. Si hay cambios significativos en el procesamiento del artículo, en los laboratorios que realizan el análisis, en la formulación de los productos a granel o terminados y en cualquier otro parámetro importante, se requerirá la revalidación de los métodos.

Requisitos

Precisión—

Precisión Intra Prueba—Es una medida de la reproducibilidad del mapeo de péptidos. Los dos pasos críticos en el mapeo de péptidos son la fragmentación (es decir, digestión) y la separación de

péptidos. La precisión es aceptable cuando los tiempos de retención absolutos y las áreas de los picos relativos son constantes de corrida a corrida y la variación promedio en el tiempo de retención es pequeña en relación con la del pico de referencia interno seleccionado. La reproducibilidad del mapa se puede mejorar si se usa un horno con columna con control de temperatura, si se equilibra exhaustivamente el sistema antes de comenzar la prueba, si primero se realiza una determinación con un blanco (mezcla de digerido control sin proteína) para minimizar los “efectos de la primera corrida” y si se intercala periódicamente un digerido del material de referencia o del Estándar de Referencia USP con las muestras de prueba para evaluar la variación sistemática de la cromatografía.

Los criterios para validar el paso de fragmentación son similares a los descritos a continuación para la separación de péptidos, pero se cumplen para pruebas consecutivas de una serie de digeridos preparados por separado de la proteína en análisis.

Los criterios para la validación del paso de separación de péptidos incluyen lo siguiente:

1. La desviación estándar promedio de los tiempos de retención absolutos de todos los picos principales para un conjunto de pruebas consecutivas del mismo digerido no excede un criterio de aceptación especificado.
2. La desviación estándar promedio del área de pico absoluta para todos los picos principales totalmente resueltos no excede un porcentaje especificado.

Precisión Inter Pruebas—Esta es una medida de la reproducibilidad del mapeo de péptidos cuando la prueba se realiza en distintos días, por distintos analistas, en distintos laboratorios, con reactivos o enzimas de distintos proveedores o con distintos lotes del mismo proveedor, con instrumental diferente, en columnas de fabricación distinta o columnas de igual fabricación pero de lotes distintos y en columnas individuales de la misma fabricación y el mismo lote. Si bien sería preferible, desde una perspectiva científica, validar el efecto de todas estas variables sobre la precisión, un enfoque práctico es validar la prueba usando aquellas variables que sean más probables de encontrar en condiciones operativas. Se pueden incluir variables adicionales cuando sea necesario.

El diseño experimental permite al analista realizar comparaciones usando tiempos de retención de picos y áreas de picos que se expresan con relación a un pico de referencia interno altamente reproducible dentro del mismo cromatograma. El área de pico relativa se expresa como el cociente entre el área del pico y el área del pico de referencia interna. El tiempo de retención relativo se puede expresar como la diferencia entre el tiempo de retención absoluto y el tiempo de retención del pico de referencia. El uso de valores relativos elimina la necesidad de realizar correcciones separadas por diferencias de volumen de un inyector a otro, por unidades de medición de las áreas de los picos, por dimensiones de la columna y por volúmenes de espacio muerto de los instrumentos. Se espera que la variabilidad en los tiempos de retención y en las áreas de los picos para los experimentos de *Precisión Inter Pruebas* sea ligeramente mayor que la variabilidad observada para la *Precisión Intra Prueba*.

Robustez—La composición de la *Fase Móvil*, la calidad de la proteasa o la pureza de los reactivos químicos, la variación y edad de la columna y la estabilidad del digerido son todos factores que podrían afectar el desempeño general de la prueba y su reproducibilidad. Se evalúan las tolerancias para cada parámetro clave y se establecen los límites de la línea de base en caso de que la prueba se use para la liberación rutinaria de lotes.

Fase Móvil—La composición de la *Fase Móvil* se optimizará para obtener la máxima resolución de péptidos en todo el perfil de elución. Se prefiere un equilibrio entre la resolución óptima y la reproducibilidad general. Un pH menor podría mejorar la separación entre los picos pero podría acortar la vida de la columna, dando como resultado una falta de reproducibilidad. Los mapas peptídicos a un pH por encima o por debajo del pH del procedimiento se comparan con el mapa peptídico obtenido al pH del procedimiento y se observa si hay diferencias significativas; también se revisan con respecto a los criterios de aceptación establecidos en el protocolo de validación.

Calidad de la Proteasa o Pureza de los Reactivos Químicos—Se prepara y digiere una muestra del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína en análisis con distintos lotes del agente de escisión. En los cromatogramas para cada

digerido se comparan las áreas de los picos, su forma y el número de picos. Se puede aplicar el mismo procedimiento a otras sustancias químicas o tratamientos previos usados durante la preparación de la muestra, como por ejemplo los reactivos reductores y de carboximetilación.

Consideraciones de la Columna—La variabilidad entre una columna y otra, incluso dentro de un mismo lote, puede afectar el desempeño de la columna en el desarrollo de mapas peptídicos. El tamaño de la columna también puede producir diferencias significativas. Se digiere un Estándar de Referencia USP o material de referencia de la proteína de prueba y el digerido se cromatografía en distintos lotes de columna de un mismo fabricante. Luego se evalúa el perfil de elución general, los tiempos de retención, la resolución de selectividad y la recuperación de los mapas. Para evaluar la robustez de la columna durante toda su vida útil, se debe realizar una prueba de mapeo de péptidos en distintas columnas y variar significativamente el número de inyecciones (por ejemplo, de 10 inyecciones a 250 inyecciones). Los mapas resultantes se comparan buscando diferencias significativas en el ensanchamiento de los picos, área de los picos y resolución general. A medida que la columna envejece, podría observarse un aumento en la contrapresión que podría afectar los mapas peptídicos.

Una precaución razonable en el uso de columnas de mapeo de péptidos es seleccionar columnas alternativas, en caso de que las columnas originales no estén disponibles o dejen de fabricarse. Realizar una prueba de mapeo de péptidos usando columnas equivalentes de distintos fabricantes y examinar los mapas. Las diferencias en la forma y el tamaño de las partículas, el tamaño y volumen de los poros, la carga de carbono y el recubrimiento terminal pueden dar lugar a diferencias significativas en los tiempos de retención, la selectividad del perfil de elución, la resolución y la recuperación. Podría ser necesario hacer ligeras modificaciones en el perfil del gradiente para lograr mapas equivalentes cuando se usen columnas de distintos fabricantes. [NOTA—Debe considerarse la equivalencia entre la instrumentación usada para la validación de la prueba y para la prueba de control de calidad de rutina. Podría ser preferible usar el mismo sistema HPLC para todas las aplicaciones. De lo contrario, se determina la equivalencia de los sistemas, lo cual puede exigir algunos cambios en las condiciones de la prueba cromatográfica.]

Estabilidad del Digerido—Se evalúa el tiempo de almacenamiento de un digerido y las condiciones de almacenamiento antes de la cromatografía. Se almacenan varias alícuotas de un mismo digerido en distintas condiciones de almacenamiento y se cromatografían. Estos mapas luego se evalúan para buscar diferencias significativas.

Reproducibilidad—Se repite la determinación de varios de los parámetros indicados anteriormente usando el mismo Estándar de Referencia USP o material de referencia y la misma muestra de la prueba en al menos dos laboratorios distintos y por dos analistas, equipados con sistemas HPLC similares. Luego se evalúan los mapas peptídicos generados para ver si existen diferencias significativas. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ (1056) ARTÍCULOS OBTENIDOS POR BIOTECNOLOGÍA—ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Este capítulo proporciona guías y procedimientos utilizados para la caracterización de artículos obtenidos por biotecnología mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Se lo ha armonizado con los capítulos correspondientes en la *Farmacopea Japonesa (JP)* y la *Farmacopea Europea (EP)*. También se muestran otras pruebas de caracterización armonizadas en *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos* (1052), *Artículos Obtenidos por*

Biotecnología—Electroforesis Capilar (1053), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Isoelectroenfoque* (1054), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Mapeo de Péptidos* (1055) y *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Valoración de Proteínas Totales* (1057).

INTRODUCCIÓN

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se usa para la caracterización cualitativa de proteínas en preparaciones biológicas, para control de pureza y para determinaciones cuantitativas. Este procedimiento se limita al análisis de proteínas con un peso entre 14 000 y 100 000 Da. Es posible ampliar la extensión de pesos de una electroforesis en gel con diversas técnicas (por ejemplo, geles de gradiente o ciertos sistemas amortiguadores de pH), pero dichas técnicas no se tratan en este capítulo. La electroforesis en gel analítica es un método adecuado para identificar y evaluar la homogeneidad de las proteínas en los fármacos. Estos métodos se usan de forma rutinaria para estimar los pesos moleculares de subunidades proteicas y para determinar las composiciones de subunidades proteicas purificadas.

Hay geles y reactivos listos para usar disponibles comercialmente, que pueden usarse en lugar de los que se describen en este capítulo, siempre que proporcionen resultados equivalentes y que cumplan con los requisitos de validación.

PRINCIPIO GENERAL DE LA ELECTROFORESIS

Bajo la influencia de un campo eléctrico, las partículas cargadas migran en la dirección del electrodo que tiene polaridad opuesta. En la electroforesis en gel, los movimientos de las partículas se retrasan por interacciones con la matriz de gel que las rodea, la cual actúa como un tamiz molecular. Las interacciones opuestas de la fuerza eléctrica y del tamiz molecular dan como resultado velocidades de migración diferenciales, de acuerdo a los tamaños, formas y cargas de las partículas. Debido a sus diferentes propiedades fisicoquímicas, las distintas macromoléculas de una mezcla migran a distintas velocidades durante la electroforesis y así se separan, en fracciones discretas. Las separaciones electroforéticas pueden realizarse en sistemas sin fases de soporte (por ejemplo, separación por electroforesis capilar en solución libre) y en medios estabilizadores, tales como placas de capa delgada, películas o geles.

CARACTERÍSTICAS DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las propiedades de tamizado de los geles de poliacrilamida se establecen mediante la red tridimensional de fibras y poros formada cuando la bisacrilamida bifuncional se entrecruza en forma adyacente a las cadenas de poliacrilamida. La polimerización se cataliza con un sistema generador de radicales libres compuesto de persulfato de amonio y *N,N,N',N'*-tetrametilendiamina (TEMED).

A medida que aumenta la concentración de acrilamida de un gel, disminuye el tamaño efectivo de sus poros. El tamaño efectivo del poro de un gel se define operacionalmente por sus propiedades de tamizado, es decir, por la resistencia que imparte a la migración de macromoléculas. Existen límites con respecto a las concentraciones de acrilamida que se pueden usar. En concentraciones altas de acrilamida, los geles se rompen con mucha más facilidad y son difíciles de manipular. A medida que disminuye el tamaño del poro de un gel, disminuye la velocidad de migración de una proteína a través del gel. Al ajustar el tamaño de poro de un gel, mediante la modificación de la concentración de acrilamida, se puede optimizar la resolución del método para un producto proteico dado. Por lo tanto, un gel se caracteriza físicamente por su composición de acrilamida y bisacrilamida.

Además de la composición del gel, el estado de la proteína es un factor importante de la movilidad electroforética. En el caso de las proteínas, la movilidad electroforética depende del valor pK de los grupos cargados y del tamaño de la molécula. Está influenciada por

el tipo, la concentración y el pH de la solución amortiguadora; por la temperatura y la intensidad del campo; y por la naturaleza del material de soporte.

Desnaturalización con Dodecilsulfato de Sodio

La desnaturalización de PAGE con dodecilsulfato de sodio (SDS) es el modo más común de electroforesis para evaluar la calidad farmacéutica de productos proteicos. Típicamente, la electroforesis analítica de proteínas se realiza bajo condiciones que aseguran la disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas individuales y que minimizan la aglomeración de estas subunidades. El detergente Dodecil Sulfato de Sodio fuertemente aniónico se usa combinado con calor para disociar las proteínas antes de que se coloquen en el gel. Los polipéptidos desnaturalizados se unen al SDS, adquieren carga negativa y exhiben una relación carga-peso estable, sin importar el tipo de proteína. Como la cantidad de SDS unido casi siempre es proporcional al peso molecular del polipéptido y es típicamente independiente de su secuencia, los complejos SDS-polipéptido migran a través de los geles de poli(acrilamida) en forma razonablemente proporcional al tamaño del polipéptido.

Las movilidades electroforéticas de todos los complejos detergente-polipéptido resultantes adoptan la misma relación funcional con los pesos moleculares de los polipéptidos. La migración de los derivados SDS se efectúa de modo previsible hacia el ánodo, observándose que los complejos de bajo peso molecular migran más rápido que los complejos más grandes. Esto significa que el peso molecular de una proteína se puede estimar por su movilidad relativa en SDS PAGE calibrada y que una banda única en un gel de este tipo es un criterio de pureza.

Sin embargo, las modificaciones de la cadena principal, tales como la *N*-glicosilación o la *O*-glicosilación, tienen un efecto significativo sobre el peso molecular aparente de una proteína. Esto se debe a que el SDS no se une a los grupos glucosídicos de la misma manera que a los grupos polipeptídicos. Por lo tanto, no se mantiene una relación estable carga-peso. El peso molecular aparente de proteínas con modificaciones postraduccionales no refleja con exactitud el peso de la cadena polipeptídica.

Condiciones Reductoras

Las subunidades de polipéptidos y su estructura tridimensional se mantienen en las proteínas mediante uniones disulfuro. Uno de los objetivos del análisis SDS PAGE en condiciones reductoras es romper esta estructura por reducción de las uniones disulfuro. La desnaturalización y disociación completa de proteínas por tratamiento con 2-mercaptoetanol o ditioneitol (DTT) despliega el esqueleto polipeptídico, formándose luego un complejo con SDS. En estas condiciones, el peso molecular de las subunidades de polipéptidos se puede calcular por regresión lineal, en presencia de estándares adecuados de peso molecular.

Condiciones No Reductoras

Para algunos análisis, no es conveniente la disociación completa de la proteína en subunidades peptídicas. En ausencia de tratamiento con agentes reductores, los enlaces disulfuro covalentes permanecen intactos, preservando la forma oligomérica de la proteína. Los complejos de SDS-proteína oligomérica migran más lentamente que sus subunidades SDS-polipéptido. Además, las proteínas no reducidas no se pueden saturar por completo con SDS y, por lo tanto, no pueden unirse al detergente en una relación de peso constante. Esto hace que las determinaciones de peso molecular de estas moléculas sean menos sencillas que los análisis de polipéptidos completamente desnaturalizados, porque es necesario que las proteínas estándar y las proteínas desconocidas tengan configuraciones similares para que las comparaciones sean válidas. Sin embargo, la tinción de una única banda en un gel de este tipo es un criterio de pureza.

Características de un Sistema Amortiguador de pH Discontinuo

El método electroforético más popular para la caracterización de una mezcla compleja de proteínas usa un sistema amortiguador de pH discontinuo compuesto por dos geles contiguos pero diferenciados: un gel de resolución o separador (inferior) y un gel concentrador (superior). Los dos geles están conformados con diferentes porosidades, pH y fuerzas iónicas. Además, se usan distintos iones móviles en el gel y en los amortiguadores de pH de los electrodos. La discontinuidad del amortiguador del pH concentra grandes volúmenes de muestra en el gel concentrador, mejorando así la resolución. Cuando se aplica electricidad, se produce una caída de voltaje a través de la solución de muestra que conduce a las proteínas hacia el gel concentrador. Los iones de glicinato del amortiguador de pH de los electrodos siguen a las proteínas hacia el gel concentrador. Se forma rápidamente un frente móvil con los iones de cloruro de alta movilidad adelante y los iones relativamente lentos de glicinato atrás. Se forma un gradiente de alto voltaje localizado entre los frentes de iones delanteros y traseros, haciendo que los complejos SDS-proteína se acumulen en una zona delgada (concentrado) y migren entre las fases de cloruro y glicinato. Dentro de un amplio límite, sin importar la altura de la muestra aplicada, todos los complejos SDS-proteína se condensan en una región muy estrecha e ingresan al gel separador como una zona delgada, bien definida, de alta densidad proteica. El gel concentrador, de grandes poros, no retrasa la migración de la mayoría de las proteínas y sirve principalmente como un medio anticonvectivo. En la interfase entre el gel concentrador y el gel separador, las proteínas sufren un marcado retardo, debido al tamaño de poro restrictivo del gel separador. Una vez en el gel separador, las proteínas continúan siendo ralentizadas por el tamizado de la matriz. Los iones de glicinato sobrepasan a las proteínas, que se mueven entonces en un espacio de pH uniforme formado por tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y glicina. El tamizado molecular hace que los complejos SDS-polipéptido se separen según sus pesos moleculares.

Preparación de Geles

En una solución amortiguadora discontinua de gel de SDS-poli(acrilamida), es importante verter el gel separador, dejarlo solidificar y verter luego el gel concentrador, porque los geles tienen diferente composición de acrilamida-bisacrilamida, solución amortiguadora y pH.

Soluciones Madre de Gel—

Solución de Acrilamida-Bisacrilamida al 30%—Preparar una solución que contenga 290 g de acrilamida y 10 g de metilen-bisacrilamida por L de agua tibia y filtrar. [NOTA—La acrilamida y la metilen-bisacrilamida se convierten, lentamente, durante el almacenamiento, en ácido acrílico y ácido bisacrílico respectivamente. Esta reacción de desamidación es catalizada por la luz y los álcalis. El pH de la solución debe ser de 7,0 o inferior. Almacenar la solución en frascos oscuros, a temperatura ambiente. Preparar todos los meses soluciones nuevas.]

Solución de Persulfato de Amonio—Preparar una pequeña cantidad de solución, con una concentración de 100 g de persulfato de amonio por L y almacenar a 4°. [NOTA—El persulfato de amonio proporciona los radicales libres que impulsan la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida. El persulfato de amonio se descompone lentamente; por lo tanto, se deben preparar soluciones nuevas semanalmente.]

TEMED—Usar un reactivo de grado electroforético. [NOTA—El TEMED acelera la polimerización de acrilamida y bisacrilamida, catalizando la formación de radicales libres a partir del persulfato de amonio. Como el TEMED sólo funciona cuando es una base libre, a un pH bajo la polimerización se inhibe.]

Solución de SDS—Usar un reactivo de grado electroforético. Preparar una solución con una concentración de aproximadamente 100 g de SDS por L y almacenar a temperatura ambiente.

Solución Amortiguadora 1,5 M—Transferir aproximadamente 90,8 g de Tris a un matraz de 500 mL, disolver en 400 mL de agua, ajustar con ácido clorhídrico hasta un pH de 8,8, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución Amortiguadora 1 M—Transferir aproximadamente 60,6 g de Tris a un matraz de 500 mL, agregar 400 mL de agua, ajustar con ácido clorhídrico hasta un pH de 6,8, diluir a volumen con agua y mezclar.

Preparación de las Placas—Limpiar dos placas de vidrio (10 cm × 8 cm), el peine de teflón, los dos espaciadores y la tubería de goma de silicona (0,6 mm × 35 cm) con detergente suave, enjuagar bien con agua y secar con un material absorbente.

Lubricar los espaciadores y la tubería con grasa no siliconada. Colocar los espaciadores a lo largo de los dos lados cortos de la placa de vidrio, a 2 mm de los bordes y a 2 mm del lado largo correspondiente a la parte inferior del gel.

Comenzar a colocar las tuberías sobre la placa de vidrio, utilizando un espaciador como guía. Cuidadosamente doblar la tubería por debajo del espaciador y seguir el lado largo de la placa de vidrio. Mientras se sostiene la tubería con un dedo por el lado largo, doblar nuevamente la tubería y colocarla sobre el segundo lado corto de la placa de vidrio, usando el espaciador como guía.

Colocar la segunda placa de vidrio perfectamente alineada con la primera y mantener unido el molde para gel haciendo presión con la mano. Colocar dos pinzas en cada uno de los dos lados cortos del molde. Colocar cuidadosamente cuatro pinzas sobre el lado largo del molde, formando así la parte inferior del molde. Verificar que la tubería corra a lo largo del borde de las placas de vidrio y que no se haya salido al colocar las pinzas. El molde está ahora listo para el vertido del gel.

Gel Separador—En un matraz Erlenmeyer, preparar el volumen adecuado de solución que contenga la concentración deseada de acrilamida, según se indica en la *Tabla 1*. Mezclar los componentes en el orden que se muestra. Antes de agregar la *Solución de Persulfato de Amonio* y el *TEMED*, verter la solución en una unidad de filtración desechable equipada con un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm y aplicar vacío. Desgasificar la solución por rotación suave de la unidad de filtración y desconectar el vacío cuando ya no se formen más burbujas en la solución. Agregar cantidades adecuadas de *Solución de Persulfato de Amonio* y de *TEMED*, según las instrucciones de la *Tabla 1*, agitar por rotación suave y verter inmediatamente en el espacio entre las dos placas de vidrio del molde. Dejar espacio suficiente para el gel concentrador (el largo de los dientes del peine más 1 cm). Con una pipeta, cubrir cuidadosamente la solución con alcohol isobutílico saturado con agua. Dejar el gel en posición vertical, a temperatura ambiente, para su polimerización.

Una vez finalizada la polimerización (aproximadamente 30 minutos después), retirar la capa superior y lavar la superficie del gel varias veces con agua, para quitar la capa de alcohol isobutílico y toda la acrilamida no polimerizada. Drenar tanto líquido como sea posible de la parte superior del gel y luego quitar el agua remanente usando el borde de una toalla de papel.

Gel Concentrador—En un matraz Erlenmeyer, preparar el volumen adecuado de solución con la concentración deseada de acrilamida, según se indica en la *Tabla 2*. Mezclar los componentes en el orden que se muestra. Antes de agregar la *Solución de Persulfato de Amonio* y el *TEMED*, verter la solución en una unidad de filtración desechable equipada con un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm y aplicar vacío. Desgasificar la solución por rotación suave de la unidad de filtración y desconectar el vacío cuando ya no se formen más burbujas en la solución. Agregar cantidades adecuadas de *Solución de Persulfato de Amonio* y de *TEMED*, según se indica en la *Tabla 2*, agitar por rotación suave y verter inmediatamente en el espacio entre las dos placas de vidrio del molde, directamente sobre la superficie del Gel Separador polimerizado. Introducir inmediatamente un peine de teflón limpio en la solución de gel concentrador, con cuidado para no atrapar burbujas de aire. Agregar más solución de gel concentrador para llenar completamente los espacios del peine. Colocar el gel en posición vertical y dejar polimerizar a temperatura ambiente. Una vez completada la polimerización (aproximadamente 30 minutos después), retirar cuidadosamente el peine de teflón y proceder según se indica a continuación.

Separación Electroforética

Solución Amortiguadora de Muestra 1—Disolver 1,89 g de Tris, 5,0 g de SDS, 50 mg de azul de bromofenol y 25,0 mL de glicerol en 100 mL de agua. Ajustar con ácido clorhídrico hasta un pH de 6,8 y diluir con agua a 125 mL. Antes de usar, diluir con un volumen igual de agua o muestra y mezclar.

Solución Amortiguadora de Muestra 2 (para condiciones reductoras)—Preparar según se indica en la *Solución Amortiguadora de Muestra 1* con la excepción de agregar 12,5 mL de 2-mercaptoetanol antes de ajustar el pH. Alternativamente, preparar según se indica para *Solución Amortiguadora de Muestra 1* excepto que se debe comenzar con aproximadamente 1,93 g de Tris y se debe agregar una cantidad adecuada de DTT para obtener una concentración final de DTT 100 µM.

Solución Amortiguadora de Corrida—Disolver 151,4 g de Tris, 721,0 g de ácido aminoacético (glicina) y 50,0 g de SDS en agua; diluir con agua a 5000 mL; y mezclar hasta obtener una solución madre. Inmediatamente antes de usar, diluir esta solución madre con agua a 10 veces su volumen, mezclar y ajustar a un pH entre 8,1 y 8,8.

Procedimiento—Enjuagar inmediatamente los pocillos con agua o con la *Solución Amortiguadora de Corrida* para eliminar toda la acrilamida no polimerizada. (Si fuera necesario, enderezar los dientes del *Gel Concentrador* con una aguja hipodérmica roma conectada a una jeringa.) Quitar las pinzas de uno de los lados cortos, retirar cuidadosamente la tubería y volver a colocar las pinzas. Proceder de manera similar con el otro lado corto. Quitar la tubería de la parte inferior del gel.

Montar el gel preparado en el aparato de electroforesis. Agregar las soluciones amortiguadoras de electroforesis a los recipientes superior e inferior. Quitar cualquier burbuja que haya quedado atrapada en el fondo del gel, entre las placas de vidrio. [NOTA—Se realiza la eliminación mejor con una aguja hipodérmica roma conectada a una jeringa. Nunca se debe correr previamente el gel antes de cargar las muestras, porque eso destruiría la discontinuidad de los sistemas amortiguadores de pH. Antes de cargar la muestra, enjuagar cuidadosamente la ranura con *Solución Amortiguadora de Corrida*.]

Preparar las soluciones de prueba y estándar en la *Solución Amortiguadora de Muestra* recomendada y tratar según se indica en la monografía individual. Aplicar el volumen adecuado de cada solución a los pocillos de *Gel Concentrador*.

Comenzar la electroforesis con condiciones recomendadas por el fabricante del equipo. Puede ser necesario variar el tiempo de corrida de la electroforesis y la corriente o el voltaje a fin de lograr una separación óptima. Verificar que el frente de tinción se mueva hacia el *Gel Separador*. Detener la electroforesis cuando la tinción haya llegado al fondo del gel. Retirar el montaje de gel del aparato y separar las placas de vidrio. Quitar los espaciadores, cortar y desechar el *Gel Concentrador* y proceder de inmediato con la tinción.

Detección de Proteínas en Geles

La tinción de Coomassie es el método de tinción de proteínas más común, con un nivel de detección en el orden de 1 µg a 10 µg de proteína por banda. La tinción con plata es el método más sensible para teñir proteínas en geles ya que es posible detectar una banda que contenga entre 10 ng y 100 ng; pero el método es más difícil y menos robusto. Todos los pasos en la tinción de gel se realizan a temperatura ambiente con agitación suave (por ejemplo, sobre un agitador de plataforma oscilante o equivalente). Hay que usar guantes cuando se tiñen los geles, para evitar la tinción de residuos dejados por las huellas digitales.

Reactivos—

Solución de Tinción de Coomassie—Preparar una solución de azul brillante Coomassie R-250, con una concentración de 1,25 g por L en una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (5:4:1). Filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

Solución de Decoloración—Preparar una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (5:4:1).

Tabla 1. Preparación de Gel Separador

Componentes de la Solución	Volumen (mL) de Componentes por Volumen de Molde de Gel Indicado Debajo							
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Acrilamida al 6%								
Agua	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
Solución de Acrilamida–Bisacrilamida al 30%	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
Solución Amortiguadora 1,5 M	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Solución de SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Solución de Persulfato de Amonio	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
Acrilamida al 8%								
Agua	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Solución de Acrilamida–Bisacrilamida al 30%	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
Solución Amortiguadora 1,5 M	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Solución de SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Solución de Persulfato de Amonio	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
Acrilamida al 10%								
Agua	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Solución de Acrilamida–Bisacrilamida al 30%	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
Solución Amortiguadora 1,5 M	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Solución de SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Solución de Persulfato de Amonio	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
Acrilamida al 12%								
Agua	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Solución de Acrilamida–Bisacrilamida al 30%	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
Solución Amortiguadora 1,5 M	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Solución de SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Solución de Persulfato de Amonio	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
Acrilamida al 14%								
Agua	1,4	2,7	3,9	5,3	6,6	8,0	10,6	13,8
Solución de Acrilamida–Bisacrilamida al 30%	2,3	4,6	7,0	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
Solución Amortiguadora 1,5 M	1,2	2,5	3,6	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Solución de SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Solución de Persulfato de Amonio	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
Acrilamida al 15%								
Agua	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
Solución de Acrilamida–Bisacrilamida al 30%	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
Solución Amortiguadora 1,5 M	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Solución de SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Solución de Persulfato de Amonio	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Tabla 2. Preparación de Gel Concentrador

Componentes de la Solución	Volumen (mL) de Componentes por Volumen de Molde de Gel Indicado Debajo							
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
Agua	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Solución de Acrilamida–Bisacrilamida al 30%	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
Solución Amortiguadora 1,0 M	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
Solución de SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
Solución de Persulfato de Amonio	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

Solución Fijadora 1—Preparar una mezcla de agua, metanol y ácido tricloroacético (5 : 4 : 1).

Solución Fijadora 2—Transferir 250 mL de metanol a un matraz volumétrico de 500 mL, agregar 0,27 mL de formaldehído, diluir a volumen con agua y mezclar.

Reactivo de Nitrato de Plata—A una mezcla de 40 mL de hidróxido de sodio 1 M y 3 mL de hidróxido de amonio, agregar gota a gota y con agitación, 8 mL de una solución de nitrato de plata de 200 g por L; diluir con agua a 200 mL y mezclar.

Solución de Desarrollo—Transferir 2,5 mL de solución de ácido cítrico (2 en 100) y 0,27 mL de formaldehído a un matraz volumétrico de 500 mL, diluir con agua a volumen y mezclar.

Solución de Detención—Preparar una solución de ácido acético al 10% (v/v).

Tinción de Coomassie—Sumergir el gel en un exceso de *Solución de Tinción de Coomassie* e incubar durante al menos 1 hora. Retirar la *Solución de Tinción de Coomassie*. Decolorar el gel con un exceso de *Solución de Decoloración*. Cambiar la *Solución de Decoloración* varias veces, hasta que las bandas de proteína teñidas se distingan claramente sobre un fondo transparente. Cuanto más completamente se decolore el gel, menor será la cantidad de proteína detectable. La decoloración se puede acelerar incluyendo unos pocos gramos de resina de intercambio aniónico o una esponja pequeña en la *Solución de Decoloración*. [NOTA—Las soluciones alcohol-ácido usadas en este procedimiento no fijan completamente las proteínas en el gel. Esto puede conducir a pérdidas de algunas proteínas de bajo peso molecular durante la tinción y decoloración de geles delgados. La fijación permanente se puede lograr por incubación del gel en *Solución Fijadora 1* durante 1 hora antes de sumergirla en la *Solución de Tinción de Coomassie*.]

Tinción con Plata—Sumergir el gel en un exceso de *Solución Fijadora 2*, e incubar durante 1 hora. Retirar la *Solución Fijadora 2*, agregar *Solución Fijadora 2* recién preparada e incubar durante al menos 1 hora, o durante la noche si fuera conveniente. Desechar la *Solución Fijadora 2*, lavar el gel en un exceso de agua durante 1 hora. Embeber el gel durante 15 minutos en una solución de glutaraldehído al 1% (v/v). Lavar el gel dos veces, durante 15 minutos cada vez, con un exceso de agua. Embeber el gel en *Reactivo de Nitrato de Plata* recién preparado durante 15 minutos en la oscuridad. Lavar el gel tres veces, durante 5 minutos cada vez, con un exceso de agua. Sumergir el gel durante aproximadamente 1 minuto en la *Solución de Desarrollo* hasta obtener una tinción satisfactoria. Detener el desarrollo mediante incubación en la *Solución de Detención* durante 15 minutos; enjuagar luego el gel con agua y proceder con el secado según se indica a continuación.

Secado de Geles

Para la tinción de Coomassie, después del paso de decoloración, incubar el gel en una solución de glicerol (1 en 10) durante al menos 2 horas. Para la tinción con plata, agregar al paso final de enjuague una incubación de 5 minutos en una solución de glicerol (1 en 50).

Sumergir dos láminas de celofán poroso en agua, e incubar de 5 a 10 minutos. Colocar una de las láminas en un marco de secado. Levantar el gel cuidadosamente y colocarlo sobre la lámina de celofán. Eliminar todas las burbujas de aire atrapadas y verter algunos mL de agua alrededor de los bordes del gel. Colocar la segunda lámina por encima y eliminar todas las burbujas de aire atrapadas. Completar el montaje del marco de secado. Colocar en una estufa de secado, dejar a temperatura ambiente hasta que este seco, o usar un secador de gel comercial.

Determinación del Peso Molecular

Los pesos moleculares de las proteínas se determinan por comparación de sus movilidades con las de varias proteínas marcadoras de peso molecular conocido. Para la calibración de geles, hay mezclas disponibles de proteínas con pesos moleculares conocidos con precisión, combinadas para una tinción uniforme. Están disponibles en diversos intervalos de pesos moleculares. Las

soluciones madre concentradas de proteínas de peso molecular conocido se diluyen en un amortiguador del pH de muestra y se cargan en el mismo gel que la muestra de proteína a analizar.

Inmediatamente después de correr el gel, se marca la posición del colorante de rastreo de azul de bromofenol para identificar el borde frontal de iones electroforéticos. Esto se puede realizar cortando muescas en los bordes del gel, o insertando una aguja empapada en tinta China en el gel, en el frente de tinción. Después de la tinción, medir las distancias de migración de cada banda de proteína (marcadoras y desconocidas) desde la parte superior del *Gel Separador*. Dividir la distancia de migración de cada proteína por la distancia recorrida por el colorante de rastreo. Las distancias de migración normalizadas así obtenidas se denominan movilidades relativas de las proteínas (con respecto al frente de tinción) y se denominan convencionalmente R_F . Construir un gráfico (semilogarítmico) del logaritmo de los pesos moleculares (M_R) de los estándares de proteínas en función de los valores R_F . [NOTA—Las gráficas son levemente sigmoideas.] A partir de la gráfica así obtenida, estimar los pesos moleculares desconocidos, por análisis de regresión lineal o interpolación, siempre que las muestras desconocidas caigan en la parte lineal de la gráfica.

Si las proteínas del marcador de peso molecular no están distribuidas a lo largo del 80% de la extensión del gel y en el intervalo de separación requerido (es decir, el intervalo que cubre el producto y su dímero o los productos y sus impurezas relacionadas) y la separación obtenida para las bandas de proteína relevantes no muestra una relación lineal entre el logaritmo del peso molecular y el R_F , entonces la prueba no es válida.

Cuantificación de Impurezas

Cuando se especifica el límite de impurezas en la monografía individual, se prepara una solución de referencia correspondiente a ese nivel de impureza, diluyendo la solución de prueba. Por ejemplo, cuando el límite es 5,0%, la solución de referencia es una dilución 1 en 20 de la solución de prueba. Ninguna impureza—cualquier banda que no sea la banda principal—en el electrofoerograma obtenido a partir de la solución de prueba es más intensa que la banda principal obtenida con la solución de referencia.

Bajo condiciones validadas y cuando se usa el procedimiento de tinción de Coomassie, las impurezas se pueden cuantificar por normalización con respecto a la banda principal, usando un densitómetro de integración. En este caso, las respuestas deben ser validadas para linealidad. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ (1057) ARTÍCULOS OBTENIDOS POR BIOTECNOLOGÍA—VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Este capítulo proporciona guías y procedimientos utilizados para la caracterización de artículos obtenidos por biotecnología. Se lo ha armonizado con los capítulos correspondientes en la *Farmacopea Japonesa (JP)* y la *Farmacopea Europea (EP)*. También se muestran otras pruebas de caracterización armonizadas en *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos* (1052), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis Capilar* (1053), *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Isoelectroenfoque* (1054), *Artículos obtenidos por Biotecnología—Mapeo de Péptidos* (1055) y *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poliacrilamida* (1056).

INTRODUCCIÓN

Los siguientes procedimientos se proporcionan para ilustrar la determinación del contenido de proteínas totales en las preparaciones farmacopeicas. Otras técnicas, tales como HPLC, también son aceptables si se demuestra la recuperación total de proteínas. Muchos de los métodos de valoración de proteínas totales descritos a continuación se pueden realizar satisfactoriamente con equipos comerciales. [NOTA—Siempre que se necesite agua, usar agua destilada.]

Método 1

La proteína en solución absorbe la luz UV a una longitud de onda de 280 nm debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, principalmente tirosina y triptófano. Esta propiedad es el fundamento del *Método 1*. La determinación de proteínas a 280 nm es principalmente una función del contenido de tirosina y triptófano de la proteína. Si la solución amortiguadora usada para disolver la proteína tiene una absorbancia elevada en relación a la del agua, hay una sustancia interferente que se puede compensar cuando el espectrofotómetro se ajusta a cero con la solución amortiguadora. Si la interferencia da como resultado una absorbancia muy alta, los resultados podrían afectarse. Además, en concentraciones bajas, la proteína puede ser adsorbida en la cubeta, reduciendo así el contenido en solución. Esto puede evitarse preparando muestras más concentradas, o usando un detergente no iónico en la preparación. [NOTA—Mantener la *Solución de Prueba*, la *Solución Estándar* y la solución amortiguadora a la misma temperatura durante la prueba.]

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis en la solución amortiguadora apropiada para obtener una solución con una concentración de 0,2 a 2 mg por mL.

Solución Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, preparar una solución del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína en análisis en la misma solución amortiguadora y a la misma concentración que la *Solución de Prueba*.

Procedimiento—Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Solución Estándar* y de la *Solución de Prueba* en celdas de cuarzo a una longitud de onda de 280 nm con un espectrofotómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando la solución amortiguadora como blanco. Para obtener resultados exactos, la respuesta debe ser lineal para el intervalo de concentraciones de proteína a ser valoradas.

Dispersión de Luz—La exactitud de la determinación espectroscópica UV de la proteína puede disminuir si la muestra dispersa la luz. Si las proteínas en la solución existen como partículas de tamaño comparable con la longitud de onda de la luz de medición (250 a 300 nm), la dispersión del haz de luz produce un aumento aparente en la absorbancia de la muestra. Para calcular la absorbancia a 280 nm causada por la dispersión de luz, hay que determinar las absorbancias de la *Solución de Prueba* a longitudes de onda de 320; 325; 330; 335; 340; 345 y 350 nm. Usando el método de regresión lineal, trazar la gráfica del logaritmo de la absorbancia observada en función del logaritmo de la longitud de onda y determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados. A partir de la gráfica así obtenida, extrapolar el valor de absorbancia causada por la dispersión de luz a 280 nm. Restar la absorbancia por dispersión de luz debido a la absorbancia total a 280 nm para obtener el valor de absorbancia de la proteína en la solución. Para reducir el efecto de la dispersión de luz, en especial si la solución está muy turbia, se puede pasar la solución por un filtro con un tamaño de poro de 0,2 μm o se puede clarificar por centrifugación.

Cálculos—Calcular la concentración, C_u , de la proteína en la muestra de la prueba, por la fórmula:

$$C_s(A_u/A_s)$$

en donde C_s es la concentración de la *Solución Estándar*; y A_u y A_s son las absorbancias corregidas de la *Solución de Prueba* y la *Solución Estándar*, respectivamente (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)).

Método 2

Este método, comúnmente conocido como la valoración de Lowry, se basa en la propiedad que tienen las proteínas de reducir la mezcla cromogénica de los ácidos fosfomolibdico y tungstico en el reactivo Folin-Ciocalteu para fenoles, que produce una absorbancia máxima a 750 nm. El reactivo Folin-Ciocalteu para fenoles reacciona principalmente con residuos tirosina en la proteína, lo cual puede conducir a una variación en la respuesta cuando se valoran diferentes proteínas. Como el método es sensible a sustancias de interferencia, se puede usar un procedimiento para precipitar la proteína de la muestra. Cuando sea necesaria la separación de las sustancias de interferencia de la proteína en la muestra de la prueba, proceder según se indica a continuación para *Sustancias de Interferencia* antes de la preparación de la *Solución de Prueba*. El efecto de las sustancias de interferencia se puede minimizar por dilución, siempre que la concentración de la proteína en análisis continúe siendo suficiente para una medición exacta.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, disolver el Estándar de Referencia USP o el material de referencia para la proteína en análisis, en la solución amortiguadora usada para preparar la *Solución de Prueba*. Diluir porciones de esta solución con la misma solución amortiguadora para obtener no menos de cinco *Soluciones Estándar* con concentraciones uniformemente espaciadas entre 5 y 100 μg de proteína por mL.

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis, en la solución amortiguadora apropiada para obtener una solución con una concentración comprendida dentro del intervalo de concentraciones de las *Soluciones Estándar*. Una solución amortiguadora apropiada producirá un pH entre 10,0 y 10,5.

Blanco—Usar la solución amortiguadora utilizada para la *Solución de Prueba* y las *Soluciones Estándar*.

Reactivos y Soluciones—

Reactivo de Sulfato de Cobre—Disolver 100 mg de sulfato cúprico y 200 mg de tartrato de sodio en agua, diluir con agua a 50 mL y mezclar. Disolver 10 g de carbonato de sodio en agua a un volumen final de 50 mL y mezclar. Verter lentamente la solución de carbonato de sodio en la solución de sulfato de cobre, mezclando. Preparar esta solución a diario.

Solución de SDS—Disolver 5 g de dodecilsulfato de sodio en agua y diluir con agua a 100 mL.

Solución de Hidróxido de Sodio—Disolver 3,2 g de hidróxido de sodio en agua, diluir con agua a 100 mL y mezclar.

Reactivo de Cobre Alcalino—Preparar una mezcla de *Reactivo de Sulfato de Cobre*, *Solución de SDS* y *Solución de Hidróxido de Sodio* (1 : 2 : 1). Este reactivo se puede almacenar a temperatura ambiente hasta 2 semanas.

Reactivo Folin-Ciocalteu para Fenoles Diluido—Mezclar 10 mL de Folin-Ciocalteu para Fenoles SR con 50 mL de agua. Almacenar en un frasco ámbar, a temperatura ambiente.

Procedimiento—Agregar 1 mL de *Reactivo de Cobre Alcalino* a 1 mL cada *Solución Estándar*, a 1 mL de la *Solución de Prueba* y a 1 mL del *Blanco* y mezclar. Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Agregar 0,5 mL del *Reactivo Folin-Ciocalteu para Fenoles Diluido* a cada solución, mezclar inmediatamente cada tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Determinar las absorbancias de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* y la *Solución de Prueba* a la longitud de onda de absorbancia máxima a 750 nm con un espectrofotómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando la solución del *Blanco* para ajustar el instrumento a cero.

Cálculos—[NOTA—La absorbancia no es función lineal de concentración proteica; sin embargo, si el intervalo de concentración de la curva estándar es lo suficientemente pequeño, se aproxima a la linealidad.] Usando el método de regresión lineal, graficar las absorbancias de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* en función de las concentraciones de proteína y determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados. A partir de la curva estándar así obtenida y de la absorbancia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la *Solución de Prueba*.

SUSTANCIAS DE INTERFERENCIA

En el siguiente procedimiento, se agrega desoxicolato-ácido tricloroacético a una muestra, para eliminar las sustancias de interferencia por precipitación de las proteínas antes de hacer la prueba. Esta técnica también puede usarse para concentrar proteínas de una solución diluida.

Reactivo de Desoxicolato de Sodio—Preparar una solución de desoxicolato de sodio en agua, con una concentración de 150 mg en 100 mL.

Reactivo de Ácido Tricloroacético—Preparar una solución de ácido tricloroacético en agua, con una concentración de 72 g en 100 mL.

Procedimiento—Agregar 0,1 mL de *Reactivo de Desoxicolato de Sodio* a 1 mL de una solución de la proteína en análisis. Mezclar en un mezclador por vórtice y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Agregar 0,1 mL de *Reactivo de Ácido Tricloroacético* y mezclar en un mezclador por vórtice. Centrifugar a $3000 \times g$ durante 30 minutos, decantar el líquido y eliminar todo líquido residual con una pipeta. Volver a disolver el pellet de proteína en 1 mL de *Reactivo de Cobre Alcalino*. Proceder según se indica para la *Solución de Prueba*.

NOTA—El desarrollo del color alcanza un máximo entre los 20 y 30 minutos del comienzo de la incubación a temperatura ambiente, y después hay una pérdida gradual de color. La mayoría de las sustancias de interferencia reducen la intensidad del color; sin embargo, algunos detergentes causan un leve aumento del color. Una concentración alta de sal puede provocar la formación de un precipitado. Como las distintas especies de proteína pueden dar respuestas de color de distinta intensidad, la proteína estándar y la proteína de prueba deben ser la misma.

Método 3

Este método, comúnmente denominado ensayo de Bradford, se basa en el cambio de absorción de 470 nm a 595 nm que se observa cuando el colorante azul brillante G se une a la proteína. El colorante azul brillante G presenta más afinidad por los residuos arginilo y lisilo en la proteína lo que conduce a la variación en la respuesta de la valoración para diferentes proteínas.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, disolver el Estándar de Referencia USP o el material de referencia para la proteína en análisis en la solución amortiguadora usada para preparar la *Solución de Prueba*. Diluir porciones de esta solución con la misma solución amortiguadora para obtener no menos de cinco *Soluciones Estándar* que tengan concentraciones uniformemente espaciadas entre 100 µg y 1 mg de proteína por mL.

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis en la solución amortiguadora apropiada para obtener una solución con una concentración comprendida dentro del intervalo de concentraciones de las *Soluciones Estándar*.

Blanco—Usar la solución amortiguadora utilizada para preparar la *Solución de Prueba* y las *Soluciones Estándar*.

Reactivo de Coomassie—Disolver 100 mg de azul brillante G* en 50 mL de alcohol. [NOTA—No todos los colorantes tienen el mismo contenido de azul brillante G y distintos productos pueden dar resultados diferentes.] Agregar 100 mL de ácido fosfórico, diluir con agua a 1 L y mezclar. Pasar la solución a través de papel de filtro (Whatman N° 1 o equivalente) y almacenar el reactivo filtrado en un frasco ámbar a temperatura ambiente. [NOTA—El colorante precipita lentamente durante el almacenamiento del reactivo. Filtrar el reactivo antes de usarlo.]

Procedimiento—Agregar 5 mL del *Reactivo Coomassie* a 100 µL de cada *Solución Estándar*; a 100 µL de la *Solución de Prueba* y a 100 µL del *Blanco* y mezclar por inversión. Evitar la formación de espuma ya que altera la reproducibilidad. Determinar las absorbancias de las soluciones de las *Soluciones Estándar* y la *Solución de Prueba* a 595 nm con un espectrofotómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando el *Blanco* para ajustar el instrumento a cero. [NOTA—No emplear celdas de

cuarzo (sílice) en el espectrofotómetro dado que el colorante se une a este material. Como las distintas especies de proteína pueden dar respuestas de color de diferente intensidad, la proteína estándar y la proteína de prueba deben ser la misma.]

Hay relativamente pocas sustancias de interferencia, pero se deben evitar los detergentes y los anfólitos en la muestra de prueba. Las muestras muy alcalinas pueden interferir con el reactivo ácido.

Cálculos—[NOTA—La absorbancia no es función lineal de la concentración proteica; sin embargo, si el intervalo de concentración de la curva estándar es lo suficientemente pequeño, se aproxima a la linealidad.] Usando el método de regresión lineal, graficar las absorbancias de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* en función de las concentraciones de proteína y determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados. A partir de la curva estándar así obtenida y de la absorbancia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la *Solución de Prueba*.

Método 4

Este método, comúnmente denominado valoración con ácido bicinonínico o BCA, se basa en la propiedad que tienen las proteínas de reducir el ión cúprico (Cu^{2+}) a ión cuproso (Cu^{1+}). El reactivo de ácido bicinonínico se usa para detectar el ión cuproso. El método tiene pocas sustancias de interferencia. Cuando hay sustancias de interferencia presentes, se puede minimizar su efecto mediante dilución, siempre que la concentración de la proteína en análisis sea suficiente para una medición exacta.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, disolver el Estándar de Referencia USP o el material de referencia para la proteína en análisis, en la solución amortiguadora usada para preparar la *Solución de Prueba*. Diluir porciones de esta solución con la misma solución amortiguadora para obtener no menos de cinco *Soluciones Estándar* con concentraciones uniformemente espaciadas entre 10 µg y 1200 µg de proteína por mL.

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis en la solución amortiguadora apropiada para obtener una solución con una concentración comprendida dentro del intervalo de concentraciones de las *Soluciones Estándar*.

Blanco—Usar la solución amortiguadora utilizada para preparar la *Solución de Prueba* y las *Soluciones Estándar*.

Reactivos

Reactivo BCA—Disolver aproximadamente 10 g de ácido bicinonínico, 20 g de carbonato de sodio monohidrato, 1,6 g de tartrato de sodio, 4 g de hidróxido de sodio y 9,5 g de bicarbonato de sodio en agua. Ajustar, si es necesario, hasta un pH de 11,25 con hidróxido de sodio o con bicarbonato de sodio. Diluir con agua a 1 L y mezclar.

Reactivo de Sulfato de Cobre—Disolver aproximadamente 2 g de sulfato cúprico en agua a un volumen final de 50 mL.

Reactivo Cobre-BCA—Mezclar 1 mL de *Reactivo de Sulfato de Cobre* y 50 mL de *Reactivo BCA*.

Procedimiento—Agregar 2 mL de *Reactivo de Cobre-BCA* a 0,1 mL de cada *Solución Estándar*; 0,1 mL de la *Solución de Prueba* y 0,1 mL del *Blanco*, y mezclar. Incubar las soluciones a 37° durante 30 minutos, anotar el tiempo y dejar que lleguen a temperatura ambiente. Dentro de los 60 minutos siguientes a la incubación, determinar las absorbancias de las soluciones de las *Soluciones Estándar* y la *Solución de Prueba* en celdas de cuarzo a 562 nm, con un espectrofotómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando la solución *Blanco* para ajustar el instrumento a cero. Después de enfriar las soluciones a temperatura ambiente, la intensidad del color continúa aumentando gradualmente. Si hay sustancias presentes que causen interferencias en la prueba, proceder según se indica en *Sustancias de Interferencia* en el *Método 2*. Como las distintas especies de proteína pueden dar respuestas de color de distinta intensidad, la proteína estándar y la proteína de prueba deben ser la misma.

Cálculos—[NOTA—La absorbancia no es función lineal de la concentración proteica; sin embargo, si el intervalo de concentración de la curva estándar es lo suficientemente pequeño, se aproxima a la linealidad.] Usando el método de regresión lineal, graficar las absorbancias de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar*

* La pureza del colorante es importante en la preparación del reactivo. Serva Blue G (Crescent Chemical Company, Hauppauge, NY) es un grado aceptable.

en función de las concentraciones de proteína y determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados. A partir de la curva estándar así obtenida y de la absorbancia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la *Solución de Prueba*.

Método 5

Este método, comúnmente denominado valoración de Biuret, se basa en la interacción del ión cúprico (Cu^{2+}) con la proteína en una solución alcalina y el desarrollo de absorbancia a 545 nm.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, preparar una solución de Albúmina Humana, para la cual se haya determinado previamente el contenido proteico por análisis de nitrógeno (usando el factor de conversión nitrógeno-proteína de 6,25) o del Estándar de Referencia USP o material de referencia para la proteína en análisis en solución de cloruro de sodio (9 en 1000). Diluir porciones de esta solución con solución de cloruro de sodio (9 en 1000) para obtener no menos de tres *Soluciones Estándar* con concentraciones uniformemente espaciadas entre 0,5 y 10 mg por mL. [NOTA—Pueden observarse respuestas bajas si la muestra en análisis tiene un nivel de prolina significativamente diferente al de la Albúmina Humana. En dichos casos se puede emplear una proteína estándar diferente.]

Solución de Prueba—Preparar una solución de la proteína de prueba en solución de cloruro de sodio (9 en 1000), con una concentración comprendida dentro del intervalo de las concentraciones de las *Soluciones Estándar*.

Blanco—Usar solución de cloruro de sodio (9 en 1000).

Reactivo de Biuret—Disolver aproximadamente 3,46 g de sulfato cúprico en 10 mL de agua caliente y dejar enfriar (*Solución 1*). Disolver aproximadamente 34,6 g de citrato de sodio dihidrato y 20,0 g de carbonato de sodio en 80 mL de agua caliente y dejar enfriar (*Solución 2*). Mezclar la *Solución 1* y la *Solución 2* y diluir con agua a 200 mL. Este *Reactivo de Biuret* es estable a temperatura ambiente durante 6 meses. No usar el reactivo si aparece turbidez o contiene algún precipitado.

Procedimiento—A un volumen de una solución de la *Solución de prueba*, agregar un volumen igual de solución de hidróxido de sodio (6 en 100) y mezclar. Agregar inmediatamente un volumen de *Reactivo de Biuret* equivalente a 0,4 volúmenes de la *Solución de Prueba* y mezclar. Dejar en reposo a una temperatura ambiente entre 15° y 25°, durante no menos de 15 minutos. Dentro de los 90 minutos siguientes a la adición del *Reactivo de Biuret*, determinar las absorbancias de las *Soluciones Estándar* y de la solución obtenida de la *Solución de Prueba* a la longitud de onda de absorbancia máxima a 545 nm con un espectrofotómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), usando el *Blanco* para ajustar el instrumento a cero. [NOTA—Toda solución que desarrolle turbidez, o un precipitado, no es aceptable para el cálculo de la concentración proteica.]

Cálculos—Usando el método de regresión lineal de cuadrados mínimos, graficar las absorbancias de las *Soluciones Estándar* en función de las concentraciones de proteína, determinando la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados y calcular el coeficiente de correlación para la misma. [NOTA—Dentro del intervalo dado de los estándares, la relación entre la absorbancia y la concentración proteica es aproximadamente lineal.] Un sistema adecuado es aquel que produce una línea con un coeficiente de correlación de no menos de 0,99. A partir de la curva estándar y de la absorbancia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la muestra, haciendo las correcciones necesarias.

Sustancias de Interferencia—A fin de minimizar el efecto de las sustancias de interferencia, se puede precipitar la proteína en la muestra de prueba inicial, como se indica a continuación. Agregar 0,1 volúmenes de ácido tricloroacético al 50% a 1 volumen de una solución de la muestra de prueba, retirar la capa sobrenadante y disolver el precipitado en un volumen pequeño de hidróxido de sodio 0,5 N. Usar la solución así obtenida para preparar la *Solución de Prueba*.

Comentarios—Esta prueba muestra una diferencia mínima entre muestras de IgG y de albúmina equivalentes. La adición de hidróxido de sodio y del *Reactivo de Biuret* como reactivo

combinado, la mezcla insuficiente después de la adición del hidróxido de sodio o un tiempo prolongado entre la adición de la solución de hidróxido de sodio y la adición del *Reactivo de Biuret* produce para las muestras de IgG una respuesta más alta que para las muestras de albúmina. El método de ácido tricloroacético usado para minimizar los efectos de sustancias de interferencia también se puede usar para determinar el contenido proteico en muestras de prueba con concentraciones por debajo de 500 µg por mL.

Método 6

Este método fluorométrico se basa en la derivatización de la proteína con *o*-ftalaldehído (OPA), que reacciona con las aminas primarias de la proteína (es decir, el aminoácido NH_2 -terminal y el grupo ϵ -amino de los residuos lisina). La sensibilidad de la prueba puede aumentarse hidrolizando la proteína antes de realizar la prueba. Mediante hidrólisis los grupos α -amino de los aminoácidos constituyentes de la proteína quedan disponibles para reaccionar con el reactivo *o*-ftalaldehído. El método requiere cantidades muy pequeñas de la proteína.

Las aminas primarias, tales como el tris(hidroximetil)aminometano y las soluciones amortiguadoras de aminoácidos, reaccionan con el *o*-ftalaldehído y deben evitarse o eliminarse. El amoníaco en concentraciones altas reacciona también con el *o*-ftalaldehído. La fluorescencia obtenida cuando la amina reacciona con el *o*-ftalaldehído puede ser inestable. El uso de procedimientos automatizados para estandarizar este procedimiento puede mejorar la exactitud y la precisión de la prueba.

Soluciones Estándar—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, disolver el Estándar de Referencia USP o el material de referencia para la proteína en análisis, en la solución amortiguadora usada para preparar la *Solución de Prueba*. Diluir porciones de esta solución con la misma solución amortiguadora para obtener no menos de cinco *Soluciones Estándar* con concentraciones uniformemente espaciadas entre 10 y 200 µg de proteína por mL.

Solución de Prueba—Disolver una cantidad adecuada de la proteína en análisis en la solución amortiguadora adecuada para obtener una solución con una concentración comprendida dentro del intervalo de concentraciones de las *Soluciones Estándar*.

Blanco—Usar la solución amortiguadora utilizada para preparar la *Solución de Prueba* y las *Soluciones Estándar*.

Reactivos—

Solución Amortiguadora de Borato—Disolver aproximadamente 61,83 g de ácido bórico en agua y ajustar con hidróxido de potasio, hasta un pH de 10,4. Diluir con agua a 1 L y mezclar.

Reactivo OPA Madre—Disolver aproximadamente 120 mg de *o*-ftalaldehído en 1,5 mL de metanol, agregar 100 mL de *Solución Amortiguadora de Borato* y mezclar. Agregar 0,6 mL de éter polioxietilén (23) laurílico y mezclar. Esta solución es estable a temperatura ambiente durante al menos 3 semanas.

Reactivo OPA—A 5 mL de *Reactivo OPA Madre*, agregar 15 µL de 2-mercaptoetanol. Preparar al menos 30 minutos antes de usar. Este reactivo es estable durante un día.

Procedimiento—Ajustar cada una de las *Soluciones Estándar* y la *Solución de Prueba* a un pH entre 8 y 10,5. Mezclar 10 µL de la *Solución de Prueba* y 10 µL de cada una de las *Soluciones Estándar* con 100 µL de *Reactivo OPA* y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Agregar 3 mL de hidróxido de sodio 0,5 N y mezclar. Usando un fluorómetro adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)), determinar las intensidades de fluorescencia de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* y de la *Solución de Prueba* a una longitud de onda de excitación de 340 nm y a una longitud de onda de emisión entre 440 y 455 nm. [NOTA—La fluorescencia de una muestra individual se lee sólo una vez, porque la irradiación disminuye la intensidad de la fluorescencia.]

Cálculos—La fluorescencia es función lineal de la concentración proteica. Usando el método de regresión lineal, graficar las intensidades de fluorescencia de las soluciones obtenidas de las *Soluciones Estándar* en función de las concentraciones de proteína y determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos

graficados. A partir de la curva estándar así obtenida y de la intensidad de fluorescencia de la *Solución de Prueba*, determinar la concentración proteica de la muestra.

Método 7

Este método se basa en el análisis de nitrógeno como un medio de determinación de proteína. La interferencia causada por la presencia de otras sustancias nitrogenadas en la muestra pueden afectar la determinación de proteína por este método. Las técnicas de análisis de nitrógeno destruyen la proteína en análisis, pero no se limitan a la determinación de proteínas en un medio acuoso.

Procedimiento 1—Determinar el contenido de nitrógeno de la proteína en análisis según se indica en *Determinación de Nitrógeno* (461). Hay instrumental disponible comercialmente para la valoración de nitrógeno por el método de Kjeldahl.

Procedimiento 2—Hay instrumental disponible comercialmente para análisis de nitrógeno. La mayoría de los instrumentos para análisis de nitrógeno emplean pirólisis (es decir, la combustión de la muestra en oxígeno a temperaturas cercanas a los 1000°), produciéndose óxido nítrico (NO) y óxidos de nitrógeno similares (NO_x) a partir del nitrógeno presente en la proteína de prueba. Algunos instrumentos convierten los óxidos nítricos en gas nitrógeno, que se cuantifica con un detector de conductividad térmica. Otros instrumentos mezclan el óxido nítrico (NO) con ozono (O₃) formándose dióxido de nitrógeno excitado (NO₂), que emite luz cuando se desintegra y se puede cuantificar con un detector de quimioluminiscencia. Se usa un material de referencia de proteína o un estándar de referencia que sea relativamente puro y similar en composición a las proteínas de la prueba para optimizar los parámetros de inyección y pirólisis y para evaluar la uniformidad en el análisis.

Cálculos—La concentración proteica se calcula dividiendo el contenido de nitrógeno de la muestra por el contenido conocido de nitrógeno de la proteína. El contenido conocido de nitrógeno de la proteína se puede determinar a partir de la composición química de la proteína, o por comparación con el contenido de nitrógeno del Estándar de Referencia USP o del material de referencia. ■^{1S} (USP30)

(1065) CROMATOGRFÍA IÓNICA

Cambio en la redacción:

APARATOS

Los instrumentos utilizados en la CI se asemejan en gran medida a los utilizados en la HPLC convencional. Los componentes típicos incluyen un muestreador automático, una bomba de alta presión, una válvula de inyección con un bucle de muestra de tamaño adecuado (normalmente de 10 a 250 µL), una guarda columna, una columna analítica, un supresor opcional u otras formas de sistema de reacción posterior al paso por columna, un detector de flujo continuo y un sistema de datos cuya complejidad puede variar desde un integrador a un sistema de datos computarizado (*Figura 1*). Dado que, por lo general, las fases móviles consisten en soluciones diluidas de ácidos, álcalis o sales, los componentes que están en contacto con la fase móvil y la muestra suelen realizarse a partir de materiales inertes, como por ejemplo polieterecetona (PEEK, por sus siglas en inglés). También pueden utilizarse los sistemas HPLC convencionales siempre que sus componentes sean compatibles con la fase móvil y las soluciones de muestras inyectadas. ■ Se debe usar un sistema exento de metales para el análisis de trazas de metales. ■^{1S} (USP30) Después de una preparación adecuada, la muestra se introduce a través de la válvula de inyección. Seguido de la supresión química opcional u otra reacción posterior al paso por columna en el efuente de la columna, se detectan las especies de analitos empleando conductividad, amperometría, UV/VIS u otras

técnicas de detección. Dado que la CI utiliza una fase móvil predominantemente iónica, suele requerirse un supresor antes de la detección conductimétrica, aunque la detección conductimétrica no suprimida se ha utilizado con éxito en el análisis farmacéutico.

Fases Estacionarias y Fases Móviles

Con el desarrollo y perfeccionamiento de la CI como técnica instrumental, ha aumentado el número de materiales de intercambio iónico desarrollados para esta técnica gracias a la comprensión de los procesos que tienen lugar en la superficie de la fase estacionaria. A diferencia del relleno de la columna de sílice predominante en la HPLC clásica, en la CI se utilizan principalmente polímeros orgánicos como materiales de soporte. Este tipo de materiales presenta una mayor estabilidad ante valores de pH extremos y, en muchos casos, son compatibles con los disolventes orgánicos. Normalmente, la separación de los aniones requiere el uso de intercambiadores de aniones a base de polímeros y bases diluidas como fases móviles. Sin embargo, para la separación de los cationes, la estabilidad en toda la gama de pH que es típica de los polímeros orgánicos no es necesaria, ya que los ácidos diluidos sirven como fases móviles. En consecuencia, para la separación de cationes suelen utilizarse intercambiadores de cationes a base de sílice que presentan una eficiencia cromatográfica considerablemente superior.

Según la técnica de separación empleada (intercambio iónico, exclusión iónica o pares iónicos), se utilizan diferentes tipos de fases estacionarias. En el caso del intercambio iónico, se utiliza como fase estacionaria un intercambiador de aniones o de cationes. Por lo general, se utiliza un intercambiador de cationes fuerte para la separación de ácidos orgánicos mediante exclusión iónica y una fase estacionaria en reversa cuando se utiliza la técnica de separación por pares iónicos. La capacidad de intercambio iónico de una resina se define como el número de sitios de intercambio iónico por peso equivalente al relleno de la columna y suele expresarse en mEq por g de resina. En el caso del intercambio iónico, los tiempos de retención de los iones de analito aumentan cuando aumenta la capacidad de intercambio iónico de la resina. Este efecto puede compensarse en parte utilizando fases móviles de mayor concentración iónica. En el proceso de fabricación de los intercambiadores iónicos a base de polímeros se utilizan copolímeros de estireno/divinilbenceno, polimetacrilato y resinas polivinílicas como materiales de sustrato. Los polímeros orgánicos actúan directamente en su superficie, a excepción de los intercambiadores iónicos a base de látex, en los que la partícula de látex totalmente porosa actúa como material de intercambio iónico. Los sustratos “películaes” que actúan en la superficie presentan una eficiencia cromatográfica mucho mayor en comparación con las resinas de actuación integral.

En el intercambio iónico, para lograr la separación se utiliza una fase móvil compuesta por especies iónicas monovalentes o divalentes, solas o mezcladas en una proporción óptima. En los métodos de exclusión iónica, particularmente para los ácidos orgánicos, la fase móvil consta de ácidos minerales para mantener los ácidos orgánicos en sus formas no disociadas. Con frecuencia, la naturaleza del analito determina la fase móvil y el método de detección utilizados. A continuación, en la sección sobre detectores, se describen las fases móviles típicamente utilizadas en la CI.

Detectores

La detección por conductividad es, sin duda, el método de detección más utilizado en CI. A pesar de que las tareas de desarrollo original de la CI incluían el uso de resinas de intercambio iónico de baja capacidad con el fin de lograr una separación cromatográfica y una detección conductimétrica de iones que fueran eficientes, en una fase móvil químicamente suprimida, los avances en tecnologías de columna y el desarrollo del instrumental permiten, en la actualidad, el uso de intercambio iónico de alta capacidad.

En la CI suprimida, la conductancia de fondo de la fase móvil iónica se reduce considerablemente a medida que fluye a través del dispositivo de supresión. Por ejemplo, el NaOH diluido, aproximadamente de 10 a 50 mM, usado como fase móvil en CI de aniones se convierte a H₂O (escasa conductividad) cuando el efuente de la columna que contiene NaOH fluye a través de un dispositivo supresor presente en forma ácida. Las especies iónicas del analito en

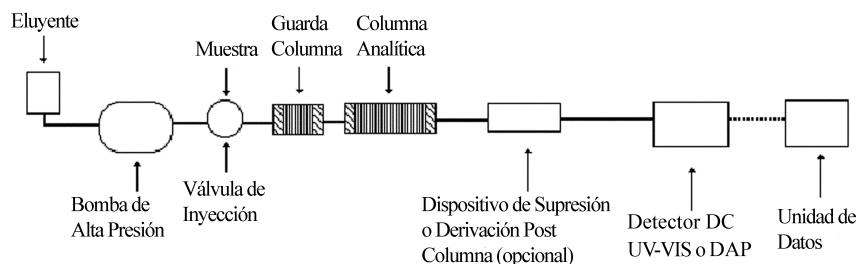


Figura 1. Ilustración esquemática de los componentes de un sistema de CI típico; DC = detector de conductividad y DAP = detector amperométrico por pulsos

el efuente de la columna se convierten de su forma salina a base de sodio o de otro metal a formas ácidas altamente conductoras (debido a la mayor conductancia equivalente de los iones de hidrógeno en comparación con otros cationes). Se producen reacciones análogas en el supresor de forma de hidróxido en la CI de cationes, en la que la fase móvil ácida se convierte en agua y los cationes del analito se convierten en formas de hidróxido altamente conductoras (debido a la mayor conductancia equivalente de los iones de hidróxido en comparación con otros aniones).

La reducción en la conductancia de fondo y el aumento en la señal debido a las especies iónicas dan como resultado una relación señal-ruido mejorada para la detección conductimétrica de iones en CI suprimida. Esto produce una reducción en el ruido de fondo y un aumento en la sensibilidad y en la capacidad de reproducción del análisis. Los dispositivos de supresión química comúnmente utilizados se encuentran en una de tres categorías generales. En la primera, las reacciones se producen a través de una membrana de intercambio iónico y los iones regeneradores son proporcionados por un producto químico o bien como productos de la electrólisis del agua. En la segunda, las reacciones de supresión se producen en un lecho de material de resina de alta capacidad de intercambio, relleno, y la regeneración se obtiene mediante un producto químico o por la electrólisis del agua. En la tercera, aunque no son muy utilizados, las reacciones de supresión tienen lugar cuando el flujo de efuente se mezcla con el flujo de material de resina de alta capacidad.

En el caso de análisis farmacéuticos, la detección conductimétrica suprimida puede utilizarse para detectar trazas de iones en aguas de alta pureza. Las fases móviles más utilizadas para la separación de aniones mediante CI suprimida incluyen iones de hidróxido o una mezcla de iones de bicarbonato y carbonato. Las fases móviles normalmente utilizadas para la separación de cationes constan, por lo general, de ácidos minerales o de ácido metanosulfónico.

Los análisis por cromatografía iónica también pueden realizarse sin supresión química, en cuyo caso el efuente de la columna analítica fluye directamente a un detector de conductividad. Los eluyentes normalmente utilizados en CI no suprimida son ácido ftálico y ácido *p*-hidroxibenzoico para la determinación de aniones y ácido metanosulfónico para la determinación de cationes. Los valores de conductancia equivalentes del cloruro, del sulfato y de otros aniones comunes son considerablemente mayores que los del anión del eluyente y, en consecuencia, se detecta un pico positivo cuando los aniones pasan por el detector. Los valores de conductancia equivalentes del sodio, del potasio, del calcio, del magnesio y de otros cationes comunes son considerablemente menores que los del catión (H^+) del eluyente. En este caso, se detecta un pico negativo cuando los cationes pasan por el detector.

La CI no suprimida es más fácil de realizar y es una técnica útil para determinar los iones de ácidos débiles como cianuro y sulfuro, que son no conductores después de la supresión química pero presentan un ruido inicial más elevado. Los análisis farmacéuticos pueden realizarse en el modo no suprimido debido a que los límites de cuantificación en mg por L suelen encontrarse en los niveles porcentuales superiores a bajos. Si bien por lo general deben implementarse metodologías con supresión química en los sistemas de instrumentos diseñados específicamente para este propósito, la CI

puede realizarse sin el supresor en una HPLC ya existente. Esto es posible debido a que los eluyentes normalmente utilizados en la CI incluyen bases o ácidos diluidos que sean compatibles con los instrumentos de HPLC ya existentes. Al considerar este método, se recomienda a los analistas que consulten al fabricante del instrumento para verificar su aplicabilidad en el análisis por CI.

OTROS DETECTORES

Otras técnicas de detección comúnmente utilizadas en CI incluyen amperometría por pulsos, detección UV directa o derivación posterior al paso por columna seguida por detección UV/VIS.

Técnica de Detección Amperométrica Por Pulsos (DAP)—Esta técnica es una variante especializada de la técnica amperométrica convencional. Este tipo de detector suele utilizarse para la detección de especies electroactivas, por ejemplo, compuestos orgánicos como por ejemplo carbohidratos, alcoholes de azúcar, aminoácidos y especies de azufre orgánico. En esta técnica, los analitos se detectan mediante un proceso de desorción oxidativa en la superficie de un electrodo ubicado en el flujo de efuente de la columna. Después del proceso de detección, se aplica una serie de potenciales durante períodos fijos para limpiar la superficie del electrodo. A diferencia de la amperometría convencional en la que la superficie del electrodo se ensucia, en esta variante se aplica una secuencia de potenciales de trabajo diferentes de rápida reiteración, denominada forma de onda, que ayuda a eliminar los productos de las reacciones redox de la superficie del electrodo.

Detección UV Directa y Indirecta^{1S (USP30)}—La Detección UV Directa se utiliza para iones inorgánicos y orgánicos que poseen un cromóforo UV. Estos incluyen ácidos orgánicos, bromuro, yoduro, nitrato, nitrito, tiosulfato y complejos cianometálicos. En forma análoga a la detección conductimétrica inversa de cationes, la detección UV también puede realizarse en forma indirecta. Este método se conoce como cromatografía fotométrica indirecta (CFI).

Detección Fotométrica—La detección fotométrica consiste en la **quelación**^{1S (USP30)} de **iones metálicos** en el **1S (USP30)** efuente de la columna con un reactivo colorante antes de su detección a una longitud de onda visible. Un ejemplo clásico es la separación de iones metálicos en la que el efuente de la columna se **quela**^{1S (USP30)} con 4-(2-piridilazo)-resorcinol seguido por su detección en un margen de 510 nm a 530 nm.

Agregar lo siguiente:

■<1070> AMBULANCIAS Y VEHÍCULOS PARA SERVICIOS MÉDICOS DE EMERGENCIA—ALMACENAMIENTO DE PREPARACIONES

El almacenamiento y manipulación de productos farmacéuticos en ambulancias y vehículos de emergencia debe realizarse de tal manera que se conserven los atributos de los artículos oficiales. En el momento de formular, evaluar, implementar y reevaluar periódicamente un plan eficaz se deben considerar varias prácticas. Dichas prácticas se enumeran en este capítulo.

Se deben implementar dispositivos de monitoreo para registrar las temperaturas semanales y permitir el cálculo de la temperatura cinética media (MKT, por sus siglas en inglés) a fin de cumplir con el almacenamiento a temperatura ambiente controlada en los vehículos utilizados en forma continuada. También se debe realizar la medición durante un período típico de desafío de 24 horas y utilizar la temperatura obtenida para el cálculo de la MKT y de la temperatura de almacenamiento de la muestra.

MONITOREO DEL GABINETE DE ALMACENAMIENTO FARMACÉUTICO; UBICACIÓN DE VEHÍCULOS ESTACIONADOS

Se debe monitorear las ambulancias y otros vehículos de asistencia médica de emergencia que transportan habitualmente artículos farmacéuticos para verificar que los perfiles de temperatura y los maletines refrigerados o gabinetes de almacenamiento farmacéutico a bordo se encuentren dentro de los límites establecidos. Se deben colocar dispositivos de monitoreo adecuados en el gabinete farmacéutico de cada vehículo para registrar las temperaturas máximas y mínimas, por lo menos, de cada día cálido de verano y cada día frío de invierno. Para evitar temperaturas extremas, el personal de las ambulancias debe contemplar el estacionamiento de los vehículos en la sombra o en garages con aire acondicionado en el verano o en garages calefaccionados en el invierno.

ROTACIÓN DE INVENTARIO

Se debe implementar un programa de rotación regular de inventario para artículos de baja rotación. Se entiende como rotación a la transferencia de los artículos rotulados adecuadamente como artículos de inventario a una instalación de clima controlado adecuada o gabinete de almacenamiento tal como en la célula sanitaria de la ambulancia. El almacenamiento de cada artículo fuera del vehículo está sujeto al requisito de almacenamiento en el etiquetado aprobado o en la monografía USP pertinente.

ALMACENAMIENTO Y MONITOREO DE LA CAJA PORTÁTIL

Las bolsas o cajas portátiles en las que se guardan fármacos deben ser aisladas y, cuando no se utilizan, se deben guardar en un gabinete de almacenamiento farmacéutico o en instalaciones a temperatura ambiente controlada. Cuando se indique, se debe considerar el almacenamiento sólo en bolsas o cajas portátiles, más que en gabinetes a bordo, para facilitar la rotación de inventario. Se recomienda el uso de indicadores de tiempo y temperatura para monitorear el daño acumulativo al contenido de todos los compartimientos.

REQUISITOS ADICIONALES PARA ALGUNOS ARTÍCULOS

Se debe proteger a todos los artículos del calor excesivo (40°). Si el artículo requiere almacenamiento en un lugar frío o seco o a temperatura ambiente controlada se deberá tomar medidas adecuadas para mantenerlo dentro de los límites definidos (ver *Conservación, Envasado, Almacenamiento y Etiquetado en Advertencias y Requisitos Generales*). Los artículos con los requisitos de almacenamiento más rigurosos determinan el almacenamiento de cargas mixtas.

ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE PREPARACIONES SENSIBLES

No se debe almacenar las preparaciones sensibles al medio ambiente en vehículos de atención de emergencias a menos que el gabinete a bordo en el que se almacenen los medicamentos sea de clima controlado o que se fije un indicador de tiempo y temperatura a cada envase. Si este tipo de preparaciones se debe guardar en el vehículo de servicios médicos de emergencia, deberá rotarse el suministro de medicamentos con el inventario de reserva de acuerdo con un plan basado en el clima local, pero que no exceda de 3 días.

USO DE INDICADORES DE TIEMPO Y TEMPERATURA

Fijar indicadores de tiempo y temperatura a cada *preparación termolábil* en la que el tiempo fuera del gabinete a bordo puede exceder un total de 4 días. Los gabinetes a bordo deben ser aislados y, mientras tengan medicamentos en su interior, se deberán usar los dispositivos de calefacción y refrigeración de acuerdo con el clima local y según se especifique para las preparaciones. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■<1080> EXCIPIENTES FARMACÉUTICOS A GRANEL—CERTIFICADO DE ANÁLISIS

ANTECEDENTES

Este capítulo de información general deriva de la *Certificate of Analysis Guide for Bulk Pharmaceutical Excipients* (Guía para el Certificado de Análisis de Excipientes Farmacéuticos a Granel), preparada por el Consejo Internacional sobre Excipientes Farmacéuticos de las Américas (IPEC-Américas, por sus siglas en inglés), documento internacional guía para la preparación y el uso apropiado de un Certificado de Análisis (COA, por sus siglas en inglés) para estos excipientes, en adelante denominados “excipientes”. El capítulo define los elementos sugeridos de un Certificado de Análisis, proporciona un modelo para organizar de manera lógica los datos requeridos y opcionales y ayuda a establecer una comprensión uniforme de las funciones y responsabilidades de los fabricantes, distribuidores y usuarios de excipientes.

Los principios y la información de este capítulo se pueden aplicar a la fabricación de todos los excipientes farmacéuticos a granel destinados a ser utilizados en medicamentos para uso humano, medicamentos para uso veterinario y productos biológicos. Como documento guía internacional, no es posible especificar todos los requisitos legales nacionales ni abarcar en detalle las características particulares de todos los excipientes. Cuando se considere el uso de este capítulo, cada fabricante, distribuidor o usuario debe tener en cuenta cómo podría aplicarse a los productos y procesos de ese

fabricante específico. La diversidad de excipientes implica que algunos de los principios de este capítulo podrían no ser aplicables a determinados productos y procesos.

El capítulo está dividido en varias partes. La primera proporciona los antecedentes necesarios para el diseño y los elementos sugeridos de un COA. Se suministra un modelo con el fin de mostrar el formato y la localización de la información en el COA. A continuación se ofrece una discusión detallada para garantizar la comprensión del propósito y significado de la información específica contenida en el COA. Ver en el *Apéndice 1*, una lista de términos usados en este capítulo de información y sus definiciones.

GUÍA GENERAL

Los reglamentos internacionales que rigen los medicamentos exigen que sus componentes se fabriquen, procesen, envasen y conserven de conformidad con las buenas prácticas de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés). Para una explicación detallada de las GMP que aplican a la fabricación de excipientes, ver *Buenas Prácticas de Fabricación para Excipientes Farmacéuticos a Granel* (1078). Un excipiente es con frecuencia una sustancia natural, una mezcla o un polímero, cuyas propiedades químicas y físicas son difíciles de cuantificar y que se usa a menudo con una amplia gama de ingredientes farmacéuticos activos y en una gran variedad de formas farmacéuticas terminadas. Hasta el momento, no se contaba con documentos guía que se enfocaran específicamente en el contenido o formato de los COA para excipientes y que trataran la diversidad tanto de los excipientes como de su uso.

Preparación y Uso Apropriado de un Certificado de Análisis—El proveedor del material debe preparar y emitir el Certificado de Análisis para excipientes, de acuerdo con las pautas generales que se discuten a continuación. La responsabilidad primordial de preparar el COA recae en el fabricante del excipiente. Es de suma importancia que el usuario del excipiente reciba un COA completo y exacto para lotes o partidas específicos destinados a ser usados en la industria farmacéutica. El distribuidor de excipientes debe tener en cuenta ciertas consideraciones adicionales para la preparación y emisión de un COA.

El usuario de un excipiente farmacéutico a granel debe recibir siempre un COA para el material que se usará en la fabricación de un medicamento. Como mínimo, el usuario deberá efectuar pruebas de identificación adecuadas en cada lote de excipiente recibido antes de liberarlo para su uso en el medicamento. Siempre que sea posible se deben usar pruebas de identidad específicas. Según los requisitos reglamentarios, se debe evaluar la conformidad de los excipientes con todas las especificaciones correspondientes. Sin embargo, es posible que no se requiera el análisis de todos los parámetros de especificación para la liberación de un lote, si en el COA del proveedor se han proporcionado las garantías de cumplimiento adecuadas. Antes de usar un excipiente en un producto farmacéutico basándose en datos del COA, el usuario debe conocer los sistemas de control del proveedor y su cumplimiento con las GMP, a través de auditorías apropiadas o de la calificación del proveedor.

No obstante, es responsabilidad del usuario del excipiente la verificación de cualquiera de los datos analíticos contenidos en el COA, si el conocimiento de dicha información se considera esencial para el uso de ese excipiente. Dichas pruebas pueden salirse del alcance de los métodos farmacopeicos descritos en el *NF*, o de los usados para desarrollar la información en el COA.

Para usar los resultados de las pruebas de un COA, el usuario debe también determinar la confiabilidad de los resultados de las pruebas del COA del proveedor, efectuando periódicamente todas las pruebas requeridas y comparando los resultados obtenidos con los suministrados por el proveedor. Ocasionalmente, puede que no sea posible efectuar todas las pruebas requeridas debido a que los equipos especiales necesarios, etc., no se encuentran disponibles para el usuario. Puede ser aceptable efectuar menos pruebas que las indicadas, siempre y cuando la confiabilidad del proveedor se establezca adecuadamente con otras técnicas de calificación apropiadas.

Es importante comprender que estos resultados pueden no siempre correlacionarse específicamente, en especial cuando un excipiente se produce como un lote continuo. Sin embargo, los resultados de las pruebas del usuario deben demostrar el cumplimiento con los requisitos de las especificaciones.

Uso de Instalaciones Contratadas—En la fabricación, prueba y distribución de excipientes se usan con frecuencia instalaciones contratadas. En esos casos, el proveedor del excipiente tiene la obligación de garantizar que las instalaciones funcionen bajo normas de calidad apropiadas (es decir, cGMP, GLP, etc.).

DISEÑO Y ELEMENTOS SUGERIDOS DE UN CERTIFICADO DE ANÁLISIS

A continuación se enumeran los elementos sugeridos de un COA y se incluyen en la sección *Modelo de Certificado de Análisis* de este capítulo. Los proveedores de excipientes pueden organizar a su discreción los elementos sugeridos presentados en el modelo de COA; sin embargo, las partes de este modelo fueron diseñadas para presentar la información sugerida y opcional en una forma lógica. Ver más adelante en este capítulo, una descripción detallada de cada elemento y ejemplos de declaraciones.

El origen e identidad del excipiente se establecen por lo general en una sección llamada *Encabezado*. El fabricante y el lugar de fabricación deben identificarse si son diferentes del proveedor y de la ubicación del proveedor, lo que permite al usuario asegurarse de que el excipiente proviene de una fuente calificada. Aunque el nombre de fabricante debe ser informado al usuario, es aceptable el uso de códigos para fabricantes y lugares de fabricación en el COA, con el fin de proteger la confidencialidad. Se debe establecer inequívocamente la identidad del excipiente, indicando los nombre farmacopeico y comercial, el grado del material y las denominaciones farmacopeicas aplicables.

Un número de lote o partida u otro medio para identificar exclusivamente la cantidad de material cubierto por el COA y la información relacionada específicamente al mismo se incluyen, por lo general, en la sección denominada *Cuerpo*. El número de lote u otra identificación exclusiva del material, su fecha de fabricación y el código o número del producto deben declararse y poder rastrearse a un lote especificado. De ser procedente, en esta sección se incluye por lo general la fecha de caducidad, la fecha recomendada de reevaluación o cualquier otra declaración relevante relacionada con la estabilidad del excipiente. Cualquier información requerida por el cliente también se debería incluir aquí.

Los resultados reales de las pruebas que sean pertinentes a la cantidad del material cubierto en el COA se incluyen en la sección *Análisis*. El nombre de la prueba, el resultado, los criterios de aceptación o especificaciones y una referencia al método de prueba utilizado se deben incluir para cada característica enumerada. Se recomienda informar los datos y observaciones reales en lugar de las declaraciones inespecíficas “pasa” o “cumple”. Se debe anotar en el COA si los resultados informados derivan de un programa de análisis periódico de lotes (skip-lot) o de análisis de frecuencia reducida, un promedio o un resultado de pruebas durante el proceso.

La sección *Declaraciones de Cumplimiento y Certificación* se usa para enumerar los diversos tipos de declaraciones que pueden requerirse, dependiendo del excipiente y las necesidades específicas del usuario. Dichas declaraciones por lo general se negocian entre el proveedor y el usuario, basándose en los requisitos de aplicación específicos. En esta sección se incluye, por lo general, cualquier declaración del proveedor que se refiera al cumplimiento de otros requisitos farmacopeicos o reglamentarios adicionales.

Muchos excipientes tienen aplicaciones diferentes de las farmacéuticas, como por ejemplo en alimentos, cosméticos o productos industriales. Cualquier producto que declara cumplir con reglamentaciones específicas debe cumplir con las especificaciones y requisitos de esa reglamentación y fabricarse bajo las GMP correspondientes.

En el COA debe aparecer la identidad del individuo que aprueba el contenido del COA, así como el número de página y total de páginas del COA. Esta información se incluye por lo general en la sección de *Pie de página*.

MODELO DE CERTIFICADO DE ANÁLISIS

A continuación se presenta un modelo del contenido y formato de un COA.

Encabezado

- Titulado “Certificado de Análisis”
- Nombre de la Compañía, Dirección, Teléfono e Identidad del Fabricante y Lugar de Fabricación
- Nombre (farmacopeico/comercial) del Excipiente
- Grado del Excipiente
- Denominación Farmacopeica

Cuerpo

- Número de Lote/Partida
- Fecha de Fabricación
- Código o Número del Producto
- Fecha de Caducidad (según corresponda)
- Fecha Recomendada de Reevaluación (según corresponda)
- Declaración de Estabilidad (según corresponda)
- Información Requerida por el Cliente

Análisis

- Nombre de la Prueba
- Resultados de la Prueba
- Criterios de Aceptación (es decir, especificaciones)
- Referencia al Método de Prueba
- Referencia al Análisis Periódico de Lotes (según corresponda)
- Referencia al Promedio o a los Resultados de Prueba durante el Proceso (según corresponda)
- Fecha de Reanálisis (según corresponda)
- Resumen de Pruebas no Farmacopeicas (si las hubiera)

Declaraciones de Cumplimiento y Certificación

- Cumplimiento con las GMP
- Referencias Reglamentarias Adicionales
- Potencial para Cumplir Normas Farmacopeicas Adicionales
- Listado de Contenido y Grado de los Ingredientes (si fuera una mezcla)
- Otras Declaraciones Específicas de Cumplimiento [por ej., impurezas orgánicas volátiles, disolventes residuales, encefalopatía espongiforme transmisible (TSE, por sus siglas en inglés), etc.]

Pie de Página

- Identidad de la Persona Autorizada para la Aprobación
- Fecha de Aprobación
- Número de Página (es decir, 1 de __)

DENOMINACIÓN FARMACOPEICA

Para que un proveedor pueda declarar el grado farmacopeico de un excipiente en el COA, se deben cumplir dos requisitos. El primer requisito es que el excipiente sea fabricado de acuerdo con los principios reconocidos de GMP (ver *Advertencias y Requisitos Generales*). La adecuada conformidad con las GMP se debe demostrar también para los pasos subsiguientes en la distribución del excipiente. El segundo requisito es que el excipiente cumpla con todas las especificaciones contenidas en la monografía oficial correspondiente, a menos que su diferencia se declare en la etiqueta, según se define en *Advertencias y Requisitos Generales*. Cuando un excipiente se declara como de grado farmacopeico, se entiende que el material ha cumplido con los requisitos anteriores y el usuario podría confirmarlo a través de una auditoría apropiada del proveedor.

Las normas farmacopeicas definen lo que se considera un artículo aceptable y establecen también los procedimientos de prueba para demostrar conformidad con los requisitos. Estas normas son aplicables en cualquier momento de la vida del artículo, desde su producción hasta su consumo. Las especificaciones de liberación del proveedor y el cumplimiento de las GMP se desarrollan y siguen

para garantizar que el artículo, cuando se almacena de acuerdo con las condiciones recomendadas, cumple con las normas farmacopeicas hasta su fecha de caducidad o fecha recomendada de reevaluación.

Todo artículo farmacopeico debe estar constituido de forma tal que cuando se examine de acuerdo con estos procedimientos de prueba y valoración, cumpla con todos los requisitos en la monografía que lo define, así como con las provisiones en *Advertencias y Requisitos Generales* y en los capítulos generales, según corresponda. Sin embargo, no debe inferirse que la aplicación de todos los procedimientos analíticos de la monografía a muestras de cada una de las partidas de producción es un prerequisite necesario para asegurar el cumplimiento con las normas farmacopeicas antes de liberar las partidas para su distribución.

Los datos obtenidos a partir de los estudios de validación de procesos de fabricación y de controles durante el proceso pueden conferir mayores garantías sobre una partida, en lo que se refiere al cumplimiento de los requisitos de una monografía en particular, que la información analítica obtenida del examen de unidades terminadas de esa partida. Basándose en tales garantías, el proveedor puede omitir los procedimientos analíticos de la monografía al juzgar el cumplimiento de la partida con las normas farmacopeicas.

FECHAS EN UN CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Parte del objetivo general de estandarizar los COA para excipientes incluye una provisión para el informe uniforme de fechas apropiadas, significativas y bien definidas. A continuación se indican las fechas específicas que se esperan encontrar en el COA, junto con las definiciones de las mismas, con el fin de proporcionar a los proveedores y usuarios de excipientes una comprensión mutua de su significado. El uso de la terminología recomendada será útil para reducir la cantidad de preguntas recibidas sobre la información relativa a las fechas de los excipientes. No es aconsejable el uso de una terminología diferente de la que se discute a continuación, porque los términos pueden estar mal definidos y tener significados diferentes para el proveedor y el usuario de excipientes. Ejemplos de aquellos términos que **no** se deben usar incluyen “vida útil”, “fecha límite de uso”, “fecha de garantía” y “período de caducidad”.

Al informar fechas en un COA para excipientes, es importante usar un formato claro y sin ambigüedades con el fin de evitar posibles tergiversaciones. Para ello, se recomienda usar una designación alfa para el mes (puede ser abreviado), en vez de una representación numérica. Se recomienda también incluir los 4 dígitos en el año (por ej., Ene. 1, 2005 ó 1° ene. 2005).

Fecha de Fabricación—La fecha de fabricación se debe incluir en el COA para cada lote de excipiente y debe ser asignada por los proveedores basándose en sus políticas y procedimientos establecidos. Se sabe que los excipientes pueden fabricarse usando una gran variedad de procesos (por ej., continuo o por partida) que pueden requerir un período de varios días o más para completarse. Además, algunos excipientes pueden ser mezclas o combinaciones de otros excipientes y la producción puede incluir pasos de reprocesamiento. Debido a esta diversidad, el proveedor debe definir claramente la fecha de fabricación y aplicarla en forma uniforme al excipiente y al proceso específicos. Al informar la fecha de fabricación, el proveedor del excipiente debe indicar la fecha de terminación del proceso final de fabricación (según lo definido por el proveedor).

Cabe destacar que el reenvasado por sí solo no se considera un paso del procesamiento utilizado para determinar la fecha de fabricación. Con el fin de permitir la rastreabilidad de un lote específico de un excipiente, pueden requerirse otras fechas además de la de fabricación, que reflejen pasos adicionales como el reenvasado.

Fecha de Caducidad y Fecha Recomendada de Reevaluación—La estabilidad de los excipientes puede ser un factor importante en la estabilidad de las formas farmacéuticas terminadas que los contienen. Muchos excipientes son muy estables y pueden no requerir pruebas exhaustivas para demostrar la conformidad continua con las especificaciones pertinentes. Otros excipientes pueden sufrir cambios químicos, físicos y microbiológicos con el tiempo, que hacen que el producto se aleje de las especificaciones establecidas.

Las fechas apropiadas de caducidad y/o fechas recomendada de reevaluación para los excipientes se deben establecer a partir de los resultados de un programa documentado de pruebas de estabilidad o a partir de datos históricos. El programa de pruebas debe incluir las condiciones definidas y controladas de almacenamiento (por ej., temperatura y humedad), la consideración de los diferentes tipos de envases que se pueden usar para la comercialización, y los métodos de prueba específicos y significativos para evaluar las características de estabilidad del excipiente. Las pruebas de estabilidad deben determinar si puede ocurrir degradación, pérdida o ganancia de humedad, cambios de viscosidad u otros cambios posibles que hagan al excipiente inaceptable para el uso (por ej., materiales inestables o higroscópicos). Ver en *Buenas Prácticas de Fabricación para Excipientes Farmacéuticos a Granel* (1078), información adicional sobre la estabilidad del excipiente.

La fecha de caducidad de un excipiente se define como la fecha después de la cual el proveedor recomienda no usar el material. Antes de la fecha de caducidad asignada, se espera que el excipiente se mantenga dentro de las especificaciones establecidas, si se almacena de acuerdo con las condiciones recomendadas por el proveedor.

La fecha recomendada de reevaluación para un excipiente es la fecha sugerida por el proveedor después de la cual el material debe ser reevaluado para garantizar el cumplimiento continuo con las especificaciones. La reevaluación del excipiente puede incluir la inspección física y pruebas químicas, físicas y microbiológicas apropiadas. Antes de la fecha de reevaluación, se espera que el excipiente se mantenga dentro de las especificaciones establecidas, siempre y cuando se haya almacenado de acuerdo con las condiciones recomendadas por el proveedor. Sin embargo, pasada la fecha recomendada de reevaluación, el excipiente no debe usarse sin la evaluación adecuada a los intervalos apropiados para determinar si el material sigue siendo aceptable para el uso. La fecha recomendada de reevaluación difiere de la fecha de caducidad en que el excipiente puede reevaluarse para extender el tiempo en que puede usarse, si lo respaldan los resultados de la evaluación y los datos de estabilidad apropiados.

Al informar la fecha de caducidad y la fecha recomendada de reevaluación, el proveedor del excipiente proporciona al usuario información importante, relacionada con la estabilidad del material. Como se discutió previamente, la asignación de una fecha de caducidad y de una fecha recomendada de reevaluación debe basarse en la evaluación apropiada de los cambios potenciales que pueden ocurrir en las propiedades del material. Es aceptable informar tanto la fecha de caducidad como la fecha recomendada de reevaluación en el COA de excipientes, si corresponde, pero no siempre se requieren ambas fechas. La fecha de caducidad y la fecha recomendada de reevaluación no deben ser informadas por un proveedor sin suficientes datos de estabilidad o de historia del producto para respaldar las fechas asignadas.

En caso de excipientes muy estables (más de 2 años), se debe informar la fecha de caducidad específica y/o la fecha recomendada de reevaluación en el COA del material o se puede incluir una declaración general de estabilidad (por ej., estabilidad mayor de 2 años). Si los datos disponibles indican que un excipiente tiene estabilidad limitada (2 años o menos) bajo las condiciones de almacenamiento anticipadas, se debe informar la fecha de caducidad específica y/o la fecha recomendada de reevaluación en el COA del material.

Si los datos de estudios formales de estabilidad de un excipiente no están disponibles, se debe incluir en el COA una declaración apropiada para indicar lo que se conoce acerca de la estabilidad del material y si se están llevando a cabo los estudios de estabilidad.

Fecha de Reanálisis—Si el proveedor de un excipiente efectúa un reanálisis y los resultados se usan para extender el tiempo de uso del material, la fecha de reanálisis se debe informar también en el COA. Las pruebas específicas que se utilizaron en el reanálisis se deben identificar claramente e informar los resultados obtenidos después del reanálisis. También se debe informar en el COA una nueva fecha recomendada de reevaluación después del reanálisis.

Fechas Adicionales—En un COA pueden aparecer otras fechas, si así lo desea el proveedor del excipiente o lo solicita el usuario. Algunos ejemplos incluyen la fecha de liberación, la fecha de envío, la fecha de análisis y la fecha en que se imprimió o aprobó el COA. Cualquier fecha adicional que aparezca en un COA para excipientes debe incluir una indicación clara de lo que representa o significa.

FRECUENCIA DEL ANÁLISIS

Para los excipientes listados en los compendios *USP–NF*, el proveedor fija las especificaciones del producto de manera que incluyan todos los parámetros enumerados en la monografía. No se requiere realizar el análisis de todos los parámetros de especificación en cada lote (ver *Advertencias y Requisitos Generales*). Sin embargo, se debe contar con suficientes datos de análisis y validación de procesos para garantizar que el lote cumpla con todas las especificaciones antes de su liberación. Esta es una práctica establecida que se ha usado exitosamente en la industria por muchos años. El análisis periódico de todos los parámetros se debe llevar a cabo para revalidar el sistema de control. Los proveedores deben determinar la frecuencia de estos análisis periódicos basándose en su comprensión del sistema de control de fabricación. Como mínimo, los parámetros se deben verificar una vez al año.

En el caso de excipientes que no estén incluidos en los compendios *USP–NF*, el proveedor debe fijar las especificaciones para garantizar que la calidad del material se mantiene de manera continua y refleja el proceso de fabricación del excipiente y las propiedades inherentes. Los métodos analíticos usados para evaluar las características de excipientes no farmacopeicos pueden ser los mismos de aquellos contenidos en la farmacopea o pueden ser exclusivos del proveedor o del material. Se debe demostrar que los métodos proporcionan resultados exactos, reproducibles y uniformes para la característica en análisis. Puede ser apropiado que en el caso de los excipientes no farmacopeicos algunas de las pruebas se efectúen con menor frecuencia.

El usuario del excipiente debe evaluar las especificaciones y métodos del proveedor para asegurarse de que sean apropiados y aceptables para el control de calidad necesario en el proceso de fabricación de su producto farmacéutico. El usuario debe determinar cuáles de las especificaciones y métodos del proveedor se requieren para la liberación del excipiente para el uso en su proceso. En caso de que el usuario necesite pruebas adicionales o métodos alternativos, el proveedor y el usuario del excipiente deben acordar los métodos y especificaciones apropiados así como también la responsabilidad para efectuar el análisis.

Análisis de Frecuencia Reducida

Cuando se lleva a cabo el análisis de frecuencia reducida de algunos parámetros (por ejemplo, cada décimo lote), se debe indicar claramente en el COA. Se debe indicar toda prueba específica sometida al análisis de frecuencia reducida. El análisis de frecuencia reducida se debe usar sólo para excipientes fabricados usando un proceso estable. Debe haber una base técnica firme y documentación suficiente que respalde el análisis de cualquier parámetro con una frecuencia reducida. Esto incluiría normalmente los siguientes puntos:

- Validación apropiada del proceso de fabricación
- Control del proceso—graficación de atributos (según corresponda)
- Controles de GMP

Como parte de la justificación para los análisis de frecuencia reducida, es importante que existan garantías establecidas que demuestren que el proceso del fabricante cumple con los requisitos de GMP apropiados para el excipiente.

Debido a su importancia, algunas pruebas se deben realizar siempre en cada lote, mientras que otras pueden ser candidatas a un análisis de frecuencia reducida. Los análisis de atributos producen datos cualitativos que proporcionan resultados del tipo cumplen/no cumplen o resultados expresados como menor de o mayor de un valor específico. El resultado simplemente establece el cumplimiento con un parámetro de especificación. No existen datos que indiquen cuán bien cumple el material, como serían los obtenidos de resultados de pruebas de variables o cuantitativas.

Los análisis de frecuencia reducida de un atributo precisan que el fabricante demuestre que el parámetro cualitativo está bajo control estadístico. Esto hace necesaria la tabulación de los resultados de la prueba para lotes producidos en forma consecutiva.

Análisis Periódico de Lotes (Skip-Lot Testing)—El análisis periódico de lotes se puede aplicar a un excipiente fabricado por un proceso continuo o por partida. Para demostrar el control apropiado

del proceso se pueden usar varios planes de muestreo estadístico aceptados comúnmente. A continuación se presentan ejemplos de cada uno.

EJEMPLO 1: Para un nivel promedio de calidad de salida (AOQL, por sus siglas en inglés) de 1% y una frecuencia de análisis de 1 en 10, el proveedor debe encontrar 100 lotes consecutivos en conformidad. Para un AOQL de 2% y una frecuencia de análisis de 1 en 10, el proveedor analizaría 50 lotes consecutivos. Para un AOQL de 1% y una frecuencia de análisis de 1 en 5, el proveedor analizaría 70 lotes consecutivos. Existen nomografías para determinar los requisitos de la prueba.

EJEMPLO 2: Cuando el excipiente se fabrica por un proceso continuo, no se produce un lote diferenciado. De nuevo, el plan de muestreo está basado en el riesgo de la aprobación de un lote que no cumpla con los requisitos. Al analizar 140 lotes consecutivos antes de pasar a una frecuencia de análisis de 1 en 10, el plan establece un riesgo bajo de aprobar un lote que no cumpla con los requisitos.

Una vez que se cumpla con el requisito, el proveedor puede monitorear la conformidad con el parámetro de la especificación analizando 1 en 10 lotes. Si algún lote no pasara el análisis, el proveedor debe volver a analizar el 100% hasta que los resultados cumplan una vez más con las especificaciones descritas anteriormente.

Dado que las propiedades físicas y químicas de los excipientes varían enormemente, el proveedor del excipiente debe determinar qué pruebas se deben efectuar rutinariamente y cuáles pueden ser apropiados para un análisis de frecuencia reducida. Esta determinación debe estar justificada y documentada fundamentándose en la idoneidad del sistema de control del proveedor. Se debe conservar la documentación donde se detallen las suposiciones y los datos que respaldan el plan de análisis periódico de lotes.

Pruebas Tipo A y Tipo B—Sólo ciertos tipos de pruebas son apropiadas para el análisis de frecuencia reducida. Las pruebas *Tipo A* se definen como las pruebas que no pueden ser controladas fácilmente a través de técnicas de control estándar de proceso o que pueden cambiar con el tiempo. Estas pruebas deben realizarse normalmente en cada lote. Las pruebas *Tipo B* se definen como aquellas pruebas que normalmente se pueden controlar usando técnicas de control estándar de proceso y que no se espera que cambien con el tiempo. Estas pruebas pueden ser adecuadas para un análisis de frecuencia reducida. A continuación se presentan ejemplos de ambos tipos de pruebas.

TIPO A: EJEMPLOS DE PRUEBAS QUE TÍPICAMENTE SE DEBEN EFECTUAR EN CADA LOTE

- **Identificación**—Requerida por GMP para los usuarios (candidata para análisis de frecuencia reducida por los proveedores)
- **Valoración**—Parámetro de calidad crítico (si se especifica)
- **Viscosidad**—Por lo general indica el grado
- **Pérdida por secado** (o determinación de humedad)—Indicación de estabilidad y controles del proceso apropiados.
- **Color**—Indicación de estabilidad y controles del proceso apropiados.
- **pH**—Indicación de estabilidad y controles del proceso apropiados.

TIPO B: EJEMPLOS DE PRUEBAS QUE PODRÍAN SER ADECUADAS PARA ANÁLISIS DE FRECUENCIA REDUCIDA

- **Impurezas de fabricación**—Basándose en los materiales de partida y procesos (por ej., cloro, sulfato, nitrato, glioxal)
- **Metales pesados**
- **Plomo**
- **Arsénico**
- **Residuo de incineración**
- **Disolventes residuales**

Esta no pretende ser una lista exhaustiva de pruebas. Simplemente proporciona algunas instrucciones sobre la forma en que un proveedor puede evaluar la importancia de cada prueba con respecto al control general del proceso. Es posible que las pruebas listadas como posibles candidatas para análisis de frecuencia reducida (*Tipo B*) requieran efectuarse en forma rutinaria (*Tipo A*), dependiendo de las materias primas y de los procesos. Se puede determinar también que algunas pruebas *Tipo A* pueden convertirse en *Tipo B*. En una instalación dedicada, es posible que no sea necesario que el proveedor realice pruebas de identificación.

Documentación—El proveedor de un excipiente debe desarrollar y mantener la documentación que esboce los sistemas de control de procesos y los datos de validación para justificar el uso de análisis de

frecuencia reducida. Esta documentación debe incluir también los procedimientos para manejar el impacto de los cambios significativos sobre el programa de análisis de frecuencia reducida. Ver en *Guía de Cambios Significativos para Excipientes Farmacéuticos a Granel* (1195), información adicional sobre cambios en los excipientes.

La cantidad mínima de lotes que se deben analizar completamente para todos los parámetros de especificación después de un cambio depende del proceso y de la importancia del cambio y se debe basar en consideraciones estadísticas firmes.

Adicionalmente, la documentación debe contener procedimientos para reevaluar el programa de análisis de frecuencia reducida cuando ocurra una falla en los análisis. Las decisiones relacionadas con la continuación de los análisis de frecuencia reducida se deben justificar basándose en las razones de la falla y la capacidad del proveedor para proporcionar garantías de que el programa de análisis de frecuencia reducida u otros parámetros durante el proceso identificarán estos tipos de fallas en el futuro.

Justificaciones para el Análisis de Frecuencia Reducida—Los siguientes son ejemplos de situaciones en las que se puede demostrar una base técnica firme y en las que los análisis de frecuencia reducida podrían, por lo tanto, estar justificados. [NOTA—Pueden haber otros ejemplos de este tipo.]

- Una impureza, subproducto o materia prima sin reaccionar podría no estar presente en el producto debido a que las materias primas o las reacciones químicas usadas podrían no contener o producir dichas sustancias por encima de los límites especificados.
- El índice de capacidad del proceso (C_p) sobre el parámetro relevante es alto y está basado en un proceso estable. Los análisis estadísticos de los datos de frecuencia reducida deben mostrar que la propiedad permanece estable y dentro de las especificaciones. Un proceso se considera estable cuando el producto del mismo, independientemente de la naturaleza del procesamiento (por partida o continuo), puede demostrar por los medios apropiados un nivel de variabilidad que cumple uniformemente con todos los aspectos de la especificación declarada (tanto de la farmacopea como del cliente) y por lo tanto es aceptable para su uso previsto. En el caso de procesos continuos, también es importante demostrar que el material se ha producido bajo condiciones en las cuales el proceso ha alcanzado un “estado estacionario”, es decir, en el cual hay mínima intervención del operario y en donde los parámetros durante el proceso se han estabilizado (ver en el *Apéndice 2* una definición más amplia de este concepto y de la forma de determinar los niveles de control).
- Para el caso de un proceso continuo, los análisis durante el proceso muestran que la propiedad determinada a una frecuencia reducida es estable y está dentro de las especificaciones. La repetición de la prueba en cada lote sería redundante.
- Un análisis que se lleva a cabo en cada lote ha mostrado estar fuertemente correlacionado con un análisis que se realiza a una frecuencia reducida. La correlación demuestra que si el lote está dentro de especificaciones en el primer análisis, estará también dentro de especificaciones en el segundo análisis.

USO DE FIRMAS ELECTRÓNICAS

Debido a la creciente dependencia de las computadoras y a la necesidad de ajustarse a sistemas de registros sin papel, se sugiere la alternativa electrónica para los registros y firmas manuscritos. Los proveedores de excipientes han agregado sistemas de información computarizada para aumentar la productividad.

El principal inconveniente en la transferencia de un COA sin una firma manuscrita es la validación de los datos. Existen varias condiciones que se deben cumplir antes de considerar aceptable la adición de una firma o nombre electrónicos en un COA.

- El acceso a los sistemas computarizados debe estar limitado a las personas autorizadas: el acceso se obtiene solo después de introducir un nombre de usuario y una contraseña. El sistema debe exigir cambios frecuentes de cada contraseña individual.
- Debe completarse una confirmación de la integridad y exactitud de la información almacenada en el sistema.

- La operación del sistema debe controlarse rutinariamente para garantizar que se transfiera la información correcta de la base de datos al registro impreso.
- Los datos introducidos en una base de datos de la cual se extrae información para un COA deben ir acompañados por registros de auditoría sellados con fecha y hora.

Cuando estos criterios se cumplen, se acepta la emisión de los COA con firmas electrónicas o el nombre de la persona responsable en el documento, en lugar de una firma manuscrita. [NOTA—Los sistemas computarizados están reglamentados actualmente por el 21 CFR 11 de la FDA. Los usuarios deben consultar el enfoque de la FDA para el cumplimiento en esta área.]

INFORMACIÓN DEL DISTRIBUIDOR

La presentación de un COA emitido por un distribuidor enfrenta algunos retos. Dado que los COA son documentos importantes que califican a los excipientes y el estado de su calidad, la fuente de esa información se vuelve muy importante para los usuarios finales. Dado que los distribuidores desempeñan diferentes papeles al prestar los servicios para los cuales fueron contratados, es necesario garantizar que los procedimientos y métodos sean apropiados para las funciones desempeñadas.

Los distribuidores pueden desempeñar un gran número de funciones relacionadas con el movimiento de excipientes y los servicios asociados con su producción. Algunos sirven simplemente como instalaciones de tránsito donde no se le hace nada al excipiente, exceptuando su almacenamiento y manipulación. Otros sirven como extensiones del proceso del fabricante al tomar cantidades a granel y reempacarlas para el fabricante. Sin embargo, otros adquieren excipientes y los reenvasan para la venta y distribución con una etiqueta diferente. Estos escenarios deben comprenderse y documentarse apropiadamente con programas que protejan la integridad y seguridad de los excipientes a medida que pasan por el proceso de distribución.

Fabricante Original y Lugar de Fabricación—La identidad del fabricante original y del lugar de fabricación debe incluirse en el COA de los excipientes. Esta información es importante porque permite la rastreabilidad de lotes específicos del excipiente y asegura a los usuarios que están obteniendo de manera uniforme un material del mismo fabricante y lugar de fabricación.

La información sobre la identidad y ubicación del fabricante no representa un inconveniente cuando el fabricante original es también el proveedor directo del excipiente para los clientes del ámbito farmacéutico. Sin embargo, cabe reconocer que esta información puede considerarse confidencial por un distribuidor de excipientes. Con el fin de resolver este problema adecuadamente, los distribuidores de excipientes deben listar la información específica, identificando el fabricante original y su ubicación o proporcionar la información bajo un código apropiado que se asigna con el propósito de identificar inequívocamente el fabricante original y el lugar de fabricación. Para proteger la confidencialidad de esta información, no se debe revelar el significado del código a los distribuidores intermediarios.

Datos del Certificado de Análisis—Cuando un distribuidor se usa principalmente como un punto de tránsito sin producirse cambios al excipiente o el empaque, el COA del fabricante que acompaña al excipiente puede distribuirse en el formato original. Si los datos se extraen, traducen o reescriben en otro papel con membrete, se debe implantar un sistema de verificación de la información reescrita y se debe demostrar su justificación cuando se lo solicite. Como alternativa, se debe indicar la fuente de los datos en el documento.

En el caso de un distribuidor que toma cantidades de un excipiente a granel de un fabricante y las introduce en un proceso (por ej., sistema de transporte y almacenamiento), se debe efectuar el análisis del excipiente empacado para demostrar que tiene la misma calidad del lote (partida) introducido. Los datos analíticos apropiados deben incluirse en el COA para verificar la calidad. El distribuidor debe usar una metodología y equipo equivalente para la evaluación analítica. Se pueden usar algunos datos del COA del fabricante original, con la justificación apropiada.

En todos los casos, se espera que el distribuidor tenga el nivel apropiado de GMP establecidas.

APÉNDICE 1

DEFINICIONES

Cambio Significativo—Cualquier cambio que altera una propiedad física o química de un excipiente, con respecto a la norma, o que es probable que altere el desempeño del excipiente en la forma farmacéutica.

Certificado de Análisis (COA)—Un documento que refiere específicamente a los resultados del análisis de una muestra representativa extraída de la partida de material que va a ser entregado.

Criterios de Aceptación—Las especificaciones y los límites de aceptación o rechazo—como por ejemplo un nivel de calidad aceptable o un nivel de calidad no aceptable, con un plan de muestreo asociado—necesarios para tomar la decisión de aceptar o rechazar un lote o partida de materia prima, producto intermedio, material de empaque o excipiente.

Distribuidor—Una parte, diferente del fabricante, que vende el excipiente.

Empaque—El envase y sus componentes que contienen el excipiente para almacenamiento y transporte al cliente.

Especificación—Los parámetros de calidad que sirven como base para la evaluación de la calidad y a los que se deben ajustar los excipientes, componentes o productos intermedios.

Excipiente—Cualquier sustancia, distinta del ingrediente farmacéutico activo o del producto farmacéutico, que ha sido evaluada de manera apropiada respecto a su seguridad y que se incluye en un sistema de liberación de fármacos para ayudar al procesamiento del mismo durante su fabricación; para proteger, mantener o mejorar la estabilidad, biodisponibilidad o aceptación por parte del paciente; para ayudar a la identificación del producto o mejorar cualquier otro atributo general de seguridad y eficacia del sistema de liberación de fármacos durante el almacenamiento o el uso.

Fabricante—La parte que efectúa el paso de procesamiento final.

Fecha de Caducidad—La fecha después de la cual el proveedor recomienda no usar el material.

Fecha de Fabricación—La fecha que indica la terminación del proceso final de fabricación (según lo definido por el proveedor para un excipiente y proceso en particular).

Fecha de Reanálisis—La fecha en la cual el proveedor de un excipiente efectúa el reanálisis para extender el tiempo en que se puede usar el material.

Fecha Recomendada de Reevaluación—La fecha sugerida por el proveedor en la que el material se debe reevaluar para garantizar el cumplimiento continuo con las especificaciones. Difiere de la *Fecha de Caducidad* en que el excipiente puede ser reevaluado para extender el tiempo en el que puede usarse, si lo respaldan los resultados de la evaluación y los datos de estabilidad apropiados.

Impureza—Cualquier componente de un excipiente que no es la entidad química deseada pero está presente como consecuencia de las materias primas usadas o del proceso de fabricación.

Índice de Capacidad del Proceso (C_p)—Una medida estadística que se puede usar para evaluar si el proceso es adecuado para cumplir con las especificaciones. Puede decirse que existe un estado de control estadístico si la variación aleatoria en los resultados de prueba para un parámetro del proceso es tal que la capacidad calculada del proceso es mayor de 1,33 (ver definición más detallada en el *Apéndice 2*).

Instalación Contratada—Una instalación interna o externa que proporciona servicios al fabricante o distribuidor de un excipiente. Pueden incluir, entre otras, las siguientes: instalaciones de fabricación, laboratorios, instalaciones de reempaque (incluido etiquetado) y almacenes.

Lote—Ver *Partida*.

Lugar—El sitio donde se fabrica el excipiente. Este puede estar dentro de las instalaciones pero en un área operativa diferente, o en una instalación remota, incluyendo un fabricante por contrato.

Número de Lote—Ver *Número de Partida*.

Número de Partida (o Número de Lote)—Una combinación única y característica de números y/o letras a partir de la cual se puede determinar toda la historia de la fabricación, procesamiento, empaque, codificación y distribución de una partida.

Partida (o Lote)—Una cantidad definida de excipiente procesado de forma tal que se pueda esperar que sea homogéneo. En un proceso continuo, una partida corresponde a una porción definida de la producción, basándose en el tiempo o cantidad (por ej., volumen del recipiente, producción de un día, etc.).

Paso del Proceso—Una instrucción al personal de fabricación del excipiente en la cual se ordena que se efectúe una operación.

Proceso—Conjunto de instrucciones operativas que describen cómo se debe sintetizar el excipiente, aislarlo, purificarlo, etc.

Proceso Continuo—Un proceso de fabricación que produce continuamente el excipiente a partir del suministro constante de materias primas.

Proceso Estable—Un proceso cuyo producto final, independientemente de la naturaleza del procesamiento (por partida o continuo), puede demostrar por los medios apropiados un nivel de variabilidad que cumple uniformemente con todos los aspectos de la especificación declarada (tanto de la farmacopea como del cliente) y por lo tanto es aceptable para el uso previsto.

Proceso por Partida—Un proceso de fabricación que produce el excipiente a partir de un suministro discreto de materias primas que está presente antes de completarse la reacción.

Programa de Análisis Periódico de Lotes (Skip-Lot Testing Program)—Análisis periódicos o intermitentes efectuados para un parámetro de prueba en particular, justificados por datos históricos que demuestran un estado de control estadístico del proceso.

Programa de Pruebas/Análisis de Frecuencia Reducida—Ver *Análisis Periódico de Lotes*

Programa de Pruebas Periódicas—Ver *Programa de Análisis Periódico de Lotes*.

Propiedad Física—Un parámetro de calidad que se puede medir únicamente con un equipo mecánico.

Propiedad Química—Un parámetro de calidad que se mide por métodos de análisis químicos o fisicoquímicos.

Proveedor—Un fabricante o distribuidor que suministra directamente el excipiente al usuario.

Reenvasado—Transferencia de un excipiente de un envase a otro.

Reprocesamiento—Reintroducción en el proceso de material previamente procesado que no se ajustó a las normas o especificaciones y repetición de etapas que ya son parte del proceso normal de fabricación.

Usuario—La parte que usa un excipiente en la fabricación de un producto farmacéutico o de otro excipiente.

capacidad requieren el cálculo de σ , la desviación estándar de la población, mientras que los índices de desempeño requieren el cálculo de s , la desviación estándar de la muestra. Por lo tanto, puede decirse que existe un estado de control estadístico para los excipientes farmacéuticos si la variación aleatoria en los resultados de prueba para un parámetro del proceso es tal que el índice de capacidad del proceso calculado o el índice de desempeño calculado es mayor de 1,33. ■1S (USP30)

<1118> DISPOSITIVOS DE MONITOREO—TIEMPO, TEMPERATURA Y HUMEDAD

Cambio en la redacción:

REGISTRADORES ELECTRÓNICOS DE HISTORIAL DE TIEMPO-TEMPERATURA

Estos dispositivos, que pueden servir como una alternativa a los ITT químicos, utilizan una de las tecnologías electrónicas de medición de la temperatura antes descritas y crean un registro del historial de temperatura experimentado por un dispositivo. Algunos son dispositivos electrónicos simples que registran y guardan los valores de temperatura representativos del historial de temperatura acumulado durante un cierto período. Estos dispositivos pueden denominarse ITT electrónicos. Tienen la ventaja de poder calcular la Temperatura Cinética Media (TCM) a partir de las mediciones registradas y además, se pueden calibrar.

Registradores de Datos—Existe un dispositivo más complejo que permite registrar la temperatura a intervalos de tiempo muy cortos y transferir el registro del historial de temperatura a un sistema periférico, como por ejemplo una computadora personal. Estos dispositivos pueden denominarse registradores de datos de temperatura electrónicos. Los registradores de datos también pueden registrar la humedad usando los sensores que se describen a continuación. ■Pueden dejarse fijos en forma permanente dentro del ambiente de almacenamiento o ser portátiles y transportarse junto con el producto. Aquellos equipados con dispositivos de transmisión (transmisión por radio o cableado) pueden utilizarse para monitorear la temperatura y la humedad de un producto en tránsito, con la capacidad de descargar los datos registrados cuando el registrador de datos ha llegado a su destino. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■<1184> PRUEBAS DE SENSIBILIZACIÓN

INTRODUCCIÓN

Este capítulo trata de la sensibilización e hipersensibilización en el contexto de los dispositivos médicos e implantes y describe métodos para analizar dichos artículos en lo que respecta a su capacidad de causar sensibilización.

Existen cuatro tipos de reacciones de hipersensibilización según el sistema de clasificación de Gell y Coombs. Las reacciones de Tipo I incluyen la fijación de IgE a mastocitos que posteriormente liberan sustancias farmacológicamente activas, como por ejemplo la histamina. Las reacciones de Tipo II son el resultado de uniones de IgG y/o IgM a las células diana, seguidas de fijación de

APÉNDICE 2

ESTADO DE CONTROL ESTADÍSTICO: PARÁMETROS DE CAPACIDAD DEL PROCESO PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE CONTROL

Un proceso se considera en estado de control estadístico si las variaciones entre los resultados observados de las muestras del proceso se pueden atribuir a un sistema constante de causas aleatorias. El índice de capacidad del proceso (Cp) o el índice de capacidad ajustado para el promedio del proceso (Cpk) o el índice de desempeño (Pp) o el índice de desempeño ajustado por el promedio del proceso (Ppk) se pueden usar para evaluar si el proceso es adecuado para cumplir con las especificaciones. Los valores de estos parámetros que excedan 1,33 muestran que el proceso es adecuado para cumplir con las especificaciones. Los valores entre 1,00 y 1,33 indican que el proceso, aunque es adecuado para cumplir con las especificaciones, requerirá control riguroso. Los valores por debajo de 1,00 indican que el proceso no es adecuado para cumplir con las especificaciones y que el proceso y/o las especificaciones deberán cambiarse. Pp/Ppk será siempre menor o igual a Cp/Cpk , respectivamente. La diferencia esencial entre los índices de capacidad y desempeño radica en los datos usados. Los índices de

complemento y lisis celular. Las reacciones de Tipo III son causadas por la presencia de complejos antígeno-anticuerpo que ocasionan lesiones físicas, como por ejemplo, daño renal debido al bloqueo glomerular. Las reacciones de Tipo IV son mediadas por células (involucran la acción de las células T y su interacción con los antígenos de linfocitos humanos). Las reacciones de Tipo IV se llaman también reacciones de hipersensibilidad retardada. La *Tabla 1*, a continuación, resume los tipos de reacciones, los mediadores de las reacciones y ejemplos de enfermedades representativas.

Tabla 1. Los Cuatro Tipos de Reacciones de Hipersensibilización*, Mediadores y Ejemplos de Enfermedades

Clase de Reacción	Mediadores	Ejemplos de Enfermedades
Tipo I	Las moléculas de IgE unidas a los mastocitos interactúan con el antígeno para liberar sustancias farmacológicamente activas.	Fiebre del heno, asma bronquial y otras reacciones atópicas
Tipo II	La IgM y/o las moléculas de IgG interactúan con células diana, fijan el complemento y producen lisis celular	Diversas alergias medicamentosas, eritroblastosis fetal, anemia hemolítica, trombocitopenia
Tipo III	Complejos antígeno-anticuerpo, complemento	Reacción de Arthus, enfermedad del suero, glomerulonefritis alérgica
Tipo IV	Linfocitos T, antígeno, monocitos, macrófagos	Dermatitis por contacto

* Según el esquema de clasificación de Gell y Coombs

Se sigue un proceso de varios pasos, descrito en el capítulo *Biocompatibilidad de los Materiales Usados en Envases de Medicamentos, Dispositivos Médicos e Implantes* (1031), con el fin de determinar qué pruebas toxicológicas necesitan realizarse, si fuera necesario, sobre un artículo determinado. En algunos casos, los artículos previamente comercializados aportan evidencia suficiente para satisfacer los requisitos toxicológicos (Ver *Figura 1* en el capítulo (1031)). Los factores importantes tratados en la *Figura 1* (capítulo (1031)) incluyen el tipo y grado de contacto con el cuerpo, la composición química, el proceso de fabricación, el proceso de esterilización y, como se mencionó anteriormente, la similitud con artículos previamente comercializados.

Si fueran necesarias más pruebas toxicológicas, es importante observar la clasificación de los dispositivos médicos proporcionada en la *Tabla 2* del capítulo de información general (1031), porque el grado y alcance de las pruebas toxicológicas que se requieran dependerán en gran medida de la naturaleza y duración del contacto del artículo con el cuerpo. La clasificación que surge de la *Tabla 2* en el capítulo (1031), junto con la duración de la exposición al artículo, se usan en las *Tablas 3 a 5* del capítulo (1031) para determinar cuáles pruebas toxicológicas se deben efectuar. La *Tabla 2*, a continuación, presenta información extraída de las *Tablas 3 a 5* del capítulo (1031) e indica aquellas circunstancias en las cuales se deben considerar las pruebas de sensibilización.

Tabla 2. Artículos para los Cuales se Deben Considerar las Pruebas de Sensibilización Basándose en la Categoría del Artículo y la Duración de la Exposición

Categoría del Dispositivo	Punto de Contacto con el Cuerpo	Duración del Contacto
Dispositivos de Piel superficial		A ^a , B ^b , C ^c
	Membrana mucosa	A, B, C
	Superficies comprometidas o expuestas	A, B, C
Dispositivos de comunicación externa	Vía sanguínea, indirecta	A, B, C

Tabla 2. Artículos para los Cuales se Deben Considerar las Pruebas de Sensibilización Basándose en la Categoría del Artículo y la Duración de la Exposición (Continuación)

Categoría del Dispositivo	Punto de Contacto con el Cuerpo	Duración del Contacto
	Comunicación con tejido, hueso o dentina	A, B, C
	Sangre circulante	A, B, C
Dispositivos para implantes	Tejido o hueso	A, B, C
	Sangre	A, B, C

^a A: limitada (menos de 24 horas)

^b B: prolongada (desde 24 horas hasta 30 días)

^c C: permanente (más de 30 días)

En este capítulo se revisan nueve métodos de prueba. La *Tabla 3* enumera los métodos y las especies con las cuales se efectúan.

Tabla 3. Metodologías que se Pueden Usar en las Pruebas de Sensibilización y Especies Requeridas para la Prueba

Prueba	Especie Usada en la Prueba
Maximización de Magnusson y Kligman	Cobayo
Prueba Estándar de Buehler	Cobayo
Epicutánea abierta	Cobayo
Adyuvante Completo de Freund	Cobayo
Optimización	Cobayo
Adyuvante Fraccionado	Cobayo
Ensayo del Nódulo Linfático Local	Ratón
Inflamación de la Oreja del Ratón	Ratón
Aumento de Vitamina A	Ratón

Dada la preponderancia de la *Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayo* (GPMT, por sus siglas en inglés) o de la *Prueba de Buehler* (BT, por sus siglas en inglés), dichas pruebas se revisarán en detalle en este capítulo. Como alternativa a los procedimientos usados con más frecuencia, se ofrece un breve resumen de las pruebas restantes.

Todas las pruebas se deben validar periódicamente en el laboratorio que las realiza, usando controles positivos, como por ejemplo aldehído hexil cinámico, mercaptobenzotiazol o benzocaína (controles positivos recomendados por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico [OECD, por sus siglas en inglés]).

PRUEBA DE MAXIMIZACIÓN DE MAGNUSSON Y KLIGMAN EN COBAYO (GPMT)

Animales

Se pueden usar machos y hembras de cobayos albinos. Todos los animales deben estar en perfecto estado de salud y pesar entre 300 g y 500 g al comienzo del experimento. Las hembras no deben estar preñadas, ni haber parido previamente. Antes de las pruebas, es importante aclimatar los animales a las condiciones del laboratorio por lo menos durante 5 días. Todos los animales deben ser manipulados según las pautas estipuladas para el tratamiento humanitario de los animales, contenidas en los requisitos reglamentarios apropiados. Se deben usar al menos 10 animales de prueba y 5 de control. Para conseguir suficiente potencia analítica (es decir, para detectar los sensibilizantes débiles), puede ser necesario usar 20 animales de prueba y 10 de control. Pueden requerirse animales adicionales para establecer las dosis apropiadas que se deben administrar (ver *Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba*).

Alojamiento y Alimentación

El cuarto de los animales debe mantenerse a $20 \pm 3^\circ$, con una humedad relativa de 30% a 70% y 12 horas de luz y oscuridad. Los animales se pueden alojar individualmente o en grupo. Se pueden usar dietas estándar de laboratorio (las recomendadas para cobayo garantizan una cantidad adecuada de ácido ascórbico). Se debe proporcionar agua potable a voluntad.

Preparación de los Animales antes de la Prueba

Los animales deben ser distribuidos en forma aleatoria mediante un método validado de aleatorización. Por ejemplo, el método puede utilizar tablas de números aleatorios o números aleatorios generados por computadora. Los sitios donde se planea aplicar el artículo de prueba en el animal (región intraescapular), deben ser depilados sin que se produzcan abrasiones en la piel. Esto se puede lograr cortando o afeitando el pelo o con depiladores químicos. El depilador químico no debe producir irritación por sí mismo. Se deben registrar las observaciones generales de los animales antes de la prueba, incluidos cualquier indicio de alteración de la salud (no usar dichos animales en la prueba), y el peso corporal.

Preparación del Artículo de Prueba¹

Este ensayo requiere que el artículo de prueba se pueda inyectar por vía intradérmica. Cuando el artículo de prueba no es apto para la administración directa, se deben preparar extractos de acuerdo con el procedimiento proporcionado en el capítulo general *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88).

Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba

El propósito de este estudio preliminar es determinar las concentraciones de la *Preparación del Artículo de Prueba* que se van a usar durante la fase inicial de inducción y la segunda fase de desafío de un estudio GPMT. Para la determinación de la concentración se pueden usar dos o tres animales.

Se deben inyectar diversas concentraciones del artículo de prueba, o extractos del artículo, por vía intradérmica (0,1 mL por sitio), con el disolvente que se va a emplear en el *Procedimiento de Prueba*. La concentración que ocasione sólo irritación leve a moderada (sin generar destrucción cutánea extensa o evidencia de toxicidad sistémica manifiesta para los animales) se debe utilizar en la *Fase de Inducción con Inyección Intradérmica* del *Procedimiento de Prueba*.

Aplicar a dos o más animales una gama de concentraciones del artículo de prueba o de extractos del artículo de prueba, por medio de vendajes oclusivos y parches. Retirar los vendajes y parches después de 24 horas y examinar los sitios en busca de eritema. Elegir la concentración que ocasione sólo un leve eritema para la *Fase de Inducción con Aplicación Tópica* del *Procedimiento de Prueba*. Utilizar la concentración más alta del artículo de prueba o del extracto que no ocasione eritema en la *Fase de Desafío* del *Procedimiento de Prueba*. Si no se alcanza el umbral de irritación, seleccionar entonces la concentración más alta posible para la *Fase de Inducción con Aplicación Tópica* y la *Fase de Desafío* del *Procedimiento de Prueba*.

Procedimiento de Prueba

FASE DE INDUCCIÓN CON INYECCIÓN INTRADÉRMICA

Esta fase requiere administrar por vía intradérmica tres pares de inyecciones, con la inyección de prueba y la de control de cada par en lados opuestos intraescapularmente. Cada inyección debe contener 0,1 mL; los pares de inyecciones 1 y 2 se deben administrar más cerca de la cabeza y el par 3 ligeramente alejado hacia la cola. Los pares están nominalmente dentro de un área de 8 cm². Los pares de inyecciones constan de:

- Par de inyección 1: Una mezcla 1:1 (v/v) de Adyuvante Completo de Freund (FCA, por sus siglas en inglés), una emulsión de aceite en agua que contiene micobacterias y el disolvente o vehículo apropiado (ver *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88)). Los animales de control reciben una mezcla de FCA y solución salina fisiológica (1:1).
- Par de inyección 2: La *Preparación del Artículo de Prueba* en la concentración especificada en *Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba*, con el disolvente o vehículo apropiado. Los animales de control reciben sólo el disolvente o vehículo.
- Par de inyección 3: La *Preparación del Artículo de Prueba* en la concentración especificada en *Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba* en una mezcla 1:1 (v/v) con FCA. Los animales de control reciben una inyección de una mezcla 1:1 (v/v) de FCA y disolvente o vehículo.

FASE DE INDUCCIÓN CON APLICACIÓN TÓPICA

Siete días (± 1 día) después de la terminación de la *Fase de Inducción con Inyección Intradérmica*, administrar la muestra de prueba por aplicación tópica en la región intraescapular de cada animal. Tanto para los animales de prueba como para los de control, si la *Preparación del Artículo de Prueba* no causa irritación cutánea, aplicar lauril sulfato de sodio al 10% en vaselina aproximadamente 24 horas antes de comenzar la *Fase de Inducción con Aplicación Tópica*, para inducir una irritación local.

En cada sitio de inyección, a los animales de prueba se les deben aplicar trozos de 2×4 cm de papel de filtro o gasa absorbente, completamente embebidos con la *Preparación del Artículo de Prueba* (preparada no más de 24 horas antes del uso), con la concentración seleccionada en *Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba*. El papel de filtro o la gasa absorbente deben asegurarse a los animales con vendajes oclusivos. Los animales de control reciben el mismo tratamiento, excepto que se debe usar el disolvente o vehículo correspondiente en lugar del artículo de prueba.

Retirar los vendajes y parches aproximadamente 48 horas después de la aplicación.

FASE DE DESAFÍO

Esta fase debe ocurrir 14 ± 1 días después de la *Fase de Inducción con Aplicación Tópica*. Se debe retirar el pelo de los sitios de aplicación de la prueba. Los parches de papel de filtro o las cámaras se empapan con *Preparación del Artículo de Prueba* recién preparada, en la concentración especificada en *Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba*. Esto se hace para todos los animales de prueba y de control. Los parches o cámaras se aseguran con un vendaje oclusivo y se retiran después de 24 ± 2 horas.

¹ Si desea más información sobre la preparación de la muestra, remítase a la Norma ANSI/AAMI/ISO/CEN 10993–12—1996: Biological Evaluation of Medical Devices—Part: Sample Preparation and Reference Materials (Evaluación Biológica de Dispositivos Médicos—Parte 12: Preparación de la Muestra y Materiales de Referencia)

Observaciones

Aproximadamente 24, 48 y 72 horas después de retirar los parches de desafío se deben examinar los sitios de aplicación en busca de signos de reacciones. Son de particular importancia los casos en donde la reacción en los animales de prueba excede la de los animales de control. Se deben registrar todos los signos de reactividad, poniendo especial atención a los signos de eritema y edema. Una reacción edematosa verdadera palidece cuando se ejerce una presión suave. Cuanto más largo sea el periodo de palidecimiento, mayor la gravedad del edema.

Interpretación

Existen varias formas de evaluar y calificar los resultados de la GMPT. Las *Tablas 4, 5 y 6* enumeran los detalles de tres de los sistemas de clasificación. Las calificaciones de 1 o más en los animales de prueba, con calificaciones de menos de 1 en los animales de control, indican sensibilización. Si los animales de control presentan reactividad grado 1 y si los animales de prueba presentan reactividad por encima de la reactividad más alta observada en los animales de control, también se sospecha de sensibilización debida al artículo de prueba. Los porcentajes de la *Tabla 4* se deben revisar si hay sólo 10 animales de prueba (es decir, las categorías serían 0, <10%, de 10% a 30%, de 31% a 60%, de 61% a 80% y de 81% a 100%). Si hay 20 animales de prueba, los múltiplos de 5% son adecuados.

Tabla 4. Clasificación Basada en el Porcentaje de Animales de Prueba Sensibles

% de Resultados Positivos en el Grupo de Prueba	Calificación Asignada	
0	—	No sensibilizante
< 8	1	Débil
8–28	2	Leve
29–64	3	Moderado
65–80	4	Fuerte
81–100	5	Extremo

Tabla 5. Clasificación Basada en la Formación de Eritema y Edema

Eritema y Escara	Grado
Ausencia de eritema	0
Eritema leve o equivoco	< 1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado	3
Eritema severo a ligera formación de escara	4
Edema	
Ausencia de edema	0
Edema leve o equivoco	< 1
Edema bien definido	2
Edema moderado	3
Edema severo	4

Tabla 6. Clasificación Basada en la Formación de Eritema Solamente

Formación de eritema	Grado
Ausencia de eritema	0
Eritema discreto o irregular	1
Eritema moderado y confluyente	2
Eritema intenso y tumefacción	3

Los resultados deben ser presentados para análisis estadístico (por ejemplo, tabla de contingencia de chi cuadrado) para establecer si las diferencias en los puntajes entre los animales tratados y los de control son significativas. Se debe comparar estadísticamente la respuesta del grupo de prueba en función del grupo de control. (Para esta comparación se puede usar la prueba U de Mann-Whitney).

Reprovocación

El grado de cualquier respuesta en el grupo de control negativo, bajo condiciones experimentales, muestra el potencial de irritación de la *Preparación del Artículo de Prueba*. En este caso, los animales de prueba y de control se deben someter a un nuevo desafío 1 semana más tarde, en el lado no tratado del animal, con una concentración reducida de la *Preparación del Artículo de Prueba*. Un cobayo sensibilizado reaccionará de alguna manera a ambos desafíos. Una reacción leve que ocurra en un único tiempo de muestreo, en una sola de las provocaciones, debe arrojar serias dudas sobre si el cobayo está realmente sensibilizado.²

PRUEBAS DE BUEHLER ESTÁNDAR (SBT)

Animales

Ver *Animales en la Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayos (GMPT)*.

Alojamiento y Alimentación

Ver *Alojamiento y Alimentación en la Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayos (GMPT)*.

Preparación de los Animales antes de la Prueba

Ver *Preparación de los Animales antes de la Prueba en la Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayos (GMPT)*. Se debe cortar el pelaje de uno de los flancos del cobayo.

Preparación del Artículo de Prueba

Ver *Preparación del Artículo de Prueba en la Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayos (GMPT)*.

Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba

El propósito de este estudio preliminar es determinar las concentraciones de la *Preparación del Artículo de Prueba* que se van a usar durante la fase inicial de inducción y la segunda fase de desafío de un estudio SBT. Para la determinación de la concentración se pueden usar dos o tres animales.

Se deben aplicar diversas concentraciones del artículo de prueba o extractos del mismo, usando parches (por ejemplo, cuatro almohadillas absorbentes de 4 cm²) o cámaras. Los parches se deben mantener en su sitio con cinta adhesiva (si fuera necesario) y vendajes oclusivos. Los parches se deben retirar después de aproximadamente 6 horas, limpiando del sitio de prueba cualquier residuo del producto químico de prueba. Las observaciones se hacen en ese momento y a las 24 y 48 horas.

La concentración que sólo causa irritación leve a moderada (eritema leve, sin evidencia de toxicidad manifiesta para los animales) y que puede aplicarse repetidamente en el mismo sitio se debe usar en la *Fase de Inducción del Procedimiento de Prueba*.

² Basketter D.A. Guinea pig predictive tests for contact hypersensitivity. En *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, 2nd ed; Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E., Kimber, I., Eds; Raven Press, Ltd: Nueva York, 1994; pp. 693–702.

Utilizar la concentración más alta del artículo de prueba o del extracto que no ocasione eritema en la *Fase de Desafío* del *Procedimiento de Prueba*.

Procedimiento de Prueba

FASE DE INDUCCIÓN

Aplicar 0,4 mL de la *Preparación del Artículo de Prueba* en un disolvente o vehículo apropiado, en la dosis identificada en *Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba*. Usar parches similares a los usados en *Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba*. Los parches se deben aplicar en un flanco (con el pelo cortado), manteniéndolos en su sitio oclusivamente durante 6 horas. Se puede necesitar restringir el movimiento de los animales para garantizar la oclusión. Los parches y cualquier residuo visible se deben retirar después de 6 horas. A los animales de control también se les aplican parches, pero éstos contienen sólo el disolvente o vehículo apropiado. Este proceso se debe repetir tres veces a la semana tanto para los animales de prueba como para los de control, en el mismo sitio, durante tres semanas consecutivas (en la Prueba de Buehler modificada se usan intervalos semanales).

FASE DE DESAFÍO

Esta fase debe realizarse 14 días después de la última aplicación de la *Fase de Inducción*. Cortar el pelo del flanco no analizado previamente de cada animal 24 horas antes de la aplicación de desafío. Al igual que en la *Fase de Inducción*, aplicar parches que contengan el artículo de prueba (a la concentración especificada en *Determinación de la Concentración del Artículo de Prueba*) o sólo disolvente o vehículo en las zonas no analizadas de los animales de prueba y de control. Con el fin de obtener bordes bien definidos en los sitios de aplicación, se prefieren las cámaras comerciales con reborde. Asegurar los parches con vendajes oclusivos y mantenerlos en su sitio durante 6 horas. Retirar todos los parches después de 6 horas.

Observaciones

A las 22 ± 2 horas después de retirar los parches, se debe cortar o depilar el pelaje de los animales en el sitio de aplicación. Después de aproximadamente 2 horas, clasificar los sitios (se pueden emplear las *Tablas 4, 5 ó 6*). Se deben registrar todos los signos de reactividad, poniendo especial atención a los signos de eritema y edema. Repetir la clasificación una vez más, después de que hayan transcurrido de 24 a 48 horas. Se puede comparar estadísticamente la respuesta del grupo de prueba en función del grupo de control. (Para esta comparación se puede usar la prueba U de Mann-Whitney).

Interpretación

Los resultados deben ser presentados para análisis estadístico (por ej., tabla de contingencia de χ^2 cuadrado) para establecer si las diferencias en los puntajes entre los animales tratados y los de control son significativas.

Ver *Interpretación* en la *Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayos (GPMT)*.

Reprovocación

Ver *Reprovocación* en la *Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayos (GPMT)*.

OTROS PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIZACIÓN

La *Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayos* y las *Pruebas de Buehler Estándar* son las pruebas de sensibilización efectuadas con más frecuencia. Sin embargo, existen otros métodos que pueden ser útiles para evaluar la capacidad de sensibilización. Algunos métodos sirven tanto para artículos de prueba sólidos como para extractos, mientras que otros sólo para extractos.

Cuando se requiera el uso de cobayos en las siguientes pruebas, los animales y sus alojamientos deben cumplir con los requisitos especificados en *Animales*, en la *Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayos*. Se debe retirar el pelaje del cobayo en los sitios de prueba, como se indica en *Preparación de los Animales antes de la Prueba*, en la *Prueba de Maximización de Magnusson y Kligman en Cobayos*.

Prueba de Draize

Fue la primera prueba predictiva aceptada por los organismos reglamentarios y todavía se usa. La prueba utiliza cobayos y el artículo de la prueba se administra a través de inyecciones intradérmicas.

PREPARACIÓN DEL ARTÍCULO DE PRUEBA

Esta prueba requiere que el artículo de prueba esté en forma de una solución que se pueda aplicar directamente a la piel del animal. Por lo tanto, podría ser necesario hacer extractos del material. Ver en *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88) la información sobre el procedimiento de preparación.

FASE DE INDUCCIÓN

Afeitar un flanco de cada uno de los 20 cobayos, luego inyectar 0,05 mL de una solución del artículo de prueba al 0,1% en el flanco anterior. Al día siguiente, y luego día por medio, hasta el día 20, inyectar 0,1 mL del artículo de prueba en un nuevo sitio del mismo flanco.

FASE DE DESAFÍO

Esta fase comienza 2 semanas después de la inyección final de la *Fase de Inducción*. Afeitar el flanco no tratado y luego inyectar 0,05 mL del artículo de prueba a cada uno de los 20 cobayos. Veinte animales no tratados previamente sirven como controles y también reciben inyecciones del artículo de prueba.

OBSERVACIONES

Los sitios de prueba de todos los animales de control y de prueba se evalúan en busca de eritema 24 y 48 horas después de las inyecciones de desafío. El grado de reacción en los animales de prueba se compara con el de los animales de control. Una respuesta más extensa y/o más intensa de los animales de prueba en función de los animales de control es indicativa de sensibilización.

Prueba Epicutánea Abierta

Esta prueba utiliza cobayos. El objetivo es determinar la dosis requerida para inducir sensibilización simulando el uso en humanos a través de la aplicación tópica del artículo de prueba.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE PRUEBA

Esta prueba requiere que el artículo de prueba esté en forma de una solución que se pueda aplicar directamente a la piel del animal. Por lo tanto, es necesario hacer extractos del material. Ver en *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88) la información sobre el procedimiento de preparación.

PRUEBAS PRELIMINARES

Una serie de concentraciones del artículo de prueba se aplica a áreas de piel de 2 cm² en el flanco anterior de 6 a 8 cobayos (0,025 mL por aplicación). Los sitios de prueba se deben examinar en busca de eritema 24 horas después de la administración del artículo de prueba. Se determinan la concentración más alta que no cause irritación (concentración máxima no irritante) y la concentración más baja que cause eritema en aproximadamente 25% de los animales (concentración mínima irritante).

FASE DE INDUCCIÓN

El artículo de prueba (o vehículo de control) se aplica a zonas de 8 cm² de la piel del flanco de 6 a 8 cobayos, diariamente durante 3 semanas o 5 veces a la semana durante 4 semanas. La cantidad por aplicación es de 0,01 mL. De nuevo se emplea una serie de concentraciones crecientes, que abarcan una progresión sucesiva a partir de la concentración mínima irritante. El artículo de prueba se debe aplicar en los mismos sitios en cada ocasión, a menos que se desarrolle irritación, en cuyo caso se debe usar un nuevo sitio en el mismo flanco. Los animales de control reciben el mismo tratamiento, excepto que se usa el vehículo en lugar del artículo de prueba.

FASE DE DESAFÍO

Cada animal se somete a desafío en el flanco no tratado, 24 a 72 horas después del último tratamiento de la *Fase de Inducción*, con 0,025 mL aplicados en zonas de 2 cm². Se usa una serie de concentraciones crecientes, desde la concentración mínima irritante hasta la concentración máxima no irritante y también se usan 5 concentraciones más bajas.

OBSERVACIONES

Los sitios de prueba se evalúan 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. Se determina la concentración máxima que no causa irritación en el grupo de control. Los animales de los grupos de prueba que desarrollen respuestas inflamatorias a concentraciones más bajas que la concentración máxima no irritante en los controles se consideran sensibilizados.

Prueba del Adyuvante Completo de Freund

Esta prueba está basada en el uso de inyecciones intradérmicas del artículo de prueba en una mezcla de adyuvante completo de Freund y agua destilada (50 : 50).

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE PRUEBA

Dado que esta prueba usa inyecciones intradérmicas, se necesita preparar extractos del material de prueba para emplear este procedimiento. Ver en *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88) la información sobre el procedimiento de extracción.

PRUEBAS PRELIMINARES

Determinar la concentración mínima irritante y la concentración máxima no irritante de la misma forma que en *Pruebas Preliminares* en la *Prueba Epicutánea Abierta*.

FASE DE INDUCCIÓN

El sitio de prueba consta de seis zonas de 2 cm² sobre los hombros de los cobayos. Se deben usar dos grupos, cada uno con 10 a 20 cobayos. A los animales del grupo de prueba se les inyecta por vía intradérmica 0,1 mL de una solución del extracto del artículo de prueba al 5% en FCA/agua. Los animales de control reciben inyecciones de FCA/agua, sin el artículo de prueba. Estas inyecciones se repiten cada 4 días hasta haber administrado un total de tres inyecciones.

FASE DE DESAFÍO

Esta fase debe comenzar 2 semanas después de la última inyección de la *Fase de Inducción*. Las aplicaciones tópicas de 0,025 mL del artículo de prueba a las concentraciones mínima irritante y máxima no irritante, además de dos concentraciones más bajas, se administran en zonas de 2 cm² del flanco afeitado. Los sitios de prueba deben permanecer descubiertos.

OBSERVACIONES

Examinar los sitios de prueba en busca de eritema 24, 48 y 72 horas después de las aplicaciones tópicas. Se debe determinar la concentración mínima no irritante en los animales de control. Aquellos animales de prueba que presenten eritema a concentraciones más bajas que la concentración mínima no irritante en los animales de control se deben considerar sensibilizados.

Prueba de Optimización

Esta prueba tiene algunas similitudes con la *Prueba de Draize*. Sin embargo, a diferencia de la *Prueba de Draize*, ésta usa tratamientos tanto intradérmicos como tópicos e incluye adyuvante para algunas de las inyecciones de inducción.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE PRUEBA

Al igual que en otros procedimientos de prueba que incluyen inyecciones intradérmicas, el artículo de prueba debe estar en una forma apta para inyección. Ver en *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88) la información sobre el procedimiento de extracción.

FASE DE INDUCCIÓN

Se usan 20 cobayos de prueba y 20 de control. A cada animal se le deben administrar un total de 10 inyecciones intradérmicas. Los animales de prueba reciben 0,1 mL de una mezcla del artículo de prueba al 0,1% y solución salina al 0,9% (50 : 50) el día 1, en una inyección aplicada en el flanco afeitado y otra en una porción de piel dorsal afeitada. Dos y 4 días más tarde, se administra otra inyección intradérmica del artículo de prueba en solución salina en 8 nuevos sitios del dorso. Cada día por medio durante las semanas 2 y 3, inyectar el artículo de prueba por vía intradérmica en 10 sitios sobre los hombros, en una mezcla 50 : 50 de solución salina y FCA. Administrar la misma secuencia de inyecciones a los 20 animales de control, excepto que no se incluye el artículo de prueba en las inyecciones de solución salina o las de solución salina/FCA.

FASE DE DESAFÍO

Treinta y cinco días después de la primera inyección, los animales son sometidos a una administración tópica de 0,1 mL de la solución al 0,1% del artículo de prueba en solución salina (animales de prueba). Los animales de control reciben sólo inyecciones de solución salina. Cuarenta y cinco días después de la primera inyección, se administra una segunda aplicación tópica. Aplicar tópicamente una concentración no irritante del artículo de prueba (0,05 mL) a una zona de 1 cm² de piel sin tratar. Este sitio se debe cubrir con un trozo de papel de filtro de 2 cm², después de lo cual se debe aplicar un vendaje oclusivo. El parche se debe retirar después de 24 horas.

OBSERVACIONES

Veinticuatro horas después de cada inyección durante la semana 1, se debe medir el espesor de un pliegue cutáneo sobre los sitios de inyección de cada animal, empleando un calibre (mm) y registrar los dos diámetros transversales más grandes de cada reacción eritematosa (mm). Los volúmenes de reacción se calculan multiplicando el espesor del pliegue por el producto de los dos diámetros transversales (expresados como µL). Para cada animal se debe calcular la media del volumen de reacción (+1 SD) durante la semana 1.

Se calculan los volúmenes de la reacción de desafío de cada animal después de las inyecciones en el día 35. Si un animal desarrolla un volumen de reacción de desafío mayor que la media de su volumen de reacción + 1 SD, se debe considerar sensibilizado.

Después de la prueba de desafío con parches, evaluar los sitios de prueba en busca de eritema y edema. Las evaluaciones se deben hacer con la *Tabla 5*.

La cantidad de animales positivos se debe comparar estadísticamente con los animales de control seudopositivos. Esto se hace tanto para los resultados de la inyección intradérmica como para los de la prueba con parches. Se puede utilizar la Prueba Exacta de Fisher.

Después de los análisis estadísticos por separado, los resultados de las inyecciones intradérmicas y de las pruebas con parche se pueden combinar y evaluar empleando la *Tabla 7*, con el fin de clasificar un artículo de prueba como un sensibilizante fuerte, moderado o débil o como no sensibilizante.

Tabla 7. Esquema de Clasificación para Artículos de Prueba basado en la Prueba de Optimización

Intradérmica % de Animales positivos	Prueba con Parche % de Animales positivos	Clasificación
S*, > 75	y/o S, > 50	Sensibilizante fuerte
S, 50–75	y/o S, 30–50	Sensibilizante moderado
S, 30–50	N.S.*, 0–30	Sensibilizante débil
N.S., 0–30	N.S., 0	No sensibilizante

* S = significativo; N.S. = no significativo

Prueba del Adyuvante Fraccionado

Esta prueba utiliza tanto FCA como lesión cutánea. El artículo de prueba se aplica tópicamente.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE PRUEBA

Dado que esta prueba emplea aplicaciones tópicas del artículo de prueba, éste puede estar en forma sólida o líquida. Si fuera necesario hacer extractos, ver los procedimientos de extracción en el capítulo *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88).

FASE DE INDUCCIÓN

Tanto para el grupo de prueba como para el de control se usan de 10 a 20 cobayos. Se debe afeitar una zona de la piel de la espalda, justo detrás de los hombros hasta que la piel quede brillante. Luego, las zonas afeitadas se deben tratar con hielo seco de 5 a 10 segundos. Sobre el área tratada se debe colocar un vendaje hecho con gasa poco densa con adhesivo elástico y con una apertura de 2 cm x 2 cm, el cual se asegura luego con cinta adhesiva. El artículo de prueba (0,2 mL de materiales viscosos, 0,1 mL de líquidos, o material sólido) se coloca dentro de la apertura del vendaje, sobre la piel tratada. Encima del artículo de prueba se deben colocar dos capas de papel de filtro #2 que se recubren con cinta oclusiva. A continuación, el papel de filtro y el material oclusivo que lo recubre se deben asegurar con cinta adhesiva al vendaje circundante. Después de 2 días, levantar el papel de filtro de los sitios de prueba y volver a aplicar el artículo de prueba en el mismo sitio. Asegurar de nuevo el papel de filtro y el recubrimiento. Después de 2 días más, levantar el papel de filtro y administrar dos inyecciones de 0,075 mL de FCA en los bordes del sitio de prueba. Luego se aplica nuevamente el material de prueba y se reasegura el papel de filtro con el recubrimiento. El artículo de prueba se debe volver a aplicar una vez más el día 7, volviéndose a sellar el papel de filtro y el recubrimiento. El día 9, retirar el papel de filtro y todo el material de vendaje asociado.

FASE DE DESAFÍO

El día 22 después del tratamiento de inducción, se debe aplicar 0,5 mL de material de prueba (o el artículo sólido) a una zona rasurada de 2 cm x 2 cm en el centro de la espalda. Los sitios de prueba se deben cubrir con papel de filtro y recubrir con cinta adhesiva. Ésta se sostiene en su sitio con un vendaje elástico asegurado con cinta adhesiva. Los animales de control reciben el mismo tratamiento en la fase de desafío. La preparación se debe retirar después de 24 horas.

OBSERVACIONES

Veinticuatro, 48 y 72 horas después de retirar la preparación de la fase de desafío, evaluar los sitios de prueba en busca de eritema y edema. Se puede emplear el esquema de clasificación de la *Tabla 5*.

Prueba de Inflamación de la Oreja del Ratón

Existe una cantidad de ventajas potenciales al usar ratones en lugar de cobayos para los métodos de sensibilización. Las pruebas clásicas en cobayos tienden a ser más costosas y tardan más tiempo. Más aún, al depender de puntajes relativamente subjetivos basados en edema y eritema, la robustez y tolerancia metodológicas podrían ser cuestionables. Esta prueba usa ratones y emplea tanto exposiciones tópicas como inyecciones.

ANIMALES

Se deben usar ratones hembra CF-1, Balb/c o swiss, de 6 a 8 semanas de edad. Pueden alojarse en grupo en jaulas con cama de contacto directo (direct bedding cages). La aclimatación debe durar por lo menos de 5 a 7 días. Deben disponer de comida (un alimento apropiado para ratones) y agua a voluntad. En el estudio no se deben usar animales con orejas dañadas. En este momento, se debe medir y registrar el espesor de ambas orejas de cada animal.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE PRUEBA

Al igual que en otros procedimientos que incluyen inyecciones intradérmicas, el artículo de prueba debe estar en una forma apta para inyección. Ver en *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88) la información sobre el procedimiento de extracción.

PRUEBAS PRELIMINARES

Para este procedimiento se deben determinar la concentración mínima irritante y la máxima no irritante del artículo de prueba. Esto se hace con cuatro grupos de dos ratones, examinando los efectos de por lo menos cuatro concentraciones del artículo de prueba.

FASE DE INDUCCIÓN

Afeitar los abdómenes de los animales y luego depilarlos con una cinta adhesiva quirúrgica hasta que el área de prueba quede brillante. Una única inyección de 0,05 mL de FCA se divide y administra por vía intradérmica en dos sitios de inyección dentro del área afeitada y depilada, pero a lo largo de los bordes. Después de las inyecciones de adyuvante, aplicar 100 µL del artículo de prueba (usar la concentración mínima irritante) o vehículo (controles) en el centro de los sitios de prueba afeitados. Después de que los sitios de prueba se sequen, regresar los ratones a las jaulas. La depilación con cinta y la aplicación del artículo de prueba (pero no del FCA) se repiten todos los días durante los siguientes 3 días.

FASE DE DESAFÍO

Esta fase debe ocurrir 7 días después de la aplicación tópica final de la fase de inducción. El artículo de prueba (a la concentración más alta no irritante) se debe aplicar tópicamente (20 µL) en una oreja, mientras que la oreja opuesta recibe 10 µL de vehículo solo. Esto se realiza para todos los animales de prueba y de control.

OBSERVACIONES

Se debe registrar el espesor de ambas orejas de cada animal 24 y 48 horas después del desafío. Las mediciones se deben hacer con un calibre (de preferencia un calibre de resorte). Un animal sensibilizado es aquel cuya oreja tratada con el artículo de prueba presenta un espesor por lo menos 20% mayor que la oreja opuesta. Para que la prueba sea válida, el espesor de las orejas de los animales de control tratadas con el artículo de prueba no debe ser más de 10% superior al de las orejas opuestas. Si las orejas de los animales de control no cumplen con los requisitos, la prueba se debe repetir, usando concentraciones más bajas.

Prueba del Nódulo Linfático Local

Esta prueba se basa en la observación de que la exposición de los ratones a los sensibilizantes puede ocasionar hiperplasia de células T en los nódulos linfáticos auriculares de los ratones. El método combina fases in vivo e in vitro y requiere el uso de radioisótopos. Un aspecto poco usual de esta prueba es que no se requiere una fase de desafío.

ANIMALES

Se deben usar cuatro grupos de un mínimo de cuatro ratones, CBA/ca machos o hembras (sólo un sexo en cada prueba), entre 8 y 12 semanas de edad.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE PRUEBA

Aunque en teoría se podría aplicar un artículo de prueba sólido a la superficie dorsal de la oreja de un ratón, en la práctica se debe usar un extracto de dicho artículo. Ver en *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88) la información sobre el procedimiento de extracción.

PRUEBAS PRELIMINARES

Se debe usar una concentración no tóxica del artículo de prueba. De no estar establecida, puede ser necesario realizar una prueba preliminar para toxicidad manifiesta, con el fin de determinar una dosis apropiada.

FASE DE INDUCCIÓN

Aplicar 25 µL de la concentración apropiada del artículo de prueba, o el vehículo (controles), a la superficie dorsal de cada oreja, durante 3 días consecutivos. Cinco días después del primer tratamiento, inyectar a los animales, a través de la vena de la cola, 2,5 mL de solución salina amortiguada con fosfato que contenga 20 µCi de ³H-metil timidina. Cinco horas después de la inyección isotópica, practicarles eutanasia a los animales. Retirar los nódulos linfáticos auriculares drenantes de todos los animales de los grupos de prueba y de control. Combinar los nódulos linfáticos de todos los animales dentro de un grupo dado, de manera que se obtenga una sola suspensión de células de cada grupo. La suspensión de células se puede obtener pasando los nódulos linfáticos a través de un tamiz de acero inoxidable de malla 200, con ayuda del émbolo de una jeringa. Centrifugar luego las células a 190 x g durante 10 minutos, resuspender en 3 mL de ácido tricloroacético (ATA) al 5% y mantenerlas durante la noche a 4°.

El precipitado resultante se debe recuperar por centrifugado y el pellet se debe resuspender en 1 mL de ATA al 5%. Colocar la suspensión en viales de centelleo con 10 mL de líquido de centelleo y contar las desintegraciones por minuto (dpm) con un contador beta.

OBSERVACIONES

Comparar las dpm de cada grupo de prueba con respecto al grupo de control. Si el cociente iguala o excede de 3 para cualquier grupo de prueba, puede considerarse que la concentración del artículo de prueba usada en ese grupo es sensibilizante.

Prueba de Aumento de Vitamina A

Esta prueba es similar a la *Prueba de Inflamación de la Oreja del Ratón* en que los artículos de prueba se aplican tópicamente en el abdomen, con una aplicación de desafío en las orejas, seguida por mediciones del espesor de las orejas. Una diferencia importante es el uso de ratones cuyo alimento se suplementa con acetato de vitamina A. El propósito de la suplementación es aumentar la reactividad del sistema inmunitario, incrementando por lo tanto la posible reacción de sensibilización.

ANIMALES

Se deben mantener ratones Balb/c machos, de 3 a 4 semanas de edad con dieta suplementada con acetato de vitamina A. La dieta se puede preparar mezclando cada kg de alimento con 0,477 g de acetato de vitamina A gelatinizado. La mezcla de comida se debe usar dentro de las 3 semanas de preparada. Los ratones a usar en los estudios de sensibilización deben alimentarse con la dieta suplementada durante por lo menos 4 semanas. Por lo tanto, los ratones deben tener de 7 a 10 semanas de edad al momento del estudio de sensibilización. En este momento se debe medir y registrar el espesor de ambas orejas de cada animal.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE PRUEBA

Aunque, en teoría, se podría aplicar un artículo de prueba sólido a la superficie dorsal de la oreja de un ratón, en la práctica se debe usar un extracto de dicho artículo. Ver en *Pruebas de Reactividad Biológica, In Vivo* (88) la información sobre el procedimiento de extracción.

PRUEBAS PRELIMINARES

Determinar la concentración máxima no irritante y la mínima irritante en sendos grupos de animales. Esto puede hacerse según se describe en *Pruebas Preliminares en la Prueba de Inflamación de la Oreja del Ratón*.

FASE DE INDUCCIÓN

Afeitar el pelaje del abdomen y del tórax de 10 ratones de cada grupo. Luego aplicar 100 µL del artículo de prueba (a la concentración mínima irritante), en los sitios de prueba, los días 0, 2, 4, 7 y 11. Los animales de control reciben 100 µL de vehículo solo en las mismas fechas.

FASE DE DESAFÍO

Esta fase debe ocurrir 4 días después de la aplicación final de la *Fase de Inducción*. Aplicar a cada oreja de todos los animales de los grupos de prueba y control, 25 µL del artículo de prueba (a la concentración máxima no irritante).

OBSERVACIONES

Se debe registrar el espesor de ambas orejas de cada animal 24 y 48 horas después del desafío. Las mediciones se deben hacer con un calibre (de preferencia un calibre de resorte). Calcular el porcentaje de aumento en el espesor de cada oreja, restando la medida previa al tratamiento de la medida posterior al tratamiento, dividiendo el resultado por la medida antes del tratamiento y multiplicando por 100. Se debe comparar estadísticamente la respuesta del grupo de prueba en función del grupo de control. (Para esta comparación se puede usar la prueba U de Mann-Whitney).

También se deben calcular los resultados de cada animal. Si el aumento en el espesor de la oreja de un animal del grupo de prueba es como mínimo 50% mayor que el aumento más elevado de un animal de control, este resultado es indicativo de sensibilización. Como evaluación general, si los resultados del estudio proporcionan un resultado significativo de la prueba estadística con un $p < 0,01$ para las comparaciones del grupo de prueba con el grupo control, o si cuando al menos dos animales de prueba tienen aumentos del espesor de la oreja que excedan el 50% de los cambios máximos en espesor en el grupo de control y la comparación de grupo presente un $p < 0,05$, esto indica sensibilización al artículo de prueba. ■^{1S} (USP30)

<1208> PRUEBAS DE ESTERILIDAD—VALIDACIÓN DE SISTEMAS AISLADORES

Cambio en la redacción:

Este capítulo suministra guías para la validación de sistemas aisladores utilizados en las pruebas de esterilidad de artículos farmacopeicos. [NOTA—En el contexto de este capítulo, el término ■“descontaminado” ■^{1S} (USP30) se refiere a un elemento o superficie que se ha sometido a un proceso de eliminación de la biocarga viable.]

Los aisladores—dispositivos que crean entornos controlados en los que se realizan las pruebas de esterilidad farmacopeica—se han utilizado desde mediados de la década de los años ochenta. A los aisladores ■^{1S} (USP30) se les suministra aire a través de un filtro ■HEPA o superior, ■^{1S} (USP30) y pueden ■descontaminarse ■^{1S} (USP30) de manera reproducible. ■Los aisladores cerrados, los cuales son

sistemas que no tienen una abertura directa al ambiente externo, son los que generalmente se usan para las pruebas de esterilidad, aunque pueden usarse aisladores abiertos que permitan la salida de materiales a través de una abertura definida impidiendo la entrada de contaminación mediante sobrepresión de aire. Los aisladores cerrados usan sólo interfaces descontaminadas o un puerto de transferencia rápida para la transferencia de materiales. Los aisladores se construyen con plásticos flexibles (como por ejemplo cloruro de polivinilo), plásticos rígidos, vidrio o acero inoxidable. ■^{1S} (USP30)

Los sistemas aisladores protegen el artículo de prueba y los suministros para evitar su contaminación durante la manipulación, eliminando esencialmente el contacto directo entre el analista y los artículos de prueba. Todas las transferencias de material al interior ■y exterior ■^{1S} (USP30) del aislador se realizan de manera aséptica mientras se mantiene una separación completa del ambiente. Las manipulaciones asépticas en el interior del aislador se realizan mediante semi-trajes (half-suits), que son componentes flexibles de la pared del aislador y que permiten a los operadores una amplia gama de movimientos dentro del aislador, o mediante guantes y mangas. No es necesario que los operadores usen ropa especial para cuartos limpios cuando llevan a cabo las pruebas de esterilidad dentro de los aisladores; la ropa normal de laboratorio es adecuada, ■aunque con frecuencia se usan guantes estériles debajo de los guantes del aislador como medida de precaución adicional contra la contaminación que entra al recinto del aislador y por razones de higiene. ■^{1S} (USP30) El interior del aislador se trata con sustancias químicas esporicidas que eliminan toda la biocarga viable ■sobre las superficies expuestas. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL AISLADOR

Sistemas de Ventilación

Los aisladores utilizados para pruebas de esterilidad están equipados con filtros de retención microbiana (se requieren filtros HEPA ■o superiores). ■^{1S} (USP30) En reposo, el aislador cumple con los requisitos de calidad del aire para ■un área de Clase 5 ISO según se define en ISO 14644-1 hasta 14644-3* ■^{1S} (USP30) (ver *Evaluación Microbiológica de Cuartos Limpios y Otros Ambientes Controlados* (1116)). No obstante, el aislador no necesita cumplir con las ■condiciones de la Clase 5 durante una operación que puede generar partículas, y no existen requisitos relativos a la velocidad del aire o al coeficiente de intercambio de aire. El aislador debe estar lo suficientemente sellado durante la descontaminación de manera que la diseminación de vapores o gases esporicidas en el ambiente que lo rodea se mantenga a niveles adecuadamente bajos. ■^{1S} (USP30) Cuando existen aberturas directas hacia el ambiente exterior, las condiciones de sobrepresión constante del aire mantienen las condiciones de esterilidad dentro del aislador. ■En general, ambos tipos de aisladores, abiertos y cerrados, se mantienen a presión positiva relativa al ambiente que los rodea, y la sobrepresión más común es de 20 Pa o más. El usuario nunca debe exceder la presión máxima recomendada por el fabricante. ■^{1S} (USP30) El flujo de aire dentro de los aisladores utilizados para las pruebas de esterilidad es unidireccional o turbulento.

Puertas y Puertos de Transferencia

■Los aisladores pueden conectarse a un descontaminador “de paso” o a un aislador de transferencia para posibilitar la recepción directa de medios estériles, líquidos de dilución estériles y suministros estériles desde el descontaminador al sistema aislador. Los puertos para transferencia rápida (PTR) permiten conectar dos aisladores entre sí, por ej. la estación de trabajo y el aislador de transferencia, para que los suministros se puedan trasladar de manera aséptica de un aislador a otro. Las conexiones asépticas entre dos

* Normas Internacionales de la International Organization for Standardization (ISO, por sus siglas en inglés) 14644-1, 14644-2, 14644-3 y 14644-7

aisladores o entre un aislador y un envase equipado con un PTR pueden realizarse en ambientes no clasificados utilizando PTR. [■]_{1S (USP30)} Las superficies no estériles de los PTR se conectan mediante bridas o aros de fijación. Un montaje de juntas comprimidas proporciona un sellado hermético, evitando así la entrada de microorganismos.

Cuando las dos bridas de un PTR se unen para formar un paso hermético, queda expuesta una banda estrecha de la junta obturadora que podría albergar contaminación microbiana. Esta junta expuesta [■] se debe desinfectar de forma rutinaria. [■]_{1S (USP30)} inmediatamente después de hacer la conexión y antes de que los materiales se transfieran a través de los PTR. Se debe utilizar una buena técnica aséptica al transferir los materiales y se debe evitar tocar la junta obturadora con los materiales que se están transfiriendo o con los guantes.

El mantenimiento preventivo y la lubricación de los montajes de juntas se realiza conforme a las recomendaciones del fabricante de los PTR. Las juntas de los PTR se cambian con la frecuencia recomendada y se monitorean periódicamente para detectar cualquier tipo de daño, ya que las juntas cortadas o gastadas no pueden proporcionar un sellado realmente hermético.

Selección de una Ubicación para el Aislador

Los aisladores para las pruebas de esterilidad no tienen que estar instalados necesariamente en un cuarto limpio clasificado, pero es importante situar el aislador en un área de acceso limitado para el personal no esencial. La ubicación apropiada permite que alrededor del aislador haya un espacio adecuado para mover los aisladores de transferencia, para la organización de los materiales y para llevar a cabo el mantenimiento general. No es necesario realizar un monitoreo ambiental del cuarto que rodea al aislador.

El control de la temperatura y la humedad del cuarto es importante para la seguridad y comodidad del operador y es crucial para el uso eficaz de ciertas tecnologías de [■]_{1S (USP30)} descontaminación. [■]_{1S (USP30)} Se prefieren condiciones de temperatura uniformes en el cuarto cuando se empleen métodos de [■]descontaminación. [■]_{1S (USP30)} sensibles a la temperatura. [■]Se debe tener cuidado de situar el aislador de manera que se eviten puntos fríos que podrían resultar en condensación excesiva cuando se usan vapores que condensan para la descontaminación. [■]_{1S (USP30)}

Cambio en la redacción:

VALIDACIÓN DEL SISTEMA AISLADOR

El sistema aislador debe ser validado antes de su uso en pruebas de esterilidad que forman parte del procedimiento de liberación de lotes. Para verificar que el sistema aislador y todo el equipo asociado son adecuados para las pruebas de esterilidad, se efectuarán estudios de validación en tres etapas: calificación de la instalación (CI), calificación operativa (CO) y calificación de funcionamiento (CF). Los siguientes apartados contienen puntos que deben considerarse para validar sistemas aisladores para pruebas de esterilidad. La asignación de funciones de prueba a una etapa determinada del programa de validación (es decir, CI, CO y CF) no es crucial, siempre y cuando se demuestre y se documente el funcionamiento correcto del aislador antes de su uso en los *Ensayos* farmacopeicos.

Calificación de la Instalación (CI)

La etapa de CI incluye una descripción detallada de las características físicas del sistema, como por ejemplo las dimensiones, la configuración interna y los materiales de construcción. La disposición de la unidad se diagrama indicando claramente, y con sus dimensiones, las interfases y los sistemas de transferencia. Se verifica que los servicios generales, como por ejemplo el suministro de aire, de vacío, el sistema de extracción externo y el control de temperatura y humedad, se ajusten a las especificaciones del diseño. Asimismo, se describen con detalle los demás equipos utilizados con

el sistema aislador; si se hacen revisiones a las especificaciones de diseño, éstas también se incluyen. Los manuales del equipo y sus copias se catalogan y se archivan en un lugar de fácil acceso para su consulta y revisión. Se verifica que los planos se ajusten a las especificaciones de diseño. Todos los planos y los diagramas de proceso e instrumentación se catalogan y se archivan en lugares donde sea fácil consultarlos.

Se revisará toda la documentación para verificar que refleja con exactitud los atributos claves del sistema instalado. Esto sirve como referencia general para determinar si el sistema aislador cumple con las especificaciones de diseño y los requisitos de instalación.

Los problemas potenciales de los equipos o de control de proceso, que podrían ocasionar fallas en el sistema durante el funcionamiento, se identifican y documentan durante el análisis en la modalidad de fallas y el análisis de riesgos. El sistema se modifica, si fuera necesario, para minimizar el riesgo de fallas, y se establecen métodos para los puntos de control críticos.

Los resultados de la CI se resumen en un Informe de Calificación de la Instalación. Se recomienda la siguiente documentación.

Equipos—Se realiza una lista de equipos con sus respectivas especificaciones de diseño. El informe de CI verifica que el equipo que cumple con las especificaciones de diseño apropiadas se recibió y se instaló de acuerdo con los requisitos del fabricante.

Materiales de Construcción—Se comprueba que los materiales de construcción de los componentes críticos del sistema se ajustan a las especificaciones de diseño. Se verifica la compatibilidad del método de [■]descontaminación. [■]_{1S (USP30)} previsto con los materiales de construcción.

Instrumentos—Se realiza un listado de los instrumentos del sistema, incluido su estado de calibración.

Especificaciones de los Servicios—Se comprueba que todos los servicios necesarios para el funcionamiento del sistema—según se definen en los manuales de uso y en los diagramas de proceso e instrumentación—están disponibles y cumplen con las especificaciones del diseño. Se inspeccionan todas las conexiones entre los sistemas de servicios y el sistema aislador, y se verifica que estas conexiones se ajustan a las especificaciones.

Certificación de Filtros—Se prueban y certifican los filtros HEPA y cualquier otro filtro de retención microbiana; se incluyen copias de los resultados de las pruebas y de los certificados en el informe de CI. Se revisan las solicitudes de compra y se verifica que el sistema de filtrado de aire cumple con las especificaciones.

Programas informáticos—Se realizará un listado de todos los programas informáticos asociados con el sistema aislador; se indicará el nombre, las dimensiones y el número de revisión del archivo. Se verifica el correcto etiquetado de los discos maestros de la computadora y se almacenan de manera segura.

Calificación Operativa (CO)

En la etapa de CO se verifica que el sistema aislador funciona de acuerdo con las especificaciones operativas.

Comprobación del Desempeño Operativo—Esta prueba verifica que todas las funciones de alerta y alarma cumplen con sus respectivas especificaciones funcionales. Se verifica la capacidad del sistema para cumplir con todos los puntos establecidos y los parámetros ajustables.

Comprobación de la Integridad del Aislador—La integridad del aislador se mantiene durante todas las condiciones normales de funcionamiento. Se realiza una prueba de fugas para verificar que se cumplen las especificaciones funcionales del fabricante y para garantizar la seguridad antes de cargar el aislador con una sustancia química [■]esporicida descontaminante. [■]_{1S (USP30)} Para proporcionar protección contra la contaminación accidental, los aisladores funcionan con una presión [■]_{1S (USP30)} positiva [■]adecuada. [■]_{1S (USP30)} durante el funcionamiento normal. [■]Los estudios de validación deben demostrar que el valor establecido de presión de aire. [■]_{1S (USP30)} puede mantenerse y controlarse durante el funcionamiento del sistema.

Verificación del Ciclo de [■]Descontaminación. [■]_{1S (USP30)}—[■]Se verifica el ciclo de descontaminación que es la función del equipo de descontaminación conjuntamente con el (los) aislador(es). [■]_{1S (USP30)}

Se pueden utilizar distintos métodos de ■descontaminación_{■1S (USP30)} para eliminar la biocarga de los sistemas aisladores y los suministros. Entre las sustancias químicas que se han utilizado para tratar los aisladores están el ácido peracético, el dióxido de cloro, el ozono y el peróxido de hidrógeno; cada uno tiene distintos requisitos relativos a las condiciones de exposición y al control del proceso. Es crucial que se cumplan los requisitos operativos del fabricante para el método de ■descontaminación_{■1S (USP30)} seleccionado y que éstos se describan en las especificaciones de funcionamiento. ■1S (USP30) La temperatura dentro del aislador también es importante, especialmente para la ■descontaminación_{■1S (USP30)} con vapor de peróxido de hidrógeno, en donde es crucial mantener la concentración ■en relación con_{■1S (USP30)} punto de condensación. Con algunas sustancias químicas esterilizantes como el dióxido de cloro y el ozono, se requiere la adición de humedad al aislador antes de la ■descontaminación_{■1S (USP30)}. Cuando sea necesaria una humedad relativa elevada, la capacidad para controlarla debe ser verificada durante la CO.

También es importante verificar la concentración y distribución de la sustancia química ■descontaminante_{■1S (USP30)}. Cuando se aplique en forma de vapor o de gas, ■la distribución puede evaluarse empleando indicadores químicos, métodos espectroscópicos o detectores electrónicos_{■1S (USP30)}.

Los métodos de ■descontaminación_{■1S (USP30)} de gas y de vapor ■pueden_{■1S (USP30)} requerir ventiladores en el aislador para distribuir la sustancia química de manera uniforme. La ubicación y la orientación de estos ventiladores se ajustan para asegurar la distribución óptima del aire. ■Si el aislador utiliza un sistema de recirculación de flujo de aire unidireccional, puede que no se requieran los ventiladores de distribución; sin embargo, esto se debe evaluar caso por caso_{■1S (USP30)}. Dado que las estanterías, los equipos, los montajes de guantes-mangas y los semi-trajes (half-suits) afectan los patrones de distribución, los controles de distribución se realizan con el aislador completamente cargado con equipos y suministros, y se define y documenta la instalación de estas unidades.

Muchas instalaciones utilizan aisladores de transferencia más pequeños como unidades portátiles de ■descontaminación_{■1S (USP30)} de superficies. En estos aisladores de transferencia, los artículos de prueba y los suministros se tratan químicamente para eliminar la biocarga antes de su transferencia a través de un PTR al interior del aislador de prueba. Se define su configuración de carga y se revisan y verifican los planos de configuración durante la CO. [NOTA—Las sustancias químicas ■descontaminantes_{■1S (USP30)} utilizadas en los aisladores actúan sobre la superficie de los materiales; por lo tanto, toda superficie que quede tapada no será tratada y podría contener biocarga viable. ■Se deben tomar medidas de precaución especiales para tratar con esporicida las superficies que se sabe están tapadas y pudieran destaparse durante las pruebas de esterilidad_{■1S (USP30)}.]

Los agentes ■descontaminantes_{■1S (USP30)} tienen que retirarse del aislador después del tiempo de exposición, lo que se logra gracias a una corriente de aire nuevo, suministrada ya sea a través del equipo de ■descontaminación_{■1S (USP30)} o mediante ■el uso del sistema de ventilación del aislador_{■1S (USP30)}. La ventilación se logra en un circuito abierto, en el cual el gas se ventea a través de un orificio de ventilación hacia la atmósfera, o en un circuito cerrado, en donde la sustancia química es retirada y destruida por el equipo de ■descontaminación_{■1S (USP30)}. Se comprueba el sistema de ventilación; si se utiliza una configuración de circuito abierto, se comprueba el flujo y la seguridad del sistema de venteo.

Desarrollo del Ciclo de ■Descontaminación_{■1S (USP30)}—Cuando se termina la CO, tiene lugar el desarrollo del ciclo de ■descontaminación_{■1S (USP30)} para establecer los parámetros necesarios para el control del proceso durante los ciclos de ■descontaminación_{■1S (USP30)} de rutina. Cualquiera de los métodos generalmente utilizados en la industria para la validación de los procesos de ■descontaminación_{■1S (USP30)}—incluidos los métodos basados en la biocarga, ■ciclos fraccionados_{■1S (USP30)} y de sobremuerte—son adecuados. El proceso de ■descontaminación_{■1S (USP30)} se confronta con indicadores biológicos (IB, por sus siglas en inglés). Se ■debe conocer_{■1S (USP30)} la población de esporas y la resistencia de los IB a las condiciones de ■descontaminación_{■1S (USP30)} aplicadas. Siempre que sea posible, ■se realiza una estimación del valor D para cada sistema IB o, como alternativa, se obtiene una curva de

supervivencia para el sistema IB_{■1S (USP30)} (ver *Indicadores Biológicos—Pruebas de Resistencia* (55)); es aceptable que el proveedor de los IB proporcione el valor D. ■1S (USP30)

Calificaciones de Funcionamiento (CF)

En la etapa de CF se verifica que el sistema funciona de acuerdo con las especificaciones requeridas por su operador. Al concluir la etapa de CF, se verifica la eficacia del ciclo de ■descontaminación_{■1S (USP30)} y, si correspondiera, la suficiencia del venteo de la sustancia química ■descontaminante_{■1S (USP30)}. Todos los datos de CF se resumen, revisan y archivan adecuadamente.

Verificación de Limpieza—En general, la limpieza no es crucial para realizar las pruebas de esterilidad. Sin embargo, los residuos de producto son motivo de preocupación cuando se prueban varios productos distintos, particularmente por los agentes antimicrobianos agresivos, ya que estos materiales podrían interferir en la capacidad de las pruebas subsiguientes para detectar niveles bajos de contaminación en el producto. La preocupación acerca de la contaminación con el producto aumenta cuando se trata de un polvo que es inherentemente antimicrobiano, ya que los polvos se diseminan más fácilmente. Limpiar hasta un nivel en donde no exista contaminación visible, resulta ser suficiente para los sistemas aisladores para pruebas de esterilidad, y es un requisito adecuado de especificación para el operador. Documentar el método, la frecuencia, el equipo y los materiales de limpieza utilizados para limpiar el aislador.

Validación de la ■Descontaminación_{■1S (USP30)}—Se tratan las superficies interiores del aislador, los equipos dentro del aislador y los materiales introducidos en el aislador para eliminar toda la biocarga. ■1S (USP30) Los métodos de ■descontaminación_{■1S (USP30)} utilizados para tratar aisladores, artículos de prueba y suministros para pruebas de esterilidad pueden alcanzar de forma reproducible ■una reducción mayor de tres_{■1S (USP30)} unidades logarítmicas en la biocarga de un indicador biológico ■1S (USP30) de alta resistencia (IB; ver *Indicadores Biológicos para Esterilización* (1035)), según se verifica por los métodos de fracción negativa o de análisis de muerte total. Los estudios de análisis de muerte total son adecuados para IB con una población de ■10³_{■1S (USP30)} esporas por unidad, mientras que los estudios de fracción negativa son apropiados para IB con una población de 10⁵ o superior. Se utiliza un número suficiente de IB para probar la reproducibilidad estadística y la distribución adecuada del agente ■descontaminante_{■1S (USP30)}. Se presta particular atención a las áreas que pueden causar problemas con relación a la concentración del agente. Se ■puede requerir_{■1S (USP30)} un número mayor de IB en los aisladores que se cargan con gran cantidad de equipos y materiales. ■1S (USP30) La capacidad del proceso para lograr de manera reproducible una muerte microbiana de ■mayor de tres_{■1S (USP30)} unidades logarítmicas se confirma en tres estudios de validación consecutivos.

El operador establecerá una periodicidad para la ■redescontaminación_{■1S (USP30)} del aislador. La periodicidad puede indicar plazos cortos (pocos días) o largos (varias semanas), dependiendo de la dificultad del mantenimiento de la esterilidad (ver *Mantenimiento de la Asepsia en el Entorno del Aislador*).

Cambio en la redacción:

VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ENVASE

Algunos materiales son susceptibles a los agentes ■descontaminantes_{■1S (USP30)} lo que puede dar como resultado la inhibición del crecimiento microbiano. Son motivo de preocupación la penetración de los agentes ■descontaminantes_{■1S (USP30)} dentro de los envases de los productos, los accesorios tales como los conjuntos de filtros y tuberías o cualquier material que pudiera entrar en contacto con los productos, los medios o los líquidos de dilución utilizados en la prueba de esterilidad. El operador es responsable de verificar que los envases, medios y suministros no resulten afectados por el proceso de ■descontaminación_{■1S (USP30)}. Los tubos con tapa de rosca, los

frascos o los viales con tapones de goma y sellados con precintos han demostrado ser muy resistentes a la penetración de los agentes ■descontaminantes■^{1S} (USP30) habituales. Envolver los materiales en papel de aluminio o colocarlos en un envase sellado evitará el contacto con el agente ■descontaminante■^{1S} (USP30) sin embargo, estos procedimientos también pueden ocasionar que algunas superficies no se ■descontaminen. En algunos casos, puede que sea necesario el uso de ciclos de descontaminación de duración más corta y concentraciones reducidas para minimizar la penetración de agentes descontaminantes dentro del envase o recipiente. Pueden ser aceptables ciclos que proveen valores de muerte menores de tres unidades logarítmicas de BI resistentes siempre que el análisis microbiológico del ambiente demuestre que el (los) aislador(es) se encuentra(n) exento(s) de biocarga recuperable.■^{1S} (USP30)

En muchos casos, el operador elegirá tratar las superficies de los envases del producto en análisis con el agente ■descontaminante■^{1S} (USP30) para minimizar la probabilidad de que entre biocarga en el aislador. El operador es responsable de demostrar, a través de estudios de validación, que la exposición de los envases de producto al agente ■descontaminante■^{1S} (USP30) no influye negativamente en la capacidad de la prueba de esterilidad para detectar niveles bajos de contaminación dentro de estos artículos de prueba. Se recomienda examinar la capacidad del envase para resistir la contaminación utilizando procedimientos de prueba tanto químicos como microbiológicos. Las pruebas de validación de bacteriostasis y fungistasis se deben efectuar utilizando artículos de prueba reales que hayan sido sometidos a todas las etapas del proceso de ■descontaminación■^{1S} (USP30) (ver *Pruebas de Esterilidad* (71)). Esto se aplica tanto a los envases de dispositivos médicos como a los envases y sistemas de cierre de productos farmacéuticos.

En los estudios de validación se debe determinar si los medios de prueba de esterilidad y los medios de control ambiental cumplen con los requisitos de la *Prueba de Promoción de Crecimiento de Organismos Aerobios, Anaerobios y Hongos en Pruebas de Esterilidad* (71).

Cambio en la redacción:

MANTENIMIENTO DE LA ASEPSIA EN EL ENTORNO DEL AISLADOR

Se debe validar la capacidad del sistema aislador para mantener un entorno aséptico durante un período operativo definido. Además, se debe implementar un programa de monitoreo microbiológico para detectar el mal funcionamiento del sistema aislador o la presencia de contaminación accidental dentro del aislador. El monitoreo microbiológico normalmente implica el uso de un programa de muestreo rutinario, que puede incluir, por ejemplo, un muestreo después de la ■descontaminación■^{1S} (USP30) el primer día de funcionamiento y un muestreo el último día del período proyectado para el mantenimiento de la asepsia. Se ■puede realizar un muestreo periódico durante todo el período de uso■^{1S} (USP30) para demostrar el mantenimiento de la asepsia dentro del aislador.

Se puede realizar un monitoreo de las superficies dentro del aislador utilizando placas de contacto para superficies planas o bien hisopos para superficies irregulares. Sin embargo, puesto que los residuos de los medios podrían suponer un riesgo para la asepsia del aislador, es mejor efectuar estas pruebas al final del período de prueba. Si se efectúa de manera concurrente con las pruebas, se debe poner mucha atención para asegurar que se eliminan todos los residuos de las superficies del aislador, ■y que éstas se limpian y desinfectan cuidadosamente.■^{1S} (USP30) Se podrán utilizar muestras activas de aire y placas de sedimentación, pero puede que no sean lo suficientemente sensibles para detectar los niveles tan bajos de contaminación presentes dentro del recinto del aislador.

■Una ruta posible■^{1S} (USP30) para que la contaminación penetre en el aislador es durante la introducción de suministros y muestras en el recinto. Es de vital importancia validar que todos los materiales introducidos en el recinto del aislador estén exentos de contaminación microbiana, así como lo es la inspección periódica de las juntas de obturación para detectar imperfecciones que podrían permitir la entrada de microorganismos. Los conjuntos de guantes y semi-trajes

(half-suits) son otra fuente ■posible■^{1S} (USP30) de contaminación microbiana. Los guantes son motivo especial de preocupación, ya que se utilizan para manejar tanto los materiales para pruebas de esterilidad como los artículos de prueba. ■En la selección de guantes y mangas debe considerarse la resistencia a la punción y a la abrasión. Los materiales Hypalon son resistentes a los esporicidas químicos empleados en la descontaminación de aisladores y también a las punciones, y se encuentran disponibles en distintos espesores para proveer un grado de sensación táctil adecuado a través de los guantes, a la vez que mantienen su integridad.■^{1S} (USP30)

Las filtraciones muy pequeñas en los guantes son difíciles de detectar hasta que el guante se estira durante el uso. Existen varios detectores de filtraciones de guantes comercialmente disponibles; el operador se asegura de que los detectores analicen el guante bajo condiciones tan similares como sea posible a las condiciones de uso reales. Las pruebas microbiológicas se utilizan para complementar o sustituir a las pruebas físicas. [NOTA—Las “placas de toque dactilar” estándar puede que no sean lo suficientemente sensibles para detectar niveles bajos de contaminación. La inmersión de los guantes en agua de peptona al 0,1% seguida de la filtración del diluyente y el sembrando en placa con medio de cultivo puede detectar pérdidas de integridad en los guantes que de otra manera pasarían inadvertidas.]

La realización de un monitoreo continuo de partículas no viables dentro del recinto del aislador es ideal, ya que puede detectar rápidamente fallas en el filtro. Una segunda opción es realizar un monitoreo periódico utilizando un equipo de conteo de partículas portátil. El muestreo de partículas se debe realizar de manera que no plantee ningún riesgo para el mantenimiento de la asepsia dentro del aislador.

Cambio en la redacción:

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESTERILIDAD

Es muy improbable que se obtenga un falso positivo en una prueba de esterilidad en un aislador validado y que funciona adecuadamente si se elimina la biocarga del interior del aislador con un alto grado de garantía, si ■los guantes, mangas y semi-trajes (half-suits) están exentos de filtraciones, y si los PTR funcionan correctamente.■^{1S} (USP30) No obstante, los aisladores son dispositivos mecánicos y sigue siendo necesaria la utilización de buenas técnicas de asepsia. La decisión de invalidar un falso positivo se tomara solamente después de cumplir totalmente con los requisitos que se establecen en *Observación e Interpretación de Resultados en Pruebas de Esterilidad* (71).

Cambio en la redacción:

CAPACITACIÓN Y SEGURIDAD

Al igual que en el caso de las pruebas de esterilidad realizadas en cuartos limpios convencionales, los operadores deben estar capacitados para realizar los procedimientos específicos del aislador. ■El uso adecuado de técnicas asépticas es crucial para la realización de pruebas de esterilidad en aisladores, así como lo es en cuartos limpios. Por lo tanto, se requiere que todos los técnicos que realizan las pruebas de esterilidad estén capacitados en cuanto a las técnicas asépticas adecuadas.■^{1S} (USP30) Todas las sesiones de capacitación y la evaluación del desempeño del operador se documentan en el historial de capacitación del individuo. Es necesario que todo el personal esté capacitado en los procedimientos de seguridad necesarios para el funcionamiento y mantenimiento del sistema de aislamiento.

Se debe evaluar la seguridad del personal en el uso de un agente ■descontaminante■^{1S} (USP30) Las Hojas de Datos de Seguridad del Material (Material Safety Data Sheets), o documentos equivalentes, deben estar disponibles en el área inmediata al lugar donde se

está utilizando el agente ■descontaminante.■^{1S} (USP30). Se deben seguir todas las precauciones de almacenamiento y seguridad. Antes de que la unidad entre en servicio, se debe efectuar y documentar una inspección del aislador y todo el equipo asociado para verificar que estén operativamente listos con respecto a su seguridad.

Agregar lo siguiente:

■<1217> FUERZA DE RUPTURA DE LAS TABLETAS

INTRODUCCIÓN

Como sistemas de administración de agentes farmacéuticos, las tabletas se encuentran en una gran variedad de presentaciones, tales como tabletas de desintegración rápida, de desintegración lenta, erosionables, masticables y de disolución bucal. Cada una de estas presentaciones exige ciertas condiciones para la unión, estructura e integridad de la matriz comprimida. Las tabletas deben ser capaces de resistir los rigores de la manipulación y transporte en la planta de fabricación, en el sistema de distribución del medicamento y, ya en el mercado, en manos de los usuarios finales (pacientes/consumidores). Los procesos de fabricación como el recubrimiento, el envasado y la impresión pueden implicar un estrés considerable que las tabletas deben estar en condiciones de soportar. Por esas razones, la resistencia mecánica de las tabletas reviste una importancia considerable y es un factor que se mide en forma rutinaria. La resistencia de la tableta sirve a la vez como criterio para conducir el desarrollo del producto y como una especificación de control de calidad.

Una prueba empleada con frecuencia para medir la capacidad de las tabletas para resistir fuerzas mecánicas consiste en ponerlas a rotar en un cilindro rotatorio con el fin de determinar su resistencia a las desportilladuras y a la abrasión de su superficie. El porcentaje de pérdida de peso después de la rotación se conoce como *friabilidad* de las tabletas. Los métodos estandarizados y el equipo para probar la friabilidad se describen en el capítulo general *Friabilidad de Tabletas* <1216>.

Otra medida de la integridad mecánica de las tabletas es su *fuerza de ruptura*, que es la fuerza requerida para que se fracturen (ej., se rompan) en un plano específico. Por lo general las tabletas se colocan entre dos platinas, una de las cuales se mueve para aplicar suficiente fuerza a la tableta hasta ocasionar su fractura. En caso de tabletas convencionales redondas (de corte transversal circular), la carga ocurre a través del diámetro (lo que se llama en ocasiones carga diametral) y la fractura ocurre en ese plano.

En la literatura farmacéutica, la fuerza de ruptura de las tabletas se conoce comúnmente como *dureza*; sin embargo, el uso de este término se presta a confusiones. En la ciencia de materiales, el término *dureza* se refiere a la resistencia de una superficie a la penetración o la hendidura con un indentador pequeño. El término *resistencia a la rotura* se usa también con frecuencia para describir la resistencia de las tabletas a la aplicación de una carga de compresión. Aunque este término describe la verdadera naturaleza de la prueba con más exactitud que el término *dureza*, pareciera implicar que las tabletas se trituran durante la prueba, lo cual a menudo no es el caso. Más aún, el término *resistencia* en esta aplicación podría cuestionarse, porque en física se usa con frecuencia para describir una tensión (ej., resistencia a la tracción). Por lo tanto, se prefiere el término *fuerza de ruptura*, que se usará en la presente discusión.

DETERMINACIONES DE LA FUERZA DE RUPTURA DE LAS TABLETAS

Los dispositivos de medición usados anteriormente eran, en general, manuales. Por ejemplo, el medidor de dureza Monsanto (o Stokes) comprimía las tabletas entre dos mordazas por medio de un tornillo y calibre de resorte. En el medidor de dureza Pfizer, la tableta se montaba verticalmente y se apretaba en un dispositivo que se asemejaba a un par de pinzas. En el durómetro Strong Cobb, la carga de ruptura se aplicaba por medio de una pequeña bomba hidráulica, que primero se hacía funcionar manualmente pero luego fue motorizada. Los problemas asociados con estos dispositivos estaban relacionados con la variabilidad de la velocidad de carga entre operarios y las dificultades en el montaje y en la calibración apropiados. Los medidores modernos emplean accionadores mecánicos, celdas de carga extensiométricas para mediciones de fuerza y procesamiento de señales electrónicas, siendo, por consiguiente, preferidos. Sin embargo, al usarlos para la determinación analítica de la fuerza de ruptura se deben tener en cuenta ciertos aspectos importantes que se discuten a continuación.

Platinas

Las platinas deben ser paralelas. Sus caras deben estar pulidas y rectificadas con precisión en forma perpendicular a la dirección del movimiento. La perpendicularidad se debe mantener durante el movimiento de la platina y el mecanismo debe estar libre de cualquier desplazamiento por flexión o torsión a medida que se aplica la carga. Las superficies de contacto deben ser más grandes que el área de contacto con la tableta.

Velocidad y Uniformidad de la Carga

Tanto la velocidad de movimiento de la platina como la velocidad a la cual se aplica la fuerza de compresión (es decir, la velocidad de carga) deben ser constantes. Cuando se mantiene una velocidad de carga constante se evita la rápida acumulación de cargas de compresión, lo cual podría llevar al cizallamiento o la trituración incontrolada y a una mayor variabilidad en la fuerza de ruptura medida. Sin embargo, las mediciones de velocidad de carga constante pueden ser demasiado lentas para el monitoreo de la producción de tabletas en tiempo real.

La velocidad a la cual se aplica la carga de compresión puede afectar significativamente los resultados, dado que en la fractura de la tableta pueden estar involucrados procesos que dependen del tiempo (*t*). La forma en que la matriz de una tableta responde a las diferencias en la velocidad de carga depende del mecanismo de la fractura. A bajas velocidades de deformación, algunos materiales se fracturan en forma dúctil, pero con velocidades de deformación más altas hay mayor probabilidad de que la fractura sea frágil. La transición de fractura dúctil a frágil se acompaña por un aumento en la fuerza de ruptura. Los dispositivos que simplemente trituran las tabletas pueden producir datos reproducibles que son engañosos porque carecen de sensibilidad.

Se debe realizar la prueba uniformemente con un equipo que se ha calibrado de forma rutinaria. Cambiar entre equipos de prueba de diseños distintos o entre fabricantes diferentes requerirá una comparación de los datos para asegurarse que las dos unidades someten la forma farmacéutica a una fuerza semejante y de manera similar. Los equipos disponibles actualmente proporcionan una velocidad de carga constante de 20 newtons (N) o menos por segundo, o un movimiento constante de la platina de 3,5 mm o menos por segundo. La ruptura controlada y uniforme es un atributo importante del procedimiento de prueba. Con el fin de garantizar la comparabilidad de los resultados, las pruebas se deben realizar bajo condiciones idénticas de velocidad de carga o movimiento de la platina. Dado que cada sistema de aplicación de carga tiene ciertas ventajas, ambos se usan en la práctica. Puesto que la situación particular de la prueba y el tipo de matriz de la tableta que se está evaluando imponen limitaciones diferentes, tampoco se cuenta con bases para declarar la preferencia absoluta por uno de los sistemas. Este capítulo general propone tomar en consideración ambos enfoques.

Los distintos métodos pueden llevar a resultados numéricamente diferentes para una muestra de tabletas dada, lo cual requiere que se especifique la velocidad de aplicación de carga o el desplazamiento, junto con la fuerza de ruptura determinada.

Fuerza de Ruptura - Dependencia de la Geometría y Masa de la Tableta

Las mediciones de la fuerza de ruptura no tienen en cuenta las dimensiones ni la forma de la tableta. Las tabletas más gruesas del mismo material, comprimidas en condiciones idénticas a las de tabletas más delgadas, con la misma forma de punzonera y la misma fuerza, requerirán fuerzas de ruptura mayores. La orientación y la fractura de la tableta deben guardar relación con las observadas durante el desarrollo de la forma farmacéutica. En comparaciones directas (es decir, sin normalización de datos), las mediciones de la fuerza de ruptura se deben efectuar en tabletas que tengan las mismas dimensiones y geometría, y una orientación uniforme en el equipo de prueba.

Orientación de la Tableta

En la compresión diametral de tabletas redondas sin ningún tipo de ranuras, la orientación de la tableta es inequívoca. Esto implica que la tableta se coloca entre las platinas de forma tal que la compresión se produce a través del diámetro. Sin embargo, es posible que las tabletas con una forma singular o compleja no tengan una orientación obvia para la determinación de la fuerza de ruptura. Con el fin de garantizar la comparabilidad de los resultados, lo mejor es convenir una orientación estándar, preferiblemente una que los operarios puedan reproducir fácilmente, dado que la fuerza de ruptura puede depender de la orientación de la tableta en el equipo de medición. En general, las tabletas se someten a prueba en forma diametral o paralela al eje más largo. Las tabletas ranuradas tienen dos posibles orientaciones. Cuando se orientan con las ranuras perpendiculares a las caras de la platina, aumenta la probabilidad de que la fractura por tensión ocurra a lo largo de la ranura. Esto proporciona información sobre la resistencia de la matriz en el punto más débil de la estructura. Se obtiene más información general sobre la resistencia de la matriz cuando las tabletas ranuradas se orientan con las ranuras paralelas a las caras de la platina.

Las tabletas en forma de cápsula o las tabletas ranuradas pueden romperse mejor en una prueba de flexión en tres puntos (2). Un accesorio, que se instala sobre las platinas o las sustituye, soporta la tableta por sus extremos y permite aplicar la carga de ruptura sobre la cara opuesta, en el punto medio de la tableta que no está apoyado. Esos accesorios generalmente se consiguen en el mismo sitio que suministra los medidores de dureza.

Unidades, Resolución y Calibración

Por lo general, los medidores de fuerza de ruptura modernos se calibran en kilopondios o newtons. La relación entre estas unidades de fuerza (3) es 1 kilopondio (kp) = 1 kilogramo fuerza (kgf) = 9,80 N. Se deben expresar los resultados de prueba en unidades estándares de fuerza para facilitar la comunicación. Algunos medidores de fuerza de ruptura ofrecen también una escala en unidades Strong Cobb (USC), una herencia de los días en que los medidores de dureza Strong Cobb eran de uso común. Se debe tener cuidado con la conversión entre USC y N o kp puesto que la USC proviene de un dispositivo hidráulico y es una medida de presión.

Por lo general, los medidores de fuerza de ruptura contemporáneos utilizan diseños electrónicos modernos con lectores digitales. Algunas unidades tienen también una impresora integrada o pueden conectarse a una impresora. Las fuerzas de ruptura se deben poder leer con una aproximación de 1 N.

Los medidores de fuerza de ruptura deben calibrarse periódicamente. El sensor de fuerza, así como la mecánica del aparato deben tenerse en cuenta. En el caso del sensor de fuerza, el intervalo completo de medición (o, como mínimo, el intervalo usado para medir la muestra de prueba) debe calibrarse con una precisión de 1 N, utilizando el método estático o el dinámico. Por lo general, la

calibración estática emplea contrapesos rastreables; se deben verificar al menos tres puntos diferentes con el fin de determinar la linealidad. La calibración dinámica utiliza una celda rastreable de carga de referencia que se comprime entre las platinas. La calibración funcional de un aparato para determinar la fuerza de ruptura debe confirmar también que la velocidad y la constancia de la velocidad para la aplicación de carga o el desplazamiento estén dentro de las tolerancias prescritas en todo el intervalo de movimiento de la platina.

Tamaño de la Muestra

Con el fin de conseguir la suficiente precisión estadística para la determinación de la fuerza de ruptura promedio, se deben analizar como mínimo muestras de 6 tabletas. La fuerza de ruptura promedio por sí sola puede ser adecuada para cumplir el propósito de controlar la calidad del proceso o del producto. En casos en los que la fuerza de ruptura pueda ser particularmente crítica, se debe disponer de los valores individuales y promedio de fuerza de ruptura.

RESISTENCIA A LA TENSIÓN

La medición de las resistencias a la tensión proporciona una medida más importante de la resistencia mecánica del material compactado y tiene en cuenta la geometría de la tableta. Si las tabletas se fracturan por tensión, se puede usar la fuerza de ruptura para calcular la resistencia a la tensión. Desafortunadamente, esto resulta práctico solo para las formas simples. Si las tabletas redondas de caras planas (cilindros rectos de bases circulares) se fracturan por tensión, como lo indica una separación completa de las mitades bajo compresión diametral, se puede usar la fuerza de ruptura para calcular la resistencia a la tensión por medio de la siguiente ecuación (4), que se aplica sólo a tabletas cilíndricas:

$$\sigma_x = \frac{2F}{\pi DH}$$

en donde σ_x es la resistencia a la tensión, F es la fuerza de ruptura, D es el diámetro de la tableta y H es el espesor de la tableta. Dado que sólo se consideran las tabletas que se fracturan por tensión, los datos se basan en las tabletas que se fracturan en forma congruente. Por lo tanto, la reproducibilidad de los datos debe mejorarse cuando se comparan con las pruebas de resistencia a la ruptura convencionales. Más aún, los datos deben normalizarse con respecto a las dimensiones de la tableta, puesto que tanto el diámetro como el espesor se incluyen en la ecuación. La derivación de esta ecuación se puede encontrar en los textos de referencia (5, 6); se basa en la teoría elástica y en las siguientes suposiciones:

1. La tableta es un cuerpo isotrópico
2. Obedece a la ley de Hooke
3. El módulo de elasticidad en compresión y en tensión es el mismo
4. Existe un punto de carga ideal

La derivación se ha extendido a las tabletas de caras convexas (7, 8):

$$\sigma_x = \frac{10F}{\pi D^2} \left[\frac{2,84H}{D} - \frac{0,126H}{W} + \frac{3,15W}{D} + 0,01 \right]^{-1}$$

en donde σ_x es la resistencia a la tensión, F es la fuerza de ruptura, D es el diámetro de la tableta, H es el espesor de la tableta y W es el espesor central del cilindro (altura de la pared de la tableta).

La velocidad de carga lenta y constante de los medidores modernos de fuerza de ruptura motorizados favorece la fractura por tensión. Sin embargo, el punto de carga ideal puede no ocurrir, debido a la trituración y a la inducción de cizallamiento en la interfase con la superficie de las platinas. La adición de una almohadilla a las platinas ayuda a evitar las cizalladuras en los puntos de contacto y promueve una verdadera fractura por tensión.

Desde ese punto de vista, se recomienda enfáticamente la almohadilla cuando se requieren mediciones muy precisas. Ésta debe ser relativamente delgada para que cualquier desviación con respecto al punto previsto de aplicación de fuerza puntual real no sea grande. La almohadilla debe también colapsar fácilmente de manera que su deformación no se vuelva parte de la fuerza medida por el aparato de prueba. En situaciones de rutina que incluyan mediciones de un gran número de muestras, la adición de almohadilla podría contribuir a inexactitudes en la medición puesto que el polvo de las muestras examinadas anteriormente podría quedarse incrustado en la matriz colapsable y, por lo tanto, alterar sus propiedades. A menos que se contemple el reemplazo frecuente de la almohadilla, puede considerarse aceptable prescindir del uso de la misma para mantener la constancia de las condiciones de la prueba.

Otra opción para determinar la resistencia a la tensión de las tabletas consiste en la flexión o torsión de las tabletas. Bajo las condiciones de carga ideales, una carga de ruptura aplicada al punto medio sin apoyo de una de las caras ocasionará la generación de tensión pura en la cara opuesta. Si las tabletas son cilindros rectos circulares y se someten a flexión en tres puntos, la resistencia a la tensión se puede calcular con la siguiente ecuación (9):

$$\sigma_x = \frac{3FL}{2H^2D}$$

en donde L es la distancia entre los apoyos y los otros términos son iguales a los definidos anteriormente. Las suposiciones son las mismas usadas para calcular la resistencia a la tensión con compresión diametral. Sin embargo, las resistencias a la tensión determinadas por flexión y compresión diametral pueden no concordar debido a la probabilidad de carga no ideal y a la inducción de cizallamiento durante la prueba.

BIBLIOGRAFÍA

1. Davies, P.N.; Newton, J.M. In *Pharmaceutical Powder Compaction Technology*; Alderborn, G., Nystrom, C., Eds.; Marcel Dekker: Nueva York, **1995**; Capítulo 7.
2. Gold, G.; Duvall, R.N.; Palermo, B.T. New instrumentation for determining flexure breaking strength of capsule-shaped tablets. *J. Pharm. Sci.* **1980**, 69(4), 384–386.
3. Diem, K., Ed. *Documenta Geigy, Scientific Tables*, 6th ed.; Geigy Pharmaceuticals: Ardsley, Nueva York, **1969**; 214.
4. Fell, J.T.; Newton, J.M. Determination of tablet strength by the diametral-compression test. *J. Pharm. Sci.* **1970**, 59(5), 688–691.
5. Tomoshenko, S. *Theory of Elasticity*; McGraw-Hill: Nueva York, **1934**; 82–85, 104–109.
6. Frocht, M.M. *Photoelasticity*; John Wiley & Sons: Nueva York, **1948**; 2, 32–39, 118–129.
7. Stanley, P.; Newton, J.M. The tensile fracture stress of capsule-shaped tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* **1980**, 32(12), 852–854.
8. Pitt, K.G.; Newton, J.M.; Stanley, P. Tensile fracture of doubly-convex cylindrical discs under diametral loading. *J. Mater. Sci.* **1988**, 23, 2723–2728.
9. Pitt, K.G.; Newton, J.M.; Richardson, R.; Stanley, P. The material tensile strength of convex-faced aspirin tablets. *J. Pharm. Pharmacol.* **1989**, 41, 289–292. ■^{1S} (USP30)

<1222> PRODUCTOS FARMACÉUTICOS CON ESTERILIZACIÓN TERMINAL—LIBERACIÓN PARAMÉTRICA

Cambio en la redacción:

INTRODUCCIÓN

La liberación paramétrica se define como la liberación de partidas o lotes de productos estériles con esterilización terminal, basada en el cumplimiento de los parámetros de esterilización críticos y definidos, y sin tener que realizar las pruebas que figuran en *Pruebas de Esterilidad* (71). La liberación paramétrica es posible cuando la forma de esterilización se comprende bien, los parámetros físicos del procesamiento están bien definidos y son predecibles y mensurables, y cuando la letalidad del ciclo ha sido validada microbiológicamente mediante el uso de indicadores biológicos apropiados o, en el caso de radiación ionizante, mediante el uso de pruebas dosimétricas y microbiológicas adecuadas. El empleo de la liberación paramétrica para procesos de esterilización requiere previa aprobación de la FDA. Al momento de evaluar solicitudes de registro que incluyan el uso de liberación paramétrica del producto, debe esperarse que las agencias reglamentarias insistan en una justificación científica bien fundada para el proceso de esterilización y en datos de validación bien documentados. Las agencias necesitarán asegurarse de que cualquier muestra comercial de un producto sea estéril y, ■si fuera analizada después de su liberación, ■^{1S} (USP30) cumpliría con los requisitos para esterilidad que se encuentran en el capítulo general *Pruebas de Esterilidad* (71).

Es importante considerar las limitaciones de las *Pruebas de Esterilidad* (71) en la evaluación de productos con esterilización terminal. Las pruebas de esterilidad descritas en el capítulo general (71) tienen una sensibilidad limitada y son estadísticamente poco apropiadas para la evaluación de productos con esterilización terminal dada la probabilidad excesivamente baja de encontrar unidades contaminadas. Por lo tanto, *una vez que un proceso de esterilización está completamente validado y funciona con uniformidad*, una combinación de datos físicos de esterilización tales como los de dosimetría o letalidad acumulada en combinación con otros métodos, como ■monitores de carga (por ej., ■^{1S} (USP30) indicadores biológicos, ■indicadores termoquímicos ■^{1S} (USP30) o integradores fisicoquímicos ■^{1S} (USP30) puede proporcionar información más exacta que las pruebas de esterilidad con respecto a la liberación al mercado de productos con esterilización terminal.

Hay cuatro formas de esterilización que teórica y prácticamente podrían cumplir con los requisitos para la liberación paramétrica: las esterilizaciones por calor húmedo, por calor seco, por óxido de etileno y por radiación ionizante. En este capítulo de información se discuten primeramente las cuestiones generales relacionadas con la liberación paramétrica, sin importar la forma de esterilización, y luego se analizan algunas formas específicas de esterilización. El capítulo *no* trata la liberación paramétrica de dispositivos médicos con esterilización terminal.

Los productos con esterilización terminal representan la categoría de menor riesgo de productos farmacéuticos estériles. A diferencia de los productos fabricados asépticamente en un ambiente microbiológicamente controlado, los productos con esterilización terminal se ■someten a un proceso de esterilización que imparte un nivel mínimo y mensurable de garantía de esterilidad (o SAL, por sus siglas en inglés). Dado que el procesamiento aséptico depende de la exclusión de la contaminación microbiológica y no está basado en la letalidad que se le confiere al producto en su envase sellado, no es posible calcular el SAL. Es importante destacar que en el caso del procesamiento aséptico, el SAL sólo puede estimarse a partir de los índices de contaminación en el llenado de medios de cultivo (media fill) u otra forma de evaluación de riesgo. En el caso de la esterilización terminal, es posible calcular un SAL mínimo

o Probabilidad de No-esterilidad o Falta de Esterilidad (PNS, por sus siglas en inglés) con bastante exactitud. Por lo tanto, el término SAL tiene diferentes significados contextuales cuando se lo emplea para describir procesos asépticos más que procesos terminales, y es importante que los científicos e ingenieros que trabajan en el campo de fabricación y control de productos estériles comprendan claramente esta diferencia. Las siglas PNS y SAL con frecuencia se usan como sinónimos. ■^{1S (USP30)}

Los productos con esterilización terminal deben tener una probabilidad de no-esterilidad (PNS) de no más de una en un millón de unidades producidas. Esto se indica frecuentemente como una PNS ■o un SAL ■^{1S (USP30)} de 10^{-6} , o una probabilidad de supervivencia de la biocarga del producto al proceso de esterilización en una unidad cualquiera del producto menor de uno en un millón. Se puede probar que un producto con esterilización terminal cumple con la PNS de 10^{-6} mediante diferentes enfoques de desarrollo del ciclo de esterilización. La aplicación apropiada de estos métodos requiere de un conocimiento científico exhaustivo del método de esterilización seleccionado para su uso con un producto determinado.

■Las estrategias empleadas para validar ■^{1S (USP30)} el desarrollo de procesos de esterilización terminal se encuentran dentro de tres categorías:

1. Proceso basado en la biocarga.
2. Proceso combinado de indicador biológico/biocarga.
3. Proceso de sobremuerte (overkill).

El proceso basado en la biocarga ■^{1S (USP30)} requiere de un amplio conocimiento de la biocarga del producto. Debe observarse que muchos de los procedimientos de determinación de la dosis de radiación implican el establecimiento del proceso sobre la base del recuento de la biocarga y de la resistencia a la radiación. Este método exige que el proceso de esterilización produzca al menos una PNS de 10^{-6} para la biocarga. Esto significa que si el nivel de biocarga activa del producto es de 10 microorganismos o una unidad logarítmica, deberían inactivarse al menos siete unidades logarítmicas de biocarga para asegurar una PNS de 10^{-6} . El método basado en la biocarga requiere que el usuario desarrolle puntos críticos de control apropiados dentro del proceso para determinar el título de la biocarga. Los productos que facilitan la supervivencia de la biocarga requieren ambientes de fabricación más controlados y controles más precisos durante el proceso. Este proceso es más apropiado para el desarrollo de ciclos en productos limpios o ultra limpios que contienen ■constantemente un nivel bajo de unidades formadoras de colonias (ufc) por unidad de producto ■^{1S (USP30)} con una baja frecuencia de microorganismos formadores de esporas. Asimismo, este proceso puede ser necesario para permitir la esterilización terminal de un producto que pudiera perder cualidades o atributos clave como resultado de un proceso de esterilización más riguroso.

■^{1S (USP30)} El microbiólogo puede encontrar que los procedimientos formales de análisis de riesgo, como por ejemplo los de Análisis de Riesgo y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés), son útiles para establecer las condiciones adecuadas de control de fabricación y los parámetros de control durante el proceso.

El proceso combinado de indicador biológico/biocarga se emplea generalmente cuando el fabricante desea un proceso de esterilización que demuestre la inactivación de gran número de microorganismos indicadores biológicos que se saben resistentes al proceso. Aunque el fabricante pueda tener preferencia por el proceso de sobremuerte (overkill), la posible pérdida de algunos atributos del producto en este tipo de proceso puede ocasionar la necesidad de emplear el proceso combinado indicador biológico/biocarga. Este último requiere del conocimiento de la biocarga dentro y sobre el producto, y de una base de datos referente a la resistencia de la biocarga a la esterilización. La resistencia relativa del indicador biológico seleccionado con respecto a la resistencia de la biocarga se debe establecer dentro o sobre el producto. Frecuentemente se emplean indicadores biológicos ■con ■^{1S (USP30)} aproximadamente 10^6 esporas ■con valor $D_{121} > 1$ minuto ■^{1S (USP30)} en el desarrollo de dicho proceso. Generalmente se realizan ciclos de exposición fraccionada para determinar la resistencia relativa a la esterilización (o valor D) entre el producto inoculado con el o los microorganismos indicadores biológicos y la biocarga encontrada frecuentemente. Este proceso es utilizado con frecuencia para el desarrollo de los

ciclos de esterilización por los fabricantes de productos parenterales con esterilización terminal, y para la esterilización por óxido de etileno de dispositivos médicos.

El proceso de sobremuerte es frecuentemente utilizado cuando el artículo a esterilizar es completamente inerte al agente esterilizante y a las condiciones del ciclo de esterilización, y no existe riesgo de pérdida de los atributos o de la calidad del producto. Cuando se emplea este proceso, se deben tener conocimientos sobre la biocarga ■para asegurar que los materiales no están adulterados antes de la esterilización. Estos datos pueden ser ■^{1S (USP30)} los datos de recuento de la biocarga del producto y también sobre la prevalencia de formadores de esporas. No se necesita que la base de datos para este proceso sea tan extensa como las requeridas para el proceso de biocarga o para el proceso de indicador biológico/biocarga. Para establecer ■la eficacia ■^{1S (USP30)} del proceso de esterilización, se utilizan generalmente indicadores biológicos resistentes al proceso que contienen aproximadamente 10^6 esporas. ■Sin embargo, se puede escoger una población de esporas de N_0 para confirmar un proceso de letalidad adecuado. La sobremuerte por lo general se define como un proceso que daría un mínimo de F_0^1 de 12 minutos (ver *Parámetros Críticos de Operación* más adelante) y se demuestra biológicamente basándose en la reducción logarítmica de esporas de indicadores biológicos calibrados. ■^{1S (USP30)}

Cambio en la redacción:

GENERALIDADES

Validación del Proceso de Esterilización

La liberación paramétrica exige primeramente que el proceso de esterilización elegido sea diseñado y validado para alcanzar una PNS de 10^{-6} . ■^{1S (USP30)} La validación de la mayoría de los procesos de esterilización incluye la validación de los parámetros físicos del proceso y de su eficacia microbiológica mediante el uso de indicadores biológicos. ■Sin embargo, ■^{1S (USP30)} el uso de indicadores biológicos para establecer o validar periódicamente procesos de esterilización por radiación gamma ■es poco común. ■^{1S (USP30)} Los organismos ampliamente reconocidos como indicadores biológicos se emplean en la validación de procesos de calor húmedo, porque permiten la comparación de los datos de letalidad medidos físicamente con la letalidad biológica. Debe existir una correlación razonable entre los datos de letalidad medidos físicamente (F_0) y la letalidad biológica del proceso determinada mediante la evaluación del producto con indicadores biológicos.

■La eficacia predecible de la esterilización terminal basada en la biocarga está fundamentada en el número y la resistencia de los microorganismos dentro o sobre el producto. Por esta razón, uno de los componentes de la liberación paramétrica es un programa activo para el control microbiológico que permita el seguimiento del recuento y la resistencia a la esterilización de la biocarga del producto. ■^{1S (USP30)} El control de la biocarga y su recuento son mucho menos significativos cuando se emplea el diseño de proceso de sobremuerte. En muchos casos, los procesos de sobremuerte no requieren de una evaluación extensiva y continua de la biocarga. También requieren de un menor control del ambiente de fabricación durante el proceso.

Programa de Control Microbiológico de Esterilización

El propósito de este programa de control es asegurar que el estado microbiológico del producto, *antes de ser esterilizado terminalmente*, no se desvíe significativamente del nivel de control microbiológico establecido durante la validación del proceso de esterilización. El programa de control microbiológico incluye el seguimiento de la biocarga dentro y sobre el producto, y el

¹ F_0 se define como el ■tiempo calculado (en minutos) ■^{1S (USP30)} de la letalidad ■del proceso ■^{1S (USP30)} equivalente ■al tiempo ■^{1S (USP30)} a 121.1° , ■asumiendo ■^{1S (USP30)} un valor Z de 10.0° en el producto que se va a esterilizar.

seguimiento del estado microbiológico de los envases, cierres o materiales de empaque que se necesiten. También incluye un programa de evaluación del estado microbiológico del ambiente donde se procesa el producto. El programa de control es particularmente importante en los casos en donde la esterilización terminal no está basada en la sobremuerte, sino en los enfoques de desarrollo de ciclos basados en la biocarga o en la combinación de indicador biológico/biocarga. En muchos casos, no se requerirá el control de la biocarga y el seguimiento del ambiente de fabricación para diseños del proceso de sobremuerte, en donde la F_0 del proceso sea por lo menos de 12 minutos. En otros casos será necesario algún seguimiento limitado, aunque se use el diseño de proceso de sobremuerte. En general, el seguimiento de la biocarga en los procesos de sobremuerte se limita a aquellos productos que sustentan el crecimiento microbiano. ^{1S (USP30)} Reviste especial preocupación en este caso la posibilidad latente de contaminación del producto con toxinas microbianas o de degradación por microorganismos.

La frecuencia del seguimiento dependerá de las variaciones en la biocarga proveniente de fuentes potenciales. Deben considerarse el número de microorganismos, su identificación, así como su resistencia a la forma de esterilización específica cuando se establece la liberación paramétrica del producto con esterilización terminal. La resistencia de diferentes especies a formas de esterilización específicas puede afectar la eficacia de la esterilización y la determinación de las condiciones del proceso de esterilización cuando se usa un método de biocarga o un proceso combinado de biocarga/indicador biológico en el desarrollo del ciclo. En el desarrollo del proceso usando el enfoque de biocarga, pueden usarse organismos indicadores más resistentes que los típicos de la biocarga, aunque no se requieren diferencias extremas en la resistencia. La información sobre el desempeño de indicadores biológicos puede encontrarse en el capítulo general *Indicadores Biológicos—Pruebas de Resistencia* (55).

Sistema de Control de Cambios

Los cambios introducidos en el equipo del proceso de esterilización pueden ocasionar una desviación significativa del proceso de liberación paramétrica inicialmente validado. Por lo tanto, es esencial que se establezca un sistema de control de cambios. Un sistema de control de cambios es un sistema formal con procedimientos operativos estándares apropiados, que incluye la aprobación de cambios en el equipo del proceso de esterilización. Este sistema permitiría la evaluación de todos los cambios relacionados con los parámetros críticos de la liberación paramétrica. El sistema de control de cambios también incluye una revisión técnica y gerencial, y criterios para la aceptación y revisión de cambios. ^{1S (USP30)} Si un cambio pudiera afectar significativamente cualquier parámetro crítico, cada parámetro tendría que ser revalidado para asegurar la esterilidad del producto farmacéutico con una PNS mínima de 10^{-6} . Una notificación apropiada a la agencia reglamentaria también debería formar parte del proceso de revalidación.

Procedimientos de Liberación

Debe establecerse un programa de garantía de la calidad que describa en detalle los pasos para la liberación paramétrica de las partidas o lotes de productos esterilizados y la documentación requerida. Aunque la garantía de esterilidad de los productos se basa primariamente en la medición de los parámetros físicos del proceso, se deben revisar, documentar y aprobar varios asuntos para la liberación paramétrica de esos productos. Entre estos asuntos se encuentran los siguientes: revisión de los registros de partida; revisión de los resultados del programa de control ambiental microbiológico en curso y de la biocarga previa a la esterilización; y una revisión de los registros de datos termográficos, de los monitores de carga y de los resultados de los datos críticos y no críticos que puedan haber sido utilizados para demostrar el control del proceso. También es importante asegurar que el esterilizador se encuentra actualizado en cuanto a calibración, mantenimiento y revalidación. ^{1S (USP30)}

El programa de liberación paramétrica no se implementa ni practica en forma intermitente. Una vez implementado dicho programa, la liberación del producto esterilizado se hace de acuerdo con los requisitos del programa aprobado reglamentariamente. La liberación del producto por otros medios no es aceptable si no se alcanzan los parámetros críticos de funcionamiento predefinidos.

Cambio en la redacción:

FORMAS DE ESTERILIZACIÓN

Esterilización por Calor Húmedo

La esterilización por calor húmedo de productos farmacéuticos abarca varios tipos de ambientes y medios de esterilización. Los procesos de vapor saturado, de rocío de agua caliente y de inmersión en agua caliente son considerados ambientes de esterilización por calor húmedo. Pueden emplearse diferentes procesos para esterilizar productos por calor húmedo, éstos pueden utilizar esterilizadores de lote o esterilizadores continuos.

PARÁMETROS CRÍTICOS DE FUNCIONAMIENTO

En las especificaciones del proceso de esterilización se define y establece una lista de parámetros clave del proceso con sus respectivos límites operativos. Los parámetros críticos de funcionamiento son aquellos absolutamente esenciales para asegurar la esterilización del producto a una PNS de 10^{-6} . Entre los ejemplos de parámetros críticos de funcionamiento se pueden incluir, aunque no exclusivamente, los siguientes: los límites de tiempo de permanencia, ^{1S (USP30)} los límites mínimo y máximo para la temperatura de permanencia pico del proceso, la temperatura de permanencia pico promedio y los resultados de las pruebas de liberación de la partida o lote que satisfacen los requisitos de CFR, Parte 211 (por ej., los resultados de laboratorio para un monitor de carga). ^{1S (USP30)} El valor de F_0 puede usarse ^{1S (USP30)} como un parámetro crítico sólo cuando ^{1S (USP30)} las relaciones entre temperatura y tiempo están bien definidas. ^{1S (USP30)} Otros parámetros medidos pueden considerarse parámetros secundarios (o no críticos); y entre ellos se encuentran el tiempo de permanencia máximo y mínimo para el pico de temperatura, la presión de la cámara y, si correspondiera, el nivel de agua de la cámara, el tiempo en que el agua esterilizante permanece por encima de los límites de temperatura definidos, y el diferencial de presión de la bomba recirculante de agua.

Esterilización por Óxido de Etileno

La implementación de la liberación paramétrica de productos farmacéuticos esterilizados por óxido de etileno es más dificultosa que la liberación paramétrica de productos esterilizados por procesos de calor húmedo. Los parámetros críticos para ^{1S (USP30)} la esterilización por óxido de etileno (ETO, por sus siglas en inglés) se interrelacionan y son más complicados que los de los procesos de calor húmedo. ^{1S (USP30)}

PARÁMETROS CRÍTICOS DE FUNCIONAMIENTO

Los parámetros críticos pueden incluir los siguientes: temperatura, cantidad de humedad relativa presente, concentración de óxido de etileno, tiempo total de exposición, densidad del producto y de la carga, y factores de permeabilidad del gas. ^{1S (USP30)}

La liberación paramétrica de productos farmacéuticos puede lograrse si se emplea un sistema automatizado de medición de los parámetros críticos, y las cargas de esterilización se definen con límites estrechos y se validan de acuerdo a los tipos de producto, densidades, materiales de empaque y configuración global de la carga. Un ejemplo de la medición de factores críticos que puede ser considerado para la liberación paramétrica sería el uso de registradores de presión de ETO calibrados para proporcionar un

estimación de la concentración de ETO durante todo el proceso, o el uso de mediciones directas de la concentración de ETO por IR o cromatografía de gases. Debido a las variaciones que pueden ocurrir en los parámetros clave durante la esterilización, la liberación paramétrica no es ampliamente usada para productos esterilizados por ETO.

Sin embargo, para asegurar una liberación paramétrica, además de ceñirse a los parámetros \blacksquare_{1S} (USP30) del proceso de esterilización por óxido de etileno, \blacksquare con frecuencia \blacksquare_{1S} (USP30) se emplean indicadores biológicos (y sus pruebas de esterilidad posterior al procesamiento de esterilización) o integradores fisicoquímicos para la esterilización por óxido de etileno \blacksquare como monitores de carga (parámetros críticos). \blacksquare_{1S} (USP30)

Esterilización por Radiación

Se han usado dos procesos de esterilización por radiación: la esterilización por rayos gamma y la esterilización por haz de electrones (es decir, radiación ionizante). Algunos productos farmacéuticos, tanto a granel como en sus formas terminadas, han sido esterilizados por radiación. Al tratar los parámetros críticos necesarios para la liberación paramétrica en la esterilización por radiación, la liberación paramétrica se refiere a menudo como *liberación dosimétrica*. La liberación dosimétrica se establece por el uso de un dosímetro químico que detecta la liberación de una dosis mínima específica de radiación, la cual ha demostrado que esteriliza el producto a una PNS mínima de 10^{-6} .

El dosímetro en la esterilización por radiación ionizante que se emplea para medir la recepción de una dosis mínima de radiación, se coloca en una zona preestablecida que absorbe dosis bajas en el transportador del producto irradiado. Esto requerirá el mapeo del perfil de la radiación ionizante absorbida a través de las diversas densidades procesadas en el transportador del producto. La dosis de radiación más baja que se especifica para el proceso se correlaciona con los niveles predecibles de reducción de la biocarga, mediante cualquiera de los tres métodos documentados.² Es posible considerar un método alternativo disponiendo del recuento extensivo de la biocarga del producto y de los datos de resistencia a la radiación. Los estudios de verificación de la dosis se realizarán con el fin de asegurar que la peor de las biocargas, considerando su resistencia y recuento, pueda ser inactivada en la zona de recepción de la dosis

más baja en el sistema transportador, de forma que se logre al menos una \blacksquare_{PNS} de 10^{-6} . \blacksquare_{1S} (USP30) Este método requerirá desde luego un programa continuo de evaluación de la biocarga. El objetivo para el ciclo de radiación es una PNS mínima de 10^{-6} en cuanto a la biocarga del producto. \blacksquare_{1S} (USP30) La liberación dosimétrica de un producto esterilizado por radiación depende de recepción de una dosis mínima, por lo tanto, los parámetros críticos de funcionamiento que gobiernan la recepción de esa dosis deben estar dentro de límites especificados. Estos parámetros críticos de funcionamiento pueden incluir: configuración de apilado dentro del transportador, densidad del producto a granel, velocidad de la cinta o del sistema transportador, distancia a la fuente de radiación, duración de la exposición del producto, y ajustes adecuados y definidos para compensar la desintegración de la fuente de radiación. La demostración de uniformidad en la dosis de radiación absorbida en las zonas de mínima y máxima absorción de la radiación dentro de los transportadores totalmente cargados, considerada sobre la base de las variaciones entre lotes es una condición necesaria para la liberación dosimétrica de productos farmacéuticos esterilizados por radiación.

Cambio en la redacción:

RESUMEN

El uso de la liberación paramétrica como sucedánea de las pruebas de esterilidad de productos descritas en el capítulo general *Pruebas de Esterilidad* (71) exige la aprobación previa de la FDA. La liberación paramétrica es ventajosa para productos con esterilización terminal. La gran extensión de datos requeridos para establecer la liberación paramétrica, \blacksquare en comparación con los procedimientos del capítulo general (71) los cuales son poco sensibles a niveles muy bajos de contaminación microbiana, \blacksquare_{1S} (USP30) puede dar como resultado una evaluación más exacta y confiable de la probabilidad de falta de esterilidad en lotes de producto. \blacksquare_{1S} (USP30)

² ANSI/AAMI/ISO 11137-1996, *Esterilización de Productos para el Cuidado de la Salud—Requisitos para la Validación y el Control de Rutina—Esterilización por Radiación*, 11 de Julio, 1994.

Reactivos, Indicadores y Soluciones

ESPECIFICACIONES DE REACTIVOS

Cambio en la redacción:

Aceite de Cedro (para aclarar cortes de muestras para microscopía)—■[8000-27-9]■_{1S} (USP30)—Se debe usar un aceite seleccionado y destilado de la madera del cedro rojo, *Juniperus virginiana* L. (Fam. Pinaceae), para este propósito. Índice de refracción: aproximadamente 1,504 a 20°. Para usarse con lentes de inmersión homogénea, se requiere un aceite especialmente preparado con un índice de refracción de $1,5150 \pm 0,0002$ a 20°.

Cambio en la redacción:

Acetaldehído ■(Etanal; Aldehído Acético).■_{1S} (USP30) CH_3CHO —44,05 ■[75-07-0]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro. Miscible con agua y con alcohol. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetanilida ■(Fenilacetamida; Antifebrina).■_{1S} (USP30) $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$ —135,16 ■[103-84-4]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos brillantes, generalmente en escamas o polvo cristalino blanco. Es estable al aire. Fácilmente soluble en alcohol y en cloroformo; soluble en agua hirviendo, en éter y en glicerina; poco soluble en agua.

Intervalo de fusión (741): entre 114° y 116°.

Reacción—La solución saturada de este reactivo es neutra al tornasol.

Pérdida por secado (731)—Secar sobre ácido sulfúrico durante 2 horas: no pierde más de 0,5% de su peso.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,05%.

Cambio en la redacción:

Acetato Cobaltoso (Acetato de Cobalto), $\text{Co}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —249,08 ■[71-48-7]■_{1S} (USP30)—Cristales rojos en forma de aguja. Soluble en agua y en alcohol. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetato Cúprico, $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ —199,65 ■[142-71-2]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetato de Amilo (Acetato de Isoamilo), $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_5\text{H}_{11}$ —130,18 ■[2308-18-1]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente e incoloro. Poco soluble en agua. Miscible con alcohol, alcohol amílico, benceno y éter.

Peso específico (841): aproximadamente 0,87.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos, Método I): no menos de 90% entre 137° y 142°.

Solubilidad en alcohol diluido—Una porción de 1,0 mL se disuelve en 20 mL de alcohol diluido para formar una solución transparente.

Acidez—Agregar 5,0 mL a 40 mL de alcohol neutralizado y, si el color rosado desaparece, valorar volumétricamente con hidróxido de sodio 0,10 N: no se requiere más de 0,20 mL para restituir el color rosado (aproximadamente 0,02% como CH_3COOH).

Agua—Una porción de 5 mL produce una solución transparente con 5 mL de disulfuro de carbono.

Cambio en la redacción:

Acetato de Amonio, $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ —77,08 ■[631-61-8]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetato de Butilo Normal, $\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ —116,16 ■[123-86-4]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetato de Cadmio, $\text{C}_2\text{H}_6\text{CdO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —266,53 ■[543-90-8]■_{1S} (USP30)—Cristales incoloros, de transparentes a traslúcidos. Fácilmente soluble en agua; soluble en alcohol.

Materia insoluble (Prueba para reactivos): no más de 1 mg, a partir de 20 g (0,005%).

Cloruros (Prueba para reactivos)—Un g presenta no más de 0,01 mg de Cl (0,001%).

Sulfatos (Prueba para reactivos, Método II)—Disolver 10 g en 100 mL de agua, agregar 1 mL de ácido clorhídrico y filtrar: el residuo no pesa más de 1,2 mg más que el residuo obtenido en una prueba completa con un blanco (0,005%).

Sustancias no precipitadas por sulfuro de hidrógeno—Disolver 2 g en una mezcla de 135 mL de agua y 15 mL de ácido sulfúrico 1 N, calentar a ebullición y pasar una corriente rápida de sulfuro de hidrógeno a través de la solución mientras se enfría. Filtrar y agregar 0,25 mL de ácido sulfúrico a 75 mL del filtrado transparente, luego evaporar hasta sequedad e incinerar suavemente: el residuo no pesa más de 1 mg (0,1%).

Cambio en la redacción:

Acetato de Calcio, $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ —**176,18** ■[62-54-4] ■_{1S} (USP30)—Polvo o gránulos cristalinos de color blanco. Soluble en aproximadamente 3 partes de agua, poco soluble en alcohol. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetato de Etilo, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ —**88,11** ■[141-78-6] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetato de Gadolinio (Gd III) Hidrato, $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3\text{Gd} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ —**334,38** ■[100587-93-7] ■_{1S} (USP30)—Polvo blanco cristalino higroscópico. Irritante. Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Acetato de Isobutilo, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$ —**116,16** ■[110-19-0] ■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro y transparente. Poco soluble en agua. Miscible con alcohol.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con fase G2. Mantener la temperatura del inyector a 130°; mantener la temperatura de la columna a 30° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 180° y se mantenga así durante 10 minutos. Mantener la temperatura del detector a 300°. El área del pico principal no es menos de 99% del área total.

Peso específico (841): entre 0,863 y 0,868.

Índice de refracción (831): entre 1,3900 y 1,3920 a 20°.

Cambio en la redacción:

Acetato de Magnesio, $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —**214,45** ■[142-72-3] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetato de Metilo, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ —**74,08** ■[74-20-9] ■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro. Soluble en agua. Miscible con alcohol y con éter.

Peso específico (841): aproximadamente 0,933.

Índice de refracción (831): entre 1,3615 y 1,3625, a 20°.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos)—No menos de 95% destila entre 57° y 58°.

Cambio en la redacción:

Acetato de Plomo, $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ —**379,33** ■[301-04-2] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetato Mercúrico, $\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ —**318,68** ■[1600-27-7] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acetilacetona (2,4-Pentanodiona; ■*Diacetilmetano*), ■_{1S} (USP30) $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ —**100,12** ■[123-54-6] ■_{1S} (USP30)—Líquido inflamable transparente, incoloro a ligeramente amarillo. Soluble en agua; miscible con alcohol, con cloroformo, con acetona, con éter y con ácido acético glacial.

Valoración—No menos de 98% de $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$, empleando un cromatógrafo de gases adecuado equipado con un detector de ionización a la llama y helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna de acero inoxidable de 3 mm × 1,83 m rellena con fase G al 10% sobre soporte S1A; mantener las temperaturas del inyector y del detector a 250° y 310°, respectivamente; y programar la temperatura de la columna para que aumente 8° por minuto, de 50° a 220°.

Índice de refracción (831): entre 1,4505 y 1,4525, a 20°.

Cambio en la redacción:

Acetofenona ■(*Feniletanona*; *Fenil Metil Cetona*), ■_{1S} (USP30) $\text{CH}_3\text{COC}_6\text{H}_5$ —**120,15** ■[98-86-2] ■_{1S} (USP30)—Líquido. Poco soluble en agua, fácilmente soluble en alcohol y en éter.

Intervalo de fusión (741): entre 19° y 20°.

Índice de refracción (831): aproximadamente 1,534 a 20°.

Peso específico (841): aproximadamente 1,03.

Cambio en la redacción:

Acetona ■(*Propanona*; *Dimetilformaldehído*), ■_{1S} (USP30) CH_3COCH_3 —**58,08** ■[67-64-1] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

[NOTA—Para determinaciones espectrofotométricas UV, usar Acetona Adecuada para Uso en Espectrofotometría UV de grado reactivo ACS.]

Cambio en la redacción:

Acetonitrilo (*Cianuro de Metilo*; ■*Cianometano*), ■_{1S} (USP30) CH_3CN —**41,05** ■[75-05-8] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

p-Acetotoluidida, $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$ —**149,19** ■[103-89-9] ■_{1S} (USP30)—Polvo blanco a blanquecino.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 μm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 230°; mantener la temperatura del detector a 300°; y mantener la temperatura de la columna a 130°, y programarla para que se eleve 10° por minuto hasta 280°. El área del pico de $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$ no es menos de 98,5% del área total.

Intervalo de fusión (741): entre 145° y 151°.

Cambio en la redacción:

Ácido Acético Glacial, CH_3COOH —**60,05** ■[64-19-7] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Acrílico ■ (*Ácido 2-Propenoico; Ácido Vinilfórmico*), ■_{1S} (USP30) $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ —**72,06** ■[79-10-7]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro. Miscible con agua, con alcohol y con éter.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama y emplear helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 150°; mantener la temperatura del detector a 300°; y mantener la temperatura de la columna a 50° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 200°. El área del pico de C₄H₈O, no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,419° y 1,423° a 20°.

Cambio en la redacción:

Ácido Adípico ■ (*Ácido Hexanodioico; Ácido 1,4-Butanodicarboxílico*), ■_{IS} (USP30) $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ —**146,14** ■ [24-04-9] ■_{IS} (USP30)—Polvo cristalino, de incoloro a blanco. Poco soluble en agua y en ciclohexano; soluble en alcohol, en metanol y en acetona; prácticamente insoluble en benceno y bencina de petróleo.

Valoración—Pesar aproximadamente 0,3 g con exactitud y disolver en 50 mL de alcohol. Agregar 25 mL de agua, mezclar y valorar con hidróxido de sodio 0,5 N SV a un pH de 9,5. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,5 N equivale a 36,54 mg de $C_{12}H_{10}O_4$. No se encuentra menos de 98%.

Intervalo de fusión (741): entre 151° y 155° , pero el intervalo entre el comienzo y el final de la fusión no excede de 2° .

Cambio en la redacción:

Ácido 4-Amino-2-clorobenzoico, $C_6H_3Cl(NH_2)(COOH)$ —**171,58**
■[2457-76-3]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos o polvo cristalino blanco.

Intervalo de fusión $\langle 741 \rangle$: entre 208° y 212° .

Cambio en la redacción:

Ácido 4-Amino-3-hidroxi-1-naftalensulfónico, $C_{10}H_9NO_4S$ —**239,25 ■**[116-63-2]■**S** (*USP30*)—Polvo de color púrpura claro. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Aminoacético (Glicina), $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ —**75,07** ■
[56-40-6]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco cristalino. Muy soluble en agua;
poco soluble en alcohol.

Contenido de nitrógeno (Prueba para reactivos)—Determinar por medio del método Kjeldahl, con una muestra de prueba secada previamente a 105° durante 2 horas: se encuentra entre 18,4% y 18,8% de N, que corresponde a no menos de 98,5% de $C_6H_5NO_2$.

Materia insoluble (Prueba para reactivos): no más de 1 mg, a partir de 10 g (0,01%).

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,05%.

Cloruros (Prueba para reactivos)—Un g presenta no más de 0,1 mg de Cl (0,01%).

Sulfatos (Prueba para reactivos, *Método I*)—Dos g no presentan más de 0,1 mg de SO_4 (0,005%).

Metales pesados (Prueba para reactivos): 0,001%, usando 5 mL de ácido clorhídrico 1 N para acidificar la solución de la muestra de prueba.

Hierro (241)—Un g, disuelto en 47 mL de agua que contenga 3 mL de ácido clorhídrico, no presenta más de 0,01 mg de Fe (0,001%).

Cambio en la redacción:

Ácido Arsenazo III, $C_{22}H_{18}As_2N_4O_{14}S_2$ —**776,38** ■ [1668-00-4]
 ■ 1S (USP30)—Polvo marrón. Estable al aire. Almacenar a temperatura ambiente en un lugar seco.

Temperatura de fusión $\langle 741 \rangle$: más de 320°.

Cambio en la redacción:

Ácido Benzoico, C₆H₅COOH—122,12 ■[65-85-0]■_{1S} (USP30)—
Usar grado reactivo ACS.

[NOTA—Se puede obtener Ácido Benzoico de calidad adecuada para usar como estándar primario del Instituto de Normas y Tecnología del gobierno de Estados Unidos (National Institute of Standards and Technology, NIST), Office of Standard Reference Materials, www.nist.gov, como muestra de estándar N° 350].

Cambio en la redacción:

Ácido 3-Benzoilbenzoico, $C_{14}H_{10}O_3$ —**226,23** ■[579-18-0]
 ■1S (USP30)—Polvo de color blanco a blanquecino.

Valoración—Preparar una mezcla de ácido trifluoroacético al 1% en agua y ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo (55:45) para la fase móvil. Inyectar aproximadamente 20 μL en un cromatógrafo de líquidos adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de 230 nm y una columna de 4,6 mm \times 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. El área del pico de $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_3$ no es menos de 98,5% del área total.

Cambio en la redacción:

Ácido Benzoilfórmico (*Ácido Fenilglioxílico*), $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCO}_2\text{H}$ —150,14 ■ [611-73-4] ■ $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ —Polvo. Soluble en metanol.

Intervalo de fusión $\langle 741 \rangle$: entre 62° y 67° .

Cambio en la redacción:

Ácido 4,4'-Bis(4-amino-1-naftilazo)-2,2'-etilbenodisulfónico,
 $C_{34}H_{26}N_6O_6S_2$ —**678,74** ■[5463-64-9]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

[NOTA—Se puede obtener un grado adecuado de TCI America, www.tciamerica.com.]

Cambio en la redacción:

Ácido Bis(2-etilhexil)fosfórico [*Fosfato de Bis-(2-etilhexilo)*], $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2]_2\text{HPO}_4$ —**322,42** ■ [298-07-7] ■ ₁₈ (USP30)—Líquido viscoso de color amarillito claro. Insoluble en agua; fácilmente soluble en cloroformo y en acetato de etilo. Índice de refracción: aproximadamente 1,443. Peso específico: aproximadamente 0,997.

Valoración—Disolver aproximadamente 250 mg, pesados con exactitud, en 50 mL de dimetilformamida, agregar 3 gotas de una solución 1 en 100 de azul de timol en dimetilformamida y valorar con metóxido de sodio 0,1 N SV hasta un punto final azul. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de metóxido de sodio 0,1 N equivale a 32,24 mg de $(C_8H_{17})_2P_2O_4$. Se encuentra entre 95% y 105%.

Solubilidad—Un volumen se disuelve en 9 volúmenes de cloroformo y produce una solución transparente. Un volumen se disuelve en 9 volúmenes de acetato de etilo y produce una solución transparente.

Color—Una solución 1 en 100 en cloroformo presenta una absorptividad de no más de 0.03 a 420 nm.

Cambio en la redacción:

Ácido Bórico, H_3BO_3 —**61,83** ■[10043-35-3]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Butírico, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ —**88,11** ■[107-92-6]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente, de incoloro a amarillo tenue. Miscible con agua y con metanol.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 500 mg, transferir a un recipiente adecuado, agregar 30 mL de agua y mezclar. Agregar 40 mL de agua y mezclar. Agregar fenolftaleína SR y valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 8,81 mg de $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$; no se encuentra menos de 99,0% de $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$.

Índice de refracción (831): aproximadamente 1,398 a 20°.

Cambio en la redacción:

Ácido *dl*-10-Canforsulfónico, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{S}$ —**232,30** ■[35963-20-3]■_{1S} (USP30)—Polvo o cristales de color blanco a blanquecino. Es ópticamente inactivo.

Intervalo de fusión (741): se descompone aproximadamente a 199°.

Cambio en la redacción:

Ácido Cáprico (Ácido Decanoico), $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$ —**172,26** ■[334-48-5]■_{1S} (USP30)—Fundido solidificado o fragmentos de color blanco. Soluble en alcohol, en cloroformo y en éter; prácticamente insoluble en agua.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada disuelta en acetona en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama y una columna capilar de 0,53 mm × 30 m recubierta con una capa de fase G25. El gas transportador es helio, que fluye a una velocidad de 9 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo. Equilibrar la temperatura de la columna inicialmente a 150°, después aumentar la temperatura a una velocidad de 10° por minuto hasta 250°. Mantener la temperatura del inyector a 240° y la del detector a 265°. El área del pico de ácido cáprico no es menos de 98,5% del área total.

Intervalo de fusión (741): entre 30° y 33°.

Cambio en la redacción:

Ácido Cianoacético, $\text{C}_3\text{H}_3\text{NO}_2$ —**85,06** ■[372-09-8]■_{1S} (USP30)—Sólido cristalino blanco a amarillo claro. Muy soluble en agua.

Valoración—Disolver aproximadamente 300 mg, pesados con exactitud, en 25 mL de agua y 25 mL de alcohol. Valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 85,06 mg de $\text{C}_3\text{H}_3\text{NO}_2$. No se encuentra menos de 99%.

Cambio en la redacción:

Ácido Cítrico Anhidro—■[77-92-9]■_{1S} (USP30)—Usar *Ácido Cítrico Anhidro* (monografía USP).

Cambio en la redacción:

Ácido Clorhídrico, HCl —**36,46** ■[7647-01-0]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Clorhídrico Diluido (10 por ciento)—■[7647-01-0]■_{1S} (USP30)—Preparar mezclando 226 mL de ácido clorhídrico con suficiente agua para obtener 1000 mL.

Cambio en la redacción:

Ácido 4-Clorobenzoico, $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{COOH}$ —**156,57** ■[74-11-3]■_{1S} (USP30)—Sólido cristalino blanco.

Valoración—Disolver aproximadamente 700 mg, pesados con exactitud, en una mezcla de 100 mL de alcohol caliente y 50 mL de agua. Valorar con hidróxido de sodio 0,5 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,5 N equivale a 78,28 mg de $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{COOH}$. No se encuentra menos de 98%.

Solubilidad—Un g disuelto en 25 mL de hidróxido de sodio 0,5 N produce una solución completa y transparente.

Cambio en la redacción:

Ácido *m*-Clorobenzoico (Ácido 3-Clorobenzoico), $\text{C}_7\text{H}_5\text{ClO}_2$ —**156,57** ■[535-80-8]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Ácido Clorogénico, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ —**354,31** ■[327-97-9]■_{1S} (USP30)—Polvo de color blanco a blanquecino. Usar un grado adecuado.

Valoración—Cuando se analiza mediante cromatografía en capa delgada (ver *Cromatografía* (621)) empleando placas recubiertas con mezcla de gel de sílice para cromatografía y una fase móvil constituida por una mezcla de alcohol butílico, agua y ácido acético (60 : 25 : 15) y se examina bajo luz UV de longitud de onda corta, se observa una sola mancha, con trazas de impurezas.

Cambio en la redacción:

Ácido 2-Cloronicotínico, $\text{C}_6\text{H}_4\text{ClNO}_2$ —**157,55** ■[2942-59-8]■_{1S} (USP30)—Polvo blanquecino.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 280°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 180° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 280°. El área del pico de $\text{C}_6\text{H}_4\text{ClNO}_2$ no es menos de 98% del área total.

Cambio en la redacción:

Ácido Cloroplatínico, $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —**517,90** ■[18497-13-7]■_{1S} (USP30)—Usar Ácido Cloroplatínico Hexahidrato de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido 5-Clorosalicílico, $C_7H_5ClO_3$ —**172,57** ■[321-14-2] ■_{1S (USP30)}—Polvo de color blanco a blanquecino.

Valoración—Cuando se analiza mediante cromatografía en capa delgada (ver *Cromatografía* (621)) usando placas recubiertas con una mezcla de gel de sílice para cromatografía y una fase móvil constituida por una mezcla de ciclohexano, cloroformo y ácido acético (14:4:2) y se examina visualmente y bajo luz UV de longitud de onda larga o rocío de yodo, se observa una sola mancha.

Intervalo de fusión (741): entre 172° y 178°.

Cambio en la redacción:

Ácido Cromotrópico (*Ácido 4,5-dihidroxibenzoico*), $C_{10}H_8O_8S_2 \cdot 2H_2O$ —**356,33** ■[148-25-4] ■_{1S (USP30)}—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Ácido 2,6-Diclorofenilacético, $C_8H_6Cl_2O_2$ —**205,04** ■[6575-24-2] ■_{1S (USP30)}—Polvo blanco.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de fase G2 de 1 µm de espesor; mantener la temperatura del inyector a 250°; mantener la temperatura del detector a 300°; y mantener la temperatura de la columna a 150° y programarla para que se eleve 10° por minuto hasta 280°. El área del pico de $C_8H_6Cl_2O_2$ no es menos de 97% del área total.

Cambio en la redacción:

Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico, $C_7H_6O_4$ —**154,12** ■[303-07-1] ■_{1S (USP30)}—Polvo blanquecino. Fácilmente soluble en alcohol; produce una solución transparente de color amarillo muy pálido.

Valoración—Disolver aproximadamente 75 mg, pesados con exactitud, en 30 mL de metanol. Agregar lentamente 40 mL de agua. Valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 15,41 mg de $C_7H_6O_4$. No se encuentra menos de 99%.

Intervalo de fusión (741): aproximadamente 207°, con descomposición.

Cambio en la redacción:

Ácido Etanosulfónico, $C_2H_5SO_3H$ —**110,13** ■[594-45-6] ■_{1S (USP30)}—Líquido entre incoloro y amarillo claro. Soluble en agua.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 300 mg, disolver en 30 mL de agua, agregar fenolftaleína SR y valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 11,013 mg de $C_2H_5SO_3H$; se encuentra entre 94,0% y 106,0%.

Índice de refracción (831): entre 1,432 y 1,436 a 20°.

Cambio en la redacción:

Ácido Fluorhídrico, HF—**20,01**—■[7664-39-3] ■_{1S (USP30)}—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Fórmico, HCOOH—**46,03** ■[64-18-6] ■_{1S (USP30)}—Usar Ácido Fórmico al 88 por ciento, de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Fórmico al 96 por ciento HCOOH—**46,03** ■[64-18-6] ■_{1S (USP30)}—Usar Ácido Fórmico al 96 por ciento, de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Glicólico, $C_2H_4O_3$ —**76,05** ■[79-14-1] ■_{1S (USP30)}—Polvo o terrones cristalinos blancos.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado (silanizado) en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2. Mantener la temperatura del inyector a 250°, la temperatura del detector a 300°, y la temperatura de la columna a 100°, programada para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 250°. El área del pico de $C_2H_4O_3$ no es menos de 98,5% del área total.

Cambio en la redacción:

Ácido D-Glucónico al 50 por ciento en Agua, $C_6H_{12}O_7$ —**196,16** ■[526-95-4] ■_{1S (USP30)}—Líquido amarillo pálido.

Valoración—Diluir aproximadamente 200 mg de la solución, pesados con exactitud, en 30 mL de agua. Valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 19,62 mg de $C_6H_{12}O_7$. No se encuentra menos de 49,0%.

Índice de refracción (831): entre 1,4160 y 1,4180 a 20°.

Rotación específica (781): entre +9,9° y +11,9°, determinada sobre la solución tal cual a 20°.

Cambio en la redacción:

Ácido p-Hidroxibenzoico, $C_7H_6O_3$ —**138,12** ■[99-96-7] ■_{1S (USP30)}—Cristales blancos.

Valoración—Transferir aproximadamente 700 mg, pesados con exactitud, a un recipiente adecuado y disolver en 50 mL de acetona. Agregar 100 mL de agua, mezclar y valorar con hidróxido de sodio 0,5 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,5 N equivale a 69,06 mg de $C_7H_6O_3$; no se encuentra menos de 97%.

Intervalo de fusión (741): en un intervalo de 2° que incluye 216°.

Cambio en la redacción:

Ácido 4-Hidroxiisoftálico, $C_8H_6O_4$ —**182,13** ■[636-46-4] ■_{1S (USP30)}—Agujas ramificadas incoloras. Fácilmente soluble en alcohol y en éter.

Intervalo de fusión (741): entre 308° y 310°, con descomposición entre 314° y 315°.

Cambio en la redacción:

Ácido Hipofosforoso al 50 por ciento (*Ácido Hipofosforoso*), HPH_2O_2 —**66,00** ■[6303-21-5]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro a ligeramente amarillo. Miscible con agua y con alcohol.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 4 mL, diluir con 25 mL de agua, agregar rojo de metilo SR y valorar con hidróxido de sodio 1 N SV: cada mL de hidróxido de sodio 1 N equivale a 66,00 mg de HPH_2O_2 . No se encuentra menos de 48%.

Cloruros—Agregar 0,2 mL a una mezcla de 10 mL de nitrato de plata SR y 5 mL de ácido nítrico, y calentar hasta que dejen de producirse humos marrones: cualquier residuo insoluble blanco remanente es inapreciable.

Fosfatos—Diluir 1 mL con agua hasta 50 mL, alcalinizar con amoníaco SR, filtrar si se forma un precipitado y agregar 5 mL de mezcla de magnesio SR al filtrado: no se forma más que un precipitado leve dentro de los 5 minutos siguientes.

Sulfatos (Prueba para reactivos, *Método I*)—Diluir 1 mL con agua hasta 50 mL: 20 mL de la solución no presentan más de 0,2 mg de SO_4 .

Cambio en la redacción:

Ácido Isonicotínico, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ —**123,11** ■[52-22-1]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Ácido Litocólico, $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_3$ —**376,57** ■[434-13-9]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco.

Valoración—Cuando se analiza por cromatografía en capa delgada, usando placas recubiertas con mezcla de gel de sílice para cromatografía y una fase móvil constituida por una mezcla de tolueno, 1,4-dioxano y ácido acético (15,2:4,2:0,6), rociando con una mezcla de ácido sulfúrico y metanol (1:1), calentando a 110° durante 20 minutos y se examina visualmente y bajo una luz UV de longitud de onda larga, presenta una única mancha.

Intervalo de fusión (741): entre 184° y 186°.

Cambio en la redacción:

Ácido Maleico, $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ —**116,07** ■[110-16-7]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco. Soluble en 1,5 partes de agua, en 2 partes de alcohol y en 12 partes de éter.

Valoración—Disolver aproximadamente 2 g, pesados con exactitud, en 100 mL de agua y valorar con hidróxido de sodio 1 N SV, usando fenoltaleína SR como indicador. Cada mL de hidróxido de sodio 1 N equivale a 58,04 mg de $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$: no se encuentra menos de 99% de $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, calculado con respecto a la sustancia seca.

Pérdida por secado—Secar al vacío sobre pentóxido de fósforo durante 2 horas: no pierde más de 1,5% de su peso.

Residuo de incineración (281): no más de 0,1%.

Cambio en la redacción:

Ácido Metacrílico—■[79-41-4]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Ácido Metafosfórico (*Metafosfato Ácido de Sodio Vítreo*), HPO_3 —**79,98** ■[37267-86-0]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Metanosulfónico, $\text{CH}_3\text{O}_3\text{S}$ —**96,11** ■[75-75-2]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Ácido 5,5'-Metilendisalicílico (*Ácido 3,3'-Metilen-bis[6-hidroxibenzoico]*), $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$ —**288,25** ■[122-25-8]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Ácido 5-Metoxi-2-metil-3-indolacético, $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ —**219,24** ■[2882-15-7]■_{1S} (USP30)—Polvo blanquecino.

Valoración—Transferir aproximadamente 110 mg, pesados con exactitud, a un vaso de precipitados de 100 mL. Agregar 30 mL de metanol y disolver mezclando. Agregar 40 mL de agua y mezclar. Valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 21,92 mg de $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_3$. No se encuentra menos de 98%.

Intervalo de fusión (741): entre 161° y 168°, pero el intervalo entre el comienzo y el final de la fusión no excede de 3°.

Cambio en la redacción:

Ácido Molibdico (*Ácido Molibdico al 85 por ciento*)—■[7782-91-4]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Monocloroacético (*Ácido Cloroacético*, *Ácido Cloroetanoico*), CH_2ClCOOH —**94,50** ■[79-11-8]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido 2-Naftalenosulfónico, $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ —**226,25** ■[120-18-3]■_{1S} (USP30)—Cristales de color blanquecino a gris claro. Soluble en agua.

Valoración—Disolver aproximadamente 1 g, pesado con exactitud, en 100 mL de agua, agregar fenoltaleína SR y valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 22,63 mg de $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$. No se encuentra menos de 98,0%.

Intervalo de fusión (741): entre 122° y 126°, pero el intervalo entre el comienzo y el final de la fusión no excede de 2°.

Cambio en la redacción:

Ácido Nítrico, HNO_3 —**63,01** ■[7697-37-2]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Nítrico Diluido (HNO_3 al 10 por ciento)—■[7697-37-2]■_{1S} (USP30)—Diluir 105 mL de ácido nítrico con agua a 1000 mL.

Cambio en la redacción:

Ácido Nítrico Fumante (*Ácido Nítrico al 90 por ciento*), HNO_3 —**63,01** ■[7697-37-2]■_{1S} (USP30)—Usar Ácido Nítrico al 90 por ciento de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Nitrilotriacético, $\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_3$ —**191,14** ■[139-13-9]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ácido Nonanoico, $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_2$ —**158,24** ■[112-05-0]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente de incoloro a amarillo pálido. Miscible con agua y con metanol.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 500 mg, transferir a un recipiente adecuado, agregar 30 mL de agua y mezclar. Agregar 40 mL de agua y mezclar. Agregar fenoltaleína SR y valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 15,82 mg de $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_2$; no se encuentra menos de 96,0% de $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_2$.

Índice de refracción ⟨831⟩: aproximadamente 1,432 a 20°.

Cambio en la redacción:

Ácido Quenodesoxicólico, $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$ —**392,57** ■[474-25-9]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco a blanquecino.

Valoración—Se observa una única mancha cuando se analiza mediante cromatografía en capa delgada, con placas recubiertas con mezcla C18 para cromatografía en fase reversa, una fase móvil constituida por ácido acético 1 N en metanol y ácido acético 1 N (19:1) y rociadas con una mezcla de ácido sulfúrico y metanol (1:1), calentadas a 110° durante 20 minutos, y examinadas visualmente y bajo luz UV de longitud de onda larga.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 165° y 168°.

Cambio en la redacción:

Ácido Yodhídrico, HI—**127,91** ■[10034-85-2]■_{1S} (USP30)—Utilizar grado reactivo ACS (que contenga no menos de 47,0% de HI).

[NOTA—Para determinación de grupos metoxilo (ver *Determinación de Grupos Metoxilo* ⟨431⟩), utilizar ácido yodhídrico al 55% de grado reactivo ACS. Utilizar también este grado para determinaciones de grupos alcoxilo en las valoraciones de las monografías individuales.]

Cambio en la redacción:

Ácido Yódico, HIO_3 —**175,91** ■[7782-68-5]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Acrilato de Etilo—■[140-88-5]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Alcohol Amílico (*Alcohol Isoamílico*), $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$ —**88,15** ■[598-75-4]■_{1S} (USP30)—Usar Alcohol Isopentílico de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Alcohol *terc*-Amílico, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ —**88,15** ■[75-85-4]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente, incoloro, inflamable y volátil.

Peso específico ⟨841⟩: aproximadamente 0,81.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos): no menos de 95%, entre 100° y 103°.

Residuo de evaporación—Evaporar 50 mL (40 g) en un baño de vapor y secar a 105° durante 1 hora: el residuo no pesa más de 1,6 mg (0,004%).

Ácidos y ésteres—Diluir 20 mL con 20 mL de alcohol, agregar 5,0 mL de hidróxido de sodio 0,1 N SV y calentar a reflujo moderadamente durante 10 minutos. Enfriar, agregar 2 gotas de fenoltaleína SR y valorar el exceso de hidróxido de sodio con ácido clorhídrico 0,1 N SV: no se consume más de 0,75 mL del hidróxido de sodio 0,1 N, realizando correcciones por la cantidad consumida en un blanco (0,06% como acetato de amilo).

Aldehídos—Agitar 5 mL con 5 mL de solución de hidróxido de potasio (30 en 100) en una probeta con tapón de vidrio durante 5 minutos y dejar que las capas se separen: no aparece color en ninguna capa.

Cambio en la redacción:

Alcohol Butílico (*1-Butanol*; *Alcohol Butílico Normal*), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{OH}$ —**74,12** ■[71-36-3]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Alcohol Butílico Secundario (*2-Butanol*), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ —**74,12** ■[78-92-2]■_{1S} (USP30)—Usar Alcohol Isobutílico de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Alcohol Butílico Terciario, $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$ —**74,12** ■[75-65-0]■_{1S} (USP30)—Usar Alcohol *terc*-Butílico de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Alcohol 2-Hidroxibencilico, $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$ —**124,14** ■[90-01-7]■_{1S} (USP30)—Escamas blanquecinas. Muy soluble en alcohol, en cloroformo y en éter; soluble en 15 partes de agua y en benceno.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* ⟨621⟩) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 μm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 250°; mantener la temperatura del detector a 300°; y mantener la temperatura de la columna a 150° y programarla para que se eleve 10° por minuto hasta 280°. El área del pico de $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$ no es menos de 99% del área total.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 83° y 85°.

Cambio en la redacción:

Alcohol Isobutílico (*2-Metil-1-propanol*), $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{OH}$ —**74,12** ■[78-83-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Alcohol Isopropílico (*2-Propanol*), $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ —**60,10** ■[67-63-0]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

[NOTA—Para valoraciones y pruebas de espectrofotometría UV, usar Alcohol Isopropílico grado reactivo ACS Adecuado para Uso en Espectrofotometría UV].

Cambio en la redacción:

Alcohol Isopropílico Deshidratado—■[67-63-0]■_{1S} (USP30)—Usar Alcohol Isopropílico previamente secado por medio de agitación con un tamiz molecular adecuado capaz de adsorber agua, y filtrado.

Cambio en la redacción:

Aleación de Devarda (Metal de Devarda)—■[8049-11-4]■_{1S} (USP30)—Polvo gris compuesto por 50 partes de cobre, 45 partes de aluminio y 5 partes de cinc.

Cambio en la redacción:

Alumbre (Alumbre de Amonio, Sulfato de Aluminio y Amonio), $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ —**453,33** ■[7784-26-1]■_{1S} (USP30)—Cristales incoloros grandes o fragmentos cristalinos o polvo blanco. Soluble en 7 partes de agua y en aproximadamente 0,5 partes de agua en ebullición; insoluble en alcohol. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Alúmina Activada ■(Óxido de Aluminio), [1344-28-1]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Alúmina Anhidra (Óxido de Aluminio; Alúmina preparada especialmente para análisis cromatográfico) ■[1344-28-1]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco o prácticamente blanco de malla 80 a 200. No se ablanda, hincha ni descompone en agua. No está lavada con ácido. Almacenar en envases bien cerrados.

Cambio en la redacción:

Aluminio, Al—Peso Atómico 26,98154 ■[7429-90-5]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS, que también cumple con los requisitos de la siguiente prueba.

Arsénico—Colocar 750 mg en el frasco generador (ver *Arsénico en Reactivos en Pruebas Generales para Reactivos*), omitiendo el trozo de algodón. Agregar 10 mL de agua y 10 mL de solución de hidróxido de sodio (3 en 10) y dejar que la reacción continúe durante 30 minutos: no se produce más que una mancha apenas perceptible en el papel de prueba de bromuro mercuríco.

Cambio en la redacción:

Aluminón (Sal [tri] Amónica del Ácido Aurín Tricarboxílico), $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_9$ —**473,43** ■[569-58-4]■_{1S} (USP30)—Polvo vítreo marrón amarillento. Fácilmente soluble en agua. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Amaranto, $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_3$ —**604,48** ■[915-67-3]■_{1S} (USP30)—Polvo fino marrón intenso o marrón rojizo oscuro. Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

4-Amino-6-cloro-1,3-bencenodisulfonamida, $\text{C}_6\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}_2$ —**285,73** ■[121-30-2]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco. Insoluble en agua y en cloroformo; soluble en amoníaco SR.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 2 mg, usando 2 g (0,1%).

Absorbancia—Una solución 1 en 200 000 en metanol presenta máximos de absorbancia aproximadamente a 223 nm, 265 nm y 312 nm. Su absorptividad (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)) a 265 nm es aproximadamente 64,0.

Cambio en la redacción:

2-Amino-5-clorobenzofenona, $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}$ —**231,68** ■[719-59-5]■_{1S} (USP30)—Usar ER 2-Amino-5-clorobenzofenona USP.

Cambio en la redacción:

3-Amino-1-propanol, $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ —**75,11** ■[156-87-6]■_{1S} (USP30)—Líquido.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos): entre 184° y 188°.

Índice de refracción (831): entre 1,461 y 1,463 a 20°.

Cambio en la redacción:

4-Aminoantipirina, $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ —**203,24** ■[83-07-8]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino de color amarillo claro. Una porción de 500 mg se disuelve completamente en 30 mL de agua y produce una solución transparente.

Intervalo de fusión (741): entre 108° y 110°.

Cambio en la redacción:

4-Aminobenzoato de Metilo, $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$ —**151,16** ■[619-45-4]■_{1S} (USP30)—Polvo blanquecino.

Valoración—Disolver aproximadamente 38 mg, pesados con exactitud, en 50 mL de ácido acético glacial. Valorar con ácido perclórico 0,1 N SV determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 15,12 mg de $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$. No se encuentra menos de 99,0%.

Intervalo de fusión (741): entre 108° y 110°.

Cambio en la redacción:

1-(2-Aminoetil)piperazina, $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_3$ —**129,20** ■[140-31-8]■_{1S} (USP30)—Líquido viscoso incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con fase G2. Mantener la temperatura del inyector a 280°; mantener la temperatura de la columna a 180° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 280° y se mantenga así durante 10 minutos. Mantener la temperatura del detector a 300°. El área del pico principal no es menos de 97% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,4978 y 1,5010, a 20°.

Cambio en la redacción:

***m*-Aminofenol** \blacksquare (3-Amino-1-Hidroxibenceno), \blacksquare_{1S} (USP30) C_6H_7NO —**109,13** \blacksquare [591-27-5] \blacksquare_{1S} (USP30)—Escamas de color crema a amarillo pálido. Moderadamente soluble en agua fría; fácilmente soluble en agua caliente, en alcohol y en éter.

Valoración—Disolver aproximadamente 1,5 g, pesados con exactitud, en aproximadamente 400 mL de agua en un matraz volumétrico de 500 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 25,0 mL de esta solución a un matraz para yodo, agregar 50,0 mL de bromo 0,1 N SV, diluir con 50 mL de agua, agregar 5 mL de ácido clorhídrico y tapar inmediatamente el matraz. Agitar durante 1 minuto, dejar en reposo durante 2 minutos y agregar 5 mL de yoduro de potasio SR a través del tapón ligeramente abierto. Agitar bien, dejar en reposo durante 5 minutos, quitar el tapón, enjuagar el tapón y el cuello del matraz con 20 mL de agua y agregar el enjuague al matraz. Valorar el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N SV, agregando 3 mL de almidón SR cerca del punto final. A partir del volumen de tiosulfato de sodio 0,1 N SV usado, calcular el volumen, en mL, de bromo 0,1 N consumido por la muestra de prueba. Cada mL de bromo 0,1 N equivale a 1,819 mg de C_6H_7NO ; no se encuentra menos de 99,5%.

Intervalo de fusión $\langle 741 \rangle$: entre 121° y 123°.

Pérdida por secado $\langle 731 \rangle$ —Secar sobre cloruro de calcio durante 4 horas: la pérdida en peso es inapreciable.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): inapreciable, usando 2 g.

Cambio en la redacción:

***p*-Aminofenol** \blacksquare (*p*-Hidroxianilina), \blacksquare_{1S} (USP30) C_6H_7NO —**109,13** \blacksquare [123-30-8] \blacksquare_{1S} (USP30)—Polvo cristalino, fino y amarillento. Poco soluble en agua y en alcohol.

Intervalo de fusión $\langle 741 \rangle$: entre 187° y 189°.

Cambio en la redacción:

***N*-Aminohexametilenimina** (*N*-Aminohomopiperidina, 1-Aminohomopiperidina), $C_6H_{14}N_2$ —**114,19** \blacksquare [5906-35-4] \blacksquare_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* $\langle 621 \rangle$) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm \times 30 m recubierta con fase G2. Mantener la temperatura del inyector a 180°; mantener la temperatura de la columna a 80° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 230° y se mantenga a 230° durante 5 minutos. Mantener la temperatura del detector a 300°. El área del pico principal no es menos de 95% del área total.

Índice de refracción $\langle 831 \rangle$: entre 1,4840 y 1,4860 a 20°.

Cambio en la redacción:

Anhídrido Acético \blacksquare (Óxido Acético; Óxido Acetilico), \blacksquare_{1S} (USP30) $(CH_3CO)_2O$ —**102,09** \blacksquare [108-24-7] \blacksquare_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Anilina, $C_6H_5NH_2$ —**93,13** \blacksquare [62-53-3] \blacksquare_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Anisol, $CH_3OC_6H_5$ —**108,14** \blacksquare [100-66-3] \blacksquare_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada (aproximadamente 0,5 μ L) en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* $\langle 621 \rangle$) equipado con un detector de ionización a la llama; el gas transportador es nitrógeno. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 30 m recubierta con fase G3; mantener la temperatura del inyector y del detector a 140° y 300°, respectivamente; mantener la temperatura de la columna a 70° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 170°. El área del pico de anisol no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción $\langle 831 \rangle$: 1,5160 a 20°.

Cambio en la redacción:

Antraceno, $C_{14}H_{10}$ —**178,23** \blacksquare [120-12-7] \blacksquare_{1S} (USP30)—Cristales o plaquetas blancas a blanquecinas. Se oscurece al exponerlo a la luz solar. Insoluble en agua; moderadamente soluble en alcohol, en benceno y en cloroformo.

Intervalo de fusión $\langle 741 \rangle$: entre 215° y 218°.

Cambio en la redacción:

Antrona, $C_{14}H_{10}O$ —**194,23** \blacksquare [90-44-8] \blacksquare_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Aprobarbital, $C_{10}H_{14}N_2O_3$ —**210,23** \blacksquare [77-02-1] \blacksquare_{1S} (USP30)—Polvo fino blanco cristalino. Poco soluble en agua fría; soluble en alcohol, cloroformo y éter.

Valoración—Disolver aproximadamente 200 mg, previamente secados a 105° durante 2 horas y pesados con exactitud, en 20 mL de dimetilformamida en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Agregar 4 gotas de solución azul de timol (1 en 200 en metanol) y valorar con metóxido de litio 0,1 N utilizando una bureta de 10 mL, un mezclador magnético y cubriendo el matraz para proteger contra el dióxido de carbono ambiental. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de metóxido de litio 0,1 N equivale a 21,02 mg de $C_{10}H_{14}N_2O_3$. Se encuentra entre 98,5% y 101,0% de $C_{10}H_{14}N_2O_3$.

Intervalo de fusión $\langle 741 \rangle$: entre 140° y 143°.

Cambio en la redacción:

Araquidato de Metilo \blacksquare (Éster metílico del ácido eicosanoico), \blacksquare_{1S} (USP30) $C_{21}H_{42}O_2$ —**326,56** \blacksquare [1120-28-1] \blacksquare_{1S} (USP30)—Escamas blanquecinas.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* $\langle 621 \rangle$) equipado con un detector de conductividad térmica y usar helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: usar una columna de vidrio de 2,0 mm \times 1,8 m rellena con fase G2 al 5% sobre soporte S1A; mantener la temperatura del inyector a 300° y mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 230° y programarla para que aumente 3° por minuto hasta 280°. El área del pico de $C_{21}H_{42}O_2$ no es menos de 99% del área total.

Intervalo de fusión $\langle 741 \rangle$: entre 46° y 51°.

Cambio en la redacción:

L-Asparagina (*Ácido L-2-Aminosuccinámico*), $\text{COOHCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CONH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ —**150,13** ■[70-47-3]■_{1S} (USP30)—Cristales incoloros. Un g se disuelve en 50 mL de agua; soluble en ácidos y en álcalis; insoluble en alcohol y en éter. Las soluciones neutras o alcalinas son levóginas; las soluciones ácidas son dextróginas.

Rotación específica (781): entre +31° y +33°, determinado en una solución en ácido clorhídrico diluido que contenga el equivalente a 5 g (con respecto a la sustancia anhidra, según se determina al secar a 105° durante 5 horas) por cada 100 mL.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,1%.

Cloruros (Prueba para reactivos)—Un g presenta no más de 0,03 mg de Cl (0,003%).

Sulfatos (Prueba para reactivos, *Método I*)—Un g presenta no más de 0,05 mg de SO_4 (0,005%).

Metales pesados (Prueba para reactivos): 0,002%.

Contenido de nitrógeno, Método II (461) : se encuentra entre 18,4% y 18,8% de N.

Cambio en la redacción:

Azul Brillante Coomassie R-250, $\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2\text{Na}$ —**825,97** ■[6104-58-1]■_{1S} (USP30)—Polvo marrón.

Cambio en la redacción:

Azul de Anilina (*Azul de Anilina Biológico Certificado*) ■[8004-91-9]■_{1S} (USP30)—Colorante soluble en agua constituido por una mezcla de trisulfonatos de trifenilparosanilina y de difenilrosanilina.

Cambio en la redacción:

Azul de Hidroxinaftol (*Sal Disódica del Ácido 1-(ácido-2-naftolazo-3,6-disulfónico)-2-naftol-4-sulfónico*), $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}_3\text{Na}_2$ —**598,50** ■[165660-27-5]■_{1S} (USP30)—Depositado sobre cristales de cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 1%. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Azul de Metileno, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ —**373,90** ■[61-73-4]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino o cristales color verde oscuro con un brillo similar al bronce. Un g se disuelve en aproximadamente 25 mL de agua y en aproximadamente 65 mL de alcohol. Soluble en cloroformo. Usar un grado adecuado con un contenido de colorante no menor de 85%.

Cambio en la redacción:

Azul de Tetrazolio (*Dicloruro 3,3'-(3,3'-Dimetoxi[1,1'-bifenil]-4,4'-diil)bis[2,5-difenil-2H-tetrazolio]*), $\text{C}_{40}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_2$ —**727,64** ■[1871-22-3]■_{1S} (USP30)—Cristales de color amarillo limón. Poco soluble en agua; fácilmente soluble en cloroformo y en metanol; insoluble en acetona y en éter.

Solubilidad en metanol—Disolver 1 g en 100 mL de metanol: se disuelve completamente y la solución es transparente.

Color—Transferir una porción de la solución en metanol obtenida en la prueba anterior a una celda de 1 cm y determinar su absorbancia a 525 nm, empleando agua como blanco: la absorbancia no es mayor de 0,20.

Absortividad molar (851)—Su absortividad molar en metanol, a 252 nm, no es menor de 50 000.

Prueba de aptitud—

PREPARACIÓN ESTÁNDAR—Disolver en alcohol una cantidad adecuada de ER Hidrocortisona USP, previamente secada a 105° durante 3 horas y pesada con exactitud, y preparar por diluciones sucesivas una solución que contenga aproximadamente 10 µg por mL.

PROCEDIMIENTO—Pipetear porciones de 10, 15 y 20 mL de la *Preparación Estándar* y transferir a matraces Erlenmeyer separados, de 50 mL, con tapones de vidrio. Agregar 10 mL y 5 mL de alcohol, respectivamente, a los matraces que contienen las porciones de 10 y 15 mL de la *Preparación Estándar*, y mezclar por rotación moderada. A cada uno de los matraces y a un cuarto matraz que contenga 20 mL de alcohol, agregar 2,0 mL de una solución preparada mediante la dilución de 50 mg de azul de tetrazolio en 10 mL de alcohol, mezclar, y luego agregar 2,0 mL de una solución preparada mediante la dilución de 1 mL de hidróxido de tetrametilamonio SR con alcohol hasta 10 mL. Mezclar, dejar los matraces en reposo en la oscuridad durante 90 minutos y determinar las absorbancias de las tres soluciones del estándar de esteroide a 525 nm, con un espectrofotómetro adecuado, usando la solución del cuarto matraz como blanco. Graficar las absorbancias sobre la abscisa y la cantidad de hidrocortisona sobre la ordenada de un papel de coordenadas aritméticas y trazar la curva de mejor ajuste: la absorbancia de cada solución es proporcional a la concentración y la absorbancia de la solución que contiene 200 µg de hidrocortisona no es menor de 0,50.

Cambio en la redacción:

Behenato de Metilo, $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_2$ —**354,61** ■[929-77-1]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de conductividad térmica; utilizar helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna de vidrio de 2,0 mm × 1,8 m rellena con fase G3 al 5% sobre soporte S1A; mantener la temperatura del inyector a 300°, mantener la temperatura del detector a 300°, la temperatura inicial del horno es 220°, la cual se mantiene durante 2 minutos, y luego programar para que se eleve 3° por minuto hasta alcanzar una temperatura final de 270°, la cual se mantiene durante 10 minutos. El área del pico de $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_2$ no es menos de 98% del área total.

Intervalo de fusión (741): entre 54° y 56°.

Cambio en la redacción:

Benceno, C_6H_6 —**78,11** ■[71-43-2]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Bencenosulfonamida, $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{NH}_2$ —**157,19** ■[98-10-2]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos a beige pálido.

Intervalo de fusión (741): entre 150° y 153°.

Cambio en la redacción:

2-Bencilaminopiridina, $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2$ —**184,24** ■[6935-27-9]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

1-Bencilimidazol, $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2$ —**158,20** ■[4238-71-5]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos.

Valoración—Transferir aproximadamente 40 mg, pesados con exactitud, a un vaso de precipitados de 100 mL. Disolver en 50 mL de ácido acético glacial. Valorar con ácido perclórico 0,1 N SV, determinando el punto final potenciométricamente con un electrodo combinado de calomel-platino. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 15,82 mg de $C_{10}H_{10}N_2$. No se encuentra menos de 99%.

Cambio en la redacción:

Benzaldehído, C_7H_6O —**106,12** ■[100-52-7]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro, muy refractivo. Soluble en agua; miscible con alcohol, éter, y aceites fijos y volátiles.

Valoración—Pipetear aproximadamente 1 mL, transferir a un frasco para pesada con tapón de vidrio tarado y pesar con exactitud. Aflojar el tapón y transferir el frasco para pesada y su contenido a un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenga 25 mL de una solución hidroalcohólica de clorhidrato de hidroxilamina (preparada del siguiente modo: disolver 34,7 g de clorhidrato de hidroxilamina en 160 mL de agua, agregar alcohol hasta 1000 mL y neutralizar frente a azul de bromofenol agregando hidróxido de sodio SR). Empleando una probeta graduada para medir el volumen, enjuagar las paredes del matraz con 50 mL adicionales de esta solución reactivo. Dejar la solución en reposo durante 10 minutos, agregar 1 mL de azul de bromofenol SR y valorar el ácido clorhídrico liberado con hidróxido de sodio 1 N SV. Realizar una determinación con un blanco utilizando las mismas cantidades de los mismos reactivos y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 1 N consumido equivale a 106,1 mg de C_7H_6O . No se encuentra menos de 98%.

Peso específico ⟨841⟩: entre 1,041 y 1,046.

Índice de refracción ⟨831⟩: entre 1,5440 y 1,5465 a 20°.

Ácido cianhídrico—Agitar 0,5 mL con 5 mL de agua, agregar 0,5 mL de hidróxido de sodio SR y 0,1 mL de sulfato ferroso SR, y entibiar la mezcla moderadamente. Agregar un pequeño exceso de ácido clorhídrico; no se observa un color azul verdoso ni un precipitado azul dentro de los 15 minutos.

Cambio en la redacción:

Benzanilida, $C_{13}H_{11}NO$ —**197,23** ■[93-98-1]■_{1S} (USP30)—Polvo blanquecino o gris claro a verde grisáceo. Insoluble en agua; moderadamente soluble en alcohol; poco soluble en éter.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 162° y 165°.

Solubilidad en acetona—Una porción de 1,0 g se disuelve completamente en 50 mL de acetona y produce una solución transparente.

Cambio en la redacción:

Benzhidrol (α -Fenilbencenometanol), $C_{13}H_{12}O$ —**184,23** ■[91-01-0]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos a amarillo pálido. Muy poco soluble en agua; soluble en alcohol, en éter y en cloroformo.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 65° y 67°, pero el intervalo entre el comienzo y el final de la fusión no excede de 2°.

Cambio en la redacción:

Benzoato de Butilo, $C_{11}H_{14}O_2$ —**178,23** ■[136-60-7]■_{1S} (USP30)—Líquido espeso, oleoso, de incoloro a amarillo pálido. Prácticamente insoluble en agua; soluble en alcohol y en éter.

Valoración—La pureza, cuando se examina mediante cromatografía de gas-líquidos, no es menos de 98%. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas para valorarlo: una columna de acero inoxidable de 3 mm \times 1,8 m rellena con fase líquida G4

sobre soporte S1A. Usar helio como gas transportador, mantener la temperatura del inyector a 180°, la temperatura de la columna a 190° y mantener el detector de ionización a la llama a 280°. El tiempo de retención es de aproximadamente 15 minutos.

Índice de refracción ⟨831⟩: entre 1,4980 y 1,5000 a 20°.

Cambio en la redacción:

Benzoato de Colesterilo, $C_{34}H_{50}O_2$ —**490,76** ■[604-32-0]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Benzoato de Etilo, $C_9H_{10}O_2$ —**150,17** ■[93-89-0]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro y transparente. Tiene olor aromático. Prácticamente insoluble en agua, miscible con alcohol, cloroformo y éter.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* ⟨621⟩), usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna de acero inoxidable de 3 mm \times 2,4 m con fase G16 al 20% sobre un soporte S1A; las temperaturas del inyector, de la columna y del detector deben mantenerse a 180°, 195° y 250°, respectivamente. El área del pico de benzoato de etilo no es menos de 98% del área total.

Índice de refracción ⟨831⟩: entre 1,5048 y 1,5058 a 20°.

Cambio en la redacción:

Benzoferonona, $(C_6H_5)_2CO$ —**182,22** ■[119-61-9]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 47° y 49°.

Cambio en la redacción:

p-Benzoquinona, ■(Quinona), ■_{1S} (USP30) $C_6H_4O_2$ —**108,09** ■[106-51-4]■_{1S} (USP30)—Polvo amarillo oscuro con un matiz verde. Poco soluble en agua; soluble en alcohol, en éter y en soluciones de álcalis fijos. Puede oscurecerse en reposo. El material oscurecido puede purificarse mediante sublimación al vacío.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 113° y 115°.

Cambio en la redacción:

Bibencilo (Dibencilo), $C_{14}H_{14}$ —**182,26** ■[103-29-7]■_{1S} (USP30)—Cristales incoloros. Fácilmente soluble en cloroformo y en éter; moderadamente soluble en alcohol; prácticamente insoluble en agua.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 53° y 55°.

Cambio en la redacción:

Bicarbonato de Aminoguanidina ■(Carbonato Ácido de Aminoguanidina), ■_{1S} (USP30) $CH_6N_4 \cdot H_2CO_3$ —**136,11** ■[2582-30-1]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco.

Valoración—Disolver aproximadamente 34 mg, pesados con exactitud, en 50 mL de ácido acético glacial. Valorar con ácido perclórico 0,1 N SV determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 13,61 mg de $CH_6N_4 \cdot H_2CO_3$. No se encuentra menos de 98,5%.

Punto de fusión ⟨741⟩: aproximadamente 170°, con descomposición.

Cambio en la redacción:

Bifenilo, $C_{12}H_{10}$ —**154,21** ■[92-52-4]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino o cristales incoloros a blancos. Insoluble en agua; soluble en alcohol y en éter. Su punto de ebullición es aproximadamente de 254°.

Intervalo de fusión (741): entre 68° y 72°.

Cambio en la redacción:

2,2'-Bipiridina (α,α' -Dipiridilo), $C_{10}H_8N_2$ —**156,18** ■[366-18-7]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco o rosado. Soluble en agua y en alcohol. Funde aproximadamente a 69° y entra en ebullición aproximadamente a 272°.

Sensibilidad—Preparar las siguientes soluciones: (A)—Disolver 350 mg de sulfato de amonio ferroso en 50 mL de agua que contenga 1 mL de ácido sulfúrico y agregar 500 mg de sulfato de hidrazina, después agregar agua para obtener 500 mL. Para utilizarla, diluir esta solución con agua en la proporción de 1 en 100 mL. (B)—Disolver 8,3 g de acetato de sodio y 12 mL de ácido acético glacial en agua para obtener un volumen de 100 mL. Agregar 1 mL de una solución de la muestra (1 en 1000) a una mezcla de 10 mL de agua, 1 mL de solución A y 1 mL de solución B: de inmediato aparece un color rosado.

Solubilidad—Una porción de 100 mg se disuelve completamente en 10 mL de agua.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,2%.

Cambio en la redacción:

Bis(trimetilsilil)acetamida (*N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida; BSA*), $CH_3CON[Si(CH_3)_3]_2$ —**203,43** ■[10416-59-8]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente incoloro. Se hidroliza rápidamente cuando se expone al aire húmedo. Manipular bajo nitrógeno y guardar en un lugar fresco.

Valoración—No menos de 90% de $CH_3CON[Si(CH_3)_3]_2$; empleando un cromatógrafo de gases adecuado equipado con un detector de conductividad térmica. Las siguientes condiciones son adecuadas y proporcionan un tiempo de retención de aproximadamente 15 minutos.

COLUMNA: de acero inoxidable de 3 mm × 1,83 m con fase G1 al 5% sobre soporte S1A.

TEMPERATURA DEL INYECTOR: 160°.

TEMPERATURA DE LA COLUMNA: 90°, programada para aumentar 4° por minuto hasta 160°.

GAS TRANSPORTADOR: Helio.

Índice de refracción (831): entre 1,4150 y 1,4170 a 20°.

Cambio en la redacción:

Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (*N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida; BSTFA*), $CF_3CON[Si(CH_3)_3]_2$ —**257,40** ■[25561-30-2]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente incoloro. Se hidroliza rápidamente cuando se expone al aire húmedo. Almacenar en un lugar fresco.

Valoración—No menos de 98% de $CF_3CON[Si(CH_3)_3]_2$; emplear un cromatógrafo de gases adecuado equipado con un detector de conductividad térmica. Las siguientes condiciones son adecuadas y proporcionan un tiempo de retención de aproximadamente 15 minutos.

COLUMNA: de acero inoxidable de 3 mm × 1,83 m con fase G1 al 5% sobre soporte S1A.

TEMPERATURA DEL INYECTOR: 170°.

TEMPERATURA DE LA COLUMNA: 70°, programada para aumentar 4° por minuto hasta 140°.

GAS TRANSPORTADOR: Helio.

Índice de refracción (831): entre 1,3820 y 1,3860 a 20°.

Cambio en la redacción:

Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con Trimetilclorosilano ■[25561-30-2]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

[NOTA—Se puede obtener un grado adecuado de Sigma-Aldrich, www.sigma-aldrich.com].

Cambio en la redacción:

Bisulfato de Amonio ■(*Sulfato Ácido de Amonio*),■_{1S} (USP30) NH_4HSO_4 —**115,11** ■[7803-63-6]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos. Fácilmente soluble en agua; prácticamente insoluble en alcohol, en acetona y en piridina.

Valoración—Disolver aproximadamente 300 mg, pesados con exactitud, en 50 mL de una mezcla de agua y alcohol (25:25). Valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 11,51 mg de NH_4HSO_4 . No se encuentra menos de 98%.

Cambio en la redacción:

Bromo, Br—Peso atómico **79,904** ■[7726-95-6]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

p-Bromoanilina, C_6H_6BrN —**172,02** ■[106-40-1]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos a blanquecinos. Insoluble en agua; soluble en alcohol y en éter.

Valoración—Transferir aproximadamente 650 mg, pesados con exactitud, a un recipiente adecuado y disolver en 50 mL de ácido acético glacial SR. Agregar cristal violeta SR y valorar con ácido perclórico 0,1 N SV. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 17,20 mg de C_6H_6BrN . No se encuentra menos de 98%.

Intervalo de fusión (741): entre 60° y 65°, dentro de un intervalo de 2°.

Cambio en la redacción:

N-Bromosuccinimida, $C_4H_4BrNO_2$ —**177,98** ■[128-08-5]■_{1S} (USP30)—Polvo o cristales de color blanco a blanquecino. Fácilmente soluble en agua, acetona y ácido acético glacial. [Precaución—Sumamente irritante para los ojos, la piel y las membranas mucosas.]

Valoración—Transferir 200 mg, pesados con exactitud, a un matraz Erlenmeyer, agregar 25 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N, tapar con un vidrio de reloj, calentar hasta ebullición y mantener en ebullición durante 5 minutos. Enfriar, transferir la solución a un vaso de precipitados, enjuagar el matraz con agua hasta que el volumen total de solución más los enjuagues sea de aproximadamente 100 mL y agregar 10 mL de ácido acético glacial. Insertar electrodos adecuados, valorar con nitrato de plata 0,1 N SV y determinar el punto final potenciométricamente. Cada mL de nitrato de plata 0,1 N equivale a 17,80 mg de $C_4H_4BrNO_2$. No se encuentra menos de 98%.

Cambio en la redacción:

Bromuro de Amonio, NH_4Br —**97,94** ■[12124-97-9]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Bromuro de Cianógeno, BrCN —**105,92** ■[506-68-3]■_{1S} (USP30)—Cristales incoloros. Volátil a temperatura ambiente. Sus vapores son altamente irritantes y *muy tóxicos*. Funde aproximadamente a 52°. Fácilmente soluble en agua y en alcohol. Almacenar en envases impermeables en un lugar frío.

Solubilidad—Sendas porciones de 1 g se disuelven completamente en 10 mL de agua y en 10 mL de alcohol, respectivamente, y producen soluciones incoloras.

Cambio en la redacción:

Bromuro Mercúrico, HgBr_2 —**360,40** ■[7789-47-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

1,3-Butanodiol (*1,3-Butilenglicol*), $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$ —**90,12** ■[107-88-0]■_{1S} (USP30)—Líquido viscoso incoloro. Muy higroscópico. Soluble en agua, en alcohol, en acetona y en metil etil cetona; prácticamente insoluble en hidrocarburos alifáticos, en benceno y en tolueno.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama y usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna de acero inoxidable de 3 mm × 1,8 m con fase G16 al 20% sobre un soporte S1A; mantener la temperatura del inyector a 265°; mantener la temperatura de la columna a 150° y programar para que aumente 8° por minuto hasta alcanzar 210°. El área del pico de butanodiol no es menos de 98% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,4390 y 1,4410, a 20°.

Cambio en la redacción:

2,3-Butanodiona (*Diacetilo*), $\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$ —**86,09** ■[431-03-8]■_{1S} (USP30)—Líquido de color amarillo brillante a verde amarillento. Soluble en agua. Miscible con alcohol y con éter. Alcanza el punto de ebullición aproximadamente a 88°.

Valoración—

SOLUCIÓN DE CLORHIDRATO DE HIDROXILAMINA—Disolver 20 g de clorhidrato de hidroxilamina en 40 mL de agua y diluir con alcohol hasta 400 mL. Agregar mezclando 300 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N SV y filtrar. Desechar después de 2 días.

PROCEDIMIENTO—Transferir aproximadamente 1 g, pesado con exactitud, a un matraz de 250 mL con tapón de vidrio, agregar 75,0 mL de *Solución de clorhidrato de hidroxilamina* y taponar el matraz. Calentar la mezcla a reflujo durante 1 hora, luego enfriar a temperatura ambiente. Agregar azul de bromofenol SR y valorar con ácido clorhídrico 0,5 N SV hasta un punto final amarillo verdoso. [NOTA—Alternativamente, se puede valorar la solución potenciométricamente a un pH de 3,4.] Realizar una prueba con un blanco utilizando las mismas cantidades de reactivos que las empleadas para la muestra de prueba y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido clorhídrico 0,5 N equivale a 43,05 mg de $\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$. No se encuentra menos de 97% de CH_3COCH_3 .

Temperatura de solidificación (651): entre –2,0° y –5,5°.

Índice de refracción (831): entre 1,3935 y 1,3965, a 20°.

Peso específico (841): aproximadamente 0,98.

Cambio en la redacción:

terc-Butil Metil Éter, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ —**88,15** ■[1634-04-4]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 100°; mantener la temperatura del detector a 300° y mantener la temperatura de la columna a temperatura ambiente y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 150°. El área del pico de $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ no es menos de 99,8% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,367 y 1,371 a 20°.

Cambio en la redacción:

n-Butilamina, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ —**73,14** ■[109-73-9]■_{1S} (USP30)—Líquido inflamable, incoloro a amarillo pálido. Miscible con agua, con alcohol y con éter. Almacenar en envases impermeables. Peso específico: aproximadamente 0,740.

Intervalo de destilación, Método I (721)—No menos de 95% destila entre 76° y 78°.

Agua, Método I (921): no más de 1,0%, determinado por el *Método Volumétrico*.

Cloruros (Prueba para reactivos)—Un g (1,5 mL) no presenta más de 0,01 mg de Cl (0,001%).

Impurezas ácidas—A 50 mL agregar 5 gotas de una solución saturada de azo violeta en benceno y valorar rápidamente con metóxido de sodio 0,1 N SV hasta un punto final azul intenso tomando precauciones para impedir la absorción de dióxido de carbono atmosférico, por ejemplo, mediante el empleo de una atmósfera de nitrógeno: para la neutralización no se requiere más de 1,0 mL de metóxido de sodio 0,1 N.

Cambio en la redacción:

terc-Butilamina, $\text{C}_3\text{H}_9\text{CNH}_2$ —**73,14** ■[75-64-9]■_{1S} (USP30)—Líquido.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama; el gas transportador es helio. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 230°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 130° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 280°. El área del pico de $\text{C}_3\text{H}_9\text{CNH}_2$ no es menos de 99,5% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,3770 y 1,3790 a 20°.

Cambio en la redacción:

4-terc-Butilfenol, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ —**150,22** ■[98-54-4]■_{1S} (USP30)—Agujas o escamas cristalinas blancas. Prácticamente insoluble en agua; soluble en alcohol y en éter.

Intervalo de fusión (741): entre 98° y 101°.

Agregar lo siguiente:

Butiraldehído (*Butanal*), $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ —**72,11** [123-72-8]—Usar un grado adecuado, purificado por redestilación, con un contenido de no menos de 99,5%.■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Butirolactona, (*Dihidro-2-(3H)-furanona*, *γ-butirolactona*)—**86,1** ■[96-48-0]■_{1S} (USP30)—Líquido aceitoso, transparente, incoloro a prácticamente incoloro. Es miscible con agua. Soluble en metanol y en éter.

Intervalo de ebullición (721): entre 193° y 208°.

Índice de refracción (831): aproximadamente 1,435 a 20°.

Peso específico (841): entre 1,128 y 1,135.

Cambio en la redacción:

Caprato de Metilo, $C_{11}H_{22}O_2$ —**186,29** ■[110-42-9]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 250°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 150° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 280°. El área del pico de $C_{11}H_{22}O_2$ no es menos de 98,5% del área total.

Cambio en la redacción:

Caprilato de Metilo, $C_9H_{18}O_2$ —**158,24** ■[111-11-5]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 230°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 130° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 280°. El área del pico de $C_9H_{18}O_2$ no es menos de 98,5% del área total.

Cambio en la redacción:

Carbamato de Metilo, $C_2H_5NO_2$ —**75,07** ■[598-55-0]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos. Fácilmente soluble en agua.

Intervalo de fusión (741): entre 54° y 56°.

Cambio en la redacción:

Carbazol, $C_{12}H_9N$ —**167,21** ■[86-74-8]■_{1S} (USP30)—Polvo de color blanquecino a tostado.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 280°; mantener la temperatura del detector a 300° y mantener la temperatura de la columna a 280°. El área del pico de $C_{12}H_9N$ no es menos de 95,5% del área total.

Cambio en la redacción:

Carbonato de Amonio ■(*Cuerno de Ciervo* (*Hartshorn Salt*))—[506-87-6]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Carbonato de Calcio, $CaCO_3$ —**100,09** ■[471-34-1]■_{1S} (USP30)—Utilizar grado reactivo ACS.

[NOTA—Un Carbonato de Calcio de calidad adecuada para su uso como estándar primario se encuentra disponible en el Instituto Nacional de Normas y Tecnología del gobierno de Estados Unidos

(National Institute of Standards and Technology - NIST), Office of Standard Reference Materials, www.nist.gov, como muestra de estándar N° 915].

Cambio en la redacción:

Carbonato de Calcio, Estándar para Quelatometría, $CaCO_3$ —**100,09** ■[471-34-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Caseína—■[9000-71-9]■_{1S} (USP30)—Polvo granulado blanco o levemente amarillo. Insoluble en agua y en otros disolventes neutros; se disuelve fácilmente en amoníaco SR y en soluciones de hidróxidos alcalinos, y forma por lo general una solución turbia.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos)—Incinerar 2 g: el residuo no pesa más de 20 mg (1,0%).

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° hasta peso constante: no pierde más de 10,0% de su peso.

Alcalinidad—Agitar 1 g con 20 mL de agua durante 10 minutos y filtrar: el filtrado no es alcalino al papel de tornasol rojo.

Sustancias solubles—Cuando el filtrado de la prueba de *Alcalinidad* se evapora y se seca a 105°, el residuo no pesa más de 1 mg (0,1%).

Grasas—Disolver 1 g en una mezcla de 10 mL de agua y 5 mL de amoníaco alcohólico SR y agitar con dos porciones de 20 mL de éter de petróleo. Evaporar el éter de petróleo a una temperatura baja y secar a 80°. El peso del residuo no excede de 5 mg (0,5%).

Contenido de nitrógeno, Método 1 (461): se encuentra entre 15,2% y 16,0% de N, con respecto a la sustancia anhidra.

Cuando se requiera caseína exenta de vitaminas, usar caseína a la que se le hayan extraído las vitaminas liposolubles mediante extracción continua con alcohol caliente durante 48 horas, seguida por secado al aire para eliminar el disolvente.

Cambio en la redacción:

Catecol (*o-Dihidroxibenceno*; ■*Pirocatecol*).■_{1S} (USP30) $C_6H_4(OH)_2$ —**110,11** ■[120-80-9]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos que presentan un cambio en su coloración al exponerse al aire y a la luz. Fácilmente soluble en agua, en alcohol, en benceno, en éter, en cloroformo y en piridina, formando soluciones transparentes.

■Usar un grado adecuado con un contenido de no menos de 99%.■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Cianoacetato de Etilo, $CNCH_2COOC_2H_5$ —**113,11** ■[105-56-6]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro a amarillo pálido. Poco soluble en agua. Miscible con alcohol y con éter. A presión atmosférica, entra en ebullición a una temperatura entre 205° y 209°, con descomposición. A una presión de 10 mm de mercurio, destila aproximadamente a 90°.

Peso específico (841): entre 1,057 y 1,062.

Acidez—Disolver 2 mL en 25 mL de alcohol neutralizado, agregar fenoltaleína SR y valorar con hidróxido de sodio 0,10N: no se requiere más de 1,5 mL para producir un color rosado.

Cambio en la redacción:

Ciclohexano, C_6H_{12} —**84,16** ■[110-82-7]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ciclohexanol, $C_6H_{12}O$ —**100,16** ■[108-93-0]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente. Fácilmente soluble en agua. Miscible con alcohol, con acetato de etilo y con hidrocarburos aromáticos.

Valoración—Cuando se examina mediante cromatografía gas-líquido, usando un cromatógrafo de gases y condiciones adecuadas, presenta una pureza de no menos de 98%.

Temperatura de fusión: aproximadamente 23°.

Peso específico: aproximadamente 0,962, a 20°.

Cambio en la redacción:

Cinconidina, $C_{19}H_{22}N_2O$ —**294,39** ■[485-71-2]■_{1S} (USP30)—Cristales o polvo cristalino o granulado de color blanco. Soluble en alcohol y en cloroformo; prácticamente insoluble en agua.

Valoración—Disolver aproximadamente 125 mg, pesados con exactitud, en 50 mL de ácido acético glacial. Agregar algunas gotas de *p*-naftolbenceína SR y valorar con ácido perclórico 0,1 N SV. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 14,72 mg de $C_{19}H_{22}N_2O$. No se encuentra menos de 99,0%.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° hasta peso constante: no pierde más de 1,0% de su peso.

Intervalo de fusión (741): entre 200° y 205°.

Rotación específica (781): entre –105° y –115°, calculada con respecto a la sustancia seca, determinada en una solución en alcohol que contenga 10 mg por mL.

Cambio en la redacción:

Cinconina, $C_{19}H_{22}N_2O$ —**294,39** ■[118-10-5]■_{1S} (USP30)—Cristales o polvo cristalino o granulado de color blanco. Poco soluble en cloroformo, moderadamente soluble en alcohol y prácticamente insoluble en agua.

Valoración—Disolver aproximadamente 125 mg, pesados con exactitud, en 50 mL de ácido acético glacial. Agregar algunas gotas de *p*-naftolbenceína SR y valorar con ácido perclórico 0,1 N SV. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 14,72 mg de $C_{19}H_{22}N_2O$. No se encuentra menos de 99,0%.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° hasta peso constante: no pierde más de 1,0% de su peso.

Intervalo de fusión (741): entre 255° y 261°.

Rotación específica (781): entre +219° y +229°, calculada con respecto a la sustancia seca, determinada en una solución en alcohol que contenga 50 mg por 10 mL.

Cambio en la redacción:

L-Cistina, $HOOC(NH_2)CHCH_2S—SCH_2CH(NH_2)COOH$ —**240,30** ■[58-89-3]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco cristalino. Muy poco soluble en agua; soluble en ácidos minerales diluidos y en soluciones de hidróxidos alcalinos; insoluble en alcohol y en otros disolventes orgánicos.

Rotación específica (781): entre –215° y –225°, determinada en una solución 2 en 100 de la muestra de prueba, previamente secada sobre gel de sílice durante 4 horas, en ácido clorhídrico diluido (1 en 10) a una temperatura de 20°.

Pérdida por secado (731)—Secar sobre gel de sílice durante 4 horas: no pierde más de 0,2% de su peso.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,1%.

Cambio en la redacción:

Citrato Cúprico ([Citrato(4-)] de dicobre), $Cu_2C_6H_4O_7$ —**315,18** ■[866-82-0]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Citrato de Calcio, $Ca_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 4H_2O$ —**570,49** ■[813-94-5]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino de color blanco. Poco soluble en agua; fácilmente soluble en ácido clorhídrico 3 N y en ácido nítrico 2 N; insoluble en alcohol. A 15 mL de ácido sulfúrico 2 N caliente agregar en pequeñas porciones, y mezclando, aproximadamente 500 mg de citrato de calcio. Calentar la mezcla a ebullición durante 5 minutos y filtrar mientras está caliente: el filtrado enfriado responde a la prueba de identificación de *Citrato* (191).

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 400 mg de la sal, previamente secada a 150° hasta peso constante, y transferir a un vaso de precipitados de 250 mL. Disolver la muestra de prueba en 150 mL de agua con 2 mL de ácido clorhídrico 3 N, agregar 15 mL de hidróxido de sodio 1 N y 250 mg de azul de hidroxinaftol, y valorar con edetato disódico 0,05 M SV hasta que la solución cambie a color azul intenso. Cada mL de edetato disódico 0,05 M equivale a 8,307 mg de $Ca_3(C_6H_5O_7)_2$: se encuentra entre 97,5% y 101%.

Carbonato y óxido de calcio—Triturar 1 g de citrato de calcio con 5 mL de agua durante 1 minuto: la mezcla no torna azul el tornasol rojo. Luego agregar 5 mL de ácido clorhídrico 3 N tibio: sólo se observan algunas burbujas aisladas.

Materia insoluble en ácido clorhídrico—Disolver 5 g calentando con una mezcla de 10 mL de ácido clorhídrico y 50 mL de agua durante 30 minutos: no queda más de 2,5 mg de residuo insoluble (0,05%).

Pérdida por secado (731)—Secar a 150° hasta peso constante: pierde entre 12,2% y 13,3% de su peso.

Arsénico (211)—Proceder con 0,50 g según se indica para compuestos orgánicos (6 ppm de As).

Metales pesados, Método I (231): 0,002%.

Cambio en la redacción:

Citrato Dibásico de Amonio ■(*Sal Diamónica de Ácido Cítrico*).■_{1S} (USP30) $(NH_4)_2HC_6H_5O_7$ —**226,18** ■[3012-65-5]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloramina T (*p*-Toluensulfoncloramida de Sodio), $C_7H_7ClNNaO_2S \cdot 3H_2O$ —**281,69** ■[127-65-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de Alprenolol, $C_{15}H_{23}NO_2 \cdot HCl$ —**285,8** ■[13707-88-5]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de Benzamidina Hidrato, ■(*Monoclorhidrato de Bencenocarboximidamida Hidrato*), $C_7H_8N_2 \cdot HCl \cdot xH_2O$ ■_{1S} (USP30)—**156,6** ■[206752-36-5]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco a blanquecino. Usar un grado adecuado.

[NOTA—Se puede obtener un grado adecuado de Sigma-Aldrich, www.sigma-aldrich.com.]

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de Benzfetamina, $C_{17}H_{21}N \cdot HCl$ —**275,82** ■[5411-22-3]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino de color blanco a blanquecino. Fácilmente soluble en agua, en alcohol y en cloroformo; poco soluble en éter.

Valoración—Disolver aproximadamente 500 mg, pesados con exactitud, en una mezcla de 50 mL de ácido acético glacial y 10 mL de acetato mercúrico SR, agregar 1 gota de cristal violeta SR y valorar con ácido perclórico 0,1 N SV hasta un punto final verde azulado. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 27,58 mg de $C_{17}H_{21}N \cdot HCl$. Se encuentra entre 98,0% y 101,0%, calculado con respecto a la sustancia seca.

Intervalo de fusión (741): entre 152° y 158°.

Rotación específica (781): entre +22° y +26°, determinada en una solución que contenga 200 mg en 10 mL, secando previamente la muestra al vacío a 60° durante 3 horas.

Pérdida por secado (731)—Secar al vacío a 60° durante 3 horas: no pierde más de 1% de su peso.

Residuo de incineración (281): no más de 0,2%.

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de 3,3'-Diaminobenzidina, $(NH_2)_2C_6H_3C_6H_3(NH_2)_2 \cdot 4HCl$ —**360,11** ■[7411-49-6]■_{1S} (USP30)—Cristales aciculares blancos a color tostado amarillento (ocasionalmente púrpura). Soluble en agua. Estable en disolventes orgánicos pero inestable en solución acuosa a temperatura ambiente. Almacenar las soluciones acuosas en el refrigerador.

Materia insoluble—Disolver 2 g en 100 mL de agua, sin calentar, y filtrar de inmediato: el residuo insoluble no excede de 1 mg (0,05%).

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 1 mg, a partir de 2 g (0,05%).

Prueba de aptitud para la detección de selenio—Disolver en agua 1,633 g de ácido selenioso (H_2SeO_3) y diluir con agua hasta 1 L. Diluir 10 mL de esta solución con agua hasta 1 L para obtener una solución que contenga 0,010 mg de Se por mL. Colocar 1 mL de la solución resultante en un vaso de precipitados de 100 mL, agregar 2 mL de solución de ácido fórmico (1 en 7) y diluir con agua hasta 50 mL. Agregar 2 mL de solución de clorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina (1 en 200) y dejar en reposo de 30 a 50 minutos. Ajustar con hidróxido de amonio 6 N a un pH entre 6 y 7. Transferir a un separador de 125 mL, agregar 10,0 mL de tolueno y agitar vigorosamente durante 30 segundos: se produce un color amarillo evidente en la capa de tolueno. Un blanco que contiene clorhidrato de diaminobenzidina pero carece de estándar de selenio, tratado del mismo modo, no presenta ningún color en la capa de tolueno.

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de Dihidroquinidina, $C_{20}H_{27}ClN_2O_2$ —**362,89** ■[1476-98-8]■_{1S} (USP30)—Láminas en forma de rombo. Fácilmente soluble en metanol y en cloroformo.

Valoración—

FASE MÓVIL—Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo, dietilamina y ácido metanosulfónico (860 : 100 : 20 : 20).

PROCEDIMIENTO—Inyectar aproximadamente 20 µL en un cromatógrafo de líquidos adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector a 235 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. El área del pico de $C_{20}H_{27}ClN_2O_2$ no es menos de 97,5% del área total.

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de 2-Etilaminopropiofenona, $C_6H_5COCH(CH_3)NHC_2H_5 \cdot HCl$ —**213,70** ■[51553-17-4]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de Fenilhidrazina, $C_6H_5NHNH_2 \cdot HCl$ —**144,60**—Polvo o cristales blancos o amarillentos. Soluble en agua y en alcohol. Almacenar en envases impermeables. Proteger de la luz. ■Usar un grado adecuado con un contenido de no menos de 99%. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de Guanidina, $CH_5N_3 \cdot HCl$ —**95,53** ■[50-01-1]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco. Fácilmente soluble en agua y en alcohol.

Intervalo de fusión (741): entre 178° y 189°.

Contenido de cloruro—Disolver aproximadamente 400 mg, pesados con exactitud, en 5 mL de agua. Agregar 5 mL de ácido acético glacial, 50 mL de metanol y 1 gota de eosina Y SR, y valorar con nitrato de plata 0,1 N SV. Cada mL de nitrato de plata 0,1 N equivale a 3,545 mg de Cl. No se encuentra menos de 36,1% ni más de 37,1%, calculado con respecto a la sustancia anhidra.

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de Guanina, $C_5H_5N_5O \cdot HCl \cdot H_2O$ —**205,60** ■[635-39-2]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco cristalino. Funde por encima de 250°, con descomposición. Poco soluble en agua y en alcohol; soluble en agua acidulada y en hidróxido de sodio SR. Sus soluciones no precipitan con yodo SR ni con yodomercuriato de potasio SR, pero forman un precipitado con trinitrofenol SR.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): inapreciable, usando 100 mg.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° hasta peso constante: no pierde más de 10,0% de su peso.

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de Hidroxilamina, $NH_2OH \cdot HCl$ —**69,49** ■[5470-11-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Clorhidrato de 1-Naftilamina, $C_{10}H_7NH_2 \cdot HCl$ —**179,65** ■[552-46-5]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco que se torna azulado tras la exposición al aire y a la luz. Soluble en agua, en alcohol y en éter.

Una solución 1 en 100, acidificada levemente con ácido acético, da un color violeta con 5 gotas de cloruro férrico SR. Una solución 1 en 40 en ácido acético diluido es incolora y no más que levemente opalescente.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos)—Incinerar 200 mg con unas gotas de ácido sulfúrico: el peso del residuo es inapreciable.

Cambio en la redacción:

Cloro, Cl_2 —**70,9** ■[7782-50-5]■_{1S} (USP30)—Gas amarillo verdoso. Se puede obtener un grado de alta pureza de la mayoría de los proveedores de gases especiales.

Cambio en la redacción:

2-Cloro-4-nitroanilina al 99%, $C_6H_5ClN_2O_2$ —**172,57** ■ [121-87-9] ■_{1S} (USP30)—Polvo blanco a blanquecino.
Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 107° y 109°.

Cambio en la redacción:

1-Cloroadamantano, $C_{10}H_{15}Cl$ —**170,68** ■ [935-56-8] ■_{1S} (USP30)—Sólido cristalino blanco.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* ⟨621⟩) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de fase G2 de 1 μm de espesor; mantener la temperatura del inyector a 250°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 150° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 280°. El área del pico de $C_{10}H_{15}Cl$ no es menos de 97,5% del área total.

Cambio en la redacción:

3-Cloroanilina, C_6H_6ClN —**127,57** ■ [108-42-9] ■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro a marrón claro. Soluble en ácido y en la mayoría de los disolventes orgánicos; prácticamente insoluble en agua.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* ⟨621⟩) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 μm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 250°; mantener la temperatura del detector a 300°; y mantener la temperatura de la columna a 150° y programarla para que se eleve 10° por minuto hasta 280°. El área del pico de C_6H_6ClN no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción ⟨831⟩: entre 1,592 y 1,596, a 20°.

Cambio en la redacción:

Clorobenceno, C_6H_5Cl —**112,56** ■ [108-90-7] ■_{1S} (USP30)—Líquido transparente e incoloro. Insoluble en agua; soluble en alcohol, benceno, cloroformo y éter. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

4-Clorobenzofenona, $C_{13}H_9ClO$ —**216,66** ■ [134-85-0] ■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Cloroformiato de 9-Fluorenilmetilo, $C_{15}H_{11}ClO_2$ —**258,70** ■ [28920-43-6] ■_{1S} (USP30)—Sólido incoloro transparente. Funde aproximadamente a 62°.

Cambio en la redacción:

Cloroformo, $CHCl_3$ —**119,38** ■ [67-66-3] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

1-Cloronaftaleno (α-Cloronaftaleno), $C_{10}H_7Cl$ —**162,62** ■ [90-13-1] ■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro a amarillo claro.

Valoración—Emplear un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización a la llama. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna de acero inoxidable de 3,2 mm × 1,83 m rellena con fase G2 al 7% sobre soporte S1A; mantener la temperatura del inyector a 250° y del detector a 310°; y programar la temperatura de la columna para que aumente a una velocidad de 10° por minuto de 50° a 250°. No se encuentra menos de 90% de $C_{10}H_7Cl$, del cual no más de 10% es 2-cloronaftaleno.

Índice de refracción ⟨831⟩: entre 1,6320 y 1,6340, a 20°.

Cambio en la redacción:

Clorotrimetilsilano ■ (Cloruro de Trimetilsililo), ■_{1S} (USP30) C_3H_9ClSi —**108,64** ■ [75-77-4] ■_{1S} (USP30)—Líquido transparente, incoloro a amarillo claro. Produce humos cuando se expone al aire húmedo.

Precaución—Reacciona vigorosamente con agua, alcoholes y otros dadores de hidrógeno. Guardar en envases impermeables de vidrio.

Índice de refracción ⟨831⟩: entre 1,3850 y 1,3890, a 20°.

Cambio en la redacción:

Cloruro Cúprico, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ —**170,48** ■ [7447-39-4] ■_{1S} (USP30)—Cristales deliquescentes de color verde azulado. Fácilmente soluble en agua; soluble en alcohol; poco soluble en éter. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Acetilcolina, ■ (Cloruro de Trimetiletanaminio; Acecolina), ■_{1S} (USP30) $[CH_3COOCH_2CH_2N(CH_3)_3]Cl$ —**181,66** ■ [60-31-1] ■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco. Muy deliquescente; muy soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol.

Intervalo de fusión ⟨741⟩—Cuando se seca previamente a 110° en un tubo capilar durante 1 hora, funde a una temperatura entre 149° y 152°.

Reacción—Una solución (1 en 10) es neutra al tornasol.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): inapreciable, desde 200 mg.

Solubilidad en alcohol—500 mg se disuelven completamente en 5 mL de alcohol y la solución resultante es incolora.

Porcentaje de acetilo (CH_3CO)—Pesar con exactitud aproximadamente 400 mg, previamente secados a 105° durante 3 horas, y disolver en 15 mL de agua en un matraz Erlenmeyer con tapón de vidrio. Agregar 40,0 mL de hidróxido de sodio 0,1 N SV y calentar en un baño de vapor durante 30 minutos. Insertar el tapón, dejar que se enfríe, agregar fenoltaleína SR y valorar el exceso de álcali con ácido sulfúrico 0,1 N SV. Determinar la normalidad exacta del hidróxido de sodio 0,1 N valorando 40,0 mL después de haberlo tratado de la misma manera que en la prueba. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 4,305 mg de CH_3CO . Se encuentra entre 23,2% y 24,2%.

Porcentaje de cloro (Cl)—Pesar con exactitud aproximadamente 400 mg, previamente secados a 105° durante 3 horas, y disolver en 50 mL de agua en un matraz de 125 mL con tapón de vidrio. Agregar agitando 30,0 mL de nitrato de plata 0,1 N SV, luego agregar 5 mL de ácido nítrico y 5 mL de nitrobenzoceno, agitar, agregar 2 mL de sulfato férrico amónico SR y valorar el exceso de nitrato de plata con tiocianato de amonio 0,1 N SV: cada mL de nitrato de plata 0,1 N equivale a 3,545 mg de Cl. Se encuentra entre 19,3% y 19,8% de Cl.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Acetilo, CH_3COCl —**78,50** ■[75-36-5]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente e incoloro. Se descompone en agua y en alcohol. Miscible con benceno y con cloroformo. Usar grado reactivo ACS.

Peso específico (841): aproximadamente 1,1.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Amonio ■(*Salmiac*). ■_{1S} (USP30) NH_4Cl —**53,49** ■[12125-02-9]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Bario, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —**244,26** ■[10361-37-2]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Bario Anhidro, BaCl_2 —**208,23** ■[10361-37-2]■_{1S} (USP30)—Se puede preparar secando cloruro de bario en capas delgadas a 125° hasta que la pérdida de peso entre dos periodos de secado sucesivos, de 3 horas de duración, no exceda de 1%.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Bencenosulfonilo, $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{Cl}$ —**176,62** ■[98-09-9]■_{1S} (USP30)—Líquido aceitoso incoloro. Insoluble en agua fría; soluble en alcohol y en éter. Solidifica a 0°.

Intervalo de fusión (741): entre 14° y 17°.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos): entre 251° y 252°.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Benciltrimetilamonio, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$ —**185,69** ■[56-93-9]■_{1S} (USP30)—Disponible como solución acuosa al 60%. Es transparente e incolora o no más que ligeramente amarilla.

Valoración—Pipetear 2 mL, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL y agregar agua a volumen. Pipetear 20 mL de la solución y transferir a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, agregar aproximadamente 30 mL de agua, luego agregar 0,25 mL de diclorofluoresceína SR y valorar con nitrato de plata 0,1 N SV. Cada mL de nitrato de plata 0,1 N equivale a 18,57 mg de $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$. Se encuentra entre 59,5% y 60,5%.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Benzoilo, $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCl}$ —**140,57** ■[98-88-4]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de *n*-Butilo (*1-Clorobutano*), $\text{C}_4\text{H}_9\text{Cl}$ —**92,57** ■[109-69-3]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente, incoloro y volátil. [Precaución—Extremadamente inflamable.] Prácticamente insoluble en agua. Miscible con alcohol y con éter.

Valoración—Cuando se examina mediante cromatografía gas-líquido, presenta una pureza de no menos de 98%. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas para la valoración del artículo: una columna de acero inoxidable de 3 mm × 1,8 m rellena con fase

G16 sobre soporte S1. El gas transportador es helio que fluye a una velocidad de aproximadamente 40 mL por minuto. Mantener la temperatura del detector aproximadamente a 310°, la temperatura del inyector aproximadamente a 230° y programar la temperatura de la columna para que aumente 10° por minuto de 35° a 150°. Utilizar un detector de ionización a la llama.

Intervalo de ebullición (721): entre 76° y 80°, dentro de un intervalo de 2°.

Índice de refracción (831): entre 1,4015 y 1,4035, a 20°.

Acidez—Agregar fenolfaleína SR a 75 mL y valorar con hidróxido de potasio 0,1 N en metanol hasta obtener un color rosado pálido que persista, agitando, durante 1,5 segundos; no se requiere más de 0,91 mL (aproximadamente 0,005% como HCl).

Agua (921): no más de 0,02%, determinado por el *Método Volumétrico*.

Residuo posterior a la evaporación—Evaporar aproximadamente 60 mL (50 g), pesados con exactitud, en una cápsula de platino tarada en un baño de vapor y secar a 105° durante 1 hora; no se encuentra más de 0,005%.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Calcio, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —**147,01** ■[10043-52-4]■_{1S} (USP30)—Usar Cloruro de Calcio Dihidrato de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Calcio Anhidro (*para secado*), CaCl_2 —**110,98** ■[10043-52-4]■_{1S} (USP30)—Usar Cloruro de Calcio Desecante de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Cobalto (*Cloruro Cobaltoso*), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —**237,93** ■[7646-79-9]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Colina, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$ —**139,62** ■[67-48-1]■_{1S} (USP30)—Cristales o polvo cristalino blanco. Muy soluble en agua. Es higroscópico. Almacenar en envases impermeables.

Valoración—Transferir aproximadamente 100 mg, previamente secados a 105° durante 2 horas y pesados con exactitud, a un vaso de precipitados, agregar 20 mL de agua y 1 gota de solución de cloruro de aluminio (1 en 10) y mezclar. Agregar, lentamente, 20 mL de una solución de tetrafenilborato sódico (1 en 50) recién preparada y filtrada, y dejar la mezcla en reposo durante 30 minutos, agitando ocasionalmente por rotación suave. Pasar a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media, y lavar el vaso de precipitados y el precipitado con cuatro porciones de 10 mL de agua. El peso del precipitado, determinado después de secar a 105° durante 2 horas, y multiplicado por 0,3298, da el peso equivalente de $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{ClNO}$. No se encuentra menos de 99,5%.

Residuo de incineración (281): no más de 0,1%.

Cambio en la redacción:

Cloruro de 3,5-Dinitrobenzoilo, $\text{C}_7\text{H}_3\text{ClN}_2\text{O}_5$ —**230,56** ■[74367-78-5]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino, amarillo pálido. Fácilmente soluble en soluciones de hidróxido de sodio diluido; soluble en alcohol. [Precaución—Corrosivo, sensible a la humedad, lacrimógeno y posible mutágeno. Almacenar bajo nitrógeno.]

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 69° y 71°.

Solubilidad en hidróxido de sodio—Una solución de 500 mg en 25 mL de hidróxido de sodio 1 N es transparente o no más que ligeramente turbia.

Residuo de incineración—Incinerar 1 g con 0,5 mL de ácido sulfúrico: el residuo no pesa más de 1 mg (0,1%).

Cambio en la redacción:

Cloruro de Lantano, $\text{LaCl}_3 \cdot (6-7)\text{H}_2\text{O}$ —■[10025-84-0] ■_{1S} (USP30)—Este reactivo está disponible en grados de hidratación que oscilan entre 6 y 7 moléculas de agua. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Litio, LiCl —42,39 ■[7447-41-8] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Magnesio, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —203,30 ■[7786-30-3] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Metileno (*Diclorometano*), CH_2Cl_2 —84,93 ■[75-09-2] ■_{1S} (USP30)—Usar Diclorometano de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro de Oro (*Ácido Cloráurico*), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ —393,83 ■[16903-35-8] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro Férrico, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —270,29 ■[7705-08-0] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cloruro Mercúrico, HgCl_2 —271,50 ■[7487-94-7] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Cobre, Cu—Peso atómico 63,546 ■[7440-50-8] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Colestano, $\text{C}_{27}\text{H}_{48}$ —372,67 ■[481-21-0] ■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Cortisona, $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$ —360,44 ■[53-06-5] ■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco. Prácticamente insoluble en agua; moderadamente soluble en alcohol y en acetona. Funde aproximadamente a 220°, con descomposición.

Máximo de absorción—El espectro de absorción UV de una solución 1 en 100 000 en alcohol presenta un máximo aproximadamente a 238 nm.

Rotación específica ⟨781⟩: aproximadamente +209°, determinada en una solución 1 en 100 en alcohol.

Cambio en la redacción:

Decanol (*Alcohol n-Decílico*), $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}$ —158,28 ■[25339-17-7] ■_{1S} (USP30)—Líquido viscoso transparente. Peso específico: aproximadamente 0,83 a 20°. Solidifica aproximadamente a 6,5°. Insoluble en agua; soluble en alcohol y en éter.

Valoración—Cuando se examina mediante cromatografía de gas-líquido, usando un cromatógrafo y condiciones adecuadas, presenta una pureza de no menos de 99%.

Cambio en la redacción:

Dextrano de Alto Peso Molecular—■[9004-54-0] ■_{1S} (USP30) Un estándar de peso molecular de dextrano con un peso molecular promedio en peso, M_{pw} , de 1×10^6 Da y un cociente entre el peso molecular promedio en peso y el peso molecular promedio en número, M_{pw}/M_{n} , de 1,0 a 1,8.

[NOTA—Se puede obtener un grado adecuado de ▲American Polymer Standards Corporation, www.ampolymer.com.] ■_{USP30}

Cambio en la redacción:

Dextrina, $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n \cdot x\text{H}_2\text{O}$ —■[9004-53-9] ■_{1S} (USP30)—Polvo amorfo blanco. Lentamente soluble en agua fría, más fácilmente soluble en agua caliente, insoluble en alcohol.

Materia insoluble—Calentar a ebullición 1 g con 30 mL de agua en un matraz pequeño: la solución es incolora y transparente, o no más que opalescente.

Pérdida por secado ⟨731⟩—Secar a 105° hasta peso constante: no pierde más de 10,0% de su peso.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos)—Incinerar 1 g con 0,5 mL de ácido sulfúrico: el residuo no pesa más de 5 mg (0,5%).

Cloruros (Prueba para reactivos)—Disolver 3 g en 75 mL de agua en ebullición, enfriar, diluir con agua a 75 mL y filtrar si fuera necesario. A 25 mL del filtrado, agregar 2 mL de ácido nítrico y 1 mL de nitrato de plata SR y dejar en reposo durante 5 minutos: si se produce turbidez, ésta no excede la turbidez de un control que contenga 0,02 mg de Cl agregado (0,002%).

Sulfatos (Prueba para reactivos, *Método I*)—A una porción de 25 mL del filtrado de la prueba anterior agregar 0,5 mL de ácido clorhídrico diluido y 2 mL de cloruro de bario SR y dejar en reposo durante 10 minutos: si se produce turbidez, ésta no excede la turbidez de un control que contenga 0,2 mg de SO_4 agregado (0,02%).

Sustancias solubles en alcohol—Calentar hasta ebullición 1 g con 20 mL de alcohol durante 5 minutos bajo un condensador de reflujo y filtrar mientras está caliente. Evaporar 10 mL del filtrado en un baño de vapor y secar a 105°. El residuo no pesa más de 5 mg (1%).

Azúcares reductores—Agitar 2 g con 100 mL de agua durante 10 minutos y filtrar hasta que esté transparente. A 50 mL del filtrado agregar 50 mL de tartrato cúprico alcalino SR y calentar hasta ebullición durante 3 minutos. Filtrar a través de un crisol de filtrado tarado, lavar con agua, luego con alcohol y finalmente con éter, y secar a 105° durante 2 horas: el precipitado de óxido cuproso no pesa más de 115 mg (lo que corresponde aproximadamente a 5% de azúcares reductores como dextrosa).

Cambio en la redacción:

Di(2-etilhexil)ftalato [*Ftalato de bis(2-etilhexilo)*], $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ —390,56 ■[117-81-7] ■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

2,3-Diaminonaftaleno, $C_{10}H_{10}N_2$ —**158,20** ■[771-97-1]■_{1S} (USP30)
—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

2,6-Dibromoquinona-clorimida (2,6-Dibromo-*N*-cloro-*p*-benzoquinona Imina; Reactivo DBQ), O: $C_6H_2Br_2$; NCl—**299,35** ■[537-45-1]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino amarillo. Insoluble en agua; soluble en alcohol y en soluciones de hidróxidos alcalinos diluidas.

Intervalo de fusión (741): entre 82° y 84°.

Solubilidad en alcohol—Una solución de 100 mg en 10 mL de alcohol no es más que ligeramente turbia.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos)—Incinerar 500 mg con 0,5 mL de ácido sulfúrico: el residuo no pesa más de 1 mg (0,2%).

Sensibilidad—A 10 mL de una solución en agua que contenga 0,01 mg de fenol, agregar 0,3 mL de una solución amortiguadora de borato de sodio (preparada disolviendo 2,84 g de borato de sodio cristalizado en 90 mL de agua tibia, agregando 8,2 mL de hidróxido de sodio 1 N y diluyendo con agua a 100 mL) y 0,1 mL de una solución de 10 mg de la muestra de prueba en 20 mL de alcohol: se desarrolla un color azul distintivo dentro de los 10 minutos.

Cambio en la redacción:

Dibutilamina, $C_8H_{19}N$ —**129,24** ■[111-92-2]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 200°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 100° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 200°. El área del pico de $C_8H_{19}N$ no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,415 y 1,419, a 20°.

Cambio en la redacción:

Diclohexilamina, $(C_6H_{11})_2NH$ —**181,32** ■[101-83-7]■_{1S} (USP30)
—Líquido transparente, fuertemente alcalino. Moderadamente soluble en agua. Miscible con disolventes orgánicos comunes. Densidad: 0,9104. Solidifica a –0,1°; funde aproximadamente a 20°.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 400 mg en un frasco para pesada pequeño, tarado, equipado con un cierre bien ajustado. Transferir el frasco tapado a un vaso de precipitados de 250 mL, agregar suficiente ácido acético glacial SR para cubrir el frasco y abrir el frasco debajo de la superficie del ácido. Agregar cristal violeta SR y valorar con ácido perclórico 0,1 N SV. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 18,13 mg de $(C_6H_{11})_2NH$. No se encuentra menos de 98%.

Peso específico (841): entre 0,911 y 0,917.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos): entre 255° y 257°.

Agua, Método I (921): no más de 0,5%.

Cambio en la redacción:

Diclorhidrato de *N,N*-Dimetil-*p*-fenilendiamina, $(CH_3)_2NC_6H_4NH_2 \cdot 2HCl$ —**209,12** ■[99-89-9]■_{1S} (USP30)—Sólido higroscópico, cristalino, fino, casi blanco que puede tener un tinte rosado. Fácilmente soluble en agua; soluble en alcohol.

Valoración—Transferir aproximadamente 400 mg, pesados con exactitud, a un vaso de precipitados de 250 mL y disolver en aproximadamente 75 mL de agua. Valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 10,46 mg de $C_8H_{12}N_2 \cdot 2HCl$. No se encuentra menos de 98%.

Solubilidad—Una solución de 1 g en 10 mL de agua no produce más que una leve turbidez.

Cambio en la redacción:

Diclorhidrato de 4,4'-Dipiridilo, $C_{10}H_8N_2 \cdot 2HCl$ —**229,11** ■[27926-72-3]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos a blanquecinos.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 230°; mantener la temperatura del detector a 300°; y mantener la temperatura de la columna a 160° y programarla para que se eleve 10° por minuto hasta 260°. El área del pico de $C_{10}H_8N_2 \cdot 2HCl$ no es menos de 98,5% del área total.

Cambio en la redacción:

Diclorhidrato de Hidrazina, $(NH_2)_2 \cdot 2HCl$ —**104,97** ■[5341-61-7]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco.

Valoración—Disolver aproximadamente 34 mg, pesados con exactitud, en 50 mL de agua. Agregar cuidadosamente 1 g de bicarbonato de sodio con agitación. [Precaución—Se puede liberar dióxido de carbono rápidamente.] Valorar con solución de yodo 0,1 N determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de solución de yodo 0,1 N equivale a 2,63 mg de $(NH_2)_2 \cdot 2HCl$. No se encuentra menos de 98%.

Cambio en la redacción:

Diclorhidrato de *N*-(1-Naftil)etilendiamina, $C_{10}H_7NH(CH_2)_2NH_2 \cdot 2HCl$ —**259,17** ■[1465-25-4]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

2,4-Dicloro-1-naftol, $C_{10}H_6OCl_2$ —**213,06** ■[2050-76-2]■_{1S} (USP30)
—Polvo tostado claro.

Intervalo de fusión (741): entre 103° y 107°, pero el intervalo entre el comienzo y el final de la fusión no excede de 2°.

Cambio en la redacción:

2,5-Dicloroanilina, $Cl_2C_6H_3NH_2$ —**162,02** ■[95-82-9]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos similares a agujas. Poco soluble en agua; soluble en alcohol y en éter.

Intervalo de fusión, Clase I (741): entre 49° y 50°.

Cambio en la redacción:

2,6-Dicloroanilina, $C_6H_3Cl_2N$ —**162,02** ■[608-31-1]■_{1S} (USP30)—Polvo blanquecino.

Intervalo de fusión (741): entre 38° y 41°.

Cambio en la redacción:

***o*-Diclorobenceno**, $C_6H_4Cl_2$ —**147,00** ■[95-50-1]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente, con un leve tinte marrón amarillento (aproximadamente APHA 20). Prácticamente insoluble en agua. Miscible con alcohol y con éter. Alcanza el punto de ebullición aproximadamente a 180°.

Valoración—Cuando se examina mediante cromatografía de gas-líquido, en condiciones adecuadas y con aparatos adecuados, presenta una pureza de no menos de 98%.

Densidad: entre 1,299 y 1,301.

Índice de refracción (831): entre 1,548 y 1,550 a 25°.

Residuo de evaporación—Evaporar 80 mL en un baño de vapor y secar a 105° durante 1 hora: el residuo no pesa más de 50 mg (0,005%).

Acidez—Agregar fenoltaleína SR a 25 mL de metanol y valorar con hidróxido de potasio alcohólico 0,02 N SV hasta que persista un leve color rosado durante 15 segundos. Pipetear 25 mL de la muestra de prueba y transferir a la solución, mezclar, evitando la exposición a la atmósfera y valorar con hidróxido de potasio alcohólico 0,02 N SV: no se requieren más de 2,2 mL para restablecer el color rosado (aproximadamente 0,005%).

Cambio en la redacción:

2,6-Diclorofenol-indofenol Sódico (2,6-Dicloro-indofenol Sódico), O: $C_6H_2Cl_2$: NC_6H_4ONa con aproximadamente $2H_2O$ —**290,08** (anhidro) ■[620-45-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Diclorofluoresceína, $C_{20}H_{10}Cl_2O_5$ —**401,20** ■[76-54-0]■_{1S} (USP30)—[NOTA—Esta especificación abarca tanto al isómero 4,5 como al isómero 2,7 de diclorofluoresceína, cualquiera de los cuales es adecuado para preparar diclorofluoresceína SR.] Polvo cristalino de color anaranjado tenue. Moderadamente soluble en agua; soluble en alcohol y en soluciones de hidróxidos alcalinos.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos)—Incinerar 200 mg con 5 gotas de ácido sulfúrico: el residuo no pesa más de 1 mg (0,5%).

Sensibilidad—Disolver 100 mg en 60 mL de alcohol, agregar 2,5 mL de hidróxido de sodio 0,1 N y diluir con agua hasta completar 100 mL. Agregar 1 mL de esta solución a una solución de yoduro de potasio que se prepara disolviendo 100 mg de yoduro de potasio, previamente secado a 105° hasta peso constante y pesado con exactitud, en 50 mL de agua que contenga 1 mL de ácido acético glacial, y valorar con nitrato de plata 0,1 N SV hasta que el color del precipitado cambie de anaranjado amarillento claro a rosado. El volumen de nitrato de plata 0,1 N consumido no es más de 0,10 mL mayor que el volumen calculado, basándose este último en el contenido de KI de la muestra seca según se determina en **Valoración** en **Yoduro de Potasio** (monografía de USP).

Cambio en la redacción:

Diclorofluorometano, $CHCl_2F$ —**102,92** ■[75-43-4]■_{1S} (USP30)—Gas incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases (ver **Cromatografía** (621)) equipado con un detector de conductividad térmica y emplear helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,53 mm × 30 m recubierta con una capa de 5 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 200°; mantener la temperatura del detector a 200°; mantener la temperatura de la columna a 0° y programarla para que aumente 5° por minuto hasta 40°, y después para que aumente 10° por minuto hasta 180°. El área del pico de $CHCl_2F$ no es menos de 98% del área total.

Cambio en la redacción:

Dicloruro de Etileno (1,2-Dicloroetano), $C_2H_4Cl_2$ —**98,96** ■[107-06-2]■_{1S} (USP30)—Usar 1,2-Dicloroetano de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Dietilamina, $(C_2H_5)_2NH$ —**73,14** ■[109-89-7]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro, inflamable, fuertemente alcalino. Miscible con agua y con alcohol. Forma un hidrato con agua. *Puede ser irritante para la piel y las membranas mucosas.* Almacenar en envases bien cerrados. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

***N,N*-Dietilanilina**, $C_6H_5N(C_2H_5)_2$ —**149,23** ■[91-66-7]■_{1S} (USP30)—Líquido ámbar a amarillo claro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada (aproximadamente 0,2 µL) en un cromatógrafo de gases adecuado (ver **Cromatografía** (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador, que fluye a una velocidad de 40 mL por minuto. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna de acero inoxidable de 3 mm × 1,8 m rellena con fase G16 al 20% sobre soporte S1A; mantener la temperatura del inyector a 250°; mantener la temperatura de la columna a 140° y programarla para que aumente 6° por minuto hasta alcanzar los 200°. Mantener la temperatura del detector a 310°. El área del pico de *N,N*-dietilanilina con un tiempo de retención de aproximadamente 4,9 minutos no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,5405 y 1,5425 a 20°.

Cambio en la redacción:

Dietilenglicol, $C_2H_4O_3$ —**106,12** ■[111-46-6]■_{1S} (USP30)—Líquido viscoso, higroscópico, de incoloro a amarillo tenue. Miscible con agua, con alcohol, con éter y con acetona. Insoluble en benceno y en tetracloruro de carbono.

Peso específico (841): entre 1,117 y 1,120 a 20°.

Intervalo de destilación (721): entre 240° y 250°.

Acidez—Transferir 54 mL (60 g) a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, agregar fenoltaleína SR y valorar con hidróxido de potasio alcohólico 0,02 N SV hasta un color rosado estable durante por lo menos 15 segundos. No se consumen más de 2,5 mL (0,005% como CH_3COOH).

Agua (921): no más de 0,2%.

Residuo de incineración (281)—Transferir 50 g a una cápsula de platino tarada, calentar la cápsula suavemente hasta que los vapores se enciendan y permitir que la muestra se queme por completo. Incinerar el residuo a $800 \pm 25^\circ$, enfriar y pesar: el residuo no pesa más de 2,5 mg (0,005%).

Cambio en la redacción:

Dietilentriamina, $C_4H_{13}N_3$ —**103,17** ■[111-40-0]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver **Cromatografía** (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con G2. Mantener la temperatura del inyector a 200°; mantener la temperatura de la columna a 100° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 250° y se mantenga a esta temperatura durante 5 minutos. Mantener la temperatura del detector a 300°. El área del pico principal no es menos de 95% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,4815 y 1,4845 a 20°.

Cambio en la redacción:

Difenilamina, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NH}$ —**169,22** ■[122-39-4]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Difenilcarbazona, $(\text{C}_6\text{H}_5\text{NHNH})_2\text{CO}$ —**242,28** ■[140-22-7]■_{1S} (USP30)—Usar 1,5-Difenilcarbhidrazida de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Difenilcarbazona [Difenilcarbazona con *s*-Difenilcarbazona (1:1)], $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHNHCON: NC}_6\text{H}_5 \cdot \text{C}_6\text{H}_5\text{NHNHCONHNHC}_6\text{H}_5$ —**482,54** ■[538-62-5]■_{1S} (USP30)—Usar Difenilcarbazona con *s*-Difenilcarbazona (1:1) grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

2,2-Difenilglicina, $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ —**227,26** ■[3060-50-2]■_{1S} (USP30)—Polvo blanquecino. Funde aproximadamente a 244°, con descomposición.

Valoración—Disolver aproximadamente 115 mg, pesados con exactitud, en 30 mL de metanol. Agregar en forma lenta aproximadamente 20 mL de agua, calentando levemente si fuera necesario para completar la disolución. Valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N equivale a 22,73 mg de $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$. No se encuentra menos de 98,0%.

Cambio en la redacción:

Digitonina, $\text{C}_{56}\text{H}_{92}\text{O}_{29}$ —**1229,31** ■[11024-24-1]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco. Casi insoluble en agua; soluble en alcohol tibio, en ácido acético glacial y en ácido acético al 75 por ciento; insoluble en cloroformo y en éter. Funde aproximadamente a 230°, con descomposición.

Rotación específica (781): entre -47° y -49°, determinada en una solución de ácido acético al 75 por ciento que contenga 100 mg por mL.

Solubilidad en alcohol—Una solución de 500 mg en 20 mL de alcohol tibio es incolora y completa.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° hasta peso constante: no pierde más de 6% de su peso.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,3%.

Eliminar lo siguiente:

■**10-11-Dihidrocarbamazepina**, $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ —**238,28**—Cristales blancos.

Valoración—Cuando se analiza mediante cromatografía en capa delgada, empleando placas recubiertas con mezcla de gel de sílice para cromatografía, una fase móvil constituida por tolueno y metanol (80:20), y se examina visualmente y bajo luz UV de longitud de onda larga, se observa una sola mancha.■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Dihidroquinina (Hidroquinina), $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ —**326,43** ■[522-66-7]■_{1S} (USP30)—Fácilmente soluble en acetona, en alcohol y en cloroformo; casi insoluble en agua.

Valoración—

FASE MÓVIL—Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo, dietilamina y ácido metanosulfónico (860:100:20:20) y metanol (82:18).

PROCEDIMIENTO—Inyectar aproximadamente 20 µL en un cromatógrafo de líquidos adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector a 235 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. El área del pico de $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ no es menos de 97,5% del área total.

Cambio en la redacción:

Diisopropilamina, $[(\text{CH}_3)_2\text{CH}]_2\text{NH}$ —**101,19** ■[108-18-9]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—No se encuentra menos de 98% de $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$, empleando un cromatógrafo de gases adecuado equipado con un detector de ionización a la llama. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: rellenar una columna de acero inoxidable de 3,2 mm × 1,83 m con soporte de poliestireno entrecruzado; mantener la temperatura del inyector a 250° y la del detector a 310°; programar la temperatura de la columna para que aumente 10° por minuto de 50° a 220°.

Índice de refracción (831): entre 1,3915 y 1,3935, a 20°.

Cambio en la redacción:

Diisopropiletilamina (*N,N*-Diisopropiletilamina), $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}$ —**129,24** ■[7087-68-5]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente e incoloro. Soluble en ácido acético glacial.

Valoración—Pesar con exactitud 500 mg, disolver en 50 mL de ácido acético glacial, mezclar, agregar cristal violeta SR y valorar con ácido perclórico 0,1 N SV. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 12,92 mg de $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}$. No se encuentra menos de 98%.

Índice de refracción (831): entre 1,4125 y 1,4145 a 20°.

Cambio en la redacción:

Dimetil Sulfona (*Metil Sulfona*), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$ —**94,13** ■[67-71-0]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos.

Intervalo de fusión (741): entre 109° y 111°.

Cambio en la redacción:

Dimetil Sulfóxido, Grado Espectrofotométrico—■[67-68-5]■_{1S} (USP30)—Usar metil sulfóxido de grado reactivo espectrofotométrico ACS.

Cambio en la redacción:

5,5-Dimetil-1,3-ciclohexanodiona, $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_2$ —**140,18** ■[126-81-8]■_{1S} (USP30)—Sólido cristalino blanco. Poco soluble en agua; soluble en alcohol, en metanol, en cloroformo y en ácido acético.

Intervalo de fusión (741): entre 148° y 150°.

Cambio en la redacción:

***N,N*-Dimetil-1-naftilamina**, $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}$ —**171,24** ■[86-56-6]■_{1S} (USP30)—Líquido aromático de color amarillo pálido a amarillo. Soluble en alcohol y en éter.

Valoración—Transferir aproximadamente 250 mg, pesados con exactitud, a un vaso de precipitados adecuado, agregar 100 mL de ácido acético glacial y mezclar para disolver. Cuando se haya disuelto por completo, valorar con ácido perclórico 0,1 N SV

determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 17,12 mg de $C_{12}H_{13}N$. No se encuentra menos de 98%.

Índice de refracción (831): entre 1,6210° y 1,6230°, a 20°, empleando luz de sodio.

Prueba de sulfanilamida—Disolver 20 mg de ER Sulfanilamida USP en 100 mL de agua para obtener la *Solución de sulfanilamida*. Pipetear 1,0 mL y 2,5 mL de la *Solución de sulfanilamida* y transferirlos a sendos vasos de precipitados de 150 mL. Diluir con agua hasta 90 mL. Para el blanco, colocar 90 mL de agua en un tercer vaso de precipitados. Agregar a cada vaso 8,0 mL de solución de ácido tricloroacético (3 en 20) y 1,0 mL de solución de nitrito de sodio (1 en 1000). Mezclar las soluciones durante 5 minutos, luego agregar 10 mL de solución amortiguadora de acetato SR y 1,0 mL de una solución 1 en 1000 de *N,N*-dimetil-1-naftilamina en alcohol. El pH es de aproximadamente 5 a 6, usando papel indicador de pH. Mezclar otros 5 minutos y luego agregar 20 mL de ácido acético glacial. El pH es de aproximadamente 3 a 4, usando papel indicador de pH. En comparación con el blanco, el vaso de precipitados que contiene 1,0 mL de la *Solución de sulfanilamida* presenta un color rosado, mientras que el otro presenta un color de rosado intenso a rojo.

Cambio en la redacción:

N,N-Dimetilacetamida, C_4H_9NO —**87,12** ■[127-19-5]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente e incoloro. Miscible con agua y con muchos disolventes orgánicos.

Valoración—Cuando se examina mediante cromatografía de gas-líquido, empleando un aparato y condiciones adecuadas, muestra una pureza de no menos de 99%.

Intervalo de destilación (721): entre 164,5° y 167,5°.

Residuo de evaporación—Evaporar 215 mL en un baño de vapor y secar a 105° durante 1 hora: el residuo no pesa más de 2 mg (0,001%).

pH de una solución al 20%—Pesar 20 g del artículo, colocar en un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con agua exenta de dióxido de carbono: la solución presenta un pH entre 4,0 y 7,0.

Absorción en el ultravioleta—Determinar su absorbancia en el intervalo de 270 a 400 nm, usando una celda de 1 cm, un espectrofotómetro adecuado y agua para ajustar el instrumento: la absorbancia no excede 1,00 a 270 nm; 0,30 a 280 nm; 0,15 a 290 nm; 0,05 a 310 nm; 0,03 a 320 nm; y 0,01 de 360 a 400 nm.

Agua, Método I (921): no más de 0,05%.

Cambio en la redacción:

p-Dimetilaminoazobenceno (*Amarillo de Metilo, Amarillo Mantequilla*), C_6H_5N : $NC_6H_4N(CH_3)_2$ —**225,29** ■[60-11-7]■_{1S} (USP30)—Laminillas amarillas o polvo cristalino amarillo.

Solubilidad—Insoluble en agua; moderadamente soluble en cloroformo, en éter o en ácidos grasos. Disolver 100 mg en 20 mL de alcohol: la solución es completa o prácticamente completa y transparente.

Intervalo de fusión (741): entre 115° y 117°.

Residuo de incineración (281): no más de 0,1%.

Sensibilidad—Agregar 0,05 mL de una solución en alcohol (1 en 200) y 2 g de cloruro de amonio a 25 mL de agua exenta de dióxido de carbono: el color amarillo limón de la solución se torna anaranjado por la adición de 0,05 mL de ácido clorhídrico 0,1 N y se restablece con la adición subsiguiente de 0,05 mL de hidróxido de sodio 0,1 N.

Cambio en la redacción:

p-Dimetilaminobenzaldehído, $(CH_3)_2NC_6H_4CHO$ —**149,19** ■[100-10-7]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

2,6-Dimetilanilina, $C_8H_{11}N$ —**121,18** ■[87-62-7]■_{1S} (USP30)—Líquido amarillo.

Índice de refracción (831): aproximadamente 1,5609, a 20°.

Cambio en la redacción:

N,N-Dimetilalanilina, $C_6H_5N(CH_3)_2$ —**121,18** ■[121-69-7]■_{1S} (USP30)—Líquido amarillo claro. Líquido transparente, incoloro cuando está recién destilado, pero que adquiere un color rojizo a marrón-rojizo. Peso específico: aproximadamente 0,960. Punto de congelación aproximadamente 2°. Insoluble en agua; soluble en alcohol, en cloroformo, en éter y en ácidos minerales diluidos.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada (aproximadamente 0,2 µL) en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, empleando helio como gas transportador con una velocidad de flujo de aproximadamente 40 mL por minuto. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna de acero inoxidable de 3 mm × 1,8 m con fase G16 al 20% sobre un soporte S1A; la temperatura del inyector se mantiene a 250°, la temperatura de la columna se mantiene a 50° y se programa para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 200°. Mantener la temperatura del detector a 310°. El área del pico de *N,N*-dimetilalanilina, con un tiempo de retención de aproximadamente 11,5 minutos, no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,5571 y 1,5591 a 20°.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos)—Destilar 100 mL: la diferencia entre las temperaturas observadas, cuando se han destilado 1 mL y 95 mL, no es mayor de 2,5°. Su temperatura de ebullición a una presión de 760 mm de mercurio es de 194,2°.

Hidrocarburos—Disolver 5 mL en una mezcla de 10 mL de ácido clorhídrico y 15 mL de agua: se produce una solución transparente y permanece transparente al enfriarse hasta aproximadamente 10°.

Anilina o monometilanilina—Colocar 5 mL en un matraz con tapón de vidrio, agregar 5 mL de una solución de anhídrido acético en benceno (1 en 10), mezclar y dejar reposar durante 30 minutos. Agregar 30,0 mL de hidróxido de sodio 0,5 N SV, agitar la mezcla, agregar fenoltaleína SR y valorar con ácido clorhídrico 0,5 N SV. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. La muestra de prueba no consume más de 0,30 mL de hidróxido de sodio 0,5 N.

Cambio en la redacción:

3,4-Dimetilbenzofenona, $C_{15}H_{14}O$ —**210,27** ■[2571-39-3]■_{1S} (USP30)—Terrones blancos que funden aproximadamente a 45°.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con fase G1: mantener la temperatura del detector y la del inyector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 180° y programarla para que aumente a una velocidad de 10° por minuto hasta 280° y se mantenga a esa temperatura durante 10 minutos. El área del pico principal no es menor de 99% del área total.

Cambio en la redacción:

2,6-Dimetilfenol, $(CH_3)_2C_6H_3OH$ —**122,16** ■[576-26-1]■_{1S} (USP30)—Sólido cristalino de color blanco a amarillo pálido.

Valoración—Inyectar una solución 1 en 3 del artículo en xileno en un cromatógrafo de gases adecuado equipado con un detector de ionización a la llama, empleando helio como gas transportador que fluye a una velocidad de aproximadamente 40 mL por minuto. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna de acero inoxidable de 3,2 mm × 1,83 m rellena con fase G25 al 10%

sobre soporte S1A; mantener la temperatura del inyector aproximadamente a 250° y la del detector a 310°; y programar la temperatura de la columna para que aumente 8° por minuto desde 100° a 200°. Inyectar de manera similar una muestra de xileno. El área del pico de $C_8H_{10}O$ no es menor del 98% del área total, corregida por xileno.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 44° y 46°.

Cambio en la redacción:

Dimetilformamida (*N,N*-Dimetilformamida), $HCON(CH_3)_2$ —**73,09** ■[68-12-2]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Eliminar lo siguiente:

■*N,N*-Dimetilformamida Dietil Acetal—**147,22** [1188-33-6]—Usar un grado adecuado.

[NOTA—Se puede obtener un grado adecuado de Sigma-Aldrich, www.sigma-aldrich.com].■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

***N,N*-Dimetiloctilamina**, $C_{10}H_{23}N$ —**157,30** ■[7378-99-6]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Índice de refracción ⟨831⟩: 1,4243 a 20°.

Cambio en la redacción:

2,5-Dimetoxibenzaldehído, $C_9H_{10}O_3$ —**166,17** ■[93-02-7]■_{1S} (USP30)—Cristales blanquecinos.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* ⟨621⟩) equipado con un detector de ionización a la llama y emplear nitrógeno como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,3 mm × 30 m recubierta con fase G1; mantener la temperatura del inyector a 270°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 150° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 270°. El área del pico principal no es menos de 97% del área total.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 50° y 52°.

Cambio en la redacción:

1,2-Dimetoxietano, $C_4H_{10}O_2$ —**90,12** ■[110-71-4]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro y transparente. Miscible con agua y con alcohol. Soluble en disolventes hidrocarbonados. *En reposo, puede formar peróxidos.*

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos)—No menos de 95% destila entre 83° y 86°.

Índice de refracción ⟨831⟩: entre 1,379 y 1,381, a 20°.

Acidez—Agregar azul de bromofenol SR a 20 mL y valorar con hidróxido de sodio 0,020 N: no se consumen más de 2,0 mL (aproximadamente 0,015% como CH_3COOH).

Agua, Método I ⟨921⟩: no más de 0,2%.

Cambio en la redacción:

(3,4-Dimetoxifenil)acetonitrilo (*Homoveratronitrilo*), $C_{10}H_{11}NO_2$ —**177,20** ■[93-17-4]■_{1S} (USP30)—Fibras blanquecinas.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 65° y 67°.

Cambio en la redacción:

***m*-Dinitrobenceno**, $C_6H_4(NO_2)_2$ —**168,11** ■[99-65-0]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino o cristales amarillo pálido. Casi insoluble en agua fría; poco soluble en agua caliente. Soluble en cloroformo y en benceno; moderadamente soluble en alcohol. Volátil en vapor.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 89° y 92°.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,5%.

Cambio en la redacción:

2,4-Dinitroclorobenceno, $C_6H_3(NO_2)_2Cl$ —**202,55** ■[97-00-7]■_{1S} (USP30)—Cristales de color amarillo a amarillo amarronado. Insoluble en agua; soluble en alcohol caliente, en éter y en benceno.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 51° y 53°.

Residuo de incineración—Incinerar 500 mg con 5 gotas de ácido sulfúrico: el residuo no pesa más de 1 mg (0,2%).

Cambio en la redacción:

2,4-Dinitrofenilhidrazina, $2,4-C_6H_3(NO_2)_2NHNH_2$ —**198,14** ■[119-26-6]■_{1S} (USP30)—Cristales de color rojo anaranjado, que en el microscopio se observan individualmente como agujas en forma de listones de color amarillo limón. Muy poco soluble en agua; poco soluble en alcohol; moderadamente soluble en ácidos inorgánicos diluidos.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 197° y 200°.

Solubilidad en ácido sulfúrico—Disolver 500 mg en una mezcla de 25 mL de ácido sulfúrico y 25 mL de agua: la solución es transparente o no más que levemente turbia.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): inapreciable, usando 500 mg.

Cambio en la redacción:

2,4-Dinitrofluorobenceno (*1-Fluoro-2,4-dinitrobenceno*), $C_6H_3FN_2O_4$ —**186,10** ■[70-34-8]■_{1S} (USP30)—Sólido de color amarillo claro. Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Dioxano (*Dióxido de Dietileno; 1,4-Dioxano*), $C_4H_8O_2$ —**88,11** ■[123-91-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Dióxido de Manganeso Activado (*Óxido de Manganeso (IV) Activado*), MnO_2 —**86,94** ■[1313-13-9]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Disulfuro de Carbono, CS_2 ■[75-15-0]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

5,5'-Ditio bis (Ácido 2-Nitrobenzoico) (*Disulfuro de 3-carboxi-4-nitrofenilo; Reactivo de Ellman*), $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ —**396,35** ■[69-78-3]■_{1S} (USP30)—Polvo amarillo; funde aproximadamente a 242°. Moderadamente soluble en alcohol.

Cambio en la redacción:

Ditiotreitol (*Reactivo de Cleland, Treo-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol, DTT*) $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$ —**154,25** ■ [3483-12-3] ■_{1S} (USP30)—Agujas levemente higroscópicas obtenidas a partir de éter. Fácilmente soluble en agua, en alcohol, en acetona, en acetato de etilo y en éter.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 42° y 44°.

Cambio en la redacción:

Ditizona (*Difeniltiocarbazona; Ácido Fenilazotiofórmico 2-Fenilhidrazida*), $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}:\text{NCSNHNHC}_6\text{H}_5$ —**256,33** ■ [60-10-6] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Diyodofluoresceína, $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{I}_2\text{O}_5$ —**584,10** ■ [31395-16-1] ■_{1S} (USP30)—Polvo de color rojo anaranjado. Poco soluble en agua; soluble en alcohol y en soluciones de hidróxidos alcalinos.

Residuo de incineración—Incinerar 200 mg con 5 gotas de ácido sulfúrico: el peso del residuo no excede de 1,0 mg (0,5%).

Sensibilidad—Pesar con exactitud aproximadamente 100 mg de yoduro de potasio, previamente secados a 105° hasta peso constante, y disolverlo en 50 mL de agua. Agregar 1 mL diyodofluoresceína SR preparada a partir de la muestra de prueba y 1 mL de ácido acético glacial, y valorar con nitrato de plata 0,1 N SV hasta que el color del precipitado cambie de rojo amarillado a rojo azulado. El volumen de nitrato de plata 0,1 N consumido no excede de 0,10 mL del volumen calculado, basado en el contenido de KI del yoduro de potasio seco determinado del siguiente modo. Disolver aproximadamente 500 mg de yoduro de potasio, pesados con exactitud, en aproximadamente 10 mL de agua y agregar 35 mL de ácido clorhídrico y 5 mL de cloroformo. Valorar con yodato de potasio 0,05 M SV hasta que el color púrpura del yodo desaparezca del cloroformo. Agregar gota a gota las últimas porciones de la solución de yodato, agitando de manera vigorosa y continua. Después de que el cloroformo se haya decolorado, dejar la mezcla en reposo durante 5 minutos. Si en el cloroformo aparece un color púrpura, valorar otra vez con la solución de yodato. Cada mL de yodato de potasio 0,05 M equivale a 16,60 mg de KI.

Agregar lo siguiente:

■ **Docusato Sódico**—Usar *Docusato Sódico* (monografía de la USP). ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

1-Dodecanol (*Alcohol Dodecílico*), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OH}$ —**186,33** ■ [112-53-8] ■_{1S} (USP30)—Líquido transparente e incoloro. Cristaliza como laminillas a partir de una solución de alcohol diluido. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

n-Eicosano, $\text{C}_{20}\text{H}_{42}$ —**282,55** ■ [112-95-8] ■_{1S} (USP30)—Sólido cristalino blanco.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 37° y 39°.

Cambio en la redacción:

Eicosanol—■ [629-96-9] ■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Eosina Y (Eosina Amarillenta Y) (*Eosina Y Biológica Certificada, Tetrabromofluoresceína Sódica*), $\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$ —**691,85** ■ [17372-87-1] ■_{1S} (USP30)—Polvo o trozos de color rojo a rojo amarillado. Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Epiandrosterona, $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2$ —**290,44** ■ [481-29-8] ■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco.

Valoración—Cuando se analiza por cromatografía en capa delgada (ver *Cromatografía* ⟨621⟩), con placas recubiertas con mezcla de gel de sílice para cromatografía y una fase móvil constituida por una mezcla de tolueno y etanol (9:1), y se examina bajo luz UV de longitud de onda corta, se observa una sola mancha con trazas de impurezas.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 172° y 177°.

Cambio en la redacción:

Equilenina, $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_2$ —**266,33** ■ [517-09-9] ■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino o cristales incoloros o blancos. Insoluble en agua; soluble en cloroformo y en dioxano; moderadamente soluble en alcohol.

Intervalo de fusión, Clase II ⟨741⟩: entre 256° y 260°.

Rotación específica ⟨781⟩: entre +85° y +88°, determinada en una solución en dioxano que contenga 75 mg de equilenina cada 10 mL.

Absorción máxima—Una solución en alcohol presenta máximos de absorción a 231, 282, 325 y 340 nm.

Cambio en la redacción:

Eriocromo Cianina R, $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{Na}_3\text{O}_9\text{S}$ —**536,40** ■ [3564-18-9] ■_{1S} (USP30)—Polvo marrón rojizo oscuro. Fácilmente soluble en agua; insoluble en alcohol.

Solubilidad—200 mg en 100 mL de agua producen una solución que permanece transparente y exenta de materia no disuelta durante 30 minutos.

Pérdida por secado ⟨731⟩—Secar al vacío sobre gel de sílice hasta peso constante: no pierde más de 2% de su peso.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos)—0,5 g, tratado con 1 mL de ácido sulfúrico y 2 mL de ácido nítrico, produce entre 42,0% y 44,0% del peso seco (el producto teórico es 42,9% de Na_2SO_4).

Sensibilidad—Agregar 2 mL de una solución (1 en 1000) a 1 mL de solución de sulfato de aluminio (1 en 10 000), calentar a $37 \pm 3^\circ$ durante 5 minutos, enfriar y agregar 1 mL de acetato de sodio SR. Se produce un color entre rojo fuerte y violeta rojizo en no más de 5 minutos.

Cambio en la redacción:

Erucato de Metilo, $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_2$ —**352,59** ■ [1120-34-9] ■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Cambio en la redacción:

Estándar Certificado de Óxido Nitroso—■ [10024-97-2] ■_{1S} (USP30)—Envase de óxido nitroso 99,9%. Se puede obtener de la mayoría de los proveedores de gases especiales.

Cambio en la redacción:

Estearato de Metilo, $C_{19}H_{38}O_2$ —**298,50** ■[112-61-8]■_{1S} (USP30)—Sólido cristalino blanquecino.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: usar una columna capilar recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 300°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 200° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 300°. El área del pico de $C_{19}H_{38}O_2$ no es menos de 99% del área total.

Intervalo de fusión (741): entre 40° y 42°.

Cambio en la redacción:

Éter Isopropílico del Ácido 4-Hidroxibenzoico, $HOC_6H_4COOCH(CH_3)_2$ —**180,18** ■[4191-73-5]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

[NOTA—Se puede obtener un grado adecuado de TCI America, www.tciamerica.com.]

Intervalo de fusión (741): entre 84° y 87°.

Cambio en la redacción:

Éter Butílico (Éter n-Dibutílico), $C_8H_{18}O$ —**130,23** ■[142-96-1]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Éter de Petróleo (Bencina de Petróleo; Solvente Hexano, Ligróina)■[8032-32-4]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente y volátil. Prácticamente insoluble en agua; soluble en alcohol absoluto. Miscible con éter, con cloroformo, con benceno y con la mayoría de los aceites fijos y volátiles.

Precaución—Es sumamente inflamable. Mantener alejado de las llamas y almacenar en envases impermeables en un lugar fresco.

Usar Éter de Petróleo grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Éter Difenílico (Éter Fenílico), $(C_6H_5)_2O$ —**170,21** ■[101-84-8]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro. Insoluble en agua; soluble en ácido acético glacial y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Alcanza la ebullición aproximadamente a 259°.

Intervalo de fusión (741): entre 26° y 28°.

Cambio en la redacción:

Éter Diisopropílico (Éter Isopropílico) [(CH₃)₂CH]₂O—**102,17** ■[108-20-3]■_{1S} (USP30)—Líquido móvil e incoloro. Poco soluble en agua. Miscible con alcohol y con éter. [Precaución—Es sumamente inflamable. No usar donde pueda encenderse. No evaporar hasta el punto próximo a sequedad, ya que tiende a formar peróxidos explosivos.]

Peso específico: entre 0,716 y 0,720.

Intervalo de destilación, Método II(721)—No menos de 95% destila entre 65° y 70°.

Peróxidos—A 10 mL, contenidos en una probeta limpia con tapón de vidrio previamente enjuagada con una porción del éter en análisis, agregar 1 mL de solución de yoduro de potasio (1 en 10) recién preparada. Agitar y dejar en reposo durante 1 minuto: no se observa color amarillo en ninguna de las dos capas (aproximadamente 0,001% como H₂O₂).

Residuo de evaporación—[Nota—Si hubiera peróxido, no efectuar este procedimiento.] Evaporar 14 mL (10 g) en una cápsula tarada poco profunda y secar a 105° durante 1 hora: el residuo no pesa más de 1 mg (0,01%).

Acidez—A 10 mL de agua contenidos en un matraz de 50 mL con tapón de vidrio, agregar 2 gotas de azul de bromotimol SR y valorar con hidróxido de sodio 0,010 N hasta que persista un color azul después de agitar vigorosamente. Agregar 5 mL de éter diisopropílico y valorar con hidróxido de sodio 0,010 N: no se requieren más de 0,30 mL para restaurar el color azul (0,005% como CH₃COOH).

[NOTA—Para las determinaciones espectrofotométricas, utilizar éter diisopropílico que cumpla con el siguiente requisito adicional:

Absorbancia—La absorbancia a 255 nm, en una celda de cuarzo de 10 mm, no excede de 0,2 utilizando agua como blanco.

Cambio en la redacción:

Éter Etilico (Diethyl Éter; Éter), $(C_2H_5)_2O$ —**74,12** ■[60-29-7]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Éter Etilico Anhidro (Diethyl Éter Anhidro; Éter Absoluto), $(C_2H_5)_2O$ —**74,12** ■[60-29-7]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Etilbenceno, C_8H_{10} —**106,17** ■[100-41-4]■_{1S} (USP30)—No menos de 99,5%.

Cambio en la redacción:

4-Etilbenzaldehído, $C_2H_5C_6H_4CHO$ —**134,18** ■[4748-78-1]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro a amarillo pálido.

Valoración—Disolver aproximadamente 600 mg, pesados con exactitud, en una mezcla de 100 mL de alcohol y 25 mL de clorhidrato de hidroxilamina 1 M en un vaso de precipitados. Cubrir el vaso de precipitados con un vidrio de reloj. Calentar moderadamente hasta que comience a formarse un condensado sobre el vidrio de reloj. Dejar que se enfríe durante aproximadamente 30 minutos. Valorar con hidróxido de sodio 0,5 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de hidróxido de sodio 0,5 N equivale a 67,09 mg de $C_2H_5C_6H_4CHO$. No se encuentra menos de 98%.

Cambio en la redacción:

Etilenglicol, $HOCH_2CH_2OH$ —**62,07** ■[107-21-1]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente, incoloro, levemente viscoso e higroscópico. Poco soluble en éter; prácticamente insoluble en benceno. Miscible con agua y con alcohol.

Peso específico (841): aproximadamente 1,11.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos): entre 194° y 200°.

Residuo de incineración—Evaporar 100 mL (110 g) en una cápsula de evaporación tarada sobre una llama hasta que los vapores continúen ardiendo después de quitar la llama. Dejar que los vapores ardan hasta que la muestra se consuma. Incinerar a $800^\circ \pm 25^\circ$ durante 1 hora, enfriar y pesar: el residuo no pesa más de 5,5 mg (0,005%).

Acidez—Agregar 0,2 mL de rojo de fenol SR a 50 mL de agua y valorar con hidróxido de sodio 0,1 N hasta un punto final rojo. Agregar 50 mL (55 g) de etilenglicol y valorar con hidróxido de sodio 0,1 N: no se requiere más de 1 mL para restituir el color rojo (0,01% como CH₃COOH).

Cloruros (Prueba para reactivos)—Una porción de 4,5 mL (5 g) no presenta más de 0,025 mg de Cl (5 ppm).

Agua, Método I (921): no más de 0,20%.

Cambio en la redacción:

2-Etoxietanol (*Etilenglicol Monoetil Éter*), $C_4H_{10}O_2$ —**90,12** ■[110-80-5]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro y transparente. ■_{1S} (USP30) Miscible con agua, alcohol, éter y acetona.

Peso específico (841): aproximadamente 0,93.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos)—No menos de 95% destila entre 133° y 135°.

Cambio en la redacción:

Fluoreno, $C_{13}H_{10}$ —**166,22** ■[86-73-7]■_{1S} (USP30)—Polvo o cristales blancos a blanquecinos. Soluble en benceno, en disulfuro de carbono, en éter y en alcohol caliente; fácilmente soluble en ácido acético glacial.

Prueba de solubilidad—Un g se disuelve en 10 mL de acetona para producir una disolución completa y transparente.

Intervalo de fusión (741): entre 113° y 117°, dentro de un intervalo de 2°.

Cambio en la redacción:

Fluorescamina, $C_{17}H_{10}O_4$ —**278,26** ■[38183-12-9]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco a blanquecino. Muy poco soluble en agua; fácilmente soluble en cloruro de metileno; soluble en alcohol; poco soluble en cloroformo.

Valoración—Disolver aproximadamente 600 mg en 75 mL de dimetilformamida y valorar con metóxido de litio 0,1 N hasta un punto final azul, usando azul de timol al 1% en dimetilformamida como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de metóxido de litio 0,1 N equivale a 27,83 mg de $C_{17}H_{10}O_4$. No se encuentra menos de 99%.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° durante 4 horas: no pierde más de 0,5% de su peso.

Cambio en la redacción:

4'-Fluoroacetofenona, $FC_6H_4COCH_3$ —**138,14** ■[403-42-9]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 200°; la temperatura del detector a 250°; y la temperatura de la columna a 100° y programada para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 250°. El área del pico de $FC_6H_4COCH_3$ no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): 1,510 a 20°.

Cambio en la redacción:

Fluoruro de Amonio, NH_4F —**37,04** ■[12125-01-8]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Formamida, $HCONH_2$ —**45,04** ■[75-12-7]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Preparación para Valoración de Digitoxina—Para asegurar la ausencia de amoníaco, tratar la Formamida del siguiente modo. Agitar una cantidad adecuada de formamida con aproximadamente 10% de su peso de carbonato de potasio anhidro durante 15 minutos y filtrar. Destilar el filtrado, en un aparato que sea totalmente de vidrio, al vacío a una presión de aproximadamente 25 mm de mercurio o menor. Desechar la primera porción del destilado que contiene agua y recoger la fracción que ebulle a aproximadamente 115° a una presión de 25 mm de mercurio o a 101° a una presión de 12 mm de mercurio. Almacenar en envases impermeables. Proteger de la luz.

Cambio en la redacción:

Fosfato Dibásico de Amonio (*Fosfato Ácido Diamónico*), $(NH_4)_2HPO_4$ —**132,06** ■[7783-28-0]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Fosfato Monobásico de Amonio (*Fosfato Diácido de Amonio*), $NH_4H_2PO_4$ —**115,03** ■[7722-76-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Ftalato de Bis(2-etilhexilo), $C_{26}H_{44}O_4$ —**390,56** ■[117-81-7]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro a amarillo claro.

Índice de refracción (831): entre 1,4855 y 1,4875, a 20°.

Cambio en la redacción:

Ftalato de Dibutilo, $C_{16}H_{22}O_4$ —**278,34** ■[84-74-2]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente e incoloro.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 2 g en un matraz adecuado, agregar 25,0 mL de hidróxido de sodio 1 N y 30 mL de alcohol isopropílico, y mezclar. Digerir la mezcla a una temperatura aproximada a la de ebullición durante 30 minutos, después enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente. Agregar fenoltaleína SR y valorar con ácido sulfúrico 1 N SV hasta que desaparezca el color rosado. Realizar una determinación completa con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido sulfúrico 1 N consumido equivale a 139,2 mg de $C_{16}H_{22}O_4$. No se encuentra menos de 98%.

Índice de refracción (831): entre 1,491 y 1,493, a 20°.

Contenido de ácido—Pesar con exactitud aproximadamente 10 g y disolver en 100 mL de una mezcla de alcohol y éter (1:1). Agregar fenoltaleína SR y valorar de inmediato con hidróxido de potasio alcohólico 0,05 N SV. Cada mL de hidróxido de potasio alcohólico 0,05 N equivale a 4,15 mg de ácido ftálico: no se encuentra más de 0,02%.

Cambio en la redacción:

Ftalato de Diisodecilo [*Ftalato de bis(isodecilo)*], $C_{28}H_{46}O_4$ —**446,66** ■[26761-40-0]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Ftalato de Dimetilo, $C_{10}H_{10}O_4$ —**194,19** ■[131-11-3]■_{1S} (USP30)—Líquido viscoso e incoloro.

Valoración—

FASE MÓVIL—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *n*-heptano para cromatografía y alcohol *n*-propílico (grado HPLC) (97 : 3). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

SOLUCIÓN ESTÁNDAR—Disolver una cantidad adecuada de ftalato de dimetilo en *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,26 mg por mL.

PROCEDIMIENTO—Inyectar aproximadamente 20 µL en un cromatógrafo de líquidos adecuado (ver *Cromatografía* (621)), equipado con un detector a 238 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L10. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. El área del pico de ftalato de dimetilo no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,514 y 1,518, a 20°.

Cambio en la redacción:

Ftalato de Dipropilo, C₁₄H₁₈O₄—**250,29** ■[131-16-8]■_{1S} (USP30)—Líquido viscoso incoloro.

Valoración—

FASE MÓVIL—Preparar una mezcla de acetonitrilo y agua (52 : 48).

PROCEDIMIENTO—Inyectar aproximadamente 20 µL en un cromatógrafo de líquidos adecuado (ver *Cromatografía* (621)), equipado con un detector a 230 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2,0 mL por minuto. El área del pico de C₁₄H₁₈O₄ no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,495 y 1,499 a 20°.

Cambio en la redacción:

Fucsina Básica—■[632-99-5]■_{1S} (USP30)—Una mezcla de clorhidratos de rosanilina y pararosanilina. Cristales o fragmentos cristalinos con un lustre de color de bronce verdoso brillante. Soluble en agua, en alcohol y en alcohol amílico.

A 10 mL de una solución (1 en 500), agregar 10 mL de amoníaco SR y 500 mg de polvo de cinc y agitar la mezcla: la solución se vuelve incolora. Colocar algunas gotas de la solución decolorada sobre papel de filtro y cerca, sobre el mismo papel, colocar algunas gotas de ácido clorhídrico diluido: se produce un color rojo en la zona de contacto.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° hasta peso constante: no pierde más de 5,0% de su peso.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos)—Incinerar 1 g con 0,5 mL de ácido sulfúrico: el residuo no pesa más de 3 mg (0,3%).

Cambio en la redacción:

Gel de Sílice Octadecilsilanizada para Cromatografía—Usar un grado adecuado.

[NOTA—Se puede obtener comercialmente un grado adecuado como “Reversed Phase Uniplates” de ■Analtech, www.analtech.com.■_{1S} (USP30).]

Cambio en la redacción:

Gitoxina, C₄₁H₆₄O₁₄—**780,94** ■[4562-36-1]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco. Prácticamente insoluble en agua, en cloroformo y en éter; poco soluble en piridina y en alcohol diluido. Funde aproximadamente a 250°, con descomposición.

Rotación específica (781): entre +3,8° y +4,8°, determinada en una solución de piridina que contenga 10 mg por mL, usando una luz de mercurio a 546,1 nm; entre +21° y +25°, determinada en una solución de partes iguales de cloroformo y metanol que contenga 5 mg por mL, usando una luz de sodio.

Aptitud—Disolver 10 mg de ER Digitoxina USP, previamente secados, 10 mg de ER Digoxina USP, previamente secados, y 10 mg de gitoxina en sendas porciones de 5 mL de una mezcla de 2 partes de cloroformo y 1 parte de metanol, y diluir cada una con fase móvil adicional hasta 10 mL. Luego proceder según se indica en *Prueba de identificación en Digoxina*. El cromatograma de la gitoxina muestra una mancha fluorescente ubicada entre las manchas de digoxina y digitoxina.

Cambio en la redacción:

Glicerina (*Glicerol*)—■[56-81-5]■_{1S} (USP30)—Usar Glicerol de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Glucosa, C₆H₁₂O₆—**180,2** ■[50-99-7]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado. Polvo blanco cristalino. ■_{1S} (USP30) Fácilmente soluble en agua; moderadamente soluble en alcohol.

Cambio en la redacción:

D-Glucuronolactona, C₆H₈O₆—**176,12** ■[32449-92-6]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Guayacol (*o-Metoxifenol*), C₇H₈O₂—**124,14** ■[95-05-1]■_{1S} (USP30)—Líquido refractivo, de incoloro a amarillento. Soluble en aproximadamente 65 partes de agua; soluble en solución de hidróxido de sodio; miscible con alcohol, con cloroformo, con éter y con ácido acético glacial.

Valoración—Cuando se examina mediante cromatografía de gas-líquido, presenta una pureza de no menos de 98%. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas para valorarlo: una columna de acero inoxidable de 3 mm × 1,8 m rellena con fase líquida G16 sobre soporte S1A de malla 60 a 80. Usar helio como gas transportador; mantener la temperatura del inyector a 180°, la temperatura de la columna a 200° y la temperatura del detector de ionización a la llama a 280°. El tiempo de retención es de aproximadamente 8 minutos.

Índice de refracción (831): entre 1,5430 y 1,5450, a 20°.

Cambio en la redacción:

Hemateína, C₁₆H₁₂O₆—**300,26** ■[475-25-2]■_{1S} (USP30)—Preparada a partir de extracto de palo de Campeche o de hematoxilina mediante tratamiento con amoníaco y exposición al aire. Cristales de color marrón rojizo con un brillo metálico verde amarillento. Muy poco soluble en agua (aproximadamente 1 en 1700); poco soluble en alcohol y en éter; insoluble en benceno y en cloroformo; fácilmente soluble en solución de amoníaco diluido, para formar una solución de color rojo púrpura oscuro, y en una solución acuosa de hidróxido de sodio (1 en 50), para formar una solución roja brillante, observadas en cada caso a través de una capa de 1 cm de profundidad. Funde a una temperatura superior a 200° y tiende a descomponerse a 250°.

Cambio en la redacción:

Hematoxilina (*Hidroxibrasilina*), C₁₆H₁₄O₆ · 3H₂O—**356,32** ■[517-28-2]■_{1S} (USP30)—Sustancia cristalina derivada del duramen de *Haematoxylon campechianum* L. (Fam. Leguminosae). Prismas incoloros a amarillos. Muy poco soluble en agua fría y en éter; rápidamente soluble en agua caliente y en alcohol caliente. La exposición a la luz la torna roja y produce una solución amarilla. Se

disuelve en amoníaco SR y en soluciones de hidróxidos y carbonatos alcalinos. Disuelta en soluciones de las siguientes sales, presenta los colores indicados: un color rojo en solución de alumbre; un color rosado en solución de cloruro estannoso; un color gris verdoso en soluciones de sales cúpricas. Se torna gradualmente negra en solución de dicromato de potasio. Almacenar la hematoxilina y sus soluciones protegidas de la luz y del aire.

Cambio en la redacción:

Hemiclorhidrato de Carboximetoxilamina, $2(\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_3) \cdot \text{HCl}$ —**218,59** ■[2921-14-4]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco. Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Heptadecanoato de Metilo, $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ —**284,48** ■[1731-92-6]■_{1S} (USP30)—Escamas cristalinas blancas.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G8; mantener la temperatura del inyector a 220°; mantener la temperatura del detector a 220°; mantener la temperatura de la columna a 180° y programar para que aumente 4° por minuto hasta alcanzar los 220°. El área del pico de $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ no es menos de 99% del área total.

Intervalo de fusión (741): entre 31° y 32°.

Cambio en la redacción:

n-Heptano para Cromatografía—Líquido inflamable, volátil, incoloro y transparente, constituido principalmente por C_7H_{16} . Prácticamente insoluble en agua; soluble en alcohol absoluto. Miscible con éter, con cloroformo, con benceno y con la mayoría de los aceites fijos y volátiles.

[NOTA—El n-heptano puede requerir una purificación pasándolo a través de una columna de gel de sílice, usando una proporción de aproximadamente 25 g de gel por cada 100 mL de n-heptano, y realizando una destilación fraccionada posterior.]

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos): entre 94,5° y 99,0°.

Pureza espectral—Medir en una celda de 1 cm a 250 nm, con un espectrofotómetro adecuado, usando agua como blanco: la absorbancia no es mayor de 0,10.

Residuo de evaporación—■Evaporar 150 mL (100 g) en un baño de vapor, y secar a 105° durante 30 minutos: el residuo pesa no más de 1 mg (0,001%)■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Hexadecanoato de Hexadecilo (Palmitato de Hexadecilo; Palmitato de Cetilo), $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_2$ —**480,85** ■[540-10-3]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

[NOTA—Se encuentran disponibles comercialmente grados adecuados como Palmitato de Hexadecilo y Éster Palmítico de Ácido Palmítico de Sigma-Aldrich, www.sigma-aldrich.com y Palmitato de Cetilo, Número de catálogo C1203, de Spectrum Chemical Mfg. Corp., www.spectrumchemical.com].

Cambio en la redacción:

Hexametildisilazano, $\text{C}_6\text{H}_{19}\text{NSi}_2$ —**161,39** ■[999-97-3]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente e incoloro.

Valoración—Cuando se examina mediante cromatografía de gas-líquidos, presenta una pureza de no menos de 95%. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas para la valoración del artículo: Una columna de vidrio de 2 mm × 1,8 m rellena con fase G3 sobre soporte S1. El gas transportador es helio, que fluye a una velocidad de aproximadamente 40 mL por minuto; mantener la temperatura del detector aproximadamente a 310°, la del inyector aproximadamente a 100° y programar la temperatura de la columna para comenzar a 35°, mantenerse a esta temperatura durante 5 minutos y luego aumentar a una velocidad de 8° por minuto hasta 200°. Utilizar un detector de ionización a la llama.

Residuo posterior a la evaporación—Transferir 200 g a una cápsula tarada y evaporar en un baño de vapor hasta sequedad. Secar el residuo a 105° durante 1 hora, enfriar y pesar: no se encuentra más de 0,0025% de residuo.

Cambio en la redacción:

Hexametenimina (Homopiperidina), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NH}$ —**99,17** ■[111-49-9]■_{1S} (USP30)—Líquido de incoloro a casi incoloro.

Índice de refracción (831): entre 1,4640 y 1,4660 a 20°.

Cambio en la redacción:

Hexanitrodifenilamina (Dipicrilamina), $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{N}_7\text{O}_{12}$ —**439,21** ■[131-73-7]■_{1S} (USP30)—Prismas o polvo de color amarillo oro. [Precaución—Explosivo.] Por lo general contiene aproximadamente 15% de agua como precaución de seguridad. Insoluble en agua, en alcohol, en acetona y en éter; soluble en ácido acético glacial y en sustancias alcalinas.

Agua, Método I (921): no más de 16%.

Cambio en la redacción:

n-Hexano, C_6H_{14} —**86,18** ■[110-54-3]■_{1S} (USP30) (para uso en espectrofotometría)—Usar *Hexanos*.

Cambio en la redacción:

Hexanofenona, $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}$ —**176,25** ■[942-92-7]■_{1S} (USP30)—Líquido amarillo.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G3; mantener la temperatura del inyector a 280°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 180° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 280°. El área del pico de $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}$ no es menos de 98% del área total.

Índice de refracción (831): $1,511 \pm 0,002$ a 20°.

Cambio en la redacción:

Hidrazina Hidrato al 85% en Agua, $(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ —**50,06** ■[7803-57-8]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Transferir 600 mg, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL. Diluir a volumen con agua y mezclar. Pipetear 10 mL y transferirlos a un vaso de precipitados adecuado, agregar 1,0 g de bicarbonato de sodio y 50,0 mL de yodo 0,1 N SV. Valorar el exceso de yodo con tiosulfato de sodio 0,1 N SV, usando almidón SR como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de yodo 0,1 N equivale a $1,252 \text{ mg}_{\text{USP30}}$ de $(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. No se encuentra menos de 83%.

Cambio en la redacción:

Hidroquinona, $C_6H_4(OH)_2$ —**110,11** ■[123-31-9]■^{1S} (USP30)—Cristales finos en forma de aguja, incoloros o blancos. Se oscurece al exponerla a la luz y al aire. Soluble en agua, en alcohol y en éter.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 250 mg y disolver en una mezcla de 100 mL de agua y 10 mL de ácido sulfúrico 0,1 N en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Agregar 3 gotas de una solución 1 en 100 de difenilamina en ácido sulfúrico y valorar con sulfato cérico 0,1 N SV hasta que la solución adquiera un color violeta rojizo. Cada mL de sulfato cérico 0,1 N equivale a 5,506 mg de $C_6H_4(OH)_2$. No se encuentra menos de 99%.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 172° y 174°.

Cambio en la redacción:

3'-Hidroxiacetofenona, $C_8H_8O_2$ —**136,15** ■[121-71-1]■^{1S} (USP30)—Escamas o terrones de polvo marrón claro. Funde aproximadamente a 96°. Moderadamente soluble en cloroformo, produciendo una solución transparente de color amarillo claro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* ⟨621⟩) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con fase G1; mantener las temperaturas del inyector y del detector a 300°; la de la columna a 180°, programada para aumentar 10° por minuto hasta 280° y mantenerse en dicha temperatura durante 10 minutos. El área del pico principal no es menos de 97% del área total.

Cambio en la redacción:

4'-Hidroxiacetofenona, $HOC_6H_4COCH_3$ —**136,15** ■[99-93-4]■^{1S} (USP30)—Polvo gris; funde aproximadamente a 109°.

Cambio en la redacción:

1-Hidroxibenzotriazol Hidrato, $C_6H_5N_3O \cdot xH_2O$ —**135,13** (anhidro) ■[12333-53-9]■^{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco. Moderadamente soluble en alcohol; produce una solución transparente de color amarillo pálido.

Cambio en la redacción:

Hidróxido de Amonio (*Hidróxido de Amonio Concentrado*)—■[1336-21-6]■^{1S} (USP30)—Usar Hidróxido de Amonio de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Hidróxido de Amonio ■(*Amonio Acuoso*), [1336-21-6]■^{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Hidróxido de Amonio al 25 por ciento—■[1336-21-6]■^{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Hidróxido de Bario, $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ —**315,46** ■[12230-71-6]■^{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Hidróxido de Calcio—■[1305-62-0]■^{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Hidróxido de Litio, $LiOH \cdot H_2O$ —**41,96** ■[1310-65-2]■^{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

4-(4-Hidroxifenil)-2-butanona, $C_{10}H_{12}O_2$ —**164,20** ■[5471-51-2]■^{1S} (USP30)—Polvo blanco.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* ⟨621⟩) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G43; mantener la temperatura del inyector a 280°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 180° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 280°. El área del pico de $C_{10}H_{12}O_2$ no es menos de 98,5% del área total.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 81° y 87°.

Cambio en la redacción:

D-α-4-Hidroxifenilglicina, $C_8H_9NO_3$ —**167,16** ■[22818-40-2]■^{1S} (USP30)—Laminillas brillantes. Moderadamente soluble en agua, en alcohol, en acetona, en éter, en cloroformo, en acetato de etilo, en benceno y en ácido acético glacial; soluble en álcalis y en ácidos minerales; fácilmente soluble en ácido clorhídrico tibio al 20% v/v.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 220° y 247°, con descomposición.

Cambio en la redacción:

8-Hidroxiquinolina (*Oxina*), C_9H_7NO —**145,16** ■[148-24-3]■^{1S} (USP30)—Usar 8-Quinolinol de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Imidazol, $C_3H_4N_2$ —**68,08** ■[288-32-4]■^{1S} (USP30)—Cristales blancos a amarillo claro. Fácilmente soluble en agua. Usar grado reactivo ACS.

Eliminar lo siguiente:

■**Iminoestilbeno**, $C_{14}H_{11}N$ —**193,24**—Polvo anaranjado amarillento. Moderadamente soluble en acetato de etilo.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 197° y 201° ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Indeno, C_9H_8 —**116,16** ■[95-13-6]■^{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* ⟨621⟩) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 10 m recubierta con una capa de 1 µm de metilsilicona; mantener la temperatura del inyector a 200°.

la del detector a 300° y la de la columna a 100°, programada para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 250°. El área del pico de indeno no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,5749 y 1,5769 a 20°.

Cambio en la redacción:

Inosina, $C_{10}H_{12}N_4O_5$ —**268,23** ■[58-63-9]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco.

Punto de fusión (741): aproximadamente 90°.

Cambio en la redacción:

Inositol (Hexahidroxíciclohexano), $C_6H_6(OH)_6$ —**180,16** ■[87-89-8]■_{1S} (USP30)—Cristales finos blancos o polvo cristalino blanco; estable al aire. Sus soluciones son neutras al tornasol. Ópticamente inactivo. Un g se disuelve en 5,7 mL de agua. Poco soluble en alcohol; insoluble en éter y en cloroformo. Almacenar en envases bien cerrados.

Intervalo de fusión (741): entre 223° y 226°.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° durante 4 horas: no pierde más de 0,5% de su peso.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,1%.

Cambio en la redacción:

Isopropilamina (2-Aminopropano), $C_3H_7NH_2$ —**59,11** ■[75-31-0]■_{1S} (USP30)—Líquido inflamable, incoloro y transparente. Miscible con agua, con alcohol y con éter.

Valoración—Transferir aproximadamente 0,2 g, pesados con exactitud, a un recipiente adecuado, agregar 50 mL de agua y mezclar. Valorar con ácido clorhídrico 0,1 N SV, usando una mezcla de verde de bromocresol SR y rojo de metilo SR (5:1) como indicador. Cada mL de ácido clorhídrico 0,1 N equivale a 59,11 mg de C_3H_7N . No se encuentra menos de 98%.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos)—No menos de 95% destila entre 31° y 33°.

Índice de refracción (831): entre 1,3743 y 1,3753, a 20°.

Cambio en la redacción:

Lactato de Calcio, $(CH_3CHOHCOO)_2Ca \cdot 5H_2O$ —**308,29** ■[814-80-2]■_{1S} (USP30)—Polvo o gránulos blancos. Es algo eflorescente y se torna anhidro a 120°. Un g se disuelve en 20 mL de agua; prácticamente insoluble en alcohol. Almacenar en envases impermeables.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 500 mg, previamente secados a 120° durante 4 horas, transferir a un recipiente adecuado y disolver en 150 mL de agua que contenga 2 mL de ácido clorhídrico diluido. Agregar 15 mL de hidróxido de sodio SR y 300 mg de indicador azul de hidroxinaftol y valorar con edetato disódico 0,05 M SV hasta que la solución se torne de color azul intenso. Cada mL de edetato disódico 0,05 M equivale a 10,91 mg de $C_6H_{10}CaO_6$. No se encuentra menos de 98%.

Pérdida por secado (731)—Secar a 120° durante 4 horas: pierde entre 25,0% y 30,0% de su peso.

Acidez—Agregar fenoltaleína SR a 20 mL de una solución 1 en 20 y valorar con hidróxido de sodio 0,10 N: no se requiere más de 0,50 mL para producir un color rosado.

Metales pesados (Prueba para reactivos)—Disolver 1 g en 2,5 mL de ácido clorhídrico diluido, diluir con agua hasta 40 mL y agregar 10 mL de sulfuro de hidrógeno SR: cualquier color marrón que se produzca no es más oscuro que el de una solución control que contenga 0,02 mg de Pb agregado (0,002%).

Magnesio y sales alcalinas—Mezclar 1 g con 40 mL de agua, agregar cuidadosamente 5 mL de ácido clorhídrico, calentar la solución, mantener en ebullición durante 1 minuto y agregar rápidamente 40 mL de ácido oxálico SR. Inmediatamente, agregar a la mezcla tibia 2 gotas de rojo de metilo SR, luego agregar amoníaco SR gota a gota, desde una bureta, hasta que la mezcla se torne apenas alcalina. Enfriar hasta temperatura ambiente, transferir a una probeta graduada de 100 mL, diluir con agua hasta 100 mL, mezclar y dejar en reposo durante 4 horas o durante toda la noche. Filtrar y transferir a una cápsula de platino 50 mL del filtrado transparente, al que se le ha agregado 0,5 mL de ácido sulfúrico. Evaporar la mezcla en un baño de vapor hasta un volumen pequeño. Calentar cuidadosamente hasta sequedad sobre una llama libre y continuar calentando hasta completar la descomposición y volatilización de las sales de amonio. Finalmente, incinerar el residuo a 800° ± 25° durante 15 minutos: el residuo no pesa más de 5 mg (1%).

Ácidos grasos volátiles—Mezclar aproximadamente 500 mg con 1 mL de ácido sulfúrico y entibiar: la mezcla no emana un olor a ácido graso volátil.

Cambio en la redacción:

Lactosa, $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ —**342,30** ■[64-42-3]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Laurato de Metilo, $C_{13}H_{26}O_2$ —**214,34** ■[110-82-0]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 280°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 180° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 280°. El área del pico de $C_{13}H_{26}O_2$ no es menos de 99,45% del área total.

Cambio en la redacción:

Lignocerato de Metilo, $C_{25}H_{50}O_2$ —**382,66** ■[2442-49-1]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos.

Cambio en la redacción:

Linoleato de Metilo, $C_{19}H_{34}O_2$ —**294,47** ■[112-63-0]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 300°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 200° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 300°. El área del pico de $C_{19}H_{34}O_2$ no es menos de 99% del área total.

Cambio en la redacción:

Linolenato de Metilo, $C_{19}H_{32}O_2$ —**292,46** ■[301-00-8]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: usar una columna

capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase de cianopropilfenilo al 14% y dimetilpolisiloxano al 86%; mantener la temperatura del inyector a 280°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 180° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 280°. El área del pico de C₁₉H₃₂O₃ no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,469 y 1,473 a 20°.

Cambio en la redacción:

L-Lisina (*Ácido 2,6-Diaminohexanoico*), C₆H₁₄N₂O₂—**146,19** ■[56-87-1]■_{1S} (USP30)—Agujas cristalinas o placas hexagonales. Soluble en agua; muy poco soluble en alcohol; insoluble en éter.

Rotación específica (781): entre +25,5° y +26,0°.

Solución de prueba: 20 mg por mL, en ácido clorhídrico diluido (1 en 2).

Contenido de nitrógeno, Método I (461): se encuentra entre 18,88% y 19,44% de N, correspondiente a no menos de 98,5% de C₆H₁₄N₂O₂, habiendo secado previamente la muestra de prueba a 105° durante 2 horas.

Cambio en la redacción:

Magnesio, Mg—**24,305** ■[7439-95-4]■_{1S} (USP30)—Metal plateado en forma de cinta. Reacciona lentamente con agua a temperatura ambiente. Se disuelve fácilmente en ácidos diluidos, liberando hidrógeno.

Valoración—Transferir 1 g, pesado con exactitud, a un matraz volumétrico de 250 mL, y disolver en una mezcla de 15 mL de ácido clorhídrico y 85 mL de agua. Al terminar la disolución, diluir a volumen con agua y mezclar. Pipetear 25 mL de la dilución y transferir a un vaso de precipitados de 400 mL, diluir con agua a 250 mL, agregar 20 mL de amoníaco-cloruro de amonio SR y algunos mg de triturado de negro de eriocromo T y valorar con edetato disódico 0,1 M SV hasta un punto final azul. Cada mL de edetato disódico 0,1 M SV equivale a 2,430 mg de Mg. Se encuentra no menos de 99%.

Cambio en la redacción:

Maleato de Bis(2-etilhexilo), C₂₀H₃₆O₄—**340,50** ■[142-16-5]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente, incoloro a amarillo pálido. Miscible con acetona y con alcohol. El peso específico es aproximadamente 0,945.

Valoración—Colocar aproximadamente 2,5 g, pesados con exactitud, en un matraz de 250 mL, agregar 50,0 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N SV y someter a reflujo durante 45 minutos. Enfriar, agregar 0,5 mL de fenoltaleína SR y valorar el exceso de álcali con ácido clorhídrico 0,5 N SV. Realizar una determinación con un blanco al mismo tiempo, empleando la misma cantidad de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 N (ver *Valoraciones Residuales en Volumetría* (541)). La diferencia, en mL, entre los volúmenes de ácido clorhídrico 0,5 N consumidos en la valoración de la prueba y en la valoración del blanco, multiplicada por 85,1, representa la cantidad, en mg, de maleato de bis(2-etilhexilo) en la porción tomada. No se encuentra menos de 97%.

Cambio en la redacción:

Mercurio, Hg—**Peso atómico 200,59** ■[7439-97-6]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Metaborato de Litio, LiBO₂—**49,75** ■[13453-69-5]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Agregar lo siguiente:

■**Metacrilato de Butilo**, C₈H₁₄O₂—**142,20** [97-88-1]—Usar un grado adecuado.■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Metacrilato de 2-Dimetilaminoetilo**, CH₂CHCO₂CH₂CH₂N(CH₃)₂—**143,18** [2439-35-2]—Usar un grado adecuado.■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Metacrilato de Metilo—■[80-62-6]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Metanol (*Alcohol Metílico*), CH₃OH—**32,04** ■[67-56-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Metil Cloroformo (*Metilcloroformo; 1,1,1-Tricloroetano*), CH₃CCl₃—**133,40** ■[71-55-6]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Metil Etil Cetona, CH₃COC₂H₅—**72,11** ■[1120-34-9]■_{1S} (USP30)—Usar 2-butanona de grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Metil Sulfóxido —■[67-68-5]■_{1S} (USP30)—Ver *Dimetil Sulfóxido*.

Cambio en la redacción:

4-Metil-2-pentanona (*Metil Isobutil Cetona*), (CH₃)₂CHCH₂COCH₃—**100,16** ■[108-10-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

2-Metil-2-propil-1,3-propanodiol, C₇H₁₆O₂—**132,20** ■[78-26-2]■_{1S} (USP30)—Cristales blancos; funden aproximadamente a 58°.

Cambio en la redacción:

Metilamina al 40 por ciento en Agua, CH₃N—**31,06** ■[74-89-5]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Usando una jeringa, transferir 0,5 mL de una muestra bien agitada a un punto bajo la superficie de 100 mL de agua. Determinar el peso de la muestra pesando la jeringa antes y después de la transferencia. Mezclar y valorar con ácido clorhídrico 0,5 N SV, determinando el punto final potenciométricamente con un electrodo de pH de plata-cloruro de plata y un electrodo de referencia de calomel. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de ácido clorhídrico 0,5 N equivale a 15,53 mg de CH₃N: se encuentra entre 39,0% y 41,0%.

Índice de refracción (831): entre 1,3680 y 1,3710 a 20°.

Cambio en la redacción:

N-Metilpirrolidina (*1-Metilpirrolidina*), $C_4H_8NCH_3$ —**85,15** [120-94-5]—■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Metoxietanol (*Éter Monometílico de Etilenglicol; 2-Metoxietanol*), $CH_3OCH_2CH_2OH$ —**76,09** ■[109-86-4]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

2-Metoxietanol (*Éter Monometílico de Etilenglicol; Metoxietanol*), $CH_3OCH_2CH_2OH$ —**76,09** ■[109-86-4]■_{1S} (USP30)—Ver *Metoxietanol*.

Cambio en la redacción:

Miristato de Isopropilo, $C_{17}H_{34}O_2$ —**270,45** ■[110-27-0]■_{1S} (USP30)—Usar *Miristato de Isopropilo* (monografía del NF). Para uso como disolvente en procedimientos de pruebas de esterilidad, el Miristato de Isopropilo cumple con la siguiente especificación adicional:

pH del extracto acuoso—Transferir 100 mL a un frasco de centrifuga de 250 mL, agregar 10 mL de agua bidestilada, tapar el frasco con una tapa adecuada y agitar vigorosamente durante 60 minutos. Centrifugar la mezcla a 1800 rpm durante 20 minutos, succionar la capa superior (miristato de isopropilo) y determinar el pH de la capa acuosa residual: el pH no es menor de 6,5.

El Miristato de Isopropilo que no se ajusta a la prueba de *pH del extracto acuoso* puede adecuarse para el uso en procedimientos de pruebas de esterilidad del siguiente modo:

Usando una columna de vidrio de 20 mm × 20 cm, agregar alúmina activada y apisonar hasta una altura de 15 cm. Pasar 500 mL del miristato de isopropilo a través de la columna, usando una leve presión positiva para mantener un flujo constante y usar el eluato recogido directamente en el procedimiento de la prueba de esterilidad.

Cambio en la redacción:

Miristato de Metilo, $C_{15}H_{30}O_2$ —**242,40** ■[124-10-7]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* {621}) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 300°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 200° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 300°. El área del pico de $C_{15}H_{30}O_2$ no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción {831}: entre 1,434 y 1,438 a 20°.

Cambio en la redacción:

Molibdato de Amonio, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ —**1235,86** ■[13106-76-8]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Monobromuro de Yodo, IBr—**206,81** ■[7789-35-5]■_{1S} (USP30)—Terrones cristalinos, agujas cristalinas o cristales de color negro, gris o púrpura azulado.

Valoración—Colocar aproximadamente 100 mL de ácido acético en un vaso de precipitados de 150 mL. Disolver por separado 2 g de yoduro de potasio en un volumen mínimo de agua, agregar esta solución al ácido acético y mezclar. Transferir aproximadamente 200 mg de Monobromuro de Yodo, pesados con exactitud, al vaso de precipitados que contiene la mezcla de yoduro de potasio y ácido acético y mezclar para disolver. Valorar de inmediato con tiosulfato de sodio 0,1 N SV, determinando el punto final potenciométricamente (ver *Volumetría* {541}). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de tiosulfato de sodio 0,1 N equivale a 20,681 mg de IBr: No se encuentra menos de 97,5%.

Cambio en la redacción:

Monocloruro de Yodo, ICl—**162,36** ■[7790-99-0]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Monóxido de Plomo (*Litargirio*), PbO—**223,20** ■[1317-36-8]■_{1S} (USP30)—Polvo pesado de color amarillento o amarillo rojizo. Insoluble en agua y en alcohol; soluble en ácido acético, en ácido nítrico diluido y en soluciones tibias de los hidróxidos alcalinos fijos.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 300 mg, recién incinerados en una mufla a $600 \pm 50^\circ$ y disolver entibiando con 10 mL de agua y 1 mL de ácido acético glacial. Diluir con 75 mL de agua, calentar a ebullición, agregar 50,0 mL de dicromato de potasio 0,1 N SV y mantener a ebullición durante 2 ó 3 minutos. Enfriar, transferir a un matraz volumétrico de 200 mL con la ayuda de agua, diluir a volumen con agua, mezclar y dejar que sedimente. Retirar 100,0 mL del líquido transparente y transferirlo a un matraz con tapón de vidrio. Agregar 10 mL de ácido sulfúrico diluido y 1 g de yoduro de potasio, insertar el tapón, mezclar suavemente y dejar en reposo durante 10 minutos. A continuación valorar el yodo liberado, que representa el exceso de dicromato, con tiosulfato de sodio 0,1 N SV, agregando 3 mL de almidón SR cerca del punto final: cada mL de dicromato de potasio 0,1 N equivale a 7,440 mg de PbO. No se encuentra menos de 98%.

Sustancias insolubles en ácido acético—Disolver 2 g en 30 mL de ácido acético glacial diluido (1 en 2), mantener a ebullición moderada durante 5 minutos, filtrar, lavar el residuo con ácido acético diluido y secar a 105° durante 2 horas: el residuo no pesa más de 10 mg (0,5%).

Sustancias no precipitadas con sulfuro de hidrógeno—Precipitar completamente el plomo del filtrado obtenido en la prueba de *Sustancias insolubles en ácido acético* haciendo pasar sulfuro de hidrógeno por el mismo, filtrar y lavar el precipitado con 20 mL de agua. A una mitad de la mezcla del filtrado y los lavados agregar 5 gotas de ácido sulfúrico, evaporar a sequedad e incinerar a $800 \pm 25^\circ$ durante 15 minutos: el residuo no pesa más de 5 mg (0,5%).

Sustancias volátiles—Pesar con exactitud aproximadamente 5 g y calentar intensamente en un crisol de porcelana cubierto: no pierde más de 2,0% de su peso.

Cambio en la redacción:

Morfolina (*Tetrahidro-1,4-oxazina*), C_4H_9NO —**87,12** ■[110-91-8]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Naftaleno, $C_{10}H_8$ —**128,17** ■[91-20-3]■_{1S} (USP30)—Placas prismáticas monoclinicas, o polvo o escamas de color blanco. Una solución en éter de petróleo presenta una fluorescencia púrpura bajo la luz de una lámpara de arco de mercurio. Insoluble en agua; muy soluble en éter y en aceites fijos y volátiles; fácilmente soluble en benceno, en disulfuro de carbono, en tetracloruro de carbono, en

cloroformo, en aceite de oliva y en tolueno; soluble en alcohol y en metanol. Sublima a temperaturas superiores a la temperatura de fusión.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 80° y 81°.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos): entre 217° y 219°.

Cambio en la redacción:

1,3-Naftalenodiol (*Naftoresorcinol*), $C_{10}H_6(OH)_2$ —**160,17** ■[132-86-5]■_{1S} (USP30)—Polvo o cristales de color blanco grisáceo a tostado. Fácilmente soluble en metanol; moderadamente soluble en agua, en alcohol y en éter.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 122° y 127°.

Solubilidad en metanol—Disolver 500 mg en 50 mL de metanol: la solución es transparente y completa.

Cambio en la redacción:

2,7-Naftalenodiol (*2,7-Dihidroxinaftaleno*), $C_{10}H_8O_2$ —**160,17** ■[582-17-2]■_{1S} (USP30)—Polvo o sólido cristalino de color blanquecino a amarillo. Se disuelve en acetona.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 187° y 191°.

Cambio en la redacción:

2-Naftil Cloroformiato (*Éster 2-Naftílico del Ácido Clorofórmico*), $ClCOOC_{10}H_7$ —**206,62** ■[7693-50-7]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

[NOTA—Se puede obtener un grado adecuado de TCI America, www.tciamerica.com].

Cambio en la redacción:

1-Naftol (*Alfanaftol*), $C_{10}H_7OH$ —**144,17** ■[90-15-3]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino o cristales incoloros o levemente rosáceos.

Cambio en la redacción:

2-Naftol (*Betanaftol*), $C_{10}H_7OH$ —**144,17** ■[135-19-3]■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino o laminillas de color blanco. Cambia de coloración con la exposición a la luz. Muy poco soluble en agua; soluble en alcohol, en éter, en cloroformo y en soluciones de hidróxidos alcalinos.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 121° y 123°.

Solubilidad en alcohol—Un g se disuelve completamente en 10 mL de alcohol y se obtiene una solución incolora o prácticamente incolora.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,05%.

Acidez—Agitar ocasionalmente 1 g con 50 mL de agua durante 15 minutos y filtrar: el filtrado es neutro al tornasol.

1-Naftol—Calentar a ebullición 100 mg con 10 mL de agua hasta disolver, enfriar y filtrar. Agregar al filtrado 0,3 mL de hidróxido de sodio 1 N y 0,3 mL de yodo 0,1 N: no se produce un color violeta.

Sustancias insolubles en amoníaco (naftaleno, etc.)—Agitar 500 mg con 30 mL de amoníaco SR: el 2-naftol se disuelve completamente y la solución no es más oscura que amarillo pálido.

Cambio en la redacción:

p-Naftolbenceína, $C_{27}H_{18}O_2$ —**374,43** ■[6948-88-5]■_{1S} (USP30)—Polvo marrón rojizo. Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Naftoresorcinol (*1,3-Dihidioresorcinol*), $C_{10}H_8O_2$ —**160,17** ■[132-86-5]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

β-Nicotinamida Adenina Dinucleótido, $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ —**663,4** ■[53-84-9]■_{1S} (USP30)—Polvo blanco muy higroscópico. Fácilmente soluble en agua.

Valoración—Disolver 17,9 g de fosfato dibásico de sodio anhidro en agua para obtener 500 mL (*Solución A*). Disolver 6,8 g de fosfato monobásico de potasio en agua hasta obtener 500 mL (*Solución B*). A un volumen de *Solución A*, agregar *Solución B* hasta ajustar la mezcla a un pH de 7,0 (aproximadamente 2:1 en volumen de *Soluciones A* y *B*) para obtener una *Solución amortiguadora de pH 7,0*. Transferir aproximadamente 25 mg de β-nicotinamida adenina dinucleótido, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 0,2 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con la *Solución amortiguadora de pH 7,0* y mezclar. Usar esta solución como *Preparación de valoración*. Determinar las absorbancias de la *Preparación de valoración* y de la *Solución amortiguadora de pH 7,0* en celdas de 1 cm a una longitud de onda de 260 nm, utilizando agua como referencia. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ en la porción de β-nicotinamida adenina dinucleótido tomada, por la fórmula:

$$(0,6634/17,6)(10/0,2)(25)(A_A - A_B)$$

en donde A_A y A_B son las absorbancias de la *Preparación de valoración* y de la *Solución amortiguadora de pH 7,0*, respectivamente. No se encuentra menos de 94,5%.

Cambio en la redacción:

Ninhidrina— $C_9H_4O_3 \cdot H_2O$ —**178,14** ■[485-47-2]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Níquel, Ni—**58,6934** ■[7440-02-0]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Nitrato de Amonio, NH_4NO_3 —**80,04** ■[6484-52-2]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Nitrato de Bario, $Ba(NO_3)_2$ —**261,34** ■[10022-31-8]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Nitrato de Cadmio, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ —**308,48** ■[10325-94-7]■_{1S} (USP30)—Cristales incoloros higroscópicos. Muy soluble en agua; soluble en alcohol.

Materia insoluble (Prueba para reactivos): no más de 1 mg, a partir de 20 g (0,005%).

Cloruros (Cl) (Prueba para reactivos)—Un g no presenta más de 0,01 mg de Cl (0,001%).

Sulfatos (Prueba para reactivos, *Método II*)—Evaporar una mezcla de 12 g de muestra y 25 mL de ácido clorhídrico en un baño de vapor hasta sequedad. Agregar otros 15 mL de ácido clorhídrico y nuevamente evaporar hasta sequedad. Disolver el residuo en 100 mL de agua, filtrar y agregar 1 mL de ácido clorhídrico: el residuo no pesa más de 1,0 mg más que el residuo obtenido en la prueba con un blanco (0,003%).

Cobre (Cu)—Disolver 0,5 g en 10 mL de agua, agregar 10 mL de *Solución de Citrato de Amonio* (ver *Plomo* (251)) y ajustar la reacción a un pH de aproximadamente 9 agregando hidróxido de amonio 1 N (aproximadamente 30 mL). Agregar 1 mL de solución de dietilditiocarbamato de sodio (1 en 1000) y mezclar. Agregar 5 mL de alcohol amílico, agitar durante aproximadamente 1 minuto y permitir que las capas se separen: si se produce color amarillo en la capa de alcohol amílico, aquel no es más oscuro que el de un blanco al que se le ha agregado 0,01 mg de Cu (0,002%).

Hierro(Fe)—Disolver 1 g en 15 mL de agua, agregar 2 mL de ácido clorhídrico y calentar hasta ebullición durante 2 minutos. Enfriar y agregar aproximadamente 30 mg de persulfato de amonio y 15 mL de una solución de tiocianato de potasio en alcohol butílico normal (preparado por disolución de 10 g de tiocianato de potasio en 10 mL de agua, entibiando la solución aproximadamente a 30°, diluyendo con alcohol butílico normal hasta 100 mL y agitando hasta que se torne transparente). Agitar vigorosamente durante 30 segundos y permitir que las capas se separen: si se produce color rojo en la capa alcohólica transparente, aquel no es más oscuro que el de un blanco al que se le ha agregado 0,01 mg de Fe (0,001%).

Plomo (Pb)—Disolver 1,0 g en 10 mL de agua, agregar 0,2 mL de ácido acético glacial y filtrar si fuera necesario. A una porción de 7 mL de agua, agregar 0,2 mL de ácido acético glacial y 3 mL de *Solución de Plomo Estándar* (ver *Plomo* (251)) y mezclar para obtener un blanco. Agregar luego a cada solución 1,0 mL de solución de cromato de potasio (1 en 10) y mezclar: después de 5 minutos, la solución de prueba no es más turbia que el blanco (0,003%).

Sustancias no precipitadas por sulfuro de hidrógeno—Disolver 2 g en 145 mL de agua, agregar 5 mL de ácido sulfúrico (1 en 10), calentar hasta ebullición y pasar una corriente rápida de sulfuro de hidrógeno a través de la solución mientras se enfría. Filtrar y, a 75 mL del filtrado transparente, agregar 0,25 mL de ácido sulfúrico, luego evaporar hasta sequedad e incinerar suavemente: el residuo no pesa más de 1 mg (0,1%).

Cambio en la redacción:

Nitrato de Calcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —**236,15** ■[13780-06-8] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Nitrato de Cobalto, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —**291,03** ■[10141-05-6] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Nitrato de Litio, LiNO_3 —**68,95** ■[7790-69-4] ■_{1S} (USP30)—Cristales incoloros. Usar un grado adecuado que declare contener no menos de 97,0%.

Cambio en la redacción:

Nitrato de Magnesio, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —**256,41** ■[10377-60-3] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Nitrato de Plomo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ —**331,21** ■[10099-74-8] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Nitrato Férrico, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ —**404,00** ■[10421-48-4] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Nitrato Mercúrico, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ —**342,62** ■[10045-94-0] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS. Este reactivo está disponible como monohidrato o como dihidrato.

Cambio en la redacción:

5-Nitro-1,10-fenantrolina, $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ —**225,20** ■[4199-88-6] ■_{1S} (USP30)—Polvo blanco. Soluble en agua.

Intervalo de fusión (741): entre 198° y 200°.

Aptitud como indicador redox—Disolver 25 mg en un volumen mínimo de ácido sulfúrico diluido, agregar 10 mg de sulfato ferroso y diluir con agua a 100 mL: la solución es color rojo intenso y presenta un máximo de absorción a 510 nm. A 1,0 mL de la solución, agregar 1,0 mL de sulfato cérico 0,01 M: desaparece el color rojo.

Cambio en la redacción:

4'-Nitroacetofenona (*p'*-Nitroacetofenona), $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_3$ —**165,15** ■[100-19-6] ■_{1S} (USP30)—Cristales amarillos.

Valoración—Inyectar una solución etérea apropiada de la muestra (aproximadamente 0,5 µL) en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de conductividad térmica y usar helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: usar una columna de acero inoxidable de 4 mm × 1,8 m con fase G1 al 10% sobre soporte S1A; mantener el inyector y el detector a 200° y 300°, respectivamente; mantener la temperatura de la columna a 170° y programarla para que aumente 3° por minuto hasta 220°. El área del pico de 4'-nitroacetofenona no es menos de 97% del área total.

Intervalo de fusión (741): entre 78° y 80°.

Cambio en la redacción:

o-Nitroanilina, $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ —**138,12** ■[88-74-4] ■_{1S} (USP30)—Cristales de color amarillo anaranjado. Poco soluble en agua fría; soluble en agua caliente; fácilmente soluble en alcohol y en cloroformo. Forma sales solubles en agua con ácidos minerales.

Intervalo de fusión (741): entre 71° y 72°.

Cambio en la redacción:

p-Nitroanilina, $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ —**138,12** ■[100-01-6] ■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino amarillo brillante. Insoluble en agua; soluble en alcohol y en éter.

Intervalo de fusión (741): entre 146° y 148°.

Solubilidad—Sendas porciones de 1 g disueltas en 30 mL de alcohol y en 40 mL de éter producen soluciones transparentes o prácticamente transparentes.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,2%.

Cambio en la redacción:

Nitrobenceno, $C_6H_5NO_2$ —**123,11** ■[98-95-3]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

4-(p-Nitrobencil)piridina, $C_{12}H_{10}N_2O_2$ —**214,22** ■[1083-48-3]■_{1S} (USP30)—Cristales amarillos. Soluble en acetona.

Materia insoluble—Disolver 1 g en 10 mL de acetona: la solución es transparente y la disolución es completa.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 71° y 74°.

Cambio en la redacción:

Nitrometano, CH_3NO_2 —**61,04** ■[75-52-5]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

1-Nitroso-2-naftol, $C_{10}H_7NO_2$ —**173,17** ■[131-91-9]■_{1S} (USP30)—Polvo de color marrón a marrón amarillento. Insoluble en agua; soluble en alcohol, en benceno, en éter, en tetracloruro de carbono y en ácido acético.

Valoración—Transferir aproximadamente 250 mg, previamente secados sobre gel de sílice hasta peso constante y pesados con exactitud, a un matraz con tapón de vidrio y disolver en 10 mL de solución de hidróxido de sodio (1 en 10). Enfriar la solución en un baño de hielo, agregar ácido sulfúrico diluido (1 en 6) hasta que se forme un precipitado ligero y permanente y la solución sea ligeramente ácida, luego agregar 3 g de yoduro de potasio, agitar para disolver, agregar 20 mL de ácido sulfúrico diluido (1 en 6), tapar inmediatamente el matraz y dejar que repose en la oscuridad durante 2 horas. Valorar el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N SV, agregando 3 mL de almidón SR cerca del punto final. Realizar una determinación completa con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de tiosulfato de sodio 0,1 N equivale a 8,66 mg de $C_{10}H_7NO_2$: no se encuentra menos de 95,0%.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 109° y 111°.

Residuo de incineración (Prueba para reactivos): no más de 0,2%.

Cambio en la redacción:

Nonadecano, $C_{19}H_{40}$ —**268,52** ■[629-92-5]■_{1S} (USP30)—Sólido blanco.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* ⟨621⟩) equipado con un detector de conductividad térmica y usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: usar una columna de acero inoxidable de 3 mm × 1,8 m rellena con fase G2 al 5% sobre soporte SIAB; mantener la temperatura del inyector a 330°, mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura del horno inicialmente a 190° y dejar que aumente gradualmente hasta 250°. El área del pico de nonadecano no es menos de 99% del área total.

Intervalo de fusión ⟨741⟩: entre 31,5° y 33,5°.

Cambio en la redacción:

Oleato de Metilo, $C_{19}H_{36}O_2$ —**296,49** ■[112-62-9]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* ⟨621⟩) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: usar una columna capilar recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 300°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 230° y programarla para que aumente 10° por minuto hasta 280°. El área del pico de $C_{19}H_{36}O_2$ no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción ⟨831⟩: 1,452 a 20°.

Cambio en la redacción:

Oxalato de Amonio, $(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$ —**142,11** ■[6009-70-7]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Óxido de Aluminio, Lavado con Ácido (*Alúmina preparada especialmente para usar en análisis cromatográficos*)—■[1344-28-1]■_{1S} (USP30)—Polvo o gránulos finos de color blanco o prácticamente blanco. Muy higroscópico. Almacenar en envases impermeables.

pH de la Suspensión espesa—El pH de una suspensión espesa bien mezclada de 5 g en 150 mL de agua exenta de amoníaco y exenta de dióxido de carbono, después de reposar 10 minutos, está entre 3,5 y 4,5.

Pérdida por incineración—Pesar con exactitud aproximadamente 1 g e incinerar, preferiblemente en una mufla, entre 800° y 825° hasta peso constante: no pierde más de 5,0% de su peso.

Sílice—Fundir 500 mg con 10 g de bisulfato de potasio durante 1 hora en un crisol de platino, enfriar y disolver en agua caliente: no queda más que una pequeña cantidad de residuo insoluble.

Aptitud para adsorción cromatográfica—Disolver 50 mg de *o*-nitroanilina en benceno para completar 50,0 mL. Diluir 10 mL de la solución resultante con benceno hasta 100,0 mL y mezclar (*Solución A*).

Rápidamente, pesar aproximadamente 2 (±0,005) g de muestra en un frasco para pesada con tapón de vidrio y transferir rápidamente a un tubo de ensayo seco con tapón de vidrio. Agregar 20,0 mL de *Solución A*, tapar, agitar vigorosamente durante 3 minutos y dejar que sedimente.

Pipetear 10 mL del sobrenadante transparente y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con benceno y mezclar (*Solución B*).

Determinar las absorbancias de las *Soluciones A* y *B* a 395 nm con un espectrofotómetro adecuado, usando benceno como blanco. Calcular, en mg, la cantidad adsorbida por g de muestra de prueba, por la fórmula:

$$[2(1 - A_B/A_A)]/W$$

en donde A_A y A_B son las absorbancias de las *Soluciones A* y *B*, respectivamente, y W es el peso, en g, del óxido de aluminio. Se adsorbe no menos de 0,3 mg de *o*-nitroanilina por cada g de óxido de aluminio.

Cambio en la redacción:

Óxido de Deuterio, D_2O —**20,032** ■[7789-20-0]■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado con una pureza isotópica mínima de 99,8 % atómico de deuterio.

Cambio en la redacción:

Óxido de Magnesio, MgO —**40,30** ■[1309-48-4]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Óxido de Mesitilo, $C_6H_{10}O$ —**98,14** ■[141-79-7]■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 150°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 50° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 200°. El área del pico de $C_6H_{10}O$ no es menos de 98% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,443 y 1,447 a 20°.

Cambio en la redacción:

Óxido Mercúrico Amarillo, HgO —**216,59** ■[21908-53-2]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Palmitato de Metilo, $C_{17}H_{34}O_2$ —**270,45** ■[112-39-0]■_{1S} (USP30)—Sólido blanco.

Valoración—Inyectar un volumen apropiado en un cromatógrafo de gases (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm × 30 m recubierta con una capa de 1 µm de fase G2; mantener la temperatura del inyector a 300°; mantener la temperatura del detector a 300°; mantener la temperatura de la columna a 200° y programar para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 300°. El área del pico de $C_{17}H_{34}O_2$ no es menos de 96,5% del área total.

Cambio en la redacción:

Pentacloruro de Antimonio, $SbCl_5$ —**299,02** ■[7647-18-9]■_{1S} (USP30)—Líquido transparente, amarillo rojizo, aceitoso, higroscópico y cáustico. Emite vapores en el aire húmedo y se solidifica por absorción de una molécula de agua. Se descompone en agua, es soluble en ácido clorhídrico diluido y en cloroformo. Alcanza la ebullición aproximadamente a 92° a una presión de 30 mm de mercurio y tiene un peso específico de aproximadamente 2,34 a 25°.

Precaución—El pentacloruro de antimonio causa quemaduras graves y su vapor es peligroso.

Valoración ($SbCl_5$)—Pesar con exactitud un matraz de 125 mL con tapón de vidrio, introducir con rapidez aproximadamente 0,3 mL de la muestra de prueba y volver a pesar. Disolver con 20 mL de ácido clorhídrico diluido (1 en 5) y agregar 10 mL de solución de yoduro de potasio (1 en 10) y 1 mL de disulfuro de carbono. Valorar el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N SV. El color marrón desaparecerá de la solución gradualmente y las últimas trazas del yodo libre se recogerán en el disulfuro de carbono, dando un color rosado. El punto final se alcanza cuando desaparece este color rosado. Cada mL de tiosulfato de sodio 0,1 N equivale a 14,95 mg de $SbCl_5$; no se encuentra menos de 99,0% de $SbCl_5$.

Sulfato (Prueba para reactivos, *Método II*)—Disolver 4,3 mL (10 g) en el volumen mínimo de ácido clorhídrico, diluir con agua hasta 150 mL, neutralizar con hidróxido de amonio y filtrar. Al filtrado, agregar 2 mL de ácido clorhídrico: la solución, usando 10 mL de cloruro de bario SR, produce no más de 1,3 mg de residuo, corregido por una prueba completa con un blanco (0,005%).

Arsénico—Agregar 10 mL de una solución preparada recientemente de 20 g de cloruro estannoso en 30 mL de ácido clorhídrico, a 100 mg de muestra disuelta en 5 mL de ácido clorhídrico. Mezclar, transferir a un tubo de comparación de color y dejar en reposo durante 30 minutos. Si se obtiene color con la solución de la muestra, aquel no debe ser más oscuro que el de un control que

contenga 0,02 mg de arsénico (As), tratado en forma similar a la muestra de prueba, al observarlo hacia abajo contra una superficie blanca (0,02% de As).

Sustancias no precipitadas por sulfuro de hidrógeno (como SO_4)—Disolver 0,90 mL (2 g) en 5 mL de ácido clorhídrico y diluir con 95 mL de agua. Precipitar el antimonio completamente con sulfuro de hidrógeno, dejar que el precipitado sedimente y filtrar con cuidado de no transferir mucho del precipitado al papel de filtro. (Conservar el precipitado). Agregar 0,5 mL de ácido sulfúrico a 50 mL del filtrado, evaporar en un crisol de porcelana tarado hasta sequedad e incinerar a $800 \pm 25^\circ$ durante 15 minutos. (Conservar el residuo). El peso del residuo incinerado no debe ser más de 0,0010 g mayor que el del peso obtenido en una prueba completa con un blanco (0,10%).

Hierro (241)—Al residuo de la prueba de *Sustancias no precipitadas por sulfuro de hidrógeno* agregar 2 mL de ácido clorhídrico y 5 gotas de ácido nítrico y evaporar en baño de vapor hasta sequedad. Recoger el residuo en 2 mL de ácido clorhídrico y diluir con agua a 47 mL: la solución no presenta más de 0,01 mg de Fe (0,001%).

Otros metales pesados (como Pb)—Disolver el precipitado en el papel de filtro de la prueba de *Sustancias no precipitadas por sulfuro de hidrógeno* con 75 mL de una solución que contenga 6 g de sulfuro de sodio y 4 g de hidróxido de sodio disueltos en agua y diluidos con agua a 100 mL. Recolectar el filtrado en el matraz original que contenga el resto del precipitado de sulfuro. Entibiar la solución para disolver los sulfuros solubles y dejar que sedimenten los sulfuros insolubles. Filtrar, lavar bien con sulfuro de hidrógeno SR y disolver el precipitado que haya quedado en el papel de filtro con 10 mL de ácido clorhídrico diluido caliente. Diluir el filtrado con agua a 50 mL. Neutralizar una porción de 25 mL de esta solución con hidróxido de sodio 1 N y agregar 1 mL de ácido acético 1 N y 10 mL de sulfuro de hidrógeno SR. Si se obtiene color marrón, éste no debe exceder el producido por 0,05 mg de ión plomo en un volumen igual de solución que contenga 1 mL de ácido acético 1 N y 10 mL de sulfuro de hidrógeno SR (0,005%).

Cambio en la redacción:

Perclorato de Litio, $LiClO_4$ —**106,39** ■[7791-03-9]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Perclorato de Magnesio Anhidro, $Mg(ClO_4)_2$ —**223,21** ■[10034-81-8]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Peróxido de Hidrógeno al 30 por ciento, H_2O_2 —**34,01** ■[7722-84-1]■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Persulfato de Amonio ■(*Peroxidisulfato de Amonio*). ■_{1S} (USP30) ($(NH_4)_2S_2O_8$)—**228,20** ■[7727-54-0]■_{1S} (USP30)—Usar Peroxidisulfato de Amonio grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Poliéster de Succinato de Dietilenglicol, $(OCH_2CH_2OCH_2CH_2OOCCH_2CH_2COO)_n$ ■—[26183-02-8]■_{1S} (USP30)—Líquido viscoso y transparente. Soluble en cloroformo. Se estabiliza mediante modificación del poliéster de succinato de dietilenglicol, para hacerlo adecuado al uso en cromatografía de gas-líquido a una temperatura de 200°.

[NOTA—Un grado adecuado se encuentra disponible en Alltech, www.alltechweb.com].

Cambio en la redacción:

Púrpura de *m*-Cresol, $C_{21}H_{18}O_5S$ —**382,43** ■[2303-01-7] ■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Queroseno—■[8008-20-6] ■_{1S} (USP30)—Mezcla de hidrocarburos, principalmente de la serie del metano. Líquido transparente e incoloro. ■_{1S} (USP30) Peso específico: aproximadamente 0,80. Destila entre 180° y 300°.

Cambio en la redacción:

Reineckato de Amonio (*Sal de Reinecke*), $NH_4[Cr(NH_3)_2(SCN)_4] \cdot H_2O$ —**354,44** ■[13573-16-5] ■_{1S} (USP30)—Cristales de color rojo oscuro o polvo cristalino rojo. Moderadamente soluble en agua fría; más soluble en agua caliente. Se descompone gradualmente en solución.

Sensibilidad—Disolver 50 mg en 10 mL de agua. Agregar 0,2 mL de la solución a 1 mL de una solución de 10 mg de cloruro de colina en 20 mL de agua y agitar suavemente: se forma un precipitado característico en 5 a 10 segundos.

Cambio en la redacción:

Rojo Congo, $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ —**696,67** ■[573-58-0] ■_{1S} (USP30)—Polvo rojo oscuro o marrón rojizo. Se descompone con la exposición a humos ácidos. Sus soluciones tienen un pH de aproximadamente 8 a 9,5. Un g se disuelve en aproximadamente 30 mL de agua. Es poco soluble en alcohol.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° durante 4 horas: no pierde más de 3,0% de su peso.

Residuo de incineración—Pesar con exactitud aproximadamente 1 g, previamente secado a 105° durante 4 horas, y colocarlo en un crisol o cápsula de porcelana. Incinerar cuidadosamente hasta que esté bien carbonizado, enfriar, agregar 2 mL de ácido sulfúrico e incinerar cuidadosamente hasta que el residuo se torne blanco o casi blanco. Enfriar, agregar 0,5 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de ácido nítrico, evaporar e incinerar nuevamente hasta peso constante: el peso del sulfato de sodio así obtenido está entre 20,0% y 24,0% del peso de la muestra seca tomada.

Sensibilidad—A 50 mL de agua exenta de dióxido de carbono, agregar 0,1 mL de solución de rojo congo (1 en 1000). El color rojo de la solución se torna violeta al agregar 0,05 mL de ácido clorhídrico 0,10 N y recupera el color rojo tras agregar 0,05 mL de hidróxido de sodio 0,10 N.

Cambio en la redacción:

Sal de Fast Blue B, $C_{14}H_{12}N_4O_2 \cdot ZnCl_4$ —**475,47** ■[91-91-8] ■_{1S} (USP30)—Polvo verde.

Pérdida por secado (731)—Secar al vacío a 110° durante 1 hora: no pierde más de 5,0% de su peso.

Absorbancia—Disolver 50 mg en 100 mL de agua. En un segundo recipiente disolver 100 mg de 2-naftol en 100 mL de 2-metoxietanol. Pipetear 5 mL de la solución de prueba y 10 mL de la solución de 2-naftol, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con acetona. Para el blanco, pipetear 5 mL de agua y 10 mL de la solución de 2-naftol, transferirlos a un segundo matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con acetona. Determinar la absorbancia de la solución de prueba en una celda de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 545 nm, con un espectrofotómetro adecuado, usando el blanco para ajustar el instrumento: la absorbancia no es menor de 0,80.

Cambio en la redacción:

Sal de Fast Blue BB, $(C_{17}H_{18}ClN_3O_3)_2 \cdot ZnCl_2$ —**831,89** ■[15710-69-7] ■_{1S} (USP30)—Polvo amarillo que funde aproximadamente a 162°, con descomposición. Moderadamente soluble en agua.

Cloruro—Transferir aproximadamente 80 mg, pesados con exactitud, a un vaso de precipitados adecuado. Agregar 25 mL de acetona, 25 mL de agua y 500 mg de nitrato de sodio. Mezclar hasta completar la disolución. Valorar con nitrato de plata 0,01 N SV, determinando el punto final potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. No se encuentra menos de 15,0% de cloruro.

Cambio en la redacción:

Sal Disódica del Ácido Cromotrópico (*Ácido 4,5-Dihidroxi-2,7-naftalenodisulfónico, Sal Disódica*), $C_{10}H_6O_8Na_2S_2 \cdot 2H_2O$ —**400,29** ■[129-96-4] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sal Nitroso R (*Disulfonato de 1-Nitroso-2-naftol-3,6-disodio*), $NOC_{10}H_4OH(SO_3Na)_2$ —**377,26** ■[525-05-3] ■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino o cristales amarillos. Un g se disuelve en aproximadamente 40 mL de agua; insoluble en alcohol.

Sensibilidad—Disolver 500 mg de acetato de sodio en una solución de 0,4 mg de cloruro cobaltoso (0,1 mg de cobalto) en 5 mL de agua. Agregar 1 mL de ácido acético diluido y, a continuación, 1 mL de una solución de sal nitroso R (1 en 500): de inmediato se produce un color rojo que persiste cuando la solución se calienta a ebullición con 1 mL de ácido clorhídrico durante 1 minuto.

Cambio en la redacción:

Salicilato de Etilo, $C_9H_{10}O_3$ —**166,17** ■[118-61-6] ■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro.

Valoración—Inyectar una muestra apropiada en un cromatógrafo de gases adecuado (ver *Cromatografía* (621)) equipado con un detector de ionización a la llama, usando helio como gas transportador. Las siguientes condiciones se consideran adecuadas: una columna capilar de 0,25 mm \times 10 m recubierta con una capa de 1 μ m de metilsilicona; mantener la temperatura del inyector a 240°, la del detector a 300° y la de la columna a 150°, programada para que aumente 10° por minuto hasta alcanzar los 250°. El área del pico de salicilato de etilo no es menos de 99% del área total.

Índice de refracción (831): entre 1,5216 y 1,5236 a 20°.

Cambio en la redacción:

Sebacato de Bis(2-etilhexilo) (*Sebacato de Dioctilo*), $C_8H_{17}OOC(CH_2)_8COOC_8H_{17}$ —**426,67** ■[122-62-3] ■_{1S} (USP30)—Líquido pálido de color pajizo. Insoluble en agua. Su índice de refracción es de aproximadamente 1,448. Adecuado para usarse en cromatografía de gases.

Peso específico, 20°/20° (841): entre 0,913 y 0,917.

Intervalo de ebullición: entre 243° y 248° a 5 mm de mercurio. [NOTA—Un grado adecuado de “Sebacato de Dioctilo” está disponible en Sigma-Aldrich, www.sigma-aldrich.com.]

Cambio en la redacción:

Sílice de Diatomeas Calcinado—■[68855-54-9] ■_{1S} (USP30)—Una forma de sílice (SiO_2) que consiste en frústulas fundidas y fragmentos de diatomeas. Polvo amorfo fino, de color rosado claro o blanco. Insoluble en agua, en ácidos y en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

Pérdida por incineración—Pesar con exactitud aproximadamente 4 g e incinerar hasta peso constante: no pierde más de 10,0% de su peso.

Impurezas orgánicas—No se oscurece visiblemente cuando se incinera.

Pérdida por secado (731)—Secar a 110° durante 2 horas: no pierde más de 2,0% de su peso.

[NOTA—“Chromosorb P” y “Chromosorb W”, disponibles en Alltech, www.alltechweb.com, son grados adecuados].

Cambio en la redacción:

Sulfamato de Amonio, $\text{NH}_4\text{OSO}_2\text{NH}_2$ —**114,13** ■[7773-06-0] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato Cérico, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ con una cantidad variable de agua—(anhidro) **332,24** ■[13590-82-4] ■1S (USP30)—También puede contener sulfatos de otros elementos térreos poco comunes asociados. Cristales o polvo cristalino de color amarillo a amarillo anaranjado. Prácticamente insoluble en agua fría, lentamente soluble en ácidos minerales diluidos fríos, pero más fácilmente soluble cuando se calienta con estos disolventes.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 800 mg, transferir a un matraz, agregar 25 mL de agua y 3 mL de ácido sulfúrico y entibiar hasta disolver. Enfriar y agregar 60 mL de una mezcla de 1 volumen de ácido fosfórico y 20 volúmenes de agua. Agregar 25 mL de solución de yoduro de potasio (1 en 10), tapar el matraz y dejar en reposo durante 15 minutos. Reemplazar el aire ubicado sobre la solución por dióxido de carbono y, mientras continúa el flujo de dióxido de carbono hacia el interior del matraz, valorar el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N SV, agregando 3 mL de almidón SR cerca del punto final. Cada mL de tiosulfato de sodio 0,1 N equivale a 33,22 mg de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. No se encuentra menos de 80,0%.

Cloruros (Prueba para reactivos)—Disolver 1 g en una mezcla de 5 mL de ácido nítrico y 4 mL de agua. Filtrar, si fuera necesario, y diluir con agua a 20 mL. A 10 mL de la dilución, agregar 1 mL de nitrato de plata SR, dejar en reposo durante 10 minutos y filtrar hasta que se torne transparente. A los 10 mL restantes de solución de prueba, agregar 1 mL de nitrato de plata SR: si se produce turbidez, ésta no excede la de un control que se prepara agregando 0,05 mg de Cl al filtrado obtenido a partir de los primeros 10 mL de la solución de prueba (0,01%).

Metales pesados—Calentar 500 mg con una mezcla de 10 mL de agua y 0,5 mL de ácido sulfúrico hasta que se complete la disolución. Enfriar, diluir con agua a 50 mL y hacer burbujear gas de sulfuro de hidrógeno a través de la solución hasta que esté saturada: el precipitado que se forma es blanco o no más oscuro que amarillo pálido.

Hierro—Disolver 100 mg en una mezcla de 5 mL de agua y 2 mL de ácido clorhídrico, entibiándola si fuera necesario, y enfriar. Transferir a una probeta con tapón de vidrio, diluir con agua a 25 mL y agregar 5 mL de tiocianato de amonio SR y 25 mL de éter. Agitar bien, aunque suavemente, y dejar que las capas se separen: si se produce color rosado en la capa de éter, éste no es más oscuro que el de un control, preparado de manera similar, que contenga 0,02 mg de Fe agregado (0,02%).

Cambio en la redacción:

Sulfato Cúprico Anhidro, CuSO_4 —**159,61** ■[7758-98-7] ■1S (USP30)—Polvo blanco o blanco grisáceo exento de un matiz azul. Se torna azul con la adición de una pequeña cantidad de agua. Soluble en agua. Almacenar en envases impermeables.

Cloruros (Prueba para reactivos)—Un g presenta no más de 0,02 mg de Cl (0,002%).

Sustancias no precipitadas por sulfuro de hidrógeno—Determinar según se indica para **Acetato Cúprico** grado reactivo ACS: el residuo no pesa más de 6 mg (0,15%).

Cambio en la redacción:

Sulfato de Aluminio y Potasio, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ —**474,39** ■[10042-67-1] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato de Amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —**132,14** ■[7783-20-2] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato de Brucina, $(\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —**1013,11** ■[5787-00-8] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato de Calcio, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —**172,17** ■[7778-18-9] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato de Litio, $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ —**127,96** ■[10377-48-7] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato de Magnesio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —**246,48** ■[10034-99-8] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato de Magnesio Anhidro, MgSO_4 —**120,37** ■[7487-88-9] ■1S (USP30)—El Sulfato de Magnesio Anhidro puede prepararse del siguiente modo. Colocar en un recipiente poco profundo una cantidad adecuada de sulfato de magnesio (ver anteriormente), preferentemente en polvo, y exponer a una temperatura de aproximadamente 80° durante varias horas, mezclando ocasionalmente. Calentar luego entre 275° y 300° hasta que el peso sea prácticamente constante. Transferir el producto aún tibio a recipientes impermeables, dado que la sal anhidra es muy higroscópica.

Cambio en la redacción:

Sulfato de *p*-Metilaminofenol, $(p\text{-CH}_3\text{NHC}_6\text{H}_4\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ —**344,38** ■[55-55-0] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato de Níquel, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —**262,85** ■[7786-81-4] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato Férrico, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ —■[10028-22-5] ■1S (USP30)—Polvo blanco grisáceo e higroscópico, o perlas de color beige, lentamente solubles en agua.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 700 mg y disolver en una mezcla de 50 mL de agua y 3 mL de ácido clorhídrico en un matraz con tapón de vidrio. Agregar 3 g de yoduro de potasio y dejar en reposo en la oscuridad durante 30 minutos. Luego diluir con 100 mL de agua y valorar con tiosulfato de sodio 0,1 N SV, agregando 3 mL de almidón SR cerca del punto final. Cada mL de tiosulfato de sodio 0,1 N equivale a 5,585 mg de Fe: se encuentra no menos de 21,0% y no más de 23,0%.

Materia insoluble (Prueba para reactivos)—Una porción de 10 g, disuelta en una mezcla de 100 mL de agua y 5 mL de ácido sulfúrico, presenta no más de 2 mg de materia insoluble (0,02%).

Cloruros—Disolver 1 g entibiando en una mezcla de 10 mL de agua y 1 mL de ácido nítrico, agregar 4 mL de ácido nítrico adicional y diluir con agua a 50 mL. A 25 mL agregar 1 mL de ácido fosfórico y 1 mL de nitrato de plata SR. Si se produce turbidez, esta no excede la obtenida con un control que contenga 0,01 mg de ión de cloruro (Cl), 1 mL de ácido nítrico, 1 mL de ácido fosfórico y 1 mL de nitrato de plata SR (0,002%).

Hierro ferroso—Disolver 4 g entibiando con 50 mL de ácido sulfúrico diluido (1 en 10), enfriar y valorar con permanganato de potasio 0,1 N: no se requiere más de 0,16 mL para que aparezca un color rosado permanente (0,02% como Fe+2). [NOTA—Dado que los reactivos empleados en las pruebas de *Cobre* y *Cinc* pueden contener cantidades excesivas de cobre y de cinc, primero se los debe purificar extrayendo con *Solución de Extracción de Ditiona* (ver *Plomo* (251)).]

Cobre—Disolver 1,2 g en 100 mL de agua. A 10 mL agregar 50 mL de una solución que contenga 5 g de tartrato de amonio y 5 mL de hidróxido de amonio. Agregar 10 mL de *Solución de Ditiona Estándar* (ver *Plomo* (251)), agitar durante 2 minutos, retirar la capa de ditiona y comparar el color rosado con el de un control que contenga 6 µg de ión de cobre (Cu) y que esté tratado exactamente como la porción de 10 mL de la solución de prueba. Si el color de la solución de prueba es menos intenso que el del control, entonces la muestra de prueba contiene menos del límite de *Cobre* y de *Cinc*. Si el color de la solución de prueba es más intenso que el del control, agregar 15 mL de ácido clorhídrico diluido (1 en 250) y agitar durante 2 minutos. Retirar la solución de ditiona y agitar con una segunda porción de 15 mL de ácido clorhídrico diluido (1 en 250) durante 2 minutos. Retirar la ditiona, combinar los dos extractos ácidos y reservar para la prueba de *Cinc*. Si se produce color rosado en la solución de ditiona, aquel no es más oscuro que el de la solución control tratada exactamente como la solución de prueba (0,005%).

Cinc—A los extractos ácidos combinados reservados de la prueba de *Cobre*, agregar acetato de sodio 0,5 M para llevar el pH hasta un nivel comprendido entre 5,0 y 5,5, y luego agregar 1 mL de tiosulfato de sodio 0,1 N. Agregar 10 mL de *Solución de Ditiona Estándar* (ver *Plomo* (251)), agitar durante 2 minutos y permitir que las capas se separen. Retirar la ditiona y descartar la capa de agua. Si se produce color rosado, este no es más intenso que el de un control preparado agregando 0,006 mg de ión cinc (Zn) a los extractos ácidos combinados del control usado en la prueba de *Cobre* (0,005%).

Nitrato—Disolver 10 g en 100 mL de ácido sulfúrico diluido (1 en 100), calentar hasta ebullición y verter, lentamente, en una mezcla de 140 mL de agua y 50 mL de amoníaco concentrado SR. Filtrar a través de un filtro plegado mientras aún está caliente, lavar con agua caliente hasta que el volumen del filtrado sea 300 mL, mezclar y enfriar. A 15 mL de esta solución, agregar 1 mL de solución de cloruro de sodio (1 en 200), 0,10 mL de índigo carmín SR y 15 mL de ácido sulfúrico. El color azul no desaparece por completo al cabo de los 5 minutos (0,01%).

Sustancias no precipitadas por amoníaco—Evaporar hasta sequedad 30 mL del filtrado obtenido en la prueba de *Nitrato* e incinerar suavemente: el peso del residuo no excede de 1 mg (0,10%).

Cambio en la redacción:

Sulfato Ferroso, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —**278,02** ■[7720-78-7] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfato Mercúrico, HgSO_4 —**296,65** ■[7783-35-9] ■1S (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Sulfuro de Hidrógeno, H_2S —**34,08** ■[7783-06-4] ■1S (USP30)—Gas incoloro y venenoso, más pesado que el aire. Soluble en agua. Se genera tratando sulfuro ferroso con ácido clorhídrico diluido o ácido sulfúrico diluido. Se pueden usar otros sulfuros que produzcan sulfuro de hidrógeno con ácidos diluidos. También está disponible en forma comprimida en cilindros.

Cambio en la redacción:

Tetracloruro de Carbono, CCl_4 —**153,82** ■[56-23-5] ■1S (USP30)—Usar un grado que cumpla con las especificaciones de la ACS en *Reagent Chemicals*, 8^{va} Edición.

Cambio en la redacción:

Tetrafluoroborato de p-Nitrobencenodiazonio, $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{BF}_4$ —**236,92** ■[456-27-9] ■1S (USP30)—Cristales color dorado amarillento. Soluble en acetonitrilo. [Precaución—Sensible a los golpes; mantener refrigerado.]

Valoración—Transferir aproximadamente 30 mg, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL con protección actínica. Disolver en ácido clorhídrico 0,01 N, diluir a volumen con ácido clorhídrico 0,01 N y mezclar. Usando material de vidrio con protección actínica, diluir 2,0 mL de la solución resultante a 50,0 mL con metanol de grado espectrofotométrico. Medir la absorbancia de esta solución en una celda de 1 cm aproximadamente a 255 nm, usando metanol como blanco. Calcular la absorbancia de la solución, dividiendo la absorbancia medida por la concentración en g por mL. Calcular el valor de valoración, por la fórmula:

$$100a/59,4$$

en donde *a* es la absorbancia de la solución: no se encuentra menos de 95,0%.

Cambio en la redacción:

Tierra de Diatomeas Fundido-Calcinada—■[91053-39-3] ■1S (USP30)—Usar un grado adecuado. [NOTA—Se puede obtener un grado adecuado de Alltech, www.alltechweb.com, disponible como “Chromosorb W, AW-DMCS”].

Cambio en la redacción:

Tierra de Diatomeas Silanizada—■[91053-39-3] ■1S (USP30)—Usar un grado adecuado.

[NOTA—Existen grados adecuados disponibles comercialmente como “Anachrome Q”, “Gas-Chrom Q” y “Varaport 30”].

Cambio en la redacción:

Tiocianato de Amonio ■(Rodanida de Amonio), ■_{1S} (USP30) NH_4SCN —**76,12** ■[1762-95-4] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Tiocianato Mercúrico, $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ —**316,76** ■[592-85-8] ■_{1S} (USP30)—Polvo cristalino blanco. Muy poco soluble en agua; soluble en soluciones de cloruro de sodio; poco soluble en alcohol y en éter.

Cambio en la redacción:

Tornasol ■—[1393-92-6] ■_{1S} (USP30)—Pigmento azul preparado a partir de varias especies de *Rocella* DeCandolle, *Lecanora* Acharius u otros líquenes (Fam. Parmeliaceae).

Descripción—Cubos, masas, fragmentos o gránulos de color azul índigo o violeta intenso. Tiene el olor combinado de índigo y violetas y tiñe la saliva de un azul intenso. Las sustancias indicadoras que contiene son solubles en agua y menos solubles o insolubles en alcohol.

Cenizas—Produce no más de 60,0% de ceniza.

Cambio en la redacción:

Tricloruro de Antimonio (*Cloruro Antimonioso*), SbCl_3 —**228,12** ■[10025-91-9] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Trifluoruro de Boro, BF_3 —**67,81** ■[7637-07-2] ■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Trifluoruro de Boro al 14% en Metanol ■[373-57-9] ■_{1S} (USP30)—Usar un grado adecuado.

Cambio en la redacción:

Trióxido de Arsénico, As_2O_3 —**197,84** ■[1327-53-3] ■_{1S} (USP30)—Utilizar grado reactivo ACS.

[NOTA—Se puede obtener Trióxido de Arsénico de calidad apropiada para usar como estándar primario del Instituto Nacional de Normas y Tecnología del gobierno de Estados Unidos (National Institute of Standards and Technology - NIST), Office of Standard Reference Materials, www.nist.gov, como muestra de estándar N° 83].

Cambio en la redacción:

Trióxido de Cromo, CrO_3 —**99,99** ■[1333-82-0] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Vanadato de Amonio (*Metavanadato de Amonio*), NH_4VO_3 —**116,98** ■[7803-55-6] ■_{1S} (USP30)—Polvo blanco y cristalino. Poco soluble en agua fría, soluble en agua caliente y en amoníaco diluido SR.

Valoración—Pesar con exactitud aproximadamente 500 mg, transferir a un recipiente adecuado, agregar 30 mL de agua y 2 mL de ácido sulfúrico diluido (1 en 4), agitar por rotación moderada para disolver y pasar dióxido de azufre gaseoso a través de la solución hasta que la reducción finalice y la solución tenga un color azul brillante. Calentar a ebullición moderada pasando una corriente de dióxido de carbono a través de la solución para eliminar el exceso de dióxido de azufre, luego enfriar y valorar con permanganato de potasio 0,1 N SV. Cada mL de permanganato de potasio 0,1 N consumido equivale a 11,7 mg de NH_4VO_3 . No se encuentra menos de 98,0%.

Solubilidad en hidróxido de amonio—Disolver 1 g en una mezcla de 3 mL de hidróxido de amonio y 50 mL de agua tibia: la solución es transparente e incolora.

Carbonato—Agregar 1 mL de agua y 2 mL de ácido clorhídrico diluido a 500 mg: no se produce efervescencia.

Cloruro—Disolver 250 mg en 40 mL de agua caliente, agregar 2 mL de ácido nítrico y dejar en reposo durante 1 hora. Filtrar y agregar al filtrado 0,5 mL de nitrato de plata SR: la turbidez producida no excede la turbidez de un blanco que contenga 0,5 mg de Cl (0,2%) agregado.

Sulfato—Disolver 500 mg en 50 mL de agua caliente y agregar 2 mL de ácido clorhídrico diluido y 1,5 g de clorhidrato de hidroxilamina. Calentar a 60° durante 3 minutos, filtrar, enfriar y agregar al filtrado 2 mL de cloruro de bario SR: no se produce turbidez ni precipitado en el plazo de 30 minutos.

Cambio en la redacción:

Verde Brillante (*Verde de Malaquita G*), $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ —**482,64** ■[3051-11-4] ■_{1S} (USP30)—Cristales brillantes de color amarillo dorado. Soluble en agua y en alcohol. Máximo de absorción: 623 nm.

Cambio en la redacción:

Yodo (*Iodo*), I_2 —**253,81** ■[7553-56-2] ■_{1S} (USP30)—Usar grado reactivo ACS.

Cambio en la redacción:

Yoduro de 1-Etilquinadino, $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{IN}$ —**299,15** ■[606-55-3] ■_{1S} (USP30)—Sólido verde amarillento. Moderadamente soluble en agua.

Valoración—Disolver aproximadamente 290 mg, pesados con exactitud, en 100 mL de agua y agregar 10 mL de ácido acético glacial. Valorar con nitrato de plata 0,1 N SV y determinar el punto final potenciométricamente usando un electrodo selectivo para ión plata y un electrodo de referencia de calomel que contenga nitrato de potasio 1 M. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de nitrato de plata 0,1 N equivale a 29,92 mg de $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{IN}$: no se encuentra menos de 97,0%.

Cambio en la redacción:

Yoduro de Metilo, CH_3I —**141,94** ■[74-88-4] ■_{1S} (USP30)—Líquido incoloro, pesado y transparente. Poco soluble en agua. Miscible con alcohol, éter y éter de petróleo. Se torna marrón por exposición a la luz como resultado de la liberación de yodo.

Valoración—Agregar 1 mL a un matraz volumétrico de 100 mL tarado con 10 mL de alcohol. Volver a pesar, agregar alcohol a volumen y mezclar. Pipetear 20 mL y transferir a un matraz con tapón de vidrio y agregar 50,0 mL de nitrato de plata 0,1 N SV y 2 mL de ácido nítrico. Insertar el tapón inmediatamente, agitar con frecuencia durante 2 horas y dejar en reposo en la oscuridad toda la noche. Volver a agitar durante 2 horas, luego agregar 50 mL de agua y 3 mL de sulfato férrico amónico SR y valorar volumétricamente el

exceso de nitrato de plata con tiocianato de amonio 0,1 N SV. Cada mL de nitrato de plata 0,1 N equivale a 14,19 mg de CH_3I : no se encuentra menos de 98,5%.

Intervalo de ebullición (Prueba para reactivos)—Destilar 50 mL en un recipiente colector frío parcialmente cerrado: no menos de 48 mL destilan entre 41,5° y 43°.

Densidad: entre 2,270 y 2,285.

Residuos de evaporación—Evaporar 4 mL (10 g) en un baño de vapor y secar el residuo a 105° durante 1 hora: el residuo no pesa más de 1 mg (0,01%).

Acidez—Agitar 3 mL con 5 mL de agua durante 30 segundos y retirar la capa inferior inmediatamente: la capa acuosa es neutra al tornasol y cuando se agrega 1 mL de nitrato de plata SR no presenta más que una leve opalescencia.

Cambio en la redacción:

Yoduro Mercúrico Rojo, HgI_2 —454,40 ■[7774-29-0]■_{1S} (USP30)
—Usar grado reactivo ACS.

SOLUCIONES VOLUMÉTRICAS

Cambio en la redacción:

Hidróxido de Potasio, Normal (1N)

KOH, **56,11**

56,11 g en 1000 mL

Disolver 68 g de hidróxido de potasio en 950 mL de agua. Agregar una solución saturada recién preparada de hidróxido de bario hasta que no se formen más precipitados. Agitar bien la mezcla y dejarla en reposo durante la noche en un frasco con tapón. Decantar el líquido transparente o filtrar la solución en un frasco de poliolefina hermético y normalizarlo siguiendo el procedimiento indicado en *Hidróxido de Sodio, Normal (1N)*.

$$\text{N} = \frac{\text{g KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4}{0,20423 \times \text{mL KOH}} \quad \text{■}_{1S} \text{ (USP30)}$$

Cambio en la redacción:

Hidróxido de Sodio, Normal (1N)

NaOH, **40,00**

40,00 g en 1000 mL

Disolver 162 g de hidróxido de sodio en 150 mL de agua libre de dióxido de carbono, enfriar la solución a temperatura ambiente y filtrar a través de papel de filtro endurecido. Transferir 54,5 mL del filtrado transparente a un recipiente de poliolefina hermético y diluir con agua libre de dióxido de carbono a 1000 mL.

Pesar con exactitud aproximadamente 5 g de biftalato de potasio, previamente triturado ligeramente y secado a 120° durante 2 horas, y disolver en 75 mL de agua libre de dióxido de carbono. Agregar 2 gotas de fenolftaleína SR y valorar con la solución de hidróxido de sodio hasta obtener un color rosa permanente. Cada ■204,23 mg■_{1S} (USP30) de biftalato de potasio equivalen a 1 mL de hidróxido de sodio 1 N.

$$\text{N} = \frac{\text{g KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4}{0,2043 \times \text{mL de Solución de NaOH}}$$

NOTAS—(1) Las soluciones de hidróxidos alcalinos absorben dióxido de carbono cuando se exponen al aire. Deben conservarse en frascos con tapones adecuados bien ajustados con un tubo relleno de una mezcla de hidróxido de sodio y cal (tubos de cal sodada) que absorbe el dióxido de carbono, para que el aire que ingrese en el recipiente pase a través de este tubo. (2) Preparar las soluciones de menor concentración (por ejemplo, 0,1 N; 0,01 N) diluyendo cuantitativamente volúmenes medidos con exactitud de la solución 1 N con suficiente agua exenta de dióxido de carbono para obtener la concentración deseada.

Volver a normalizar la solución con frecuencia.

Cambio en la redacción:

Tiosulfato de Sodio, Décimo Normal (0,1 N)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, **248,19**

24,82 g en 1000 mL

Disolver aproximadamente 26 g de tiosulfato de sodio y 200 mg de carbonato de sodio en 1000 mL de agua recientemente calentada a ebullición y enfriada. Normalizar esta solución del siguiente modo.

Pesar con exactitud aproximadamente 210 mg de dicromato de potasio patrón primario, previamente pulverizado y secado ■según las instrucciones de la etiqueta, si fuera necesario,■_{1S} (USP30) y disolver en 100 mL de agua en un matraz de 500 mL con tapón de vidrio. Mezclar por rotación moderada para disolver los sólidos, destapar y agregar rápidamente 3 g de yoduro de potasio, 2 g de bicarbonato de sodio y 5 mL de ácido clorhídrico. Tapar suavemente el matraz, mezclar por rotación moderada y dejar en reposo durante exactamente 10 minutos en un lugar oscuro. Enjuagar el tapón y las paredes interiores del matraz con agua y valorar el yodo liberado con la solución de tiosulfato de sodio hasta que la solución se torne de un color verde amarillento. Agregar 3 mL de almidón SR y continuar con la volumetría hasta que el color azul haya desaparecido. Realizar una determinación con un blanco.

Volver a normalizar la solución con la frecuencia que indiquen los datos de estabilidad de laboratorio. En caso de no contar con dichos datos, normalizar semanalmente.

$$\text{N} = \frac{\text{mg K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}{49,04 \times \text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$$

Tablas de Referencia

ENVASES PARA DISPENSAR CÁPSULAS Y TABLETAS	
<p>La siguiente tabla sirve como fuente de información para el farmacéutico que participa en la situación típica de dispensación y que ya está familiarizado con los requisitos de <i>Envasado y almacenamiento</i> establecidos en las monografías individuales. En la tabla adjunta se listan las cápsulas y las tabletas oficiales de la <i>Farmacopea de los Estados Unidos</i> y se indican las especificaciones pertinentes a los envases – impermeable (I), bien cerrado (B) y resistente a la luz (RL) – en los que se deben dispensar los medicamentos que se reenvasan.</p> <p>Esta tabla no está destinada a reemplazar los requisitos definitivos declarados en las monografías individuales ni debe interpretarse como un reemplazo de los mismos.</p>	
Especificaciones del Envase para Tabletas y Cápsulas	
Título de la Monografía	Especificaciones del Envase
Agregar lo siguiente: ■ Bitartrato de Hidrocodona y Metilbromuro de Homatropina, Tabletas	I, RL ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Clorhidrato de Fexofenadina, Tabletas	B ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Clorhidrato de Fexofenadina y Clorhidrato de Pseudoefedrina, Tabletas de Liberación Prolongada	B ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Clorhidrato de Nefazodona, Tabletas	I ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Desogestrel y Etinil Estradiol, Tabletas	B ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Doxazosina, Tabletas	I ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Estradiol y Acetato de Noretindrona, Tabletas	B ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Fosinopril Sódico, Tabletas	I ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Fosinopril Sódico e Hidroclorotiazida, Tabletas	I ■ 1S (USP30)

Especificaciones del Envase para Tabletas y Cápsulas (Continuación)	
Título de la Monografía	Especificaciones del Envase
Agregar lo siguiente: ■ Irbesartán, Tabletas	B ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Irbesartán e Hidroclorotiazida, Tabletas	B ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Metilsulfonilmetano, Tabletas	I, RL ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Mononitrato de Isosorbida, Tabletas	I ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Nevirapina, Tabletas	B ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Norgestimato y Etinil Estradiol, Tabletas	B ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Pentazocina y Acetaminofeno, Tabletas	I, RL ■ 1S (USP30)
Agregar lo siguiente: ■ Quinapril, Tabletas	B ■ 1S (USP30)

DESCRIPCIÓN Y SOLUBILIDAD

Descripción y Solubilidad Relativa de Artículos de la USP y del NF

Las secciones “descripción” y “solubilidad” relativas a un artículo (anteriormente incluidas en la monografía individual) son de índole general. La información se suministra para quienes usan, preparan y dispensan fármacos, sólo para indicar las propiedades descriptivas y de solubilidad de un artículo que cumple con las normas de la monografía. Las propiedades no son normas o pruebas de pureza en sí mismas aunque pueden contribuir indirectamente a la evaluación preliminar de la integridad de un artículo.

Sabor y Olor

En muchos casos se indican características organolépticas porque pueden resultar propiedades descriptivas y útiles de las sustancias. Sin embargo, no están destinadas para su aplicación como pruebas de identificación de sustancias.

La inclusión del olor y el sabor, entre otras propiedades descriptivas, puede ayudar a identificar el agente causante después de una exposición accidental o el contacto con una sustancia. Esta información se ofrece como advertencia o para informar acerca de las sensaciones que pueden experimentarse. Se recomienda firmemente no usar el olor o el sabor como pruebas de identificación o contenido.

El olor característico de una sustancia volátil aparece de inmediato al abrir el envase que lo contiene. El olor puede ser agradable (por ejemplo, el Aceite de Menta), desagradable (por ejemplo, el Dióxido de Azufre) o potencialmente peligroso ante la exposición prolongada (por ejemplo, Alquitrán de Hulla). Además, se puede encontrar un olor inesperado si no se conocen las características de una sustancia o si un envase ha sido etiquetado incorrectamente. En consecuencia, los envases de tales sustancias se deben abrir con precaución, preferiblemente en una campana de extracción bien ventilada. Asimismo, se puede experimentar una sensación o un sabor característicos en la boca si trazas de material residual presente en los dedos entran inadvertidamente en contacto con la lengua o con las mucosas adyacentes.

Solubilidad

Se considera una prueba de pureza sólo cuando, en la monografía individual, se la indica como prueba de solubilidad cuantitativa especial y está designada bajo el encabezado de la prueba.

Las solubilidades aproximadas de sustancias de la Farmacopea y del Formulario Nacional se indican mediante los términos descriptivos de la siguiente tabla. El término “miscible” utilizado en esta Farmacopea se refiere a una sustancia que produce una mezcla homogénea al mezclarse en cualquier proporción con el disolvente designado.

Término Descriptivo	Partes de Disolvente Requeridas para 1 Parte de Soluta
Muy soluble	Menos de 1
Fácilmente soluble	De 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Moderadamente soluble	De 30 a 100
Poco soluble	De 100 a 1000
Muy poco soluble	De 1000 a 10 000
Prácticamente insoluble o Insoluble	10 000 o más

Los artículos solubles de la Farmacopea y del Formulario Nacional, cuando se solubilizan, pueden mostrar trazas de impurezas físicas, tales como fragmentos diminutos de papel de filtro, fibras y otras partículas, a menos que sean limitados o excluidos por pruebas definidas u otras especificaciones en las monografías individuales.

Agregar lo siguiente:

■ **Aceite de Coco:** Líquido viscoso transparente, de color blanco a tostado amarillento claro. Fácilmente soluble en cloruro de metileno y en éter de petróleo (pe: 65° a 70°); muy poco soluble en alcohol; prácticamente insoluble en agua. *Categoría del NF:* Agente de recubrimiento; agente emulsionante y/o solubilizante. ■1S (NF25)

Agregar lo siguiente:

■ **Acetato de Desmopresina:** Polvo blanco, ligero. Soluble en agua, en alcohol y en ácido acético. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ **Acetato de Gonadorelina:** Polvo blanco a levemente amarillento. Soluble en agua; moderadamente soluble en metanol. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ **Besilato de Amlodipino:** Polvo blanco o casi blanco. Fácilmente soluble en metanol; moderadamente soluble en alcohol; poco soluble en 2-propanol y en agua. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ **Budesónida:** Polvo cristalino blanco a blanquecino, inodoro. Fácilmente soluble en cloroformo; moderadamente soluble en alcohol; prácticamente insoluble en agua y en heptano. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ **Copolímero de Metacrilato de Amino:** Gránulos incoloros a amarillentos. Soluble en acetona, en alcohol isopropílico y en ácidos diluidos; prácticamente insoluble en agua. Las soluciones son transparentes a ligeramente turbias. *Categoría del NF:* Agente de recubrimiento; polímero de membrana; aglutinante de tabletas. ■1S (NF25)

Agregar lo siguiente:

■ **Dantroleno Sódico:** Polvo fino de color anaranjado a marrón anaranjado. Moderadamente soluble en acetona, en dimetilformamida y en glicerina. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ **Didanosina:** Polvo cristalino blanco a blanquecino. Muy soluble en dimetil sulfóxido; prácticamente insoluble o insoluble en acetona y en metanol. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ **Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo:** Líquido blanco lechoso de baja viscosidad con un débil olor característico. Es miscible con agua en cualquier proporción; se mantiene la apariencia blanca lechosa. Al mezclar una parte con

cinco partes de acetona, alcohol o alcohol isopropílico, se obtiene una solución viscosa transparente o levemente opalescente; el polímero primero precipita, pero luego se disuelve en el disolvente orgánico en exceso. Cuando se mezcla con hidróxido de sodio 1 N en una relación de 1 : 2, la dispersión no se disuelve; se mantiene la apariencia blanca lechosa. *Categoría del NF:* Agente de recubrimiento; polímero de membrana; aglutinante de tabletas. ■1S (NF25)

Agregar lo siguiente:

■**Drospirenona:** Polvo blanco a blanquecino. Fácilmente soluble en cloruro de metileno; soluble en acetona y en metanol; moderadamente soluble en acetato de etilo y en alcohol; prácticamente insoluble en hexano y en agua. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Eritritol:** Polvo cristalino blanco o casi blanco, o gránulos de libre fluidez. Es estable al calor y no es higroscópico. Fácilmente soluble en agua; muy poco soluble en alcohol. *Categoría del NF:* Humectante; agente edulcorante. ■1S (NF25)

Agregar lo siguiente:

■**Estrógenos Conjugados Sintéticos:** Un polvo cristalino o amorfo, blanco a beige claro que es inodoro o con un olor leve. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Meloxicam:** Polvo amarillo pálido. Soluble en dimetilformamida; poco soluble en acetona; muy poco soluble en metanol y en alcohol; prácticamente insoluble en agua. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Metilsulfonilmetano:** Polvo o cristales escamosos de color blanco. Funde aproximadamente a 109°. Fácilmente soluble en agua, en metanol, en alcohol y en acetona. Moderadamente soluble en éter. ■1S (USP30)

Cambio en la redacción:

■**Milrinona:** Sólido cristalino, de color blanco a tostado. Es higroscópico. Fácilmente soluble en dimetil sulfóxido; ■muy poco soluble en metanol; prácticamente insoluble en agua y en cloroformo. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Sevoflurano:** Líquido transparente, incoloro, no inflamable y volátil. Poco soluble en agua. Miscible con alcohol, con cloroformo y con éter. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Topiramato:** Polvo blanco a blanquecino. Fácilmente soluble en cloruro de metileno. ■1S (USP30)

Suplementos Dietéticos

Monografías Oficiales

Extracto de Tomate con Licopeno

Agregar lo siguiente:

■ **Recuento microbiano** (2021)—Cumple con los requisitos de las pruebas para ausencia de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El recuento total de microorganismos aerobios no excede de 1000 ufc por g, y el recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de 200 ufc por g. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ **Límite de aflatoxinas** (561): no más de 4 µg por kg del total de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2; no más de 2 µg por kg de aflatoxina B1. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Metilsulfonilmetano



C₂H₆O₂S 94,13
Dimethyl sulfone.
Sulfonilbismetano [67-71-0].

» El Metilsulfonilmetano contiene no menos de 98,0 por ciento y no más de 102,0 por ciento de C₂H₆O₂S, calculado con respecto a la sustancia anhidra. La pureza cromatográfica no es menos de 99,8%.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Estándares de referencia USP (11)—ER Metilsulfonilmetano USP. ER Dimetil Sulfóxido USP.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Intervalo de fusión (741): entre 108,5° y 110,5°.

Recuento microbiano (2021)—Cumple con los requisitos de las pruebas para determinar la ausencia de *Escherichia coli* en 10 g. El recuento total de microorganismos aerobios no excede de 1000 ufc por g o mL, y el recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de 100 ufc por g o mL.

Agua, Método I (921): no más de 0,1%. [NOTA—Para este análisis, se pueden necesitar aproximadamente 500 mg de metilsulfonilmetano.]

Metales pesados, Método I (231): 3 µg por g.

Pureza cromatográfica y límite del dimetil sulfóxido—

Solución madre del estándar—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Dimetil Sulfóxido USP y diluir cuantitativamente con metanol, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg de ER Dimetil Sulfóxido USP por mL.

Solución de control de sensibilidad—Diluir la *Solución madre del estándar* con metanol para obtener una solución con una concentración de 2,0 µg por mL.

Solución de aptitud del sistema—En un matraz volumétrico de 50 mL, disolver 20 mg de ER Metilsulfonilmetano USP en 5 mL de la *Solución madre del estándar*, diluir a volumen con metanol y mezclar para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg de ER Dimetil Sulfóxido USP por mL y 0,4 mg de ER Metilsulfonilmetano USP por mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 100 mg de metilsulfonilmetano, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y diluir a volumen con metanol, y mezclar. Someter a ultrasonido a 50° durante 1 minuto, dejar que se enfríe a temperatura ambiente y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar el cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama y una columna capilar de 0,53 mm × 30 m, recubierta con una fase G2 de 5 µm de espesor. Mantener la temperatura de la columna a 120°. Usar helio como gas transportador, el cual fluye a una velocidad de 5,0 mL por minuto. La relación de partición es 2:1. Mantener la temperatura del inyector y del detector a 250°. Cromatografiar la *Solución de control de sensibilidad*: el pico de dimetil sulfóxido debe ser mayor que 10 veces la altura del ruido, esta última se determina mediante un procedimiento adecuado. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre dimetil sulfóxido y metilsulfonilmetano no es menor de 2,0.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 1 µL) de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Metilsulfonilmetano tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la respuesta de cada impureza individual en el cromatograma de la *Solución de prueba*; y r_s es la suma de las respuestas de todos los picos, diferentes del pico de disolvente: no se encuentra más de 0,1% de dimetil sulfóxido; no se encuentra más de

0,05% de cualquier otra impureza individual; y la suma de todas las impurezas, incluyendo el dimetil sulfoxido, no es más de 0,2%.

Valoración—

Diluyente—Transferir aproximadamente 950 mL de metanol a un matraz volumétrico de 1 L. Agregar 0,60 mL de di(etilenglicol) metil éter y diluir a volumen con metanol.

Preparación estándar—Disolver en *Diluyente* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Metilsulfonilmetano USP y diluir cuantitativamente con *Diluyente*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,4 mg por mL. Someter a ultrasonido a 50° durante 1 minuto, dejar que se enfríe a temperatura ambiente y mezclar.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 40 mg de Metilsulfonilmetano, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Someter a ultrasonido a 50° durante 1 minuto, dejar que se enfríe a temperatura ambiente y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* <621>)—Equipar el cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama y una columna capilar de 0,53 mm × 30 m, recubierta con una fase G2 de 5 µm. Mantener la temperatura de la columna a 120°. Usar helio como gas transportador, el cual fluye a una velocidad de 5,0 mL por minuto. La relación de partición es 2 : 1. Mantener la temperatura del inyector y del detector a 250°. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de C₂H₆O₂S en la porción de Metilsulfonilmetano tomada, por la fórmula:

$$100C(R_U/R_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Metilsulfonilmetano USP en la *Preparación estándar*; y *R_U* y *R_S* son los cocientes de respuesta entre los picos de metilsulfonilmetano y di(etilenglicol) metil éter, obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Metilsulfonilmetano, Tabletas

» Las Tabletas de Metilsulfonilmetano contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de metilsulfonilmetano (C₂H₆O₂S).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables y resistentes a la luz.

Estándares de referencia USP <11>—ER Metilsulfonilmetano USP.

Identificación—El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Desintegración y disolución <2040>: cumplen con los requisitos de *Desintegración* únicamente; 30 minutos.

Variación de peso <2091>: cumplen con los requisitos.

Valoración—

Diluyente, Preparación estándar y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en *Valoración* en Metilsulfonilmetano.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Disolver en *Diluyente*, una porción del material reducido a polvo fino, pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 1 Tableta, mezclar y someter a ultrasonido durante 15 minutos a 50°. Dejar que se enfríe a temperatura ambiente, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Diluir cuantitativamente con *Diluyente* para obtener una concentración final de 0,4 mg de metilsulfonilmetano por mL. Transferir aproximadamente 1 mL de la suspensión a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y centrifugar durante 20 segundos. Usar el sobrenadante.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de metilsulfonilmetano (C₂H₆O₂S) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$DC(R_U/R_S)$$

en donde *D* es el factor de dilución; *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Metilsulfonilmetano USP en la *Preparación estándar*; y *R_U* y *R_S* son los cocientes de respuesta entre los picos de metilsulfonilmetano y di(etilenglicol) metil éter obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Valeriana

Cambio en la redacción:

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Proteger de la luz y la humedad. ■Almacenar a temperatura ambiente. ■1S (USP30)

Cambio en la redacción:

Sustancias extraíbles—Mezclar 2 g de Valeriana, secada cuidadosamente a 40° y reducida a polvo grueso, con ■20 mL de alcohol al 70 por ciento. ■1S (USP30) y dejar en reposo durante 2 horas, agitando frecuentemente. Filtrar, evaporar ■5 mL. ■1S (USP30) del filtrado en un baño de agua hasta sequedad y secar el residuo a 105°. El peso del residuo seco no es menos de 100 mg (20%).

Cambio en la redacción:

Recuento microbiano <2021>—El recuento bacteriano total no excede de ■10⁵. ■1S (USP30) ufc por g, el recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de ■10³. ■1S (USP30) ufc por g y ■las bacterias Gram-negativas tolerantes a la bilis no exceden de 10³. ■1S (USP30) Cumple con los requisitos de las pruebas para ausencia de *Salmonella* spp y *Escherichia coli*. ■1S (USP30)

Valeriana en Polvo

Cambio en la redacción:

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados. Proteger de la luz y de la humedad. ■ Almacenar a temperatura ambiente. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Etiquetado—La etiqueta indica el nombre científico en latín y, después de la denominación oficial, las partes de la planta ■^{1S} (USP30) de donde se obtuvo el artículo.

Cambio en la redacción:

Características botánicas—

Estructuras de diagnóstico: Numerosos fragmentos de células parenquimatosas que contienen glóbulos de aceite volátil y gránulos de almidón; fragmentos de vasos y traqueidas con engrosamientos escaliformes y reticulares, y fibras estrechas fuertemente ■ lignifica-

das. ■^{1S} (USP30); fragmentos de peridermis y de capa pilífera con pelos radiculares; numerosos gránulos de almidón, raramente simples, principalmente compuestos de 2 a 6 componentes, esferoidales, plano-convexos, de 3 a 20, principalmente de 8 a 12 µm de diámetro, con un hilio central, siendo los gránulos de almidón de un diámetro entre 7 y 30 µm.

Valeriana, Tabletas

Cambio en la redacción:

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz. ■ Almacenar a temperatura ambiente. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP 〈11〉—■ *ER Fluoresceína USP*. ■^{1S} (USP30) *ER Ácido Valerénico USP*.

Excipientes

Excipientes USP y NF, Agrupados por Categoría

En la siguiente tabla de referencia, los excipientes se han agrupado por categoría funcional para indicar su uso más común en la formulación de productos farmacéuticos. La lista de sustancias incluidas en cada categoría no es exhaustiva. La inclusión de una sustancia en una determinada categoría no implica que su uso o elección se limite al indicado ni que no tenga ninguna otra utilidad.

Cambio en la redacción:

Agente Edulcorante

Acesulfamato de Aspartamo
Acesulfamo Potásico
Aspartamo
Azúcar Compresible
Azúcar de Confitería
Dextratos
Dextrosa
■ Eritritol ■^{1S} (NF25)
Excipiente de Dextrosa
Fructosa
Galactosa
Jarabe
Maltitol
Maltosa
Manitol
Sacarina
Sacarina Cálcica
Sacarina Sódica
Sacarosa
Solución de Sorbitol
Sorbitol
Sucralosa
Tagatosa

Cambio en la redacción:

Agente Emulsionante y/o Solubilizante

■ Aceite de Coco ■^{1S} (NF25)
Aceite de Ricino Hidrogenado Polioxilado 40
Aceite de Ricino Polioxilado 25
Ácido Estéarico
Ácido Oleico (Coadyuvante)
Alcohol Oleílico (Estabilizante)
Alcoholes de Lanolina
Cera Emulsionante
Cetoestearil Sulfato de Sodio
Colesterol
Copolímero de Carbómero
Diestearato de Glicerilo
Dietanolamina (Coadyuvante)
Esteratos de Dietilenglicol
Esteratos de Etilenglicol
Esterato de Polioxietileno 50
Esterato de Polioxilo 40

Esterato de Sodio
Éter Polioxil 10 Oleílico
Éter Polioxil 20 Cetoestearílico
Éter Polioxil Estearílico
Éter Polioxil Laurílico
Goma Arábiga
Interpolímero de Carbómero
Lauril Sulfato de Sodio
Lecitina
Monoestearato de Glicerilo
Monoestearato de Propilenglicol
Monoestearato de Sorbitán
Monoetanolamina (Coadyuvante)
Monoglicéridos y Diglicéridos
Monolaurato de Sorbitán
Monolinoleato de Glicerilo
Monooleato de Glicerilo
Monooleato de Sorbitán
Monopalmitato de Sorbitán
Polisorbato 20
Polisorbato 40
Polisorbato 60
Polisorbato 80
Poloxámero
Sesquioleato de Sorbitán
Trioleato de Sorbitán
Trolamina

Cambio en la redacción:

Agente de Recubrimiento

■ Aceite de Coco ■^{1S} (NF25)
Acetato de Celulosa
Acetato Ftalato de Celulosa (ver Celacefato)
Acetato Ftalato de Polivinilo
Acetato Succinato de Hipromelosa
Almidón Pregelatinizado Modificado
Barniz Farmacéutico
Carboximetilcelulosa Sódica
Celaburato
Celacefato (anteriormente Acetato Ftalato de Celulosa)
Cera de Carnauba
Cera Microcristalina
Copolímero de Ácido Metacrílico
Copolímero de Metacrilato de Amonio
■ Copolímero de Metacrilato de Amino ■^{1S} (NF25)
Covodona
Dióxido de Titanio
Dispersión Acuosa de Etilcelulosa
Dispersión de Copolímero de Ácido Metacrílico
■ Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo ■^{1S} (NF25)
Dispersión de Copolímero de Metacrilato de Amonio
Etilcelulosa
Ftalato de Hidroxipropil Metilcelulosa (ver Ftalato de Hipromelosa)

Ftalato de Hipromelosa (anteriormente Ftalato de Hidroxipropil Metilcelulosa)
Gelatina
Goma Laca
Hidroxipropil Celulosa
Hidroxipropil Metilcelulosa (ver Hipromelosa)
Hipromelosa (anteriormente Hidroxipropil Metilcelulosa)
Maltodextrina
Metilcelulosa
Polietilenglicol
Sacarosa
Zeína

Cambio en la redacción:**Aglutinante de Tabletas**

Acetato Succinato de Hipromelosa
Ácido Algínico
Almidón de Maíz
Almidón de Papa
Almidón de Tapioca
Almidón de Trigo
Almidón Pregelatinizado
Almidón Pregelatinizado Modificado
Carboximetilcelulosa Sódica
Celulosa Microcristalina
Copolímero de Carbómero
Copolímero de Metacrilato de Amonio
■Copolímero de Metacrilato de Amino■_{1S} (NF25)
Copoovidona
Dextrina
■Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo■_{1S} (NF25)
Dispersión de Copolímero de Metacrilato de Amonio
Etilcelulosa
Gelatina
Glucosa Líquida

Goma Arábica
Goma Guar
Hidroxipropil Celulosa de Baja Sustitución
Hidroxipropil Metilcelulosa (ver Hipromelosa)
Hipromelosa (anteriormente Hidroxipropil Metilcelulosa)
Homopolímero de Carbómero
Interpolímero de Carbómero
Jarabe
Maltodextrina
Maltosa
Metilcelulosa
Óxido de Polietileno
Povidona

Cambio en la redacción:**Humectante**

■Eritritol■_{1S} (NF25)
Glicerina
Hexilenglicol
Maltitol
Propilenglicol
Solución de Sorbitol-Sorbitán
Sorbitol
Tagatosa

Cambio en la redacción:**Polímero de Membrana**

Acetato de Celulosa
■Copolímero de Metacrilato de Amino■_{1S} (NF25)
Celaburato
Copolímero de Metacrilato de Amonio
■Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo■_{1S} (NF25)
Dispersión de Copolímero de Metacrilato de Amonio

Monografías Oficiales de NF 25

Alfadex

Cambio en la redacción:

» La Alfadex está compuesta por seis unidades D-glucopiranosilo unidas por enlaces alfa-(1-4). Contiene no menos de 98,0 por ciento y no más de 101,0 por ciento de $(C_6H_{10}O_5)_6$, calculado con respecto a la sustancia ■anhidra. ■_{1S} (NF25)

Agregar lo siguiente:

■**Envasado y almacenamiento**—Conservar en envases impermeables. No se especifican requisitos de almacenamiento. ■_{1S} (NF25)

Eliminar lo siguiente:

■**Pérdida por secado** {731}—Secar 1,0 g a 120° durante 2 horas: no pierde más de 10,0% de su peso. ■_{1S} (NF25)

Agregar lo siguiente:

■**Agua, Método I** {921}: no más de 11,0%. ■_{1S} (NF25)

Cambio en la redacción:

Azúcares reductores—

Solución cúprica—Disolver en agua 15 g de sulfato cúprico para obtener 100 mL.

Solución de tartrato—Disolver en agua 2,5 g de carbonato de sodio anhidro, 2,5 g de tartrato de sodio y potasio, 2,0 g de bicarbonato de sodio y 20 g de sulfato de sodio anhidro para obtener 100 mL.

Solución cúprica-tartárica—Inmediatamente antes de usar, mezclar 1 parte de *Solución cúprica* con 25 partes de *Solución de tartrato*.

Reactivo de molibdato de amonio—Mezclar 10 mL de solución de arseniato disódico (6 en 100), 50 mL de una solución de molibdato de amonio (1 en 10) y 90 mL de ácido sulfúrico diluido, y diluir con agua hasta 200 mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 1,0 g de Alfadex, pesado con exactitud, ■y calculado con respecto a la sustancia anhidra, ■_{1S} (NF25) a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua, previamente hervida y enfriada a temperatura ambiente, y mezclar. A 1 mL de esta solución agregar 1 mL de *Solución cúprica-tartárica*. Calentar en un baño de agua durante 10 minutos y enfriar luego a temperatura ambiente. Agregar 10 mL de *Reactivo de molibdato de amonio* y dejar en reposo durante 15 minutos.

Solución estándar—Preparar según se indica en la *Solución de Prueba*, al mismo tiempo, excepto que se debe usar 1 mL de una solución que contenga 20 mg de glucosa por L.

Procedimiento—Medir concomitantemente la absorbancia de la *Solución de prueba* y de la *Solución estándar* a la longitud de onda de máxima absorción, a 740 nm, con respecto a la del agua, con un espectrofotómetro adecuado. La absorbancia de la *Solución de prueba* no es mayor que la de la *Solución estándar* (0,2%).

Cambio en la redacción:

Impurezas que absorben luz—

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 1,0 g de Alfadex, pesado con exactitud, ■y calculado con respecto a la sustancia anhidra, ■_{1S} (NF25) a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua, previamente hervida y enfriada a temperatura ambiente, ■mezclar, y pasar a través de un filtro de 0,2 µm. ■_{1S} (NF25)

Procedimiento—Determinar la absorbancia de la *Solución de prueba* en una celda de 1 cm, con un espectrofotómetro adecuado, después de corregir por el blanco: entre 230 nm y 350 nm, la absorbancia no es mayor de 0,10; y entre 350 nm y 750 nm, la absorbancia no es mayor de 0,05.

Cambio en la redacción:

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de agua y metanol (90 : 10). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* {621}).

Preparación estándar—■Disolver en agua una cantidad, pesada con exactitud, de ER Alfa Ciclodextrina USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg por mL, calculada con respecto a la sustancia anhidra. ■_{1S} (NF25)

Preparación de aptitud del sistema—■Disolver en agua cantidades, pesadas con exactitud, de ER Alfa Ciclodextrina USP, ER Beta Ciclodextrina USP y ER Gamma Ciclodextrina USP para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 1,0 mg por mL de ER Alfa Ciclodextrina USP, calculada con respecto a la sustancia anhidra, y aproximadamente 0,5 mg por mL de ER Beta Ciclodextrina USP y de ER Gamma Ciclodextrina USP, calculadas cada una con respecto a la sustancia anhidra. ■_{1S} (NF25)

Preparación madre de valoración—Transferir 250 mg de Alfadex, pesados con exactitud, ■y calculados con respecto a la sustancia anhidra, ■_{1S} (NF25) a un matraz volumétrico de 25 mL y disolver en agua con ayuda de calor. Enfriar y diluir a volumen con agua.

Preparación de valoración—Transferir 5,0 mL de la *Preparación madre de valoración* a un matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con agua.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* {621})—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de índice de refracción y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de ■₅ µm. ■_{1S} (NF25) La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación de aptitud del sistema* y registrar los cromatogramas durante aproximadamente 3,5 veces el tiempo de retención de alfa ciclodextrina. Registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: ■_{1S} (NF25) la resolución, R, entre los picos de gamma ciclodextrina y alfa ciclodextrina no es menor de 1,5; y para el pico de alfa ciclodextrina, la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más

de 2,0%. ■[NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son de aproximadamente 1,0 para alfa ciclodextrina, aproximadamente 2,2 para beta ciclodextrina y aproximadamente 0,7 para gamma ciclodextrina.]■_{1S} (NF25)

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales. Calcular el porcentaje de (C₆H₁₀O₅)₆ en la porción de Alfadex tomada, por la fórmula:

$$\frac{2500(C/W)(r_U/r_S)}{\text{■}_{1S} \text{ (NF25)}}$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de alfa ciclodextrina en la *Preparación estándar*; ■_{1S} (NF25) *W* es el peso, en mg, de alfa ciclodextrina tomado para preparar la *Preparación madre de valoración*; y ■*r_U* y ■*r_S*■_{1S} (NF25) son las respuestas de los picos de alfa ciclodextrina obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente.

Agregar lo siguiente:

■Copolímero de Amino Metacrilato

» El Copolímero de Amino Metacrilato es un copolímero completamente polimerizado de metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo, metacrilato de butilo y metacrilato de metilo. Contiene no menos de 20,8 por ciento y no más de 25,5 por ciento de grupos dimetilaminoetilo (C₄H₁₀N), calculado con respecto a la sustancia seca.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a una temperatura que no exceda de 25°.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Copolímero de Amino Metacrilato USP*.

Color de la solución—La absorbancia de la *Solución de prueba* preparada en la prueba de *Viscosidad*, determinada en una celda de 1 cm a 420 nm con un espectrofotómetro adecuado, no es mayor de 0,300. Usar agua como blanco.

Identificación—

A: *Absorción en el Infrarrojo* (197K).

B: Verter 1 mL de la *Solución de prueba* preparada en la prueba de *Viscosidad* sobre una placa de vidrio y dejar que se evapore el disolvente: se produce una película incolora transparente.

Viscosidad (911)—

Solución de prueba—Disolver 12,5 g en una mezcla de 35,0 g de acetona y 52,5 g de alcohol isopropílico. [NOTA—Reservar una porción de esta solución para la prueba de *Color de la solución*.]

Procedimiento—Equipar un viscosímetro rotatorio adecuado con un sistema adaptador compuesto de un cilindro de medición y un vástago. El cilindro de medición tiene un diámetro interno de 2,762 cm y una altura de 13,50 cm; el vástago tiene un diámetro de 2,515 cm, una altura de 9,074 cm y un eje de 0,40 cm de diámetro. Transferir 16 mL de la *Solución de prueba* al cilindro de medición y ajustar la temperatura de la solución y el adaptador a 20 ± 0,1°. Mientras el vástago gira a 30 rpm, observar y registrar inmediatamente la lectura de la escala. Convertir la lectura de la escala a centipoises multiplicando la lectura por la constante del viscosímetro, el sistema adaptador y la velocidad empleada. La viscosidad está entre 3 y 6 centipoises.

Pérdida por secado (731)—Secar a 110° durante 3 horas: no pierde más de 2,0% de su peso.

Residuo de incineración (281): no más de 0,1%.

Límite de monómeros—

PRUEBA 1, LÍMITE DE METACRILATO DE BUTILO Y METACRILATO DE METILO—

Solución amortiguadora de fosfato (0,0625 M) de pH 2,0—Preparar una solución acuosa que contenga 8,9 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y 8,5 g de fosfato monobásico de potasio por L. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 2,0.

Fase móvil—Preparar una mezcla de metanol y *Solución amortiguadora de fosfato (0,0625 M) de pH 2,0* (55 : 45).

Solución estándar—Preparar una solución en acetonitrilo con una concentración de aproximadamente 1000 µg por mL de metacrilato de butilo y de metacrilato de metilo. Diluir 1,0 mL de la solución con agua a 250,0 mL y mezclar.

Solución de prueba—Disolver aproximadamente 1,0 g de Copolímero de Amino Metacrilato, pesado con exactitud, en *Solución amortiguadora de fosfato (0,0625 M) de pH 2,0* y diluir con *Solución amortiguadora de fosfato (0,0625 M) de pH 2,0* a 50,0 mL, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 205 nm y una columna de 4,6 mm × 12 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre metacrilato de butilo y metacrilato de metilo no es menor de 10; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 3,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en µg, de cada monómero en la porción de Copolímero de Amino Metacrilato tomada, por la fórmula:

$$50C(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en µg por mL, de cada monómero en la *Solución estándar*; y *r_U* and *r_S* son las respuestas de los picos para cada monómero obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentra más de 0,1% de cada monómero.

PRUEBA 2, LÍMITE DE METACRILATO DE 2-DIMETILAMINOETOILO—

Solución de fosfato monobásico de potasio (0,025 M)—Preparar una solución acuosa que contenga 3,4 g de fosfato monobásico de potasio por L.

Fase móvil—Preparar una mezcla de *Solución de fosfato monobásico de potasio (0,025 M)* y tetrahidrofurano (75 : 25).

Solución estándar—Preparar una solución en tetrahidrofurano con una concentración de aproximadamente 200 µg por mL de metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo. Diluir 2,0 mL de la solución con tetrahidrofurano a 50,0 mL y mezclar.

Solución de prueba—Disolver en tetrahidrofurano aproximadamente 1,0 g de Copolímero de Amino Metacrilato, pesado con exactitud, diluir con tetrahidrofurano a 50,0 mL y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 215 nm y una columna de 4,6 mm × 12 cm rellena con material L8. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir la respuesta del pico principal. Calcular la cantidad, en µg, de metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo en la porción de Copolímero de Amino Metacrilato tomada, por la fórmula:

$$50C(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en µg por mL, del monómero en la *Solución estándar*; y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos de metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentra más de 0,1%.

Valoración—Disolver 0,20 g en una mezcla de 4 mL de agua y 96 mL de ácido acético glacial, y mezclar. Valorar con ácido perclórico 0,1 N SV, determinando el punto final potenciométricamente (ver *Volumetría* (541)). Un mL de ácido perclórico 0,1 N es equivalente a 7,21 mg de los grupos de dimetilaminoetilo (C₄H₁₀N).■^{1S} (NF25)

Silicato de Calcio

Cambio en la redacción:

» El Silicato de Calcio, ■cristalino o amorfo,■^{1S} (NF25) es un compuesto de óxido de calcio y dióxido de silicio. Contiene no menos de 4,0 por ciento de óxido de calcio y no menos de ■35,0■^{1S} (NF25) por ciento de dióxido de silicio.

Cambio en la redacción:

pH (791): entre 8,4 y ■11,2;■^{1S} (NF25) determinado en una suspensión acuosa bien mezclada (1 en 20).

Cambio en la redacción:

Límite de fluoruro—

■NOTA—Almacenar todas las soluciones en envases plásticos.
Solución amortiguadora—Transferir 147 g de citrato de sodio a un matraz volumétrico de 500 mL, disolver y diluir a volumen con agua.
Solución amortiguadora de ajuste de la fuerza iónica—Transferir 42 mL de ácido clorhídrico, 121 g de tris(hidroximetil)aminometano y 115 g de tartrato de sodio a un matraz volumétrico de 500 mL que contenga 250 mL de agua. Mezclar para disolver y diluir a volumen con agua.
Sistema de electrodos—Usar un electrodo específico indicador de ión fluoruro y un electrodo de referencia adecuado conectados a un medidor de pH capaz de medir potenciales con una reproducibilidad de ±0,2 mV (ver pH (791)).
Solución madre del estándar—Disolver en agua una cantidad, pesada con exactitud, de ER Fluoruro de Sodio USP para obtener una solución que contenga 221 µg por mL. Cada mL de esta solución madre contiene 100 µg de ión fluoruro.
Solución de prueba—Transferir aproximadamente 2,0 g de Silicato de Calcio, pesados con exactitud, a un vaso de precipitados de teflón de 100 mL que contenga una barra magnética. Agregar 20 mL de agua y 2,0 mL de ácido clorhídrico. Cubrir con un vidrio de reloj y calentar hasta ebullición vigorosa durante 1 minuto, mezclando constantemente. Retirar del calor y enfriar. Transferir la suspensión enfriada a un vaso de precipitados de teflón de 100 mL. Agregar 25 mL de *Solución amortiguadora* y ajustar con hidróxido de amonio o ácido clorhídrico a un pH entre 5 y 6. Agregar 50 mL de *Solución amortiguadora de ajuste de la fuerza iónica* y agua para obtener 100 mL de solución.
Línea de respuesta estándar—Obtener una línea de respuesta estándar con cuatro soluciones estándar que contengan 0; 0,10; 0,20 y 0,40 µg de fluoruro por mL del siguiente modo. Agregar 23 mL de agua, 2 mL de ácido clorhídrico y 25 mL de *Solución amortiguadora* a un vaso de precipitados de plástico de 100 mL. Ajustar con hidróxido de amonio a un pH entre 5 y 6, y agregar *Solución amortiguadora de ajuste de la fuerza iónica* para obtener 100 mL de solución. Insertar el electrodo en la solución, mezclar durante al menos 15 minutos y registrar el potencial de la *Solución estándar* que contenga 0 µg de fluoruro por mL. Cuando se estabiliza el electrodo, agregar 100 µL de la *Solución madre del estándar* al vaso de precipitados y mezclar. Dejar que el electrodo se estabilice

durante 5 minutos y medir el potencial de la *Solución estándar* que contenga 0,10 µg de fluoruro por mL. De manera similar, agregar otros 100 µL y 200 µL de la *Solución madre del estándar* y registrar el potencial de las *Soluciones estándar* que contengan 0,20 µg de fluoruro por mL y 0,40 µg de fluoruro por mL, respectivamente. Después de cada adición, seguir mezclando durante 5 minutos antes de registrar la lectura.
Procedimiento—Insertar el electrodo calibrado en la *Solución de prueba*, mezclar durante 5 minutos y registrar la medición. A partir del potencial medido de la *Solución de prueba* y de la *Línea de respuesta estándar*, determinar la concentración, *C*, en µg por mL, de ión fluoruro en la *Solución de prueba*. Calcular la cantidad, en µg por g de fluoruro en Silicato de Calcio, por la fórmula:

100C/W

en donde *W* es el peso, en g, de Silicato de Calcio tomado. El límite es 10 µg por g.■^{1S} (NF25)

Cambio en la redacción:

Valoración de dióxido de silicio—Transferir ■la cantidad apropiada de Silicato de Calcio (ver la *Tabla 2*),■^{1S} (NF25) pesada con exactitud, a un vaso de precipitados, agregar 5 mL de agua y 10 mL de ácido perclórico, y calentar hasta que se produzcan humos blancos densos de ácido perclórico. Tapar el vaso de precipitados con un vidrio de reloj y continuar el calentamiento durante ■2 horas.■^{1S} (NF25) Dejar que se enfríe, agregar 30 mL de agua, filtrar y lavar el precipitado con 200 mL de agua caliente. [NOTA—Conservar el filtrado y los lavados combinados para usar en la *Valoración de óxido de calcio*.] Transferir el papel de filtro y su contenido a un crisol de platino, calentar lentamente hasta sequedad, luego calentar lo suficiente para carbonizar el papel de filtro ■e incinerar aproximadamente entre 900° y 1000° ■^{1S} (NF25) hasta peso constante. Humedecer el residuo con 5 gotas de ácido ■perclórico,■^{1S} (NF25) agregar 15 mL de ácido fluorhídrico, calentar con cuidado en una placa de calentamiento hasta que todo el ácido se haya eliminado e incinerar a una temperatura no inferior a 1000° hasta peso constante. Enfriar en un desecador y pesar: la pérdida de peso representa el peso del SiO₂. El porcentaje de dióxido de silicio en el Silicato de Calcio está entre 90,0% y 110,0% del contenido declarado en el etiquetado o dentro del intervalo de porcentajes declarado en el etiquetado.

■Tabla 2

Peso de la Muestra	Contenido de Óxido de Calcio
aproximadamente 400 mg	más de 25%
aproximadamente 600 mg	11%–25%
aproximadamente 1000 mg	4%–10%

■^{1S} (NF25)

Cambio en la redacción:

Valoración de óxido de calcio—Neutralizar al tornasol, empleando hidróxido de sodio 1 N, la combinación del filtrado con los lavados reservada en la *Valoración de dióxido de silicio*. Mientras se revuelve, agregar aproximadamente ■10 mL,■^{1S} (NF25) de edetato disódico 0,05 M SV desde una bureta de 50 mL. Agregar 15 mL de hidróxido de sodio 1 N y 300 mg de azul de hidroxinaftol, y continuar la valoración hasta un punto final azul. Cada mL de edetato disódico 0,05 M equivale a 2,804 mg de CaO. El porcentaje de CaO en el Silicato de Calcio está entre 90,0% y 110,0% del contenido declarado en el etiquetado o dentro del intervalo de porcentajes declarado en el etiquetado.

Agregar lo siguiente:**■ Aceite de Coco**

Coconut oil.

Aceite de coco [8001-31-8].

» El Aceite de Coco es el aceite fijo refinado obtenido de las semillas de *Cocos nucifera* Linné (Fam. Palmae).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz y completamente llenos. No se especifican requisitos de almacenamiento.

Identificación—Cumple con los requisitos de la prueba de Composición de ácidos grasos.

Intervalo de fusión (741): entre 23° y 26°.

Índice de acidez (401): no más de 0,5; determinado en 20,0 g.

Índice de peróxido (401): no más de 5,0.

Materia insaponificable (401): no más de 1,0%.

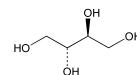
Composición de ácidos grasos—El Aceite de Coco presenta el siguiente perfil de composición de ácidos grasos, según se indica en la sección Composición de Ácidos Grasos en Grasas y Aceites Fijos (401):

Longitud de la cadena de carbono	Número de enlaces dobles	Porcentaje (%)
6	0	≤1,5
8	0	5,0–11,0
10	0	4,0–9,0
12	0	40,0–50,0
14	0	15,0–20,0
16	0	7,0–12,0
18	0	1,5–5,0
20	0	≤0,2
16	1	≤1,0
18	1	4,0–10,0
18	2	1,0–3,0
18	3	≤0,2
20	1	≤0,2

Agua, Método I (921): no más de 0,1%, usando 50 mL de cloroformo como disolvente en lugar de 35 a 40 mL de metanol.

Arsénico, Método II (211): no más de 0,5 µg por g.

Impurezas alcalinas—Mezclar 10 mL de acetona recién destilada y 0,3 mL de agua y agregar 0,05 mL de azul de bromofenol SR. Neutralizar la solución a color verde, si fuera necesario, con ácido clorhídrico 0,01 N o hidróxido de sodio 0,01 N. Agregar 10 mL de Aceite de Coco, agitar y dejar en reposo. Valorar con ácido clorhídrico 0,01 N SV para cambiar el color de la capa superior a amarillo: no se requiere más de 0,1 mL de ácido clorhídrico 0,01 N SV. ■1S (NF25)

Agregar lo siguiente:**■ Eritritol**C₄H₁₀O₄ 122,12

1,2,3,4-Butanetetrol.

Butano1,2,3,4-tetrol (*meso*-eritritol) [149-32-6].

» El Eritritol se obtiene de la fermentación del hidrolizado enzimático de almidón (a partir de almidones como el trigo y el maíz). Se obtiene del caldo de fermentación de levaduras osmofílicas adecuadas como *Moniliella pollinis* o *Trichosporonoides megachiliensis*. Contiene no menos de 96,0 por ciento y no más de 102,0 por ciento de C₄H₁₀O₄, calculado con respecto a la sustancia anhidra.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados. Almacenar a temperatura ambiente.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Eritritol USP*.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (191K).

B: Intervalo de fusión (741): entre 119° y 123°.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° durante 4 horas; no pierde más de 0,2% de su peso. Usar aproximadamente 8 g de muestra.

Agua, Método I (921): no más de 0,5%.

Conductividad—Disolver 20,0 g de Eritritol en un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con el mismo disolvente. Con un conductímetro adecuado, seleccionar una celda de conductividad que sea apta para las propiedades y la conductividad de la solución en análisis. Emplear un material de referencia certificado¹ —por ejemplo, una solución de cloruro de potasio—que sea adecuada para efectuar la medición. El valor de la conductividad del material de referencia certificado debe ser aproximado al valor de conductividad esperado de la solución en análisis. Después de calibrar el aparato con una solución de material de referencia certificado, enjuagar la celda de conductividad varias veces con agua y, por lo menos dos veces, con la solución acuosa en análisis. Medir la conductividad de la solución a una temperatura de 20° mientras se mezcla suavemente con un mezclador magnético: la conductividad no es más de 20 µS por cm.

Límites microbianos (61)—El recuento total de microorganismos aerobios mediante el *Método de Placa* no es más de 1000 ufc por g. El recuento total de hongos filamentosos y levaduras no es más de 100 ufc por g. Cumple con los requisitos de las pruebas para determinar la ausencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.

Residuo de incineración (281): no más de 0,1%.

Límite de plomo—

Solución estándar de plomo—Preparar según se indica en *Reactivos Especiales en Metales Pesados* (231).

Solución de prueba—Disolver 20,0 g de Eritritol en ácido acético diluido y diluir con ácido acético diluido a 100 mL. Agregar 2,0 mL de una solución de pirrolidinoditiocarbamato de amonio saturada (que contenga aproximadamente 10 g de pirrolidinoditiocarbamato

¹ Se pueden utilizar soluciones de calibración de conductividad, disponibles comercialmente, para la normalización del conductímetro, estandarizadas por métodos rastreables al Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés). Las soluciones preparadas según las instrucciones dadas en la Norma ASTM D1125 de la *American Society for Testing and Materials* (Sociedad Estadounidense de Pruebas y Materiales [ASTM, por sus siglas en inglés]) pueden usarse, siempre que la conductividad de la solución resultante sea la misma que la de la solución preparada a partir del material certificado por el NIST.

de amonio por L) y 10,0 mL de metil isobutil cetona, y agitar durante 30 segundos. Proteger de la luz brillante. Dejar que las dos capas se separen y utilizar la capa de metil isobutil cetona.

Solución blanco—Preparar según se indica en *Solución de prueba*, excepto que se debe omitir el uso de Eritritol.

Soluciones estándar—Preparar según se indica en *Solución de prueba*, excepto que se deben preparar tres soluciones agregando 0,5 mL, 1,0 mL y 1,5 mL de *Solución estándar de plomo* además de los 20,0 g de Eritritol.

Procedimiento—Ajustar el espectrofotómetro de absorción atómica a cero usando metil isobutil cetona tratada previamente según se describe en *Solución de prueba*, pero sin el agregado de muestra. Usar una lámpara de plomo de cátodo hueco como fuente de radiación, una llama de aire-acetileno y una longitud de onda de análisis de 283,3 nm. Introducir la *Solución de prueba* y cada una de las tres *Soluciones estándar* en el instrumento. Registrar la lectura estable de absorbancia. Graficar las lecturas de absorbancia en función de las concentraciones conocidas de plomo agregado (en µg) y trazar una línea recta. Extrapolar la línea hasta la intersección con el eje de concentración, que equivale a la concentración, en mg por kg, de plomo en la muestra. No se encuentra más de 0,5 mg por kg.

Compuestos relacionados—

Fase móvil, Preparación de valoración, Preparación estándar, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Solución estándar—Transferir 2,0 mL de la *Preparación estándar* a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 1 mg de eritritol por mL.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución de prueba* y de la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza encontrada, por la fórmula:

$$VC/W (r_i/r_s)$$

en donde *V* es el volumen, en mL, de la *Solución de prueba*; *C* es la concentración de Eritritol, en mg por mL, en la *Solución estándar*; *W* es la cantidad de Eritritol, en mg, tomada para preparar la *Solución de prueba*; *r_i* es la respuesta del pico para la *Solución de prueba*; y *r_s* es la respuesta del pico de eritritol en la *Solución estándar*: no se encuentra más de 2,0% de cualquier impureza individual, y no se encuentra más de 2,0% de impurezas totales.

Valoración—

Fase móvil—Usar ácido sulfúrico al 0,01% filtrado y desgasificado.

Preparación estándar—Disolver una cantidad de ER Eritritol USP, pesada con exactitud, en agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 50 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir 500 mg de Eritritol, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar.

Solución de aptitud del sistema—Transferir cantidades de ER Eritritol USP y glicerol, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico adecuado, disolver y diluir con agua para obtener una solución con concentraciones de aproximadamente 0,05 mg por mL cada uno.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector de índice de refracción y una columna de 7,8 mm x 30 cm o equivalente rellena con material L17. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,8 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 70°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,0 para eritritol y 1,1 para glicerol; y la resolución, *R*, entre eritritol y glicerol no es menor de 2,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas

durante un período equivalente a tres veces el tiempo de retención de eritritol y medir las respuestas de los picos. Calcular la cantidad, en mg, de C₄H₁₀O₄ en la porción de Eritritol tomada, por la fórmula:

$$VC(r_u/r_s)$$

en donde *V* es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración*; *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Eritritol USP en la *Preparación estándar*; y *r_u* y *r_s* son las respuestas de los picos de eritritol obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (NF25)

Agregar lo siguiente:

■Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo

[9010-88-2].

» La Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo es una dispersión acuosa de un copolímero de acrilato de etilo y metacrilato de metilo, con un peso molecular promedio de aproximadamente 800 000. Puede contener agentes emulsionantes adecuados.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados. Almacenar entre 5° y 25°, con excursiones permitidas hasta 30°. No congelar.

Etiquetado—Etiquetar indicando el nombre y la cantidad de cualquier emulsionante agregado.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo USP*.

Identificación, Absorción en el Infrarrojo (197K)—

Muestra de prueba—Secar según se especifica en la prueba de Pérdida por secado.

Viscosidad (911)—Equipar un viscosímetro rotativo adecuado con un sistema adaptador que consiste de un cilindro de medición y un vástago. El cilindro de medición tiene un diámetro interno de 2,762 cm y una profundidad de 13,50 cm; el vástago tiene un diámetro de 2,515 cm y una altura de 9,074 cm, y tiene un eje de 0,40 cm de diámetro. Mezclar la Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo, pipetear y transferir 16 mL en el cilindro de medición, ajustar la temperatura de la Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo y adaptar a 20 ± 0,1°. Con el vástago girando a 30 rpm, observar y registrar inmediatamente la lectura de la escala. Convertir la lectura de la escala a centipoises multiplicando la lectura por la constante para el viscosímetro, el sistema adaptador y la velocidad usada. La viscosidad no es más de 50 centipoises.

Límites microbianos (61)—El recuento total de microorganismos aerobios no excede de 1000 ufc por g y el recuento total de hongos filamentosos y levaduras no excede de 100 ufc por g.

pH (791): entre 5,5 y 8,6.

Pérdida por secado (731)—Secar a 110° durante 3 horas: pierde entre 68,5% y 71,5% de su peso.

Residuo de incineración (281)—Utilizando condiciones de calentamiento moderadas (por ej., baño de vapor, baño de arena) para evitar pérdida de material, evaporar la Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo hasta sequedad antes de la incineración: no se obtiene más de 0,4% de residuo, calculado con respecto a la sustancia sin secar.

Límite de monómeros—

Solución de perclorato sódico—Disolver 3,5 g de perclorato sódico en 100 mL de agua.

Acido fosfórico de pH 2,0—Diluir ácido fosfórico con agua para obtener una solución con un pH de 2,0.

Fase móvil—Preparar una mezcla de *Acido fosfórico de pH 2,0* y metanol (80:20), filtrar y desgasificar. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Preparar una solución en tetrahydrofurano con concentraciones de aproximadamente 2 µg por mL de acrilato de etilo y de metacrilato de metilo. Agregar 5,0 mL de una *Solución de perclorato sódico* a 10,0 mL de esta solución y mezclar. Diluir 5,0 mL de la mezcla con agua hasta 10,0 mL y mezclar.

Solución madre de prueba—Disolver 1,0 g de Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo con tetrahydrofurano, y diluir a 50 mL con el mismo disolvente.

Solución de prueba—Agregar 10,0 mL de la *Solución madre de prueba* a 5,0 mL de *Solución de perclorato sódico*, gota a gota, mezclando continuamente. Centrifugar y filtrar el sobrenadante transparente. Diluir 5,0 mL del sobrenadante transparente con agua a 10,0 mL y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 200 nm y una columna de 4,6 mm × 120 mm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el acrilato de etilo y el metacrilato de metilo no es menor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0% para cada analito.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en µg, de cada monómero en la porción de Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo tomada, por la fórmula:

$$10C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en µg por mL, del monómero en la *Solución estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos para el monómero obtenido a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentra más de 0,01% de monómeros totales.

Contenido de coágulo—Pesar con exactitud un tamiz de acero inoxidable con aberturas de 125 µm y filtrar 100 g de Dispersión de Copolímero de Acrilato de Etilo y Metacrilato de Metilo a través del mismo. Lavar el tamiz con agua destilada hasta obtener un filtrado transparente y secar el tamiz a 105° hasta peso constante: el peso del residuo no excede de 1000 mg (1%). ■^{1S} (NF25)

Óxido de Polietileno

Cambio en la redacción:

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz. ■No se especifican requisitos de almacenamiento. ■^{1S} (NF25)

Cambio en la redacción:

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K)—

Muestra de prueba: secada previamente al vacío, a temperatura ambiente, hasta peso constante.

B: La viscosidad de la solución en alcohol isopropílico acuoso, determinada a 25° ■empleando un viscosímetro adecuado con validación apropiada. ■^{1S} (NF25) y en una concentración que se indica en el etiquetado, está comprendida dentro del intervalo de viscosidad indicado en el etiquetado.

Cambio en la redacción:

Límite de óxido de etileno libre—

Solución madre del estándar—[Precaución—El óxido de etileno es tóxico e inflamable. Preparar las soluciones en una campana de extracción bien ventilada.] Emplear las condiciones especiales de manipulación que se describen a continuación para llevar a cabo la preparación. A temperatura ambiente, el óxido de etileno es un gas. Generalmente se almacena en un cilindro de gas graduado o en una pequeña bomba metálica de presión. Enfriar el cilindro en un refrigerador antes de usar. Transferir aproximadamente 5 mL del óxido de etileno líquido a un vial para suero de 10 mL frío. Sellar el vial y guardar en un refrigerador. Transferir aproximadamente 40 g de acetona, pesados con exactitud, a un vial para suero tarado de 50 mL, que pueda sellarse herméticamente con un septo con recubrimiento interno de teflón y una tapa metálica precintada. Sellar el vial y pesarlo con exactitud. Transferir aproximadamente 60 µL del óxido de etileno líquido al mismo vial con una jeringa hermética para cromatografía de gases previamente enfriada en un refrigerador. Pesar el vial y determinar la cantidad agregada por la diferencia de peso. Esta *Solución madre del estándar* contiene aproximadamente 1 µg de óxido de etileno por µL. [NOTA—Esta solución puede guardarse durante 1 semana en el vial para suero sellado con precinto, en un congelador.]

Preparaciones estándar—Transferir 1,0 g del Óxido de Polietileno en análisis a cuatro viales para suero, tarados, de 50 mL, que puedan sellarse herméticamente con septos con recubrimiento interno de teflón y tapa metálica precintada. Sellar los viales. A cada uno de los viales, transferir respectivamente 2,0 µL, 4,0 µL, 6,0 µL y 8,0 µL de la *Solución madre del estándar* y mezclar. Estos viales contienen aproximadamente 2 µg, 4 µg, 6 µg y 8 µg de óxido de etileno, respectivamente, a partir de la *Solución madre del estándar*. Calentar los viales a 100° durante 30 minutos y enfriar a temperatura ambiente.

Preparación de prueba—Transferir aproximadamente 1 g del Óxido de Polietileno en análisis, pesado con exactitud, a un vial para suero tarado de 50 mL que pueda ser sellado herméticamente con un septo con recubrimiento interno de teflón y una tapa metálica precintada. Pesar el vial y determinar la cantidad de Óxido de Polietileno agregada por la diferencia de peso. Sellar el vial, calentar a 100° durante 30 minutos y enfriar a temperatura ambiente.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama, una columna capilar de 0,53 mm × 10 m con una capa de 20 µm de fase G45 y un sistema de inyección dividida. El gas transportador es helio, que fluye a una velocidad de aproximadamente 15 mL por minuto. El gas de compensación también es helio, con una velocidad de flujo en el sistema de inyección dividida de aproximadamente 15 mL por minuto. Mantener las temperaturas del inyector y del detector aproximadamente a 200° y 250°, respectivamente. Mantener la temperatura de la columna aproximadamente a 70° durante 5 minutos después de la inyección, programar luego para aumentar a una velocidad de 10° por minuto hasta aproximadamente 200° y mantener esta temperatura durante 5 minutos. Inyectar en el cromatógrafo de gases 300 µL de la fase gaseosa del vial de *Preparación estándar* que contiene aproximadamente 6 µg de óxido de etileno de la *Solución madre del estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 5%. ■[NOTA—Se preparan varios viales para inyecciones repetidas.] ■^{1S} (NF25)

Procedimiento—[NOTA—Para efectuar las inyecciones, se puede emplear un aparato para muestreo de fase gaseosa que transfiera automáticamente la cantidad medida de la fase gaseosa.] Con una jeringa impermeable a los gases, inyectar por separado en el cromatógrafo de gases volúmenes iguales (aproximadamente 300 µL) de la fase gaseosa de cada una de las *Preparaciones estándar* y de la *Preparación de prueba*, registrar los cromatogramas y medir

las áreas de los picos. Determinar, por comparación de los tiempos de retención, si se detecta óxido de etileno en la *Preparación de prueba*. Graficar las respuestas de ■la *Preparación de prueba* y ■1S (NF25) las *Preparaciones estándar* en función del contenido, en µg, de óxido de etileno en cada vial, proporcionadas por la *Solución madre del estándar*; trazar la línea recta que mejor se ajuste a los ■cinco ■1S (NF25) puntos; y calcular el coeficiente de correlación para la línea. ■[NOTA—El contenido de óxido de etileno, proporcionado por la *Solución madre del estándar*, es 0 µg en la *Preparación de prueba*.] ■1S (NF25) Un sistema adecuado es aquel que produce una línea con un coeficiente de correlación no menor de 0,99. Extrapolar la línea hasta que intercepte el eje de contenido en el lado negativo. A partir de la intercepción, determinar la cantidad total, T_U , en µg, de óxido de etileno en la *Preparación de prueba*. Calcular el porcentaje de óxido de etileno en la porción de Óxido de Polietileno tomada, por la fórmula:

$$100(T_U / W)$$

en donde W es el peso, en µg, de Óxido de Polietileno tomado para preparar la *Preparación de prueba*: el límite es 0,001%.

Poliisobutileno

Cambio en la redacción:

Pérdida por secado (731)—Secar una muestra de 5 g a 105° durante 2 horas: no pierde más de ■0,3% ■1S (NF25) de su peso.

Fosfato Tribásico de Sodio

Cambio en la redacción:

Pérdida por incineración (733)—■Pesar con exactitud aproximadamente 2 g, secar a 110° durante 5 horas, luego incinerar aproximadamente a 800° durante 30 minutos: ■1S (NF25) la forma anhidra pierde no más de 2,0% de su peso, el monohidrato pierde entre 8,0% y 11,0% de su peso, y el dodecahidrato pierde entre 45,0% y 57,0% de su peso.

Monografías Oficiales Generales de USP 30

Agua Estéril para Inhalación

Eliminar lo siguiente:

■ **pH** <791>: entre 4,5 y 7,5 en una solución que contenga 0,3 mL de solución saturada de cloruro de potasio por cada 100 mL de muestra de prueba. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ **Amoníaco**—Para envases con volumen de llenado de menos de 50 mL, diluir 50 mL del producto con 50 mL de *Agua de Alta Pureza* (ver *Reactivos en Envases* <661>) y usar esta dilución como solución de prueba; cuando el volumen de llenado sea de 50 mL o más, usar 100 mL del producto como solución de prueba. Agregar 2 mL de yodomercuriato de potasio alcalino SR a 100 mL de la solución de prueba: cualquier color amarillo que se produzca inmediatamente no es más oscuro que el color de un control que contenga 30 µg de amoníaco agregado (proporcionado por el agregado de 1 mL de la solución final que se obtiene por dilución de 3,0 mL de amoníaco SR hasta 100 mL con *Agua de Alta Pureza*; y diluyendo luego 1,0 mL de esta solución a 100 mL) en 100 mL de *Agua de Alta Pureza*. Ésto corresponde a un límite de 0,6 mg por L para envases con un volumen de llenado de menos de 50 mL y de 0,3 mg por L cuando el volumen de llenado sea de 50 mL o más. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ **Calcio**—A 100 mL, agregar 2 mL de oxalato de amonio SR: no se produce turbidez. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ **Dióxido de carbono**—A 25 mL, agregar 25 mL de hidróxido de calcio SR: la mezcla permanece transparente. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ **Cloruros**—A 20 mL colocados en un tubo de comparación de color, agregar 5 gotas de ácido nítrico y 1 mL de nitrato de plata SR y mezclar suavemente: la turbidez formada dentro de los 10 minutos no es mayor que la producida por una solución control, constituida por 20 mL de *Agua de Alta Pureza* (ver *Reactivos en Envases* <661>) con 10 µg de cloruro (0,5 mg por L), cuando se la trata de manera similar y se la observa hacia abajo sobre una superficie oscura, iluminando lateralmente los tubos. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ **Sulfatos**—A 100 mL, agregar 1 mL de cloruro de bario SR: no se produce turbidez. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ **Conductividad del agua** <645>—Realizar *Etapa 2, Paso 4* usando una cantidad suficiente de agua para realizar la prueba. La conductividad no es más de 25 µS/cm para envases con un volumen nominal de 10 mL o menos a $25 \pm 1^\circ$; y no más de 5 µS/cm para envases con un volumen nominal de más de 10 mL a $25 \pm 1^\circ$. ■^{1S} (USP30)

Agua Estéril para Irrigación

Eliminar lo siguiente:

■ **pH** <791>: entre 5,0 y 7,0 en una solución que contenga 0,3 mL de solución saturada de cloruro de potasio por cada 100 mL de muestra de prueba. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ **Amoníaco**—Para envases con volumen de llenado de menos de 50 mL, diluir 50 mL del producto con 50 mL de *Agua de Alta Pureza* (ver *Reactivos en Envases* <661>) y usar esta dilución como solución de prueba; cuando el volumen de llenado sea de 50 mL o más, usar 100 mL del producto como solución de prueba. Agregar 2 mL de yodomercuriato de potasio alcalino SR a 100 mL de la solución de prueba: cualquier color amarillo que se produzca inmediatamente no es más oscuro que el color de un control que contenga 30 µg de amoníaco agregado (proporcionado por el agregado de 1,76 mL de hidróxido de amonio 1,0 N) en 100 mL de *Agua de Alta Pureza*. Ésto corresponde a un límite de 0,6 mg por L para envases con un volumen de llenado de menos de 50 mL y de 0,3 mg por L cuando el volumen de llenado sea de 50 mL o más. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ **Calcio**—A 100 mL, agregar 2 mL de oxalato de amonio SR: no se produce turbidez. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■**Dióxido de carbono**—A 25 mL, agregar 25 mL de hidróxido de calcio SR: la mezcla permanece transparente. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■**Cloruros**—A 20 mL colocados en un tubo de comparación de color, agregar 5 gotas de ácido nítrico, 1 mL de nitrato de plata SR y mezclar suavemente: la turbidez formada dentro de los 10 minutos no es mayor que la producida por una solución control, constituida por 20 mL de *Agua de Alta Pureza* (ver *Reactivos en Envases* (661)) con 10 µg de cloruro (0,5 mg por L), cuando se la trata de manera similar y se la observa hacia abajo sobre una superficie oscura, iluminando lateralmente los tubos. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■**Sulfatos**—A 100 mL, agregar 1 mL de cloruro de bario SR: no se produce turbidez. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Conductividad del agua** (645)—Realizar *Etapa 2, Paso 4* usando una cantidad suficiente de agua para realizar la prueba. La conductividad no es más de 25 µS/cm para envases con un volumen nominal de 10 mL o menos a $25 \pm 1^\circ$; y no más de 5 µS/cm para envases con un volumen nominal de más de 10 mL a $25 \pm 1^\circ$. ■^{1S} (USP30)

Agua Purificada Estéril

Eliminar lo siguiente:

■**pH** (791): entre 5,0 y 7,0 en una solución que contenga 0,3 mL de solución saturada de cloruro de potasio por cada 100 mL de muestra de prueba. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■**Amoniaco**—Para envases con volumen de llenado de menos de 50 mL, diluir 50 mL del producto con 50 mL de *Agua de Alta Pureza* (ver *Reactivos en Envases* (661)) y usar esta dilución como solución de prueba; cuando el volumen de llenado sea de 50 mL o más, usar 100 mL del producto como solución de prueba. Agregar 2 mL de yodomercuriato de potasio alcalino SR a 100 mL de la solución de prueba: cualquier color amarillo que se produzca inmediatamente no es más oscuro que el color de un control que contenga 30 µg de amoníaco agregado (proporcionado por el agregado de 1 mL de la solución final que se obtiene por dilución de 3,0 mL de amoníaco SR hasta 100 mL con *Agua de Alta Pureza*; y diluyendo luego 1,0 mL de esta solución a 100 mL) en 100 mL de *Agua de Alta Pureza*. Esto corresponde a un límite de 0,6 mg por L para envases con un volumen de llenado de menos de 50 mL y de 0,3 mg por L cuando el volumen de llenado sea de 50 mL o más. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■**Calcio**—A 100 mL, agregar 2 mL de oxalato de amonio SR: no se produce turbidez. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■**Dióxido de carbono**—A 25 mL, agregar 25 mL de hidróxido de calcio SR: la mezcla permanece transparente. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■**Cloruros**—A 20 mL colocados en un tubo de comparación de color, agregar 5 gotas de ácido nítrico y 1 mL de nitrato de plata SR y mezclar suavemente: la turbidez que se forma dentro de los 10 minutos no es mayor que la producida por una solución control, constituida por 20 mL de una solución de cloruro de sodio en *Agua de Alta Pureza* (ver *Reactivos en Envases* (661)), con 825 µg de cloruro de sodio por L (10 µg de Cl en 20 mL), cuando se la trata de manera similar y se la observa hacia abajo sobre una superficie oscura, iluminando lateralmente los tubos. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■**Sulfatos**—A 100 mL, agregar 1 mL de cloruro de bario SR: no se produce turbidez. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Conductividad del Agua** (645)—Realizar *Etapa 2, Paso 4* usando una cantidad suficiente de agua para realizar la prueba. La conductividad no es más de 25 µS/cm para envases con un volumen nominal de 10 mL o menos a $25 \pm 1^\circ$; y no más de 5 µS/cm para envases con un volumen nominal más de 10 mL a $25 \pm 1^\circ$. ■^{1S} (USP30)

Alopurinol

Cambio en la redacción:

» El Alopurinol contiene no menos de 98,0 por ciento y no más de 102,0 ■^{1S} (USP30) por ciento de $C_5H_4N_4O$, calculado con respecto a la sustancia seca.

Cambio en la redacción:

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados. ■Almacenar a temperatura ambiente. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—*ER Alopurinol USP. ER Compuesto Relacionado A de Alopurinol USP. ■ER Compuesto Relacionado B de Alopurinol USP. ER Compuesto Relacionado C de Alopurinol USP. ER Compuesto Relacionado D de Alopurinol USP. ER Compuesto Relacionado E de Alopurinol USP. ER Compuesto Relacionado F de Alopurinol USP.* ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:**■Pureza cromatográfica—**

Adsorbente: una capa de celulosa para cromatografía de 0,1 mm de espesor que contenga un indicador fluorescente.

Solución de prueba—Disolver 250 mg de Alopurinol en una mezcla de hidróxido de amonio 6 N e hidróxido de sodio 1 N (9 : 1) para obtener 10,0 mL y mezclar.

Solución estándar—Disolver una cantidad adecuada de ER Compuesto Relacionado A de Alopurinol USP en hidróxido de amonio 6 N para obtener una solución con una concentración conocida de 50 µg por mL.

Volumen de aplicación: 10 µL.

Fase móvil—Agitar 200 mL de alcohol butílico y 200 mL de hidróxido de amonio 6 N, desechar la capa inferior y agregar 20 mL de alcohol butílico a la capa superior.

Procedimiento—Proceder según se indica en *Cromatografía en Capa Delgada en Cromatografía* (621). Desarrollar el cromatograma hasta que el frente de la fase móvil esté a 1 cm de la parte superior de la placa, secar al aire y examinar bajo luz UV. Toda mancha en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de prueba*, con excepción de la mancha principal, no es más intensa que la mancha que aparece en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*: no se encuentra más de 0,2% de ninguna impureza individual. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Compuestos relacionados—[NOTA—Almacenar e inyectar la *Solución estándar* y la *Solución de prueba* a 8°, usando un muestreador automático enfriado.]

Solución A—Disolver 1,25 g de fosfato monobásico de potasio en 1000 mL de agua, filtrar y degasificar.

Solución B—Usar metanol.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de *Solución A* y *Solución B* (90 : 10).

Solución madre del estándar—Pesar con exactitud aproximadamente 5 mg de ER Alopurinol USP, de ER Compuesto Relacionado A de Alopurinol USP, de ER Compuesto Relacionado B de Alopurinol USP, de ER Compuesto Relacionado C de Alopurinol USP, de ER Compuesto Relacionado D de Alopurinol USP, de ER Compuesto Relacionado E de Alopurinol USP y de ER Compuesto Relacionado F de Alopurinol USP, y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 2,0 mL de hidróxido de sodio 0,1 N para disolver, someter a ultrasonido en seguida agitando por rotación suave durante no más de 1 minuto, agregar 80 mL de *Diluyente* y someter a ultrasonido durante 5 minutos adicionales. Diluir a volumen con *Diluyente*. [NOTA—Esta solución es estable durante 48 horas cuando se almacena a 8°.]

Solución estándar—Diluir cuantitativamente un volumen, medido con exactitud, de la *Solución madre del estándar* con *Diluyente* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,5 µg de alopurinol y aproximadamente 0,5 µg de cada uno de los compuestos relacionados A, B, C, D, E y F de alopurinol por mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 25 mg de Alopurinol, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 5,0 mL de hidróxido de sodio 0,1 N para disolver, someter a ultrasonido en seguida agitando por rotación suave durante no más de 1 minuto, agregar 80 mL de *Diluyente* y someter a ultrasonido durante 5 minutos adicionales. Diluir a volumen con *Diluyente*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. Mantener la

temperatura de la columna a 30°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0–30	90→70	10→30	gradiente lineal
30–35	70	30	isocrática
35–36	70→90	30→10	gradiente lineal
36–46	90	10	reequilibrio

Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar*; identificar los picos (ver la *Tabla 1*) y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado B de alopurinol y el compuesto relacionado C de alopurinol no es menor de 0,8; y el factor de asimetría para el pico de alopurinol no es mayor de 1,5.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 40 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas, e identificar el pico de alopurinol y los picos debidos a las impurezas que figuran en la *Tabla 1*.

Tabla 1

Nombre	Tiempo de Retención Relativo	Límite (%)
Compuesto relacionado A de alopurinol ¹	0,62	0,2
Compuesto relacionado C de alopurinol ³	0,79	0,2
Compuesto relacionado B de alopurinol ²	0,81	0,2
Alopurinol	1,0	—
Compuesto relacionado D de alopurinol ⁴	4,4	0,2
Compuesto relacionado E de alopurinol ⁵	4,8	0,2
Compuesto relacionado F de alopurinol ⁶	6,5	0,2

¹ 3-Amino-1H-pirazol-4-carboxamida

² 5-(Formilamino)-1H-pirazol-4-carboxamida

³ 5-(4H-1,2,4-Triazol-4-il)-1H-pirazol-4-carboxamida

⁴ Etil-5-amino-1H-pirazol-4-carboxilato

⁵ Etil-5-(formilamino)-1H-pirazol-4-carboxilato

⁶ Etil-(E/Z)-3-(2-carboxi-2-cianoetienil)amino-1H-pirazol-4-carboxilato

Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Alopurinol tomada, por la fórmula:

$$10(C/W)(r_i/r_s)$$

en donde *C* es la concentración, en µg por mL, de cada impureza individual en la *Solución estándar*; *W* es el peso, en mg, de Alopurinol tomado para preparar la *Solución de prueba*; y *r_i* y *r_s* son las respuestas de los picos para cada impureza individual obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente. [NOTA—Para impurezas no especificadas, *r_s* es la respuesta del pico para el pico de alopurinol obtenido a partir de la *Solución estándar*.] Además de no exceder los límites de cada impureza en la *Tabla 1*, no se encuentra más de 0,1% de cualquier impureza no especificada individual; y no se encuentra más de 1,0% de impurezas totales. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Valoración—■[NOTA—Almacenar e inyectar la *Solución de aptitud del sistema*, la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración* a 8°, usando un muestreador automático enfriado.]

Fase móvil—Disolver 1,25 g de fosfato monobásico de potasio en 1000 mL de agua, filtrar y degasificar.

Solución de aptitud del sistema—Transferir cantidades, pesadas con exactitud, de ER Alopurinol USP, de ER Compuesto Relacionado B de Alopurinol USP y de ER Compuesto Relacionado

C de Alopurinol USP, a sendos matraces volumétricos adecuados, disolver en un volumen pequeño de hidróxido de sodio 0,1 N y de inmediato diluir cuantitativamente con *Fase móvil* para obtener soluciones con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,05 mg por mL. Transferir 1,0 mL de cada una de estas tres soluciones a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Alopurinol USP en un volumen pequeño de hidróxido de sodio 0,1 N y de inmediato diluir cuantitativamente con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL. Diluir cuantitativamente un volumen, medido con exactitud, de esta solución con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,08 mg de alopurinol por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 50 mg de Alopurinol, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver en 5,0 mL de hidróxido de sodio 0,1 N, de inmediato diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Diluir cuantitativamente un volumen, medido con exactitud, de esta solución con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,08 mg de alopurinol por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 230 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,8 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado B de alopurinol y el compuesto relacionado C de alopurinol no es menor de 1,1, y aquella entre el compuesto relacionado C de alopurinol y alopurinol no es menor de 6,0. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,7 para el compuesto relacionado B de alopurinol, 0,8 para el compuesto relacionado C de alopurinol y 1,0 para alopurinol.] Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de $C_5H_4N_4O$ en la porción de Alopurinol tomada, por la fórmula:

$$100(C_S / C_U)(r_U / r_S)$$

en donde C_U y C_S son las concentraciones, en mg por mL, de alopurinol en la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Alúmina, Magnesias y Carbonato de Calcio, Tabletas

(Título vigente no cambiará hasta el 1° de febrero de 2010)
Cambio de título de la monografía—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010
Ver Alúmina, Magnesias y Carbonato de Calcio, Tabletas Masticables

Agregar lo siguiente:

■Alúmina, Magnesias y Carbonato de Calcio, Tabletas Masticables

(La Monografía con este nuevo título—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010)

(El título actual de la monografía es Alúmina, Magnesias y Carbonato de Calcio, Tabletas)

» Las Tabletas Masticables de Alúmina, Magnesias y Carbonato de Calcio contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de hidróxido de aluminio $[Al(OH)_3]$, hidróxido de magnesio $[Mg(OH)_2]$ y carbonato de calcio $(CaCO_3)$.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Etiquetado—Etiquetar las Tabletas Masticables indicando que se deben masticar antes de tragar. Las Tabletas Masticables preparadas empleando gel de hidróxido de aluminio desecado pueden ser etiquetadas indicando el contenido de hidróxido de aluminio en términos de la cantidad equivalente de gel de hidróxido de aluminio desecado, sobre la base de que cada mg de gel desecado equivale a 0,765 mg de $Al(OH)_3$.

Identificación—A una porción de 3 g de Tabletas Masticables reducidas a polvo fino, agregar 25 mL de agua y 25 mL de ácido sulfúrico 2 N, mezclar y calentar en un baño de vapor durante 10 minutos. Enfriar, agregar 50 mL de alcohol y mezclar: la mezcla así obtenida cumple con los requisitos de las pruebas de *Identificación A, B y C en Alúmina, Magnesias y Carbonato de Calcio, Suspensión Oral*, comenzando en la prueba de *Identificación A* donde dice “colocar en un baño de hielo durante 30 minutos”.

Desintegración (701): 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumple con los requisitos de *Variación de Peso* con respecto a alúmina, magnesias y carbonato de calcio.

Capacidad neutralizante de ácido (301)—La dosis mínima individual recomendada en el etiquetado consume no menos de 5 mEq de ácido y no menos del número de mEq calculado por la fórmula:

$$0,55(0,0385A) + 0,8(0,0343M) + 0,9(0,02C)$$

en donde 0,0385; 0,0343 y 0,02 son las capacidades neutralizantes de ácido teóricas, en mEq, de $Al(OH)_3$, $Mg(OH)_2$ y $CaCO_3$, respectivamente; y *A*, *M* y *C* son las cantidades respectivas, en mg, de $Al(OH)_3$, $Mg(OH)_2$ y $CaCO_3$ en la muestra analizada, basadas en las cantidades declaradas.

Valoración de hidróxido de aluminio—

Solución volumétrica de edetato disódico—Preparar según se indica en la *Valoración en Alumbre de Amonio*.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir a un vaso de precipitados una porción del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 600 mg de hidróxido de aluminio, agregar 20 mL de agua y agregar lentamente 40 mL de ácido clorhídrico 3 N, mezclando. Calentar la mezcla hasta ebullición, enfriar, y filtrar, recogiendo en un matraz volumétrico de 200 mL. Lavar el vaso de precipitados con agua, agregando los lavados al filtro. Agregar agua a volumen y mezclar.

Procedimiento—Proceder según se indica en el *Procedimiento* en la *Valoración de hidróxido de aluminio en Alúmina, Magnesias y Carbonato de Calcio, Suspensión Oral*. Cada mL de *Solución volumétrica de edetato disódico* 0,05 M equivale a 3,900 mg de $Al(OH)_3$.

Valoración de hidróxido de magnesio—

Solución volumétrica de edetato disódico y Preparación de valoración—Preparar según se indica en la *Valoración de hidróxido de aluminio*.

Procedimiento—Proceder según se indica en el *Procedimiento en la Valoración de hidróxido de magnesio en Alúmina, Magnesita y Carbonato de Calcio, Suspensión Oral*. Cada mL de edetato disódico 0,05 M equivale a 2,916 mg de $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

Valoración de carbonato de calcio—

Solución volumétrica de edetato disódico y Preparación de valoración—Preparar según se indica en la *Valoración de hidróxido de aluminio*.

Procedimiento—Proceder según se indica en el *Procedimiento en la Valoración de carbonato de calcio en Alúmina, Magnesita y Carbonato de Calcio, Suspensión Oral*. Cada mL de edetato disódico 0,05 M equivale a 5,004 mg de CaCO_3 .

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2010) ■^{1S} (USP30)

Alúmina, Magnesita y Simeticona, Tabletas

(Título vigente—no cambiará hasta el 1° de febrero de 2010)

El cambio de título de la monografía—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010

Ver Alúmina, Magnesita y Simeticona, Tabletas Masticables

Agregar lo siguiente:

■ Alúmina, Magnesita y Simeticona, Tabletas Masticables

(La Monografía con este nuevo título—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010)

(El título actual de la monografía es Alúmina, Magnesita y Simeticona, Tabletas)

» Las Tabletas Masticables de Alúmina, Magnesita y Simeticona contienen el equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de las cantidades declaradas de hidróxido de aluminio $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ e hidróxido de magnesio $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$, y una cantidad de polidimetilsiloxano $[-(\text{CH}_3)_2\text{SiO}-]_n$ de no menos de 85,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de simeticona.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Etiquetado—Etiquetar las Tabletas Masticables indicando que se deben masticar antes de tragar. Etiquetar las Tabletas Masticables indicando el contenido de sodio si éste es superior a 5 mg por Tableta. Las Tabletas Masticables pueden etiquetarse indicando el contenido de hidróxido de aluminio en función de la cantidad equivalente de gel de hidróxido de aluminio desecado, considerando que cada mg de gel desecado equivale a 0,765 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Polidimetilsiloxano USP. Identificación*—

A: Absorción en el Infrarrojo (197S)—
Celda: 0,5 mm.

Solución: preparada según se indica en la *Valoración de polidimetilsiloxano*.

B: A una porción de Tabletas Masticables reducidas a polvo fino, que equivalga aproximadamente a 600 mg de hidróxido de magnesio, agregar 25 mL de ácido clorhídrico 3 N y 25 mL de agua, y mezclar. Calentar a ebullición moderada durante 2 minutos. Dejar que se enfríe y filtrar. Agregar 5 gotas de rojo de metilo SR, calentar a ebullición y agregar hidróxido de amonio 6 N hasta que el color de la solución apenas se torne amarillo intenso. Continuar en ebullición durante 2 minutos y filtrar: el filtrado así obtenido cumple con los requisitos a las pruebas para *Magnesita* (191).

C: Lavar el precipitado obtenido en la prueba de *Identificación B* con una solución caliente de cloruro de amonio (1 en 50) y disolver el precipitado en ácido clorhídrico: la solución así obtenida cumple con los requisitos a la prueba de *Identificación C* en *Suspensión Oral de Alúmina, Magnesita y Simeticona*.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos de *Variación de Peso* con respecto a hidróxido de aluminio y a hidróxido de magnesio.

Capacidad neutralizante de ácido (301)—La dosis mínima individual recomendada en el etiquetado consume no menos de 5 mEq de ácido y no menos del número de mEq calculado por la fórmula:

$$0,55(0,0385A) + 0,8(0,0343M)$$

en donde 0,0385 y 0,0343 son las capacidades neutralizantes de ácido teóricas, en mEq, de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y $\text{Mg}(\text{OH})_2$, respectivamente; y *A* y *M* son las cantidades, en mg, de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y $\text{Mg}(\text{OH})_2$ en la muestra analizada, basadas en las cantidades declaradas.

Actividad antiespumante—

Solución espumante—Disolver 500 µg de Azul FD&C No. 1 y 1 g de octoxinol 9 en 100 mL de ácido clorhídrico 0,1 N.

Procedimiento—[NOTA—Para cada prueba, emplear un recipiente de vidrio de 250 mL limpio y sin uso.] Transferir una cantidad de Tabletas Masticables reducidas a polvo fino, pasada completamente por un tamiz de malla 80, equivalente a 20 mg de simeticona, a un frasco cilíndrico de vidrio de 250 mL, limpio y sin uso, provisto con un tapón de 50 mm, y que contenga 100 mL de la *Solución espumante* entibiada previamente a 37°. Proceder según se indica en *Procedimiento* de la prueba para *Actividad antiespumante* en *Simeticona*, comenzando donde dice “Tapar el recipiente”. El tiempo de actividad antiespumante no excede de 45 segundos.

Contenido de sodio—

Solución de cloruro de potasio, Solución madre de cloruro de sodio y Preparaciones estándar—Preparar según se indica en la prueba de *Contenido de sodio en Alúmina, Magnesita y Simeticona, Suspensión Oral*.

Preparación de prueba—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir una porción del polvo pesada con exactitud, equivalente al peso promedio de 1 Tableta Masticable, a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 50 mL de ácido clorhídrico 1 N, calentar a ebullición durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, diluir a volumen con agua y mezclar. Filtrar, desechando los primeros mL del filtrado. Transferir 5,0 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 100 mL que contenga 10,0 mL de *Solución de cloruro de potasio*, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Proceder según se indica en la prueba de *Contenido de sodio en Alúmina, Magnesita y Simeticona, Suspensión Oral*. Calcular la cantidad, en mg, de sodio por Tableta Masticable tomada, por la fórmula:

$$2C$$

Valoración de hidróxido de aluminio—

Solución volumétrica de edetato disódico—Preparar y normalizar según se indica en *Valoración en Alumbre de Amonio*.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir a un vaso de precipitados de 150 mL una porción del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 800 mg de hidróxido de aluminio, agregar 20 mL de agua, mezclar y agregar lentamente 30 mL de ácido clorhídrico 3 N. Calentar moderadamente, si fuera necesario,

para facilitar la disolución, enfriar a temperatura ambiente y filtrar en un matraz volumétrico de 200 mL. Lavar el filtro con agua, vertiendo el agua en el matraz; agregar agua a volumen y mezclar.

Procedimiento—Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración de hidróxido de aluminio en Alúmina, Magnesias y Simeticona, Suspensión Oral*.

Valoración de hidróxido de magnesio—

Preparación de valoración—Preparar según se indica en la *Valoración de hidróxido de aluminio*.

Procedimiento—Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración de hidróxido de magnesio en Alúmina, Magnesias y Simeticona, Suspensión Oral*.

Valoración de polidimetilosiloxano—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir una porción del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 33 mg de simeticona, a un frasco redondo de 120 mL, de boca estrecha y con tapa de rosca, agregar 40 mL de hidróxido de sodio 0,1 N y agitar por rotación moderada para dispersar. Agregar 20,0 mL de tolueno, cerrar bien el frasco con una tapa que tenga un revestimiento interno inerte y agitar durante 30 minutos, exactamente cronometrados, en un agitador de oscilación vertical (por ejemplo, aproximadamente 200 oscilaciones por minuto y un recorrido de 38 ± 2 mm). Transferir la mezcla a un separador de 125 mL y dejar que se separe. Retirar la capa orgánica superior y transferir a un tubo de centrifuga con tapa de rosca que contenga aproximadamente 2 g de sulfato de sodio anhidro. Cerrar el tubo con una tapa de rosca que tenga revestimiento interno inerte, agitar vigorosamente y centrifugar la mezcla hasta obtener un sobrenadante transparente (*Preparación de valoración*). Del mismo modo, preparar una *Preparación estándar* usando aproximadamente 33 mg de ER Polidimetilosiloxano USP, pesados con exactitud. Preparar un blanco mezclando 10 mL de tolueno con aproximadamente 1 g de sulfato de sodio anhidro y centrifugando para obtener un sobrenadante transparente. Determinar concomitantemente las absorbancias de las soluciones en celdas de 0,5 mm a la longitud de máxima absorción, aproximadamente a $7,9 \mu\text{m}$ ($1265,8 \text{ cm}^{-1}$), con un espectrofotómetro IR adecuado, utilizando el blanco para ajustar el instrumento. Calcular la cantidad, en mg, de $[-(\text{CH}_3)_2\text{SiO}-]_n$ en la porción de Tabletas Masticables tomada, por la fórmula:

$$(W)(A_U/A_S)$$

en donde W es el peso, en mg, de ER Polidimetilosiloxano USP utilizado para obtener la *Preparación estándar*; y A_U y A_S son las absorbancias de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente.

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2010) ■_{1S} (USP30)

Alúmina, Magnesias, Carbonato de Calcio y Simeticona, Tabletas

(Título vigente—no cambiará hasta el 1° de febrero de 2010)

Cambio de título de la monografía—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010

Ver Alúmina, Magnesias, Carbonato de Calcio y Simeticona, Tabletas Masticables

Agregar lo siguiente:

■ Alúmina, Magnesias, Carbonato de Calcio y Simeticona, Tabletas Masticables

(La Monografía con este nuevo título será oficial a partir del 1° de febrero de 2010)

(El título actual de la monografía es Alúmina, Magnesias, Carbonato de Calcio y Simeticona, Tabletas)

» Las Tabletas Masticables de Alúmina, Magnesias, Carbonato de Calcio y Simeticona contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de hidróxido de aluminio $[\text{Al}(\text{OH})_3]$, hidróxido de magnesio $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$ y carbonato de calcio (CaCO_3), y una cantidad de polidimetilosiloxano $[-(\text{CH}_3)_2\text{SiO}-]_n$ que es de no menos de 85,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de simeticona.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Etiquetado—Etiquetar las Tabletas Masticables indicando que se deben masticar antes de tragar. Etiquetar las Tabletas Masticables para declarar el contenido de sodio, si es más de 5 mg por Tableta Masticable.

Estándares de referencia USP (11)—ER Polidimetilosiloxano USP

Identificación—

A: Cortar una Tableta Masticable en trozos, agregar 50 mL de ácido sulfúrico 1 N, mezclar hasta que los trozos se desintegren y calentar en un baño de vapor durante 10 minutos. Enfriar, agregar 50 mL de alcohol y mezclar. La mezcla así obtenida responde a las pruebas de *Identificación A*, *B* y *C* en *Alúmina, Magnesias y Carbonato de Calcio, Suspensión Oral*, comenzando en la prueba de *Identificación A* donde dice “colocar en un baño de hielo durante 30 minutos”.

B: Absorción en el Infrarrojo (197S)—

Celda: 0,5 mm.

Solución: preparada según se indica en la *Valoración de polidimetilosiloxano*.

Límites microbianos (61)—El recuento total de microorganismos aerobios no excede de 200 ufc por g, el recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de 200 ufc por g y las Tabletas Masticables cumplen con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Salmonella* spp y *Escherichia coli*.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos de *Variación de Peso* con respecto al hidróxido de aluminio, al hidróxido de magnesio y al carbonato de calcio.

Capacidad neutralizante de ácido (301)—Disolver un número de Tabletas Masticables contado con exactitud, equivalente aproximadamente a 120 mEq de capacidad neutralizante de ácido, en aproximadamente 400 mL de agua. Transferir la mezcla a un matraz volumétrico de 500 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Utilizar 75,0 mL de esta solución como *Preparación de prueba*. Proceder según se indica en el apartado *Procedimiento para Polvos, Sólidos Efervescentes, Suspensiones y Otros Líquidos, Tabletas No Masticables, Tabletas Masticables y Cápsulas*. La dosis mínima individual recomendada en el etiquetado consume no menos de 5 mEq de ácido y no menos del número de mEq calculado por la fórmula:

$$0,55(0,0385A) + 0,8(0,0343M) + 0,9(0,02C)$$

en donde 0,0385; 0,0343 y 0,02 son las capacidades neutralizantes del ácido teóricas, en mEq, de $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y CaCO_3 , respectivamente, y A , M y C son las cantidades, en mg, de $\text{Al}(\text{OH})_3$,

Mg(OH)₂ y CaCO₃ en la muestra analizada, basadas en las cantidades declaradas.

Actividad antiespumante—

Solución espumante—Disolver 1 g de octoxinol 9 en 100 mL de ácido clorhídrico 0,3 N.

Procedimiento—[NOTA—Para cada prueba, utilizar un recipiente cilíndrico de vidrio limpio de 250 mL.] Pesar no menos de 10 Tabletas Masticables, cortarlas en pequeños trozos y mezclar. Transferir una porción de los trozos de Tabletas Masticables mezclados, equivalente aproximadamente a 20 mg de simeticona, a un recipiente cilíndrico de vidrio limpio de 250 mL, con una tapa de 50 mm, que contenga 100 mL de *Solución espumante* previamente entibiada a 37°. Después de que cese la efervescencia, proceder según se indica en *Procedimiento* en la prueba de *Actividad antiespumante* en *Simeticona*, comenzando donde dice “Tapar el recipiente”. El tiempo de actividad antiespumante no excede de 45 segundos.

Contenido de sodio—

Solución de cloruro de potasio—Disolver 3 g de cloruro de potasio en agua en un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Ácido clorhídrico diluido—Preparar mezclando 226 mL de ácido clorhídrico con suficiente agua para obtener 1000 mL.

Solución estándar—Transferir 2,5420 g de cloruro de sodio, previamente secados a 105° durante 2 horas, a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar. Transferir 10,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 mL de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. A tres matraces volumétricos de 100 mL, cada uno con 10,0 mL de *Solución de cloruro de potasio* y 3,0 mL de *Ácido clorhídrico diluido*, agregar, respectivamente, 10,0; 20,0 y 30,0 mL de esta solución. Estas soluciones contienen 1,0; 2,0 y 3,0 µg de sodio (Na) por mL, respectivamente.

Solución de prueba—Pesar con exactitud 10 Tabletas Masticables y determinar el peso promedio, *A*, en mg. Cortar 4 Tabletas Masticables en trozos, combinar los trozos y pesarlos. Transferir los trozos combinados a un matraz volumétrico de 500 mL, agregar 150 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y agitar por rotación moderada para desintegrar los trozos. Diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 10,0 mL de *Solución de cloruro de potasio*, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución blanco—Transferir 3,0 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y 10,0 mL de *Solución de cloruro de potasio* a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Determinar concomitantemente las absorbancias de las *Soluciones estándar* y de la *Solución de prueba* en la línea de emisión de sodio a 589,0 nm con un espectrofotómetro de absorción atómica adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)) equipado con una lámpara de sodio de cátodo hueco y una llama de aire-acetileno, utilizando la *Solución blanco* como blanco. Graficar las absorbancias de las *Soluciones estándar* en función de la concentración de sodio, en µg por mL, y trazar la línea recta que mejor se ajuste a los tres puntos graficados. A partir de la gráfica así obtenida, determinar la concentración, *C*, en µg por mL, de sodio en la *Solución de prueba*. Calcular los mg de sodio (Na) en cada Tableta tomada, por la fórmula:

$$5C(A/W)$$

en donde *A* es el peso promedio, en mg, de cada Tableta Masticable; y *W* es el peso, en mg, de la porción de Tabletas Masticables tomada para preparar la *Solución de prueba*. Las Tabletas Masticables contienen no más de 5 mg de sodio por Tableta Masticable, excepto cuando la etiqueta indica que contienen más de 5 mg de sodio por Tableta Masticable, las tabletas contienen no más de 110% de la cantidad declarada.

Valoración de hidróxido de aluminio—

Solución volumétrica de Edetato disódico—Preparar y normalizar según se indica en *Valoración en Alumbre de Amonio*.

Preparación de valoración—Transferir un número de Tabletas Masticables contado con exactitud, equivalente aproximadamente a 665 mg de hidróxido de aluminio, a un vaso de precipitados adecuado. Agregar 15 mL de ácido clorhídrico y agitar por rotación

moderada para disolver las Tabletas Masticables. Agregar 80 mL de agua, filtrar y transferir a un matraz volumétrico de 200 mL. Lavar el filtro con agua vertiendo el agua en el matraz; agregar agua a volumen y mezclar.

Procedimiento—Pipetear 20 mL de *Preparación de valoración* y transferir a un vaso de precipitados de 250 mL; luego agregar, en el orden mencionado y mezclando continuamente, 25,0 mL de *Solución volumétrica de edetato disódico* y 20 mL de solución amortiguadora de ácido acético-acetato de amonio SR y calentar a una temperatura cercana al punto de ebullición durante 5 minutos. Enfriar, agregar 50 mL de alcohol y 2 mL de ditizona SR, y mezclar. Valorar con sulfato de cinc 0,05 M SV hasta que el color cambie de violeta verdoso a rosado. Realizar una determinación con un blanco, reemplazando con 20 mL de agua la *Preparación de valoración* y haciendo todas las correcciones necesarias. Cada mL consumido de *Solución volumétrica de edetato disódico* 0,05 M equivale a 3,900 mg de Al(OH)₃.

Valoración de hidróxido de magnesio—

Solución de cloruro de lantano—Transferir 17,6 g de cloruro de lantano a un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 100 mL de agua y agregar cuidadosamente 50 mL de ácido clorhídrico. Mezclar y dejar enfriar. Diluir a volumen con agua y mezclar.

Ácido clorhídrico diluido—Preparar mezclando 226 mL de ácido clorhídrico con suficiente agua para obtener 1000 mL.

Solución de cloruro de potasio—Disolver 3 g de cloruro de potasio en agua en un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución madre de magnesio—Transferir 1,000 g de magnesio metálico a un matraz volumétrico de 1000 mL que contenga 10 mL de agua, agregar lentamente 10 mL de ácido clorhídrico y agitar por rotación moderada para disolver el metal. Diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 2,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Esta solución contiene 20 µg de magnesio (Mg) por mL.

Preparaciones estándar—A cada uno de tres matraces volumétricos de 100 mL, cada uno de los cuales contiene 5,0 mL de *Solución de cloruro de lantano*, agregar 1,0; 2,0 y 3,0 mL, respectivamente, de *Solución madre de magnesio*. Diluir cada solución a volumen con agua y mezclar. Estas soluciones contienen 0,1; 0,2 y 0,3 µg de magnesio (Mg) por mL, respectivamente.

Preparación de valoración—Transferir un número de Tabletas Masticables contado con exactitud, equivalente aproximadamente a 250 mg de hidróxido de magnesio (100 mg de magnesio), a un matraz volumétrico de 1000 mL. Agregar 500 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y agitar por rotación moderada para desintegrar las Tabletas Masticables. Agregar 100,0 mL de *Solución de cloruro de potasio*, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 2,0 mL de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 100 mL, agregar 5,0 mL de *Solución de cloruro de lantano*, diluir a volumen con agua y mezclar.

Blanco—Agregar 50 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y 10,0 mL de *Solución de cloruro de potasio* a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 mL de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 2,0 mL de esta solución a un tercer matraz volumétrico de 100 mL, agregar 5,0 mL de *Solución de cloruro de lantano*, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Determinar concomitantemente las absorbancias de las *Preparaciones estándar* y de la *Preparación de valoración* en la línea de emisión de magnesio a 285,2 nm, con un espectrofotómetro de absorción atómica adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)) equipado con una lámpara de magnesio de cátodo hueco y una llama de aire-acetileno, utilizando el *Blanco* para ajustar el instrumento. Graficar las absorbancias de las *Preparaciones estándar* en función de la concentración, en µg por mL, de magnesio y trazar la línea recta que mejor se ajuste a los tres puntos graficados. Del gráfico obtenido, determinar la concentración, *C*, en µg por mL, de magnesio en la *Preparación de valoración*. Calcular la cantidad, en mg, de hidróxido de magnesio [Mg(OH)₂] en cada Tableta Masticable tomada, por la fórmula:

$$(58,34/24,305)(500C/N)$$

en donde 58,34 es el peso molecular de hidróxido de magnesio; 24,305 es el peso atómico del magnesio; y *N* es el número de

Tabletas Masticables tomado para preparar la *Preparación de valoración*.

Valoración de carbonato de calcio—

Preparación de valoración—Preparar según se indica en *Valoración de hidróxido de aluminio*.

Procedimiento—Pipetear un volumen de la *Preparación de valoración*, equivalente aproximadamente a 50 mg de carbonato de calcio, transferir a un vaso de precipitados de 400 mL y agregar 200 mL de agua, un volumen de solución de hidróxido de sodio (1 en 2) equivalente al volumen de la *Preparación de valoración* tomada y 250 mg de azul de hidroxinaftol. Mezclar con un mezclador magnético y valorar de inmediato con edetato disódico 0,05 M SV hasta que la solución adquiera netamente un color azul. Realizar una determinación con un blanco, reemplazando la *Preparación de valoración* tomada por un volumen equivalente de agua tomada, y hacer las correcciones necesarias. Cada mL de edetato disódico 0,05 M equivale a 5,004 mg de CaCO_3 .

Valoración de polidimetilsiloxano—

Ácido clorhídrico diluido—Preparar mezclando 400 mL de ácido clorhídrico con suficiente agua para obtener 1000 mL.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 60 mg de ER Polidimetilsiloxano USP, pesados con exactitud, a un separador, agregar 30,0 mL de cloroformo y 60 mL de *Ácido clorhídrico diluido*, agitar durante 30 segundos y dejar que las fases se separen. Retirar aproximadamente 10 mL de la capa orgánica inferior y transferir a un tubo de ensayo de 15 mL con tapa de rosca que contenga 0,5 g de sulfato de sodio anhidro. Tapar el tubo con una tapa de rosca con revestimiento interno inerte, agitar vigorosamente y centrifugar la mezcla hasta obtener un sobrenadante transparente.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir una porción del polvo pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 60 mg de simeticona, a un frasco con tapa de rosca apropiado, agregar 30,0 mL de cloroformo y 60 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y dejar en reposo, agitando con frecuencia, hasta que las Tabletas Masticables se disuelvan. Transferir el contenido del frasco a un separador, agitar y dejar que las fases se separen. Retirar aproximadamente 10 mL de la capa orgánica inferior y transferir a un tubo de ensayo de 15 mL con tapa de rosca que contenga 0,5 g de sulfato de sodio anhidro. Tapar el tubo con una tapa de rosca con revestimiento interno inerte, agitar vigorosamente y centrifugar la mezcla hasta obtener un sobrenadante transparente.

Blanco—Colocar 30,0 mL de cloroformo y 60 mL de *Ácido clorhídrico diluido* en un separador, agitar durante 30 segundos y dejar que las fases se separen. Retirar aproximadamente 10 mL de la capa orgánica inferior y transferir a un tubo de ensayo de 15 mL con tapa de rosca que contenga 0,5 g de sulfato de sodio anhidro. Tapar el tubo con una tapa de rosca con revestimiento interno inerte, agitar vigorosamente y centrifugar la mezcla hasta obtener un sobrenadante transparente.

Procedimiento—Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración* en celdas de 0,5 mm a la longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 7,9 μm , con un espectrofotómetro IR apropiado, utilizando el *Blanco* para ajustar el instrumento. Calcular la cantidad, en mg, de $[-(\text{CH}_3)_2\text{SiO}-]_n$ en cada Tableta Masticable tomada, por la fórmula:

$$(W/N)(A_U/A_S)$$

en donde W es el peso, en mg, de ER Polidimetilsiloxano USP usado para preparar la *Preparación estándar*; N es el número de Tabletas Masticables tomado para preparar la *Preparación de valoración*; y A_U y A_S son las absorbancias de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente.

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2010) ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Sulfato de Aluminio y Acetato de Calcio para Solución Tópica

» El Sulfato de Aluminio y Acetato de Calcio para Solución Tópica contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de sulfato de aluminio tetradecahidrato $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}]$ y de acetato de calcio monohidrato $(\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases unitarios y proteger del calor excesivo.

Identificación—

A: Colocar aproximadamente 0,25 g de Sulfato de Aluminio y Acetato de Calcio para Solución Tópica en un tubo de ensayo. Agregar 10 mL de agua y 0,25 g de carbonato de calcio. Calentar en un baño de vapor durante 10 minutos y filtrar. Agregar de 3 a 4 gotas de cloruro férrico SR al filtrado. Un color o precipitado marrón rojizo indica acetato. [NOTA—Después de agregar el cloruro férrico SR, la solución se puede calentar durante 1 minuto para acelerar la reacción.]

B: Suspender 2 g de muestra en 50 mL de agua y filtrar. El filtrado cumple con los requisitos de las pruebas para *Sulfato* (191) y para *Calcio* (191).

pH (791): entre 4,0 y 4,8 en una solución (1 en 200).

Valoración de sulfato de aluminio—

Preparación de valoración—Transferir 10 g de Sulfato de Aluminio y Acetato de Calcio para Solución Tópica, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 1000 mL. Agregar 100 mL de ácido clorhídrico 1,2 M y aproximadamente 250 mL de agua. Calentar en un baño de vapor o placa de calentamiento hasta que se disuelva. Enfriar, diluir a volumen con agua y mezclar. [NOTA—Reservar una porción de esta *Preparación de valoración* para la *Valoración de acetato de calcio*.]

Procedimiento—Transferir una alícuota de 5,0 mL de la *Preparación de valoración* a un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Agregar 40,0 mL de edetato disódico 0,01 M SV y 20 mL de solución amortiguadora SR de ácido acético-acetato de amonio, y mezclar bien. Agregar 50 mL de alcohol y 2 mL de ditiona SR. [NOTA—Seguir el orden indicado de adición.] Valorar con sulfato de cinc 0,02 M SV hasta que el color cambie de violeta verdoso a rosado transparente. Realizar una valoración volumétrica con un blanco, reemplazando la *Preparación de valoración* por 5,0 mL de agua. Cada mL de edetato disódico 0,01 M equivale a 2,972 mg de sulfato de aluminio tetradecahidrato $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}]$. Calcular el porcentaje de sulfato de aluminio tetradecahidrato $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}]$ por la fórmula:

$$[(1000)(100)C_F M(V_B - V_U)] / 5,0 M_T W$$

en donde 1000/5,0 es el factor de dilución; 100 es el factor de conversión a porcentaje; C_F es el factor de conversión (2,972 mg de muestra por mL de edetato disódico 0,01 M); M es la molaridad real de la solución volumétrica; V_B es el volumen de valoración volumétrica del blanco, en mL; V_U es el volumen de valoración volumétrica de la muestra, en mL; M_T es la molaridad teórica de la solución volumétrica (0,02); y W es el peso de la muestra, en mg.

Valoración de acetato de calcio—

Procedimiento—Transferir una alícuota de 5,0 mL de la *Preparación de valoración* reservada de la *Valoración de sulfato de aluminio* a un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Agregar de 1 a 2 mL de trietanolamina al 50% para enmascarar el aluminio. Mezclar bien. Agregar 100 mL de agua, 15 mL de hidróxido de sodio 1 N y aproximadamente 300 mg de azul de hidroxinaftol. [NOTA—Seguir el orden indicado de adición.] Valorar con edetato disódico 0,01 M SV. El indicador cambiará de color púrpura a azul transparente en el punto final. Cada mL de edetato disódico 0,01 M equivale a 1,762

mg de acetato de calcio monohidrato ($C_4H_6CaO_4 \cdot H_2O$). Calcular el porcentaje de acetato de calcio monohidrato ($C_4H_6CaO_4 \cdot H_2O$) por la fórmula:

$$[(1000)(100)V_U C_F M] / 5,0 M_T W$$

en donde 1000/5,0 es el factor de dilución; 100 es el factor de conversión a porcentaje; V_U es el volumen de valoración volumétrica de la muestra, en mL; C_F es el factor de conversión (1,762 mg de muestra por mL de edetato disódico 0,01 M); M es la molaridad real de la solución volumétrica; M_T es la molaridad teórica de la solución volumétrica (0,01); y W es el peso de la muestra, en mg. ■ IS (USP30)

Amifostina

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—

Fase móvil—Disolver 1,0 mL de ácido nonafluorobutansulfónico en 1200 mL de agua de grado HPLC, agregar 400 µL de ácido trifluoroacético y ajustar con trietilamina a un pH de 2,5. Preparar una mezcla desgasificada de esta solución y acetonitrilo (68 : 32).

Solución blanco—Usar agua.

Solución estándar de tiol—Transferir aproximadamente 12,4 mg de ER Amifostina Tiol USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar. [NOTA—Inyectar inmediatamente después de la preparación o refrigerar hasta su uso. La solución es estable durante 48 horas si se mantiene aproximadamente a 5°.]

Solución de aptitud del sistema—Disolver aproximadamente 5,0 mg de ER Amifostina USP, pesados con exactitud, en 1 mL de *Solución estándar de tiol* y mezclar. [NOTA—Inyectar inmediatamente después de la preparación o refrigerar hasta su uso. La solución es estable durante 12 horas si se mantiene aproximadamente a 5°.]

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 50 mg de Amifostina, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 1 mL. Disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar. [NOTA—Inyectar inmediatamente después de la preparación o refrigerar hasta su uso. La solución es estable durante 48 horas si se mantiene aproximadamente a 5°.]

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. Mantener la temperatura de la columna a 30° y mantener la temperatura de las soluciones a inyectar entre 2° y 8°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y la *Solución estándar de tiol*, y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre los picos de amifostina y amifostina tiol no es menor de 2,0; la eficiencia de la columna calculada para el pico de amifostina tiol no es menor de 2300 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 4,0; el factor de capacidad, k' , es mayor de 0,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 4,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar de tiol*, de la *Solución de prueba* y de la *Solución blanco*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos, excluyendo los picos correspondientes a los obtenidos a partir de la *Solución blanco*. Calcular el porcentaje de amifostina tiol en la porción de Amifostina tomada, por la fórmula:

$$\bullet(134,24/207,17)100(C/W)(r_U/r_S)\bullet_s$$

en donde 134,24 y 207,17 son los pesos moleculares de amifostina tiol y de diclorhidrato de amifostina tiol, respectivamente; C es la concentración, en mg por mL, de diclorhidrato de amifostina tiol en la *Solución estándar de tiol*; W es el peso, en mg, de Amifostina tomada para preparar la *Solución de prueba*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de amifostina tiol obtenidos a partir de la

Solución de prueba y la *Solución estándar de tiol*, respectivamente. Calcular el porcentaje de cada una de las impurezas restantes en la porción de Amifostina tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_A)$$

en donde r_i y r_A son las respuestas correspondientes a los picos de cada impureza y de amifostina, respectivamente, obtenidos a partir de la *Solución de prueba*: no se encuentra más de 0,1% de cualquier impureza individual, excluyendo amifostina tiol; y no se encuentra más de 0,3% de impurezas totales, incluyendo amifostina tiol.

Amifostina para Inyección

Cambio en la redacción:

» La Amifostina para Inyección es una sustancia cristalina •_s y estéril adecuada para el uso parenteral. Contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de amifostina ($C_5H_{15}N_2O_3PS$).

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—

Fase móvil, **Solución blanco** y **Solución de aptitud del sistema**•_s—Preparar según se indica en la prueba de *Compuestos relacionados* en *Amifostina*.

Solución estándar de tiol—Transferir aproximadamente 40,1 mg de ER Amifostina Tiol USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar. [NOTA—Inyectar inmediatamente después de la preparación o refrigerar hasta su uso. La solución es estable durante 48 horas si se mantiene aproximadamente a 5°.]

Solución estándar de disulfuro—Transferir aproximadamente 18,6 mg de ER Disulfuro de Amifostina USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. [NOTA—Inyectar inmediatamente después de la preparación o refrigerar hasta su uso. La solución es estable durante 48 horas si se mantiene aproximadamente a 5°.]

•**Solución de prueba**—Transferir aproximadamente 50 mg de Amifostina para Inyección, pesada con exactitud, a un matraz volumétrico de 1 mL, disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar. [NOTA—Inyectar inmediatamente después de la preparación o refrigerar hasta su uso. La solución es estable durante 48 horas si se mantiene aproximadamente a 5°.]•_s

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector capaz de registrar tanto a 220 nm como a 247 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. Mantener la temperatura de la columna a 30° y mantener la temperatura de las soluciones a inyectar entre 2° y 8°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Cromatografiar la *Solución de aptitud del sistema*, la *Solución estándar de disulfuro* y la *Solución estándar de tiol*, y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna calculada para el pico de amifostina tiol no es menor de 2300 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 4,0; el factor de capacidad, k' , es mayor de 0,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 4,0%. La eficiencia de la columna calculada para el pico de disulfuro de amifostina no es menor de 2000 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 4,5; el factor de capacidad, k' , es mayor de 2,2; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 4,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar de tiol*, de la *Solución estándar de disulfuro*, de la *Solución de prueba* y

de la *Solución blanco*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos excepto los picos correspondientes a la *Solución blanco*. Calcular el porcentaje de amifostina tiol en la porción de Amifostina para Inyección tomada, por la fórmula:

$$\bullet(134,24/207,17)100(C/W)(r_U/r_S)\bullet_s$$

en donde 134,24 y 207,17 son los pesos moleculares de amifostina tiol y de diclorhidrato de amifostina tiol, respectivamente; C es la concentración, en mg por mL, de diclorhidrato de amifostina tiol en la *Solución estándar de tiol*; W es el peso, en mg, de amifostina tomado para preparar la *Solución de prueba*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de amifostina tiol registrados a 220 nm, obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar de tiol*, respectivamente. Calcular el porcentaje de disulfuro de amifostina en la porción de Amifostina para Inyección tomada, por la fórmula:

$$\bullet(266,47/412,31)(100C/W)(r_U/r_S)\bullet_s$$

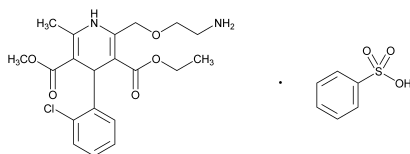
en donde 266,47 y 412,31 son los pesos moleculares del disulfuro de amifostina y del tetraclorhidrato de disulfuro de amifostina, respectivamente; C es la concentración, en mg por mL, de ER Disulfuro de Amifostina USP en la *Solución estándar de disulfuro*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos registrados a 247 nm, obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar de disulfuro*, respectivamente: no se encuentra más de 2,0% de impurezas totales, incluyendo la amifostina tiol y el disulfuro de amifostina. Calcular el porcentaje de cada una de las impurezas restantes en la porción de Amifostina para Inyección tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_A)$$

en donde r_i y r_A son las respuestas correspondientes a los picos de cada impureza y de amifostina, respectivamente, obtenidos a partir de la *Solución de prueba*: no se encuentra más de 0,1% de cualquier impureza individual, excepto amifostina tiol.

Agregar lo siguiente:

■ Besilato de Amlodipino



$C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$ 567,05

3,5-Pyridinedicarboxylic acid, 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-, 3-ethyl 5-methyl ester, (\pm)-, monobenzenesulfonate.

Monobenzenesulfonato de 3-etil 5-metil (\pm)-2-[(2-aminoetoxi)metil]-4-(*o*-clorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridindicarboxilato [111470-99-6].

» El Besilato de Amlodipino contiene no menos de 97,0 por ciento y no más de 102,0 por ciento de $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$, calculado con respecto a la sustancia anhidra.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Proteger de la luz. Almacenar a temperatura ambiente.

Estándares de referencia USP <11>—ER Besilato de Amlodipino USP.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo <197M>.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Rotación óptica <781A>: entre $-0,10^\circ$ y $+0,10^\circ$, determinada a 20° .

Solución de prueba: 10 mg por mL, en metanol.

Agua, Método I <921>: no más de 0,5%.

Residuo de incineración <281>: no más de 0,2%.

Metales pesados, Método II <231>: 0,002%.

Compuestos relacionados—

PRUEBA 1—

Adsorbente: una capa de mezcla de gel de sílice para cromatografía de 0,25 mm de espesor.

Solución de prueba—Transferir 140 mg de Besilato de Amlodipino a un matraz volumétrico de 2 mL, disolver y diluir a volumen con metanol, y mezclar.

Solución de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 14 mg de ER Besilato de Amlodipino USP a un recipiente adecuado, disolver en 0,2 mL de metanol, y mezclar.

Solución madre del estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Besilato de Amlodipino USP en metanol para obtener una solución que contenga 7,0 mg por mL.

Solución estándar 1—Transferir 3,0 mL de la *Solución madre del estándar* a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con metanol y mezclar.

Solución estándar 2—Transferir 1,0 mL de la *Solución madre del estándar* a otro matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con metanol y mezclar.

Volumen de aplicación: 10 μ L.

Fase móvil—Usar la capa superior de una mezcla de metil isobutil cetona, agua y ácido acético glacial (50:25:25).

Procedimiento—Proceder según se indica en *Cromatografía en Capa Delgada* en *Cromatografía* <621>. Secar la placa durante 15 minutos a 80° . Examinar la placa bajo luz UV a 254 nm y 365 nm. El cromatograma de la *Solución de aptitud del sistema* presenta dos manchas menores claramente separadas con valores R_f de aproximadamente 0,18 y 0,22. Comparar las intensidades de todas las manchas secundarias observadas en el cromatograma de la *Solución de prueba* con las intensidades de las manchas principales de los cromatogramas de las *Soluciones estándar*. Cualquier mancha obtenida a partir de la *Solución de prueba*, excepto la mancha principal, no es mayor en tamaño que la mancha obtenida a partir de la *Solución estándar 1* (0,3%), y como máximo, dos manchas son más intensas que la mancha obtenida a partir de la *Solución estándar 2* (0,1%).

PRUEBA 2—

Solución amortiguadora de pH 3,0 y Fase móvil—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución de aptitud del sistema—Disolver aproximadamente 5 mg de Besilato de Amlodipino en 5 mL de peróxido de hidrógeno y calentar a 70° durante 45 minutos.

Solución estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Besilato de Amlodipino USP en *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,003 mg por mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 50 mg de Besilato de Amlodipino, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* <621>)—Preparar según se indica en la *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre la impureza A de amlodipino y amlodipino no es menor de 4,5. [NOTA—A efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,2 para bencensulfonato, 0,5 para la impureza A de amlodipino y 1,0 para amlodipino. La impureza A de amlodipino es 3-etil 5-metil 2-[(2-aminoetoxi)metil]-4-(2-clorofenil)-6-metilpiridin-3,5-dicarboxilato.] Inyectar en el cromatógrafo la *Solución*

estándar y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar para inyecciones repetidas no es más de 10,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas por un período que sea de aproximadamente tres veces el tiempo de retención de amlodipino y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Besilato de Amlodipino tomada, por la fórmula:

$$100(1/F)(C_S/C_T)(r_i/r_S)$$

en donde *F* es el factor de respuesta relativa, que es igual a 0,5 para la impureza A de amlodipino y a 1,0 para otras impurezas; *C_S* y *C_T* son las concentraciones, en mg por mL, de besilato de amlodipino en la *Solución estándar* y la *Solución de prueba*, respectivamente; *r_i* es la respuesta para cada pico de impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y *r_S* es la respuesta del pico de besilato de amlodipino obtenido a partir de la *Solución estándar*: no se encuentra más de 0,3% de la impureza A de amlodipino, y no se encuentra más de 0,3% de otras impurezas totales. Descartar cualquier pico de menos de 0,03% y descartar cualquier pico debido al bencensulfonato.

Valoración—

Solución amortiguadora de pH 3,0—Disolver 7,0 mL de trietilamina en 800 mL de agua. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 3,0 ± 0,1 y diluir con agua a 1 L.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora de pH 3,0*, metanol y acetonitrilo (50:35:15). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Besilato de Amlodipino USP en *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,05 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 50 mg de Besilato de Amlodipino, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar. Transferir 5,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 237 nm y una columna de 3,9 mm × 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de C₂₀H₂₅ClN₂O₅ · C₆H₆O₃S en la porción de Besilato de Amlodipino tomada, por la fórmula:

$$100(C_S/C_U)(r_U/r_S)$$

en donde *C_S* y *C_U* son las concentraciones, en mg por mL, de besilato de amlodipino en la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración*, respectivamente; y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Besilato de Atracurio

Cambio en la redacción:

Pureza cromatográfica—

Solución amortiguadora, *Solución A*, *Solución B* y *Fase móvil* — Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Transferir 1,0 mL de la *Preparación estándar*, preparada según se indica en la *Valoración*, a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Solución A* y mezclar.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Preparar según se indica en la *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: las respuestas de los isómeros *cis-cis* de no menos de dos inyecciones no difieren en más de 10%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos, excepto los tres picos isoméricos principales. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Besilato de Atracurio tomada, por la fórmula:

$$\blacksquare 10\,000(1/F)(C/W)(r_i/r_S)\blacksquare_{1S} \text{ (USP30)}$$

en donde ■*F* es el factor de respuesta relativo del pico de impureza, que es 1,9 para laudanosina y 1,0 para todas las demás impurezas desconocidas; ■_{1S} (USP30) *C* es la concentración, en mg por mL, del isómero *cis-cis* en la *Solución estándar*; *W* es el peso, en mg, de Besilato de Atracurio tomado para preparar la *Solución de prueba*; *r_i* es la respuesta del pico de cada impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y *r_S* es la respuesta de pico del isómero *cis-cis* obtenido a partir de la *Solución estándar*: ■ no se encuentra más de 0,5% de laudanosina, no se encuentra más de 1,0% de cualquier otra impureza individual; ■_{1S} (USP30) y no se encuentra más de 3,5% de impurezas totales. ■[NOTA—A los efectos de la identificación, el tiempo de retención relativo para laudanosina es aproximadamente 0,3.] ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Valoración—

Solución amortiguadora—Transferir aproximadamente 10,2 g de fosfato monobásico de potasio a un matraz volumétrico de 1000 mL y disolver en aproximadamente 950 mL de agua. Mientras se mezcla, ajustar con ácido fosfórico a un pH de 3,1, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución A—Preparar una mezcla de *Solución amortiguadora*, acetonitrilo y metanol (75:20:5).

Solución B—Preparar una mezcla de *Solución amortiguadora*, metanol y acetonitrilo (50:30:20).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en *Solución A* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Besilato de Atracurio USP para obtener una solución con una concentración conocida que contenga aproximadamente 1,0 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 100 mg de Besilato de Atracurio, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Solución A* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 280 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 desactivado para bases. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Elución
0	80	20	equilibrio
0–5	80	20	isocrática
5–15	80→40	20→60	gradiente lineal
15–25	40	60	isocrática
25–30	40→0	60→100	gradiente lineal

Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: ■_{1S} (USP30) la resolución, *R*, entre el isómero *trans-trans* y el isómero *cis-trans*, y entre el isómero *cis-trans* y el isómero *cis-cis*, no es menor de 1,1; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. ■[NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de

retención relativos son aproximadamente 0,8, 0,9 y 1,0 para el isómero *trans-trans*, el isómero *cis-trans* y el isómero *cis-cis*, respectivamente.]■^{1S} (USP30)

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar las respuestas correspondientes a los tres picos isoméricos. Calcular la cantidad, en mg, de C₆₅H₈₂N₂O₁₈S₂ en la porción de Besilato de Atracurio tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Besilato de Atracurio USP en la *Preparación estándar*; y *r_U* y *r_S* son las sumas de las respuestas correspondientes a los picos del isómero *trans-trans*, el isómero *trans-cis* y el isómero *cis-cis* obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Azitromicina

Cambio en la redacción:

Etiquetado—Etiquetar indicando si se trata del monohidrato o del dihidrato. En los casos en los que se indique la cantidad de azitromicina en el etiquetado de cualquier preparación que contenga Azitromicina, aquella se deberá entender en términos de azitromicina anhidra (C₃₈H₇₂N₂O₁₂). ■Si se usa una prueba diferente de la *Prueba 1*, el etiquetado declara la prueba de *Límite de sustancias relacionadas* con la cual cumple el artículo.■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—*ER Azaeritromicina A USP*. *ER Azitromicina USP*. ■*ER Identidad de Azitromicina USP*. *ER N-Óxido de Azitromicina USP*.■^{1S} (USP30) *ER N-Demetilazitromicina USP*. *ER Desosaminilazitromicina USP*.

Cambio en la redacción:

Límite de sustancias relacionadas—■[NOTA—Realizar la *Prueba 1* o la *Prueba 2*, dependiendo del proceso de fabricación usado.]

PRUEBA 1—■^{1S} (USP30)[NOTA—Usar agua que tenga una resistividad no menos de 18 Mohm cm.]

Fase móvil—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución amortiguadora de fosfato de potasio de pH 7,5—Transferir 2,7 g de fosfato monobásico de potasio a un matraz volumétrico de 1000 mL. Diluir a volumen con agua y mezclar. Ajustar con hidróxido de potasio 10 N a un pH de 7,5 ± 0,1.

Solución de dilución—Preparar una mezcla de *Solución amortiguadora de fosfato de potasio de pH 7,5* y acetonitrilo (750:250).

Solución madre del estándar—Disolver cuantitativamente cantidades, pesadas con exactitud, de ER Desosaminilazitromicina USP, ER N-Demetilazitromicina USP y ER Azitromicina USP con acetonitrilo para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 45; 105 y 160 µg por mL, respectivamente.

Solución estándar—Transferir 4,0 mL de la *Solución madre del estándar* a un matraz volumétrico de 200 mL, diluir a volumen con la *Solución de dilución* y mezclar. Esta solución contiene concentraciones conocidas de ER Desosaminilazitromicina USP, ER N-Demetilazitromicina USP y ER Azitromicina USP de aproximadamente 0,9; 2,1 y 3,2 µg por mL, respectivamente.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 33 mg de Azitromicina, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 5 mL de acetonitrilo y someter a ultrasonido

durante aproximadamente 20 segundos para disolver. Diluir a volumen con *Solución de dilución* y mezclar. [NOTA—Usar esta solución dentro de las 6 horas.]

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector electroquímico amperométrico con electrodos dobles de carbón vítreo operado en la modalidad de oxidación selectiva con el electrodo 1 ajustado a +0,70 ± 0,05 V y el electrodo 2 ajustado a +0,85 ± 0,05 V, y la corriente de fondo optimizada a 95 ± 25 nanoamperios, una guarda columna de 4,6 mm × 5 cm rellena con material L29 de 5 µm y una columna analítica de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L29 de 5 µm o rellena con material L49 de 3 µm sin la guarda columna. [NOTA—En general, mantener el electrodo 1 a 0,12 V por debajo del potencial del electrodo 2 y mantener los electrodos a una temperatura constante de aproximadamente 26°.] La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,4 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo, la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el **Procedimiento**: la eficiencia de la columna no es menos de 1500 platos teóricos para el pico de azitromicina; el factor de asimetría para cada uno de estos compuestos no es mayor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 5% para cada uno de estos compuestos. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,38 para desosaminilazitromicina, 0,54 para N-demetilazitromicina y 1,0 para azitromicina.]

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas, empleando un período de elución para la *Solución de prueba* que sea 3,3 veces el tiempo de elución del pico de azitromicina en el cromatograma de la *Solución estándar*, y medir las áreas de todos los picos. Calcular los porcentajes de desosaminilazitromicina y de N-demetilazitromicina en la Azitromicina tomada, por la fórmula:

$$0,1(CP/W)(r_i/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en µg por mL, del Estándar de Referencia USP adecuado en la *Solución estándar*; *P* es la potencia especificada, en porcentaje, del Estándar de Referencia USP correspondiente; *W* es el peso, en mg, de Azitromicina tomado para preparar la *Solución de prueba*; y *r_i* y *r_S* son las áreas de los picos para el analito correspondiente en los cromatogramas obtenidas a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente. Calcular los porcentajes de otras sustancias relacionadas en la Azitromicina tomada, por la fórmula:

$$0,01(CP/W)(r_i/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en µg por mL, de ER Azitromicina USP en la *Solución estándar*; *P* es la pureza especificada, en µg por mg, de ER Azitromicina USP; *W* es el peso, en mg, de la Azitromicina tomada para preparar la *Solución de prueba*; *r_i* es el área del pico para un pico de una sustancia relacionada individual en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y *r_S* es el área del pico de azitromicina en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*. No se encuentra más de 0,3% de desosaminilazitromicina, 0,7% de N-demetilazitromicina y 1,0% de cualquier otra sustancia individual relacionada; la suma de todas las sustancias relacionadas no es más de 3,0%.

■**PRUEBA 2**—

Solución amortiguadora de fosfato—Disolver aproximadamente 8,7 g de fosfato dibásico de potasio en 1 L de agua, ajustar con ácido fosfórico al 20% a un pH de 8,2 y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y *Solución amortiguadora de fosfato* (6:4). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución estándar 1—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Azitromicina USP en Fase móvil, y diluir cuantitativamente para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 35 µg por mL.

Solución estándar 2—Preparar una solución en Fase móvil que contenga aproximadamente 7 mg de ER Identidad de Azitromicina USP por mL.

Solución estándar 3—Preparar una solución en Fase móvil que contenga aproximadamente 14 µg de ER N-Óxido de Azitromicina USP por mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 70,0 mg de Azitromicina, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Solución de aptitud del sistema—Preparar una solución en *Fase móvil* que contenga aproximadamente 0,07 mg de ER Azaeritromicina A USP y 7 mg de ER Azitromicina USP por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 210 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,9 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 30°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre azaeritromicina A y azitromicina no es menor de 8,0; y el factor de asimetría para el pico de azitromicina no es mayor de 2,5. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,47 para azaeritromicina A y 1,00 para azitromicina.]

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar 1*, de la *Solución estándar 2*, de la *Solución estándar 3*, de la *Solución de prueba* y de la *Fase móvil*, registrar los cromatogramas, identificar los picos en el cromatograma de la *Solución de prueba* en comparación con los cromatogramas obtenidos a partir de la *Solución estándar 2* y de la *Solución estándar 3*, y medir las áreas de los picos. Descartar cualquier pico debido al frente del disolvente y cualquier pico correspondiente a los obtenidos a partir de la *Fase móvil*. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Azitromicina tomada, por la fórmula:

$$(CP/W)(1/F)(r_i/r_s)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Azitromicina USP en la *Solución estándar 1*; *P* es la pureza especificada, en µg por mg, de ER Azitromicina USP; *W* es el peso, en mg, de Azitromicina tomada para preparar la *Solución de prueba*; *F* es el factor de respuesta relativa (ver la *Tabla 1*); *r_i* es el área del pico de cualquier impureza obtenida a partir de la *Solución de prueba*; y *r_s* es el área del pico de azitromicina obtenida a partir de la *Solución estándar 1*. Las impurezas cumplen con los límites que se especifican en la *Tabla 1*. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Subsalicilato de Bismuto, Suspensión Oral

» La Suspensión Oral de Subsalicilato de Bismuto es una suspensión que contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de C₇H₅BiO₄. Puede contener uno o más amortiguadores, colorantes, saborizantes, conservantes, estabilizantes, edulcorantes y agentes de suspensión adecuados.

Identificación—

A: Cumple con los requisitos de las pruebas para *Bismuto* (191).

B: Cumple con los requisitos de las pruebas para *Salicilato* (191), después de acidificar con ácido nítrico.

pH (791): entre 3,0 y 5,0.

Límites microbianos (61)—El recuento total de microorganismos aerobios no excede de 100 ufc por g, el recuento combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de 50 ufc por g y cumple con los requisitos de las pruebas para determinar la ausencia de *Escherichia coli*.

Valoración—

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 500 mg de bismuto metálico, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 200 mL, disolver en 12 mL de ácido nítrico y diluir a volumen con ácido nítrico 0,01 N. Transferir 10,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 500 mL y diluir a volumen con ácido nítrico 1 N para obtener una solución con una concentración de 50 µg de bismuto por mL.

Preparación de valoración—Transferir una cantidad, medida con exactitud, de aproximadamente 10 g de Suspensión Oral, previamente bien agitada en su envase original para garantizar la homogeneidad, a un matraz volumétrico de 200 mL. Agregar aproximadamente 100 mL de ácido nítrico 1 N, mezclar y diluir a volumen con ácido nítrico 1 N. Mezclar bien sin agitar, transferir 10,0 mL de esta mezcla a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con ácido nítrico 1 N. Centrifugar aproximadamente 20 mL a 4500 rpm durante al menos 10 minutos.

Procedimiento—Transferir un volumen, medido con exactitud, de la *Preparación de valoración* que contenga aproximadamente 0,9 mg de subsalicilato de bismuto y 10 mL de la *Preparación estándar* a sendos matraces volumétricos de 50 mL. Agregar 10,0 mL de solución de ácido ascórbico al 10% y 25,0 mL de solución de yoduro de potasio al 20% a cada matraz volumétrico, diluir a volumen con agua y mezclar bien. Determinar concomitantemente las absorbancias de ambas soluciones en celdas de 1,0 cm a una longitud de onda

Tabla 1

Compuesto	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta Relativa	Límite (p/p, %)
N-Óxido de azitromicina	0,20	0,45	0,40
3'-(N,N-dimetil)-3'-N-formilazitromicina	0,26	1,8	0,30
3'-N-demetil-3'-N-formilazitromicina (rotamero 1)	0,34	4,1	0,15
3'-N-demetil-3'-N-formilazitromicina (rotamero 2)	0,37	4,1	0,15
6-Demetilazitromicina (azaeritromicina A)	0,47	0,67	0,50
3'-De(dimetilamino)-3'-oxoazitromicina	0,80	1,9	0,25
2-Desetil-2-propilazitromicina	1,52	1,0	0,50
3-Deoxiaazitromicina (azitromicina B)	1,60	1,0	0,50
3'-N-demetil-3'-N-[(4-metilfenil)sulfonil]-azitromicina	2,14	7,0	0,50
Impureza individual desconocida	—	1,0	0,20
Impurezas totales	—	—	2,0

de 463 nm con un espectrofotómetro adecuado, usando el blanco de reactivos para ajustar el espectrofotómetro. Calcular la cantidad, en mg, de subsalicilato de bismuto ($C_7H_5BiO_4$) en la porción de Suspensión Oral tomada, por la fórmula:

$$(362,09/208,98)20(C/V)(A_U/A_S)$$

en donde 362,09 y 208,98 son los pesos moleculares de subsalicilato de bismuto y de bismuto, respectivamente; C es la concentración, en μg por mL, de bismuto en la *Preparación estándar*; V es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración* tomada; y A_U y A_S son las absorbancias de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Subsalicilato de Bismuto, Tabletas

» Las Tabletas de Subsalicilato de Bismuto contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de subsalicilato de bismuto ($C_7H_5BiO_4$).

Etiquetado—Etiquetar las Tabletas masticables para indicar que deben masticarse antes de tragarlas.

Identificación—

A: Cumple con los requisitos de las pruebas para *Bismuto* (191).

B: Después de acidificar con ácido nítrico, cumple con los requisitos de la prueba para *Salicilato* (191) con cloruro férrico SR.

Desintegración (701): 10 minutos. [NOTA—Esta prueba no se aplica a Tabletas etiquetadas como masticables.]

Valoración—

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 500 mg de bismuto, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 200 mL, disolver en 12 mL de ácido nítrico y diluir a volumen con ácido nítrico 0,01 N. Transferir 10,0 mL de la solución así obtenida a un matraz volumétrico de 500 mL y diluir a volumen con ácido nítrico 1 N para obtener una concentración de 50 μg de bismuto por mL.

Preparación de valoración—Transferir una porción pesada con exactitud de Tabletas reducidas a polvo fino, equivalente aproximadamente a 90 mg de subsalicilato de bismuto, a un matraz volumétrico de 200 mL, agregar aproximadamente 150 mL de ácido nítrico 1 N, y someter a ultrasonido durante 2 minutos. Diluir a volumen con ácido nítrico 1 N. Transferir 20,0 mL de la solución así obtenida a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con ácido nítrico 1 N. Centrifugar una porción a 4500 rpm durante al menos 10 minutos.

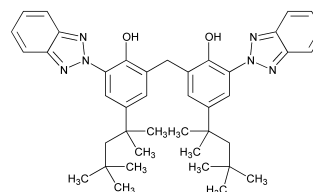
Procedimiento—Transferir 10,0 mL, medidos con exactitud, de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar* a sendos matraces volumétricos de 50,0 mL. Agregar 10,0 mL de solución de ácido ascórbico al 10% y 25,0 mL de solución de yoduro de potasio al 20% a cada matraz volumétrico y diluir a volumen con ácido nítrico 1 N. Determinar concomitantemente la absorbancia de las soluciones a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 463 nm, con un espectrofotómetro adecuado utilizando las soluciones de reactivos combinados como blanco. Calcular la cantidad, en mg, de $C_7H_5BiO_4$ en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$(362,09/208,98)(C)(A_U/A_S)$$

en donde 362,09 y 208,98 son los pesos moleculares de subsalicilato de bismuto y de bismuto, respectivamente; C es la concentración, en mg por mL, de bismuto en la *Preparación estándar*; y A_U y A_S son las absorbancias de las soluciones de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Bisotrizol



$C_{41}H_{50}N_6O_2$ 658,90

Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)]-

2,2'-Metilenbis[6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol] [103597-45-1].

» El Bisotrizol contiene no menos de 96,0 por ciento y no más de 102,0 por ciento de $C_{41}H_{50}N_6O_2$, calculado con respecto a la sustancia tal como se encuentra.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados y almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Bisotrizol USP*. *ER Compuesto Relacionado A de Bisotrizol USP*. *ER Mezcla de Resolución de Bisotrizol USP*.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Metales pesados, Método II (231): 0,002%.

Límite de compuesto relacionado A de bisotrizol y del isómero de bisotrizol—

Diluyente, Solución A, Solución B y Fase móvil—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución madre del estándar A—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Bisotrizol USP en tetrahidrofurano para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,65 mg por mL.

Solución madre del estándar B—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Bisotrizol USP en tetrahidrofurano para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,40 mg por mL.

Solución estándar—Transferir cuantitativamente 5 mL de *Solución madre del estándar A* y 1,0 mL de *Solución madre del estándar B* a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 60 mL de tetrahidrofurano y diluir a volumen con *Diluyente*.

Solución de prueba—Proceder según se indica en la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre bisotrizol y el isómero de bisotrizol no es menor de 1,5. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,42 para el compuesto relacionado A de bisotrizol y aproximadamente 1,1 para el isómero de bisotrizol.]

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 10 μL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de compuesto relacionado A de bisotrizol tomado, por la fórmula:

$$10\,000(C/W)(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Compuesto Relacionado A de Bisotrizol USP; W es el peso, en mg, de

Bisotrizol tomado; r_U es la respuesta del pico para el compuesto relacionado A de bisotrizol en la *Solución de prueba*; y r_S es la respuesta del pico para el compuesto relacionado A de bisotrizol en la *Solución estándar*: no se encuentra más de 0,5% del compuesto relacionado A de bisotrizol. Calcular el porcentaje del isómero de bisotrizol tomado, por la fórmula:

$$10\,000(C/W)(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Bisotrizol USP; W es el peso, en mg, de Bisotrizol tomado; r_U es la respuesta del pico para el isómero de bisotrizol en la *Solución de prueba*; y r_S es la respuesta del pico de bisotrizol en la *Solución estándar*: no se encuentra más de 4,0% del isómero de bisotrizol.

Compuestos relacionados—

Diluyente, Solución A, Solución B, Fase móvil y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución de prueba—Proceder según se indica en la *Preparación de valoración*.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 10 μ L) de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de todos los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Bisotrizol tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_S)$$

en donde r_i es la respuesta del pico para cada impureza individual, y r_S es la suma de las respuestas de todos los picos: no se encuentra más de 0,1% de cualquier impureza individual, excluidos el compuesto relacionado A de bisotrizol y el isómero de bisotrizol. No se encuentra más de 4,0% de impurezas totales, incluidos el compuesto relacionado A de bisotrizol y el isómero de bisotrizol, determinados en la prueba para el *Límite de compuesto relacionado A de bisotrizol y del isómero de bisotrizol*.

Valoración—

Diluyente—Preparar una mezcla (60:40) que contenga tetrahydrofurano y una solución acuosa de la sal de sodio del ácido 1-pentansulfónico al 0,2% (p/v).

Solución A—Preparar una solución filtrada y desgasificada que contenga 0,4 g de la sal de sodio del ácido 1-pentansulfónico, 800 mL de metanol, 200 mL de agua y 0,5 mL de ácido fosfórico.

Solución B—Preparar una solución filtrada y desgasificada que contenga 0,4 g de la sal de sodio del ácido 1-pentansulfónico, 1000 mL de metanol y 0,5 mL de ácido fosfórico.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Mezcla de Resolución de Bisotrizol USP en tetrahydrofurano, y diluir cuantitativamente con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,8 mg por mL de bisotrizol.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 80 mg de ER Bisotrizol USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver en 60 mL de tetrahydrofurano, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 80 mg de Bisotrizol, pesados con exactitud a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver en 60 mL de tetrahydrofurano, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 346 nm y una columna de 3,0 mm \times 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,8 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 40°. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0–1	70	30	isocrática
1–11	70→3	30→97	gradiente lineal
11–27	3	97	isocrática
27–28	3→70	97→30	gradiente lineal

Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema*, y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,0 para

bisotrizol y 1,1 para el isómero de bisotrizol; la resolución, R , entre bisotrizol y el isómero de bisotrizol no es menor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* no es más de 2,0%.

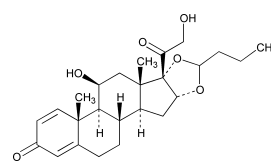
Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ L) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{41}H_{50}N_6O_2$ en la porción de Bisotrizol tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Bisotrizol USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Budesónida



$C_{25}H_{34}O_6$ 430,53

Pregna-1,4-diene-3,20-dione, 16,17-butyridenebis(oxy)-11,21-dihydroxy-, [11 β ,16 α (R)], y 16 α ,17-[(S)-Butyridenebis(oxy)]-11 β ,21-dihydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione.

(RS)-11 β ,16 α ,17,21-Tetrahidroxipregna-1,4-dieno-3,20-diona 16,17-acetal cíclico con butiraldehído [51372-29-3; 51372-28-2; 51333-22-3].

» La Budesónida es una mezcla de dos formas epiméricas, epímero A(C-22S) y epímero B(C-22R). Contiene no menos de 44,0 por ciento y no más de 51,0 por ciento de epímero A, y la suma de ambos epímeros no es menos de 98,0 por ciento y no es más de 102,0 por ciento de $C_{25}H_{34}O_6$, calculado con respecto a la sustancia seca.

NOTA—Proteger todas las soluciones que contengan budesónida de la luz.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables y resistentes a la luz. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—ER Budesónida USP.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: Absorción en el Ultravioleta (197U)—

Solución: 25 μ g por mL.

Medio: metanol.

Límites microbianos (61)—El recuento total de microorganismos aerobios no excede de 1000 ufc por g y el recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de 100 ufc por g.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° hasta peso constante. No pierde más de 0,3% de su peso.

Límite de 21-acetato de budesónida—

Solución amortiguadora—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (55:45). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Preparar según se indica en la *Preparación estándar* en la *Valoración*.

Solución de prueba—Preparar según se indica en la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 3,1 para el primer epímero eluido de 21-acetato de budesónida, aproximadamente 3,2 para el segundo epímero eluido de 21-acetato de budesónida, 1,0 para el primer epímero eluido de budesónida (epímero B) y aproximadamente 1,1 para el segundo epímero eluido de budesónida (epímero A); y la eficiencia de la columna no es menos de 5500 platos teóricos, determinada a partir del pico del epímero B de budesónida.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 20 µL) de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de 21-acetato de budesónida en la porción de Budesónida tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la suma de las áreas de los picos de los dos epímeros de 21-acetato de budesónida; y r_s es la suma de las áreas de los dos picos de budesónida; no se encuentra más de 0,10% de 21-acetato de budesónida.

Límite de 11-cetobudesónida—

Solución amortiguadora—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora*, acetonitrilo e isopropanol (65:26:9). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Preparar según se indica en la *Preparación estándar* en la *Valoración*.

Solución de prueba—Proceder según se indica en la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 3,5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 50°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,73 y 0,78, respectivamente, para los dos epímeros de 11-cetobudesónida, aproximadamente 0,68 para 21-deshidrobudesónida, aproximadamente 0,84 para 14,15-deshidrobudesónida y 1,0 para el primer epímero eluido de budesónida (epímero B); la resolución, R , entre el primer epímero de 11-cetobudesónida y 21-deshidrobudesónida no es menor de 1,0 y entre el segundo epímero de 11-cetobudesónida y 14,15-deshidrobudesónida no es menor de 1,2; y la eficiencia de la columna no es menos de 5500 platos teóricos, determinada a partir del pico del epímero B de budesónida.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 20 µL) de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de 11-cetobudesónida en la porción de Budesónida tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_v)$$

en donde r_i es la suma de las áreas de los dos picos de cetobudesónida; y r_v es la suma de las áreas de los dos picos de budesónida; no se encuentra más de 0,2% de 11-cetobudesónida.

Compuestos relacionados—

Solución amortiguadora y *Fase móvil*—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Preparar según se indica en la *Preparación estándar* en la *Valoración*.

Solución de prueba—Proceder según se indica en la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 5500 platos teóricos, determinada a partir del pico de epímero B de budesónida.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 20 µL) de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir todas las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Budesónida tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es el área del pico de cada impureza; y r_s es la suma de las respuestas de todos los picos: las impurezas cumplen con los requisitos indicados en la *Tabla* siguiente.

Nombre del Compuesto	Tiempo de Retención Relativo	Límite (%)
16 α -Hidroxilprednisolona ¹	0,11	0,2
D-Homobudesónida ²	0,36	0,10
21-Deshidrobudesónida (epímeros) ³	0,61; 0,66	0,07
14,15-Deshidrobudesónida ⁴	0,86	0,10
Impurezas especificadas totales	—	0,4
Cualquier otra impureza	—	0,10
Total de impurezas sin especificar	—	0,4

¹ 11 β ,16 α ,17,21-tetrahidroxipregna-1,4-dieno-3,20-diona

² 16 α ,17-[(1*RS*)-etilidenbis(oxo)]-11 β ,21-dihidroxipregna-1,4-dieno-3,20-diona

³ 16 α ,17-[(1*RS*)-butilidenbis(oxo)]-11 β -hidroxi-3,20-dioxopregna-1,4-dien-21-al

⁴ 16 α ,17-[(1*RS*)-butilidenbis(oxo)]-11 β ,21-dihidroxipregna-1,4,14-trieno-3,20-diona

Valoración—

Solución amortiguadora—Disolver 3,17 g de fosfato monobásico de sodio en agua, agregar 0,23 g de ácido fosfórico, diluir con agua hasta 1000 mL y mezclar. El pH es 3,2 ± 0,1.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (68:32). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en acetonitrilo una cantidad, pesada con exactitud, de ER Budesónida USP y diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Solución amortiguadora* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL. La proporción de acetonitrilo en la *Preparación estándar* no excede de 30%.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 25 mg de Budesónida, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver en 15 mL de acetonitrilo, diluir a volumen con *Solución amortiguadora* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el tiempo de retención relativo para el epímero A es 1,1 con respecto al epímero B; la resolución, R , entre los dos picos de los epímeros de budesónida es mayor de 1,5; y la eficiencia de la columna no es menos de 5500 platos teóricos, determinada a partir del pico del epímero B de budesónida.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y

medir las áreas de los picos principales. Calcular el porcentaje de epímero A ($C_{25}H_{34}O_6$) en la porción de Budesónida tomada, por la fórmula:

$$100[r_{UA}/(r_{UA} + r_{UB})]$$

en donde r_{UA} y r_{UB} son las áreas de los picos del epímero A y el epímero B obtenidas a partir de la *Preparación de valoración*, respectivamente. Calcular la cantidad, en mg, de budesónida ($C_{25}H_{34}O_6$) en la porción de Budesónida tomada, por la fórmula:

$$50C[(r_{UA} + r_{UB})/(r_{SA} + r_{SB})]$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Budesónida USP en la *Preparación estándar*; r_{SA} y r_{SB} son las áreas de los picos del epímero A y el epímero B obtenidas a partir de la *Preparación estándar*, respectivamente; y los otros términos son los definidos anteriormente. ■^{1S} (USP30)

Clorhidrato de Bupropión, Tabletas de Liberación Prolongada

Cambio en la redacción:

Disolución (711)—

■PARA PRODUCTOS QUE DECLARAN ESTAR DESTINADOS A ADMINISTRARSE CADA 12 HORAS—■^{1S} (USP30)

PRUEBA 1—

Medio: agua; 900 mL.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempos: 1; 4 y 8 horas.

Procedimiento—Determinar la cantidad de $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ disuelta empleando absorción UV a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 298 nm, utilizando una celda de 1,0 cm, en porciones filtradas de la solución en análisis, diluidas apropiadamente con *Medio* si fuera necesario, en comparación con una Solución estándar con una concentración conocida de ER Clorhidrato de Bupropión USP en el mismo *Medio*.

Tolerancias—Los porcentajes de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ disuelta en los tiempos especificados se ajustan a la *Tabla de Aceptación 2*.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta
1	entre 25% y 45%
4	entre 60% y 85%
8	no menos de 80%

PRUEBA 2—Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con la *Prueba de Disolución 2* de la USP.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N, pH 1,5; ■(preparado transfiriendo aproximadamente 50 mL de ácido clorhídrico concentrado a 6000 mL de agua, agregando aproximadamente 18 g de hidróxido de sodio, mezclando y ajustando con hidróxido de sodio diluido o con ácido clorhídrico a un pH de $1,5 \pm 0,05$); ■^{1S} (USP30) 900 mL, ■desgasificado. ■^{1S} (USP30)

Aparato 1: 50 rpm.

Tiempos: 1; 2; 4 y 6 horas.

Determinar los porcentajes de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ disuelta empleando el siguiente método.

Solución amortiguadora—Disolver 3,45 g de fosfato monobásico de sodio monohidrato en 996 mL de agua, agregar 4,0 mL de trietilamina y mezclar. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de $2,80 \pm 0,05$.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y metanol (65:35). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Disolver en *Medio* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Bupropión USP y diluir cuantitativamente con *Medio*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida similar a la esperada en la *Solución de prueba*.

Solución de prueba—Usar porciones de la solución en análisis y pasar a través de un filtro de nailon de 0,45 μ m.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 298 nm y una columna de 4,6 mm \times 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 2000 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ L) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de clorhidrato de bupropión disuelto en cada tiempo de muestreo.

Tolerancias—Los porcentajes de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ disuelta en los tiempos especificados se ajustan a la *Tabla de Aceptación 2*.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta
1	entre 25% y 50%
2	entre 40% y 65%
4	entre 65% y 90%
6	no menos de 80%

PRUEBA 3—Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con la *Prueba de Disolución 3* de la USP.

Medio, Aparato y Procedimiento—Proceder según se indica en la *Prueba 1*, excepto que la longitud de onda debe ser aproximadamente a 250 nm.

Tiempos: 1; 2; 4 y 6 horas.

Tolerancias: los porcentajes de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ disuelta en los tiempos especificados se ajustan a la *Tabla de Aceptación 2*.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta
1	entre 30% y 55%
2	entre 50% y 75%
4	entre 70% y 90%
6	no menos de 80%

■PARA PRODUCTOS QUE DECLARAN ESTAR DESTINADOS A ADMINISTRARSE CADA 24 HORAS—

PRUEBA 4—Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con la *Prueba de Disolución 4* de la USP.

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 mL, desgasificado.

Aparato 1: 75 rpm.

Tiempo: 2; 4; 8 y 16 hours.

Procedimiento—Determinar la cantidad de $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ disuelta empleando absorción UV a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 252 nm, utilizando una celda de 1,0 cm, en porciones filtradas de la solución en análisis, diluidas apropiadamente con *Medio*, si fuera necesario, en comparación con una Solución estándar con una concentración conocida de ER Clorhidrato de Bupropión USP en el mismo *Medio*.

Tolerancias—Los porcentajes de la cantidad declarada de $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ disuelta en los tiempos especificados se ajustan a la *Tabla de Aceptación 2*.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta
2	no más de 20%
4	entre 20% y 45%
8	entre 65% y 85%
16	no menos de 80%

■^{1S} (USP30)

Carbonato de Calcio, Magnesio y Simeticona, Tabletas

(Título vigente—no cambiará hasta el 1° de febrero de 2010)
Cambio de título de la monografía—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010

Ver Carbonato de Calcio, Magnesio y Simeticona, Tabletas Masticables

Agregar lo siguiente:

■ Carbonato de Calcio, Magnesio y Simeticona, Tabletas Masticables

(La Monografía con este nuevo título—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010)

(El título actual de la monografía es Carbonato de Calcio, Magnesio y Simeticona, Tabletas)

» Las Tabletas Masticables de Carbonato de Calcio, Magnesio y Simeticona contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de carbonato de calcio (CaCO_3) e hidróxido de magnesio [$\text{Mg}(\text{OH})_2$], y una cantidad de polidimetilsiloxano [$-(\text{CH}_3)_2\text{SiO}-$]_n que es no menos de 85,0 por ciento y no más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de simeticona.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Etiquetado—Etiquetar las Tabletas Masticables indicando que se deben masticar antes de tragar. Etiquetar las Tabletas Masticables declarando el contenido de sodio, en mg por Tableta Masticable, si es más de 5 mg por Tableta Masticable.

Estándares de referencia USP (11)—ER Polidimetilsiloxano USP.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197S)—

Solución—Utilizando Tabletas Masticables, proceder para obtener los espectros de absorción IR según se indica en *Valoración de polidimetilsiloxano en Alúmina, Magnesio y Simeticona, Tabletas Masticables*.

B: La adición de ácido clorhídrico 1 N a una Tableta Masticable produce efervescencia y la solución resultante, después de haber sido filtrada, cumple con los requisitos a las pruebas para *Calcio* (191).

C: Calentar 2 Tabletas Masticables en 20 mL de ácido sulfúrico 1 N. Enfriar, agregar 20 mL de alcohol, mezclar y dejar en reposo durante 30 minutos. Filtrar esta solución y agregar 2 mL de ácido clorhídrico 1 N al filtrado: esta solución cumple con los requisitos a las pruebas para *Magnesio* (191).

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos de *Variación de Peso* con respecto al carbonato de calcio y al hidróxido de magnesio.

Capacidad neutralizante de ácido (301)—La dosis mínima individual recomendada en el etiquetado no consume menos de 5 mEq de ácido.

Actividad antiespumante—

Solución espumante—Disolver 500 µg de Azul FD&C No. 1 y 1 g de octoxinol 9 en 100 mL de ácido clorhídrico 0,1 N.

Procedimiento—[NOTA—Para cada prueba, usar un recipiente cilíndrico de vidrio de 250 mL, limpio y sin usar.] Transferir una cantidad de Tabletas Masticables reducidas a polvo fino, que haya pasado completamente a través de un tamiz de malla 80, equivalente a 20 mg de simeticona, a un recipiente cilíndrico de vidrio de 250 mL limpio, con una tapa de 50 mm, que contenga 100 mL de *Solución espumante* previamente calentada a 37°. Proceder según se indica en *Procedimiento* en la prueba para *Actividad antiespumante* en *Simeticona*, comenzando donde dice “Tapar el recipiente”. El tiempo de actividad antiespumante no excede de 45 segundos.

Contenido de sodio (si así lo indica la etiqueta)—

Solución de cloruro de lantano—Preparar según se indica en la *Valoración de carbonato de calcio e hidróxido de magnesio*.

Ácido clorhídrico diluido—Preparar según se indica en la *Valoración de polidimetilsiloxano*.

Solución estándar—Transferir 2,542 g de cloruro de sodio, previamente secados a 105° durante 2 horas, a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 5,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 4,0 mL de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 100 mL que contenga 6,0 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y 2,0 mL de *Solución de cloruro de lantano*, diluir a volumen con agua y mezclar. Esta solución contiene 2,0 µg de sodio (Na) por mL.

Solución de prueba—Transferir 3,0 mL de la capa acuosa reservada durante la elaboración de la *Preparación de valoración* en la *Valoración de polidimetilsiloxano* a un matraz volumétrico de 50 mL que contenga 1,0 mL de *Solución de cloruro de lantano*, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución blanco—Transferir 15,0 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y 5,0 mL de *Solución de cloruro de lantano* a un matraz volumétrico de 250 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Solución estándar* y la *Solución de prueba* en línea de emisión del sodio a 589,0 nm, con un espectrofotómetro de absorción atómica adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)) equipado con una lámpara de sodio de cátodo hueco y una llama de aire-acetileno, utilizando la *Solución blanco* como blanco. Calcular los mg de sodio (Na) en cada Tableta Masticable tomada, por la fórmula:

$$(5C/6)(A/W)(A_U/A_S)$$

en donde *C* es la concentración, en µg por mL, de sodio en la *Solución estándar*; *A* es el peso promedio, en mg, de cada Tableta Masticable; *W* es el peso, en mg, de la porción de Tabletas Masticables de la *Preparación de valoración* en la *Valoración de polidimetilsiloxano* usada para preparar la *Solución de prueba*; y *A_U* y *A_S* son las absorbancias de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente. Cada Tableta Masticable contiene un número de mg de sodio no mayor del declarado en la etiqueta.

Valoración de polidimetilsiloxano—

Solución de sacarina—Preparar una solución de sacarina en 4-metil-2-pentanona que contenga 12,5 mg por mL.

Ácido clorhídrico diluido—Mezclar 200 mL de ácido clorhídrico con suficiente agua para obtener 1000 mL.

Preparación estándar—Disolver una cantidad adecuada de ER Polidimetilsiloxano USP en 4-metil-2-pentanona para obtener una solución madre con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL. En el día de uso, transferir 20,0 mL de esta solución y 5,0 mL de *Solución de sacarina* a un matraz volumétrico de 250 mL, diluir a volumen con 4-metil-2-pentanona y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 0,08 mg de ER Polidimetilsiloxano USP por mL.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir una porción del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 20 mg de polidimetilsiloxano, a un separador de 125 mL. Agregar cuidadosamente 50,0 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y agitar por rotación suave hasta que la reacción disminuya. Tapar y mezclar. Liberar cuidadosamente la presión, agregar 50,0 mL de 4-metil-2-pentanona y mezclar durante 10 minutos. Dejar que las capas se separen y verter la capa acuosa en un recipiente con tapón adecuado. [NOTA—Reservar esta capa acuosa para usarla en la *Preparación de valoración* en la *Valoración de carbonato de calcio e hidróxido de magnesio* y para preparar la *Solución de prueba* en la prueba de

Contenido de sodio.] Pasar la capa orgánica a través de un filtro que contenga 50 g de sulfato de sodio anhidro. Transferir 10,0 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 1,0 mL de *Solución de sacarina*, diluir a volumen con metil isobutil cetona y mezclar.

Solución blanco—Transferir 1,0 mL de la *Solución de sacarina* a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con 4-metil-2-pentanona y mezclar.

Procedimiento—Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración* en la línea de emisión del silicio a 251,6 nm, con un espectrofotómetro de absorción atómica adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de la Luz* (851)) equipado con una lámpara de silicio de cátodo hueco y una llama de óxido nítrico-acetileno, utilizando la *Solución blanco* como blanco. Calcular la cantidad, en mg, de polidimetilsiloxano en cada Tableta Masticable tomada, por la fórmula:

$$250C(A/W)(A_U/A_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Polidimetilsiloxano USP en la *Preparación estándar*; A es el peso promedio, en mg, de cada Tableta Masticable; W es el peso, en mg, de la porción de Tabletas Masticables tomada para preparar la *Preparación de valoración*; y A_U y A_S son las absorbancias de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Valoración de carbonato de calcio e hidróxido de magnesio—

Solución de cloruro de lantano—Transferir 26,8 g de cloruro de lantano a un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 100 mL de agua y agregar cuidadosamente 50 mL de ácido clorhídrico. Mezclar y dejar que se enfríe. Diluir a volumen con agua y mezclar.

Ácido clorhídrico diluido—Preparar según se indica en la *Valoración de polidimetilsiloxano*.

Solución madre del estándar de calcio—Transferir 499,5 mg de estándar primario de carbonato de calcio a un matraz volumétrico de 200 mL y agregar 10 mL de agua. Agregar cuidadosamente 5 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y agitar por rotación suave para disolver el carbonato de calcio. Diluir a volumen con agua y mezclar. Esta solución contiene 1000 µg de calcio (Ca) por mL.

Solución madre del estándar de magnesio—Transferir 1,000 g de magnesio metálico a un matraz volumétrico de 1000 mL que contenga 10 mL de agua, agregar lentamente 10 mL de ácido clorhídrico y agitar por rotación suave para disolver el metal. Diluir a volumen con agua y mezclar. Esta solución contiene 1000 µg de magnesio (Mg) por mL.

Preparación estándar de calcio y magnesio—A un matraz volumétrico de 250 mL, agregar 10,0 mL de *Solución madre del estándar de calcio* y 5,0 mL de *Solución madre del estándar de magnesio*, diluir a volumen con agua y mezclar. Esta solución contiene 40 µg de calcio (Ca) y 20 µg de magnesio (Mg) por mL. En el día de uso, transferir 4,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL que contenga 2,0 mL de *Solución de cloruro de lantano*, diluir a volumen con agua y mezclar. Esta solución contiene 1,6 µg de calcio (Ca) y 0,8 µg de magnesio (Mg) por mL.

Preparación de valoración—Transferir un volumen medido con exactitud de la capa acuosa reservada durante la elaboración de la *Preparación de valoración* en la *Valoración de polidimetilsiloxano*, que equivalga aproximadamente a 28 mg de carbonato de calcio, a un matraz volumétrico de 200 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 3,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL que contenga 2,0 mL de *Solución de cloruro de lantano*, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución blanco—Transferir 5,0 mL de la *Solución de cloruro de lantano* a un matraz volumétrico de 250 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento para carbonato de calcio—Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración* en la línea de emisión del calcio a 422,7 nm con un espectrofotómetro de absorción atómica adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)) equipado con una lámpara de calcio de cátodo hueco y una llama de

óxido nítrico-acetileno, utilizando la *Solución blanco* como blanco. Calcular la cantidad, en mg, de carbonato de calcio (CaCO₃) en cada Tableta Masticable tomada, por la fórmula:

$$(100,09/40,08)(1000C/3V)(A/W)(A_U/A_S)$$

en donde 100,09 es el peso molecular del carbonato de calcio, 40,08 es el peso atómico del calcio; C es la concentración, en µg por mL, de calcio en la *Preparación estándar*; V es el volumen, en mL, de la capa acuosa reservada durante la elaboración de la *Preparación de valoración* en la *Valoración de polidimetilsiloxano* usado para elaborar la *Preparación de valoración*; A es el peso promedio, en mg, de cada Tableta Masticable; W es el peso, en mg, de la porción de Tabletas Masticables tomada para elaborar la *Preparación de valoración* en la *Valoración de polidimetilsiloxano*; y A_U y A_S son las absorbancias de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Procedimiento para hidróxido de magnesio—Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración* en la línea de emisión del magnesio a 285,2 nm, con un espectrofotómetro de absorción atómica adecuado (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)) equipado con una lámpara de magnesio de cátodo hueco y una llama de óxido nítrico-acetileno, utilizando la *Solución blanco* como blanco. Calcular la cantidad, en mg, de hidróxido de magnesio [Mg(OH)₂] en cada Tableta Masticable tomada, por la fórmula:

$$(58,34/24,305)(1000C/3V)(A/W)(A_U/A_S)$$

en donde 58,34 es el peso molecular de hidróxido de magnesio, 24,305 es el peso atómico de magnesio; C es la concentración, en µg por mL, de magnesio en la *Preparación estándar*; V es el volumen, en mL, de la capa acuosa reservada durante la elaboración de la *Preparación de valoración* en la *Valoración de polidimetilsiloxano* usada para elaborar la *Preparación de valoración*; A es el peso promedio, en mg, de cada Tableta Masticable tomada; W es el peso, en mg, de la porción de Tabletas Masticables tomada para elaborar la *Preparación de valoración* en la *Valoración de polidimetilsiloxano*; y A_U y A_S son las absorbancias de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2010).■_{1S} (USP30)

Cefadroxilo para Suspensión Oral

Agregar lo siguiente:

■Disolución (711)—

Medio: agua; 900 mL.

Aparato 2: 25 rpm.

Tiempo: 30 minutos.

Procedimiento—Pesar con exactitud 5,0 mL de la Suspensión Oral reconstituida y transferir al vaso de disolución. Determinar la cantidad de cefadroxilo disuelta empleando absorción UV a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 263 nm, en porciones filtradas de la solución en análisis, diluidas apropiadamente con *Medio*, si fuera necesario, en comparación con una *Solución estándar* con una concentración conocida de ER Cefadroxilo USP en el mismo *Medio*. Calcular la cantidad de cefadroxilo disuelta por la fórmula:

$$\frac{A_U \times C_S \times 900 \times 100}{A_S \times W \times D \times LC}$$

en donde A_U y A_S son las absorbancias obtenidas a partir de la solución en análisis y la *Solución estándar*, respectivamente; C_S es la concentración, en mg por mL, de la *Solución estándar*; 900 es el volumen, en mL, de *Medio*; 100 es el factor de conversión a porcentaje; W es el peso, en mg, de los 5 mL de la Suspensión Oral

reconstituida tomada; D es el factor de dilución de la solución en análisis; y LC es la cantidad declarada, en mg por 5 mL.

Tolerancias—No menos de 75% (Q) de la cantidad declarada de cefadroxilo se disuelve en 30 minutos. ■^{1S} (USP30)

Clorhidrato de Cefepima

Cambio en la redacción:

Límite de *N*-metilpirrolidina—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de ácido nítrico 0,01 N y acetonitrilo (100 : 1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

■ **Solución de enjuague de la columna**—Transferir 5,0 mL de ácido nítrico a un matraz volumétrico de 1 L. Diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir esta solución a un matraz apropiado, agregar 1 L de acetonitrilo y mezclar. ■^{1S} (USP30)

Solución estándar—Transferir aproximadamente 0,16 mL de *N*-metilpirrolidina, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar. Transferir 4,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con ácido nítrico 0,01 N y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 0,05 mg de *N*-metilpirrolidina por mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 100 mg de Clorhidrato de Cefepima, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y diluir a volumen con ácido nítrico 0,01 N, y mezclar. ■[NOTA—Se puede guardar esta solución hasta 6 horas si se mantiene a 5°; de lo contrario, usar esta solución dentro de los 30 minutos.] ■^{1S} (USP30)

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—■ Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de conductividad y una columna de 4,6 mm × 5 cm rellena con material L52 de 5 μm. Se recomienda colocar una guarda columna de 4,4 mm × 5 cm rellena con material L17 entre la bomba y el inyector. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. La conductancia de fondo típica es de aproximadamente 3500 μS. ■^{1S} (USP30) Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el tiempo de retención de la *N*-metilpirrolidina no es menos de 8 minutos y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 5,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 μL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos para *N*-metilpirrolidina. Calcular el porcentaje de *N*-metilpirrolidina en la porción de Clorhidrato de Cefepima tomada, por la fórmula:

$$1000(C/W)(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de *N*-metilpirrolidina en la *Solución estándar*; W es la cantidad, en mg, de Clorhidrato de Cefepima tomada para preparar la *Solución de prueba*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de *N*-metilpirrolidina obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentra más de 0,3%. ■[NOTA—La Cefepima de la *Solución de prueba* eluye como un pico ancho aproximadamente a los 55 minutos. Para minimizar el tiempo de equilibración al comienzo del día siguiente, se recomienda encender el detector la noche anterior y bombear la *Fase móvil* a través del sistema durante la noche a una velocidad de flujo de 0,2 mL por minuto. Se recomienda también, después de cada inyección de *Solución de prueba*, lavar el cromatógrafo con *Solución de enjuague de la columna* durante 30 minutos, a una velocidad de flujo de 1 mL por minuto, para eliminar la cefepima de la columna; y luego cambiar el sistema a *Fase móvil* a una velocidad de flujo de 1 mL por minuto para la reequilibración.] ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—

Solución de fosfato de potasio—Disolver 0,68 g de fosfato monobásico de potasio en 1000 mL de agua.

Solución A—Preparar una mezcla de *Solución de fosfato de potasio* y acetonitrilo (9 : 1). ■Ajustar con hidróxido de potasio o ácido fosfórico a un pH de 5,0, filtrar y desgasificar. ■^{1S} (USP30)

Solución B—Preparar una mezcla de *Solución de fosfato de potasio* y acetonitrilo (1 : 1). ■Ajustar con hidróxido de potasio o ácido fosfórico a un pH de 5,0, filtrar y desgasificar. ■^{1S} (USP30)

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Preparar una solución de ER Aptitud del Sistema de Clorhidrato de Cefepima USP en *Solución A* que contenga aproximadamente 1,4 mg por mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 70 mg de Clorhidrato de Cefepima, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y diluir a volumen con *Solución A*, someter a ultrasonido y mezclar. [NOTA—Inyectar esta solución inmediatamente o almacenarla en un refrigerador e inyectarla dentro de las 12 horas.]

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 μm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Elución
0–10	100	0	isocrática
10–30	100→50	0→50	gradiente lineal
30–35	50	50	isocrática
35–36	50→100	50→0	gradiente lineal

Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*:

■^{1S} (USP30) la resolución, R , entre cefepima y el compuesto relacionado A de cefepima no es menor de 5, y entre el compuesto relacionado A de cefepima y el compuesto relacionado B de cefepima no es menor de 10. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de prueba* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de capacidad, k' , es mayor de 0,6; la eficiencia de la columna no es menos de 4000 platos teóricos; y el factor de asimetría no es mayor de 1,5. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,0 para cefepima, 2,7 para el compuesto relacionado A de cefepima y aproximadamente 4,3 para el compuesto relacionado B de cefepima.] ■^{1S} (USP30)

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 10 μL) de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Clorhidrato de Cefepima tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la respuesta del pico de cada impureza; y r_s es la suma de las respuestas de todos los picos: no se encuentra más de 0,3% de compuesto relacionado A de cefepima; no se encuentra más de 0,2% de compuesto relacionado B de cefepima; y no se encuentra más de 0,1% de cualquier otra impureza.

Cimetidina

Cambio en la redacción:

Identificación—

A: ■ *Absorción en el Infrarrojo* (197K). ■ *IS* (USP30)
B: El espectro de absorción UV de una solución (1 en 80 000) en ácido sulfúrico 0,1 N presenta un máximo y un mínimo a la misma longitud de onda que el de una solución similar de ER Cimetidina USP, medida concomitantemente.

Cambio en la redacción:

Pureza cromatográfica—

Fase móvil—Mezclar 240 mL de metanol, 0,3 mL de ácido fosfórico (85%), 940 mg de 1-hexanosulfonato de sodio y suficiente agua para obtener 1 L. Filtrar antes de usar. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Preparar una solución de ER Cimetidina USP en *Fase móvil* con una concentración de 0,80 µg por mL.

Solución de prueba—Transferir 100,0 mg de Cimetidina, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 250 mL, disolver en aproximadamente 50 mL de *Fase móvil* y diluir a volumen con *Fase móvil*. Mezclar, someter a ultrasonido durante 15 minutos y volver a mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de capacidad, *k'*, no es menor de 3,0; el número de platos teóricos, *n*, no es menos de 2000; y la desviación estándar relativa de la respuesta para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. ■ Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Cimetidina tomada, por la fórmula:

$$100(0,001C_S/C_U)(r_U/r_S)$$

en donde *C_S* es la concentración, en µg por mL, de cimetidina en la *Solución estándar*; el multiplicador de 0,001 es para la conversión de µg por mL a mg por mL; *C_U* es la concentración, en mg por mL, de Cimetidina en la *Solución de prueba*; *r_U* es la repuesta del pico para cada impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y *r_S* es la respuesta del pico de cimetidina obtenido a partir de la *Solución estándar*: no se encuentra más de 0,2% de cualquier impureza individual y no se encuentra más de 1,0% de impurezas totales. ■ *IS* (USP30)

Ciprofloxacino

Cambio en la redacción:

Pureza cromatográfica—

Fase móvil, ■ *IS* (USP30) *Solución de resolución*, *Preparación de valoración* y *Sistema cromatográfico*—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Procedimiento—Proceder según se indica en el *Procedimiento* en la *Valoración*. Calcular el porcentaje de cada pico de impureza en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación de valoración* tomada, por la fórmula:

$$100 r_i / r_s$$

en donde *r_i* es la respuesta para cada pico de impureza; y *r_s* es la suma de las respuestas de todos los picos: no se encuentra más de 0,2% de análogo etilendiamínico de ciprofloxacino o de cualquier otro pico de impureza individual y la suma de todos los picos de impurezas no es más de 0,5%.

Cambio en la redacción:

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de ácido fosfórico 0,025 M, previamente ajustada con trietilamina, a un pH de 3,0 ± 0,1, y acetonitrilo (87:13). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 12,5 mg de ER Ciprofloxacino USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 25 mL. Agregar 0,1 mL de ácido fosfórico al 7%, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución de resolución—■ Preparar una solución de 0,025 mg por mL de ER Análogo Etilendiamínico de Ciprofloxacino USP en *Fase móvil*. Transferir 1,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con *Preparación estándar* y mezclar. ■ *IS* (USP30)

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 25 mg de Ciprofloxacino, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar 0,2 mL de ácido fosfórico al 7%, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 278 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm ■ *IS* (USP30) rellena con material L1 y mantener la columna a una temperatura de 30° ± 1°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: ■ *IS* (USP30) la resolución, *R*, entre el pico de análogo etilendiamínico de ciprofloxacino y el pico de ciprofloxacino no es menor de 6. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna determinada a partir del pico de ciprofloxacino no es menos de 2500 platos teóricos; el factor de asimetría para el pico de ciprofloxacino no es mayor de 2,5; ■ *IS* (USP30) y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,5%. ■ [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,7 para el análogo etilendiamínico de ciprofloxacino y 1,0 para ciprofloxacino.] ■ *IS* (USP30)

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas correspondientes a los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de C₁₇H₁₈FN₃O₃ en la porción de Ciprofloxacino tomada, por la fórmula:

$$50C(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Ciprofloxacino USP en la *Preparación estándar*; y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos de ciprofloxacino obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Ciprofloxacino, Inyección

Cambio en la redacción:

Límite de análogo etilendiamínico de ciprofloxacino—

Fase móvil, *Solución de resolución*, *Preparación de valoración* \blacksquare_{1S} (USP30) y *Sistema cromatográfico*—Preparar \blacksquare_{1S} (USP30) según se indica en la *Valoración*.

\blacksquare_{1S} (USP30)

Procedimiento—Proceder según se indica en el *Procedimiento* en la *Valoración*. \blacksquare_{1S} (USP30) Calcular el porcentaje de análogo etilendiamínico de ciprofloxacino a partir del cromatograma obtenido de la *Preparación de valoración* \blacksquare_{1S} (USP30) por la fórmula:

$$100[0,7r_A/(0,7r_A + r_C)]$$

en donde 0,7 es el factor de corrección del análogo etilendiamínico de ciprofloxacino; y r_A y r_C son las respuestas de los picos de análogo etilendiamínico de ciprofloxacino y de ciprofloxacino, respectivamente. No contiene más de 0,5% de análogo etilendiamínico de ciprofloxacino.

Cambio en la redacción:

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de ácido fosfórico 0,025 M, previamente ajustada con trietilamina a un pH de $3,0 \pm 0,1$, y acetonitrilo (87:13). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)). \blacksquare_{1S} (USP30)

Preparación estándar—Disolver cuantitativamente en *Fase Móvil* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente $\blacksquare_{0,5}$ mg \blacksquare_{1S} (USP30) por mL.

Solución de resolución—Preparar una solución de 0,025 mg por mL de ER Análogo Etilendiamínico de Ciprofloxacino USP en *Fase móvil*. Transferir 1,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con *Preparación estándar* y mezclar. \blacksquare_{1S} (USP30)

Preparación de valoración—Transferir a un matraz volumétrico de 50 mL \blacksquare_{1S} (USP30) un volumen de Inyección, medido con exactitud, que equivalga aproximadamente a 25 mg de ciprofloxacino, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 278 nm y una columna de 4,6 mm \times 25 cm rellena con material L1 y mantenerla a una temperatura de $30 \pm 1^\circ$. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el pico de análogo etilendiamínico de ciprofloxacino y el pico de ciprofloxacino no es menor de 6. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna determinada a partir del pico de ciprofloxacino no es menos de 2500 platos teóricos; el factor de asimetría para el pico de ciprofloxacino no es mayor de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,5%. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,7 para el análogo etilendiamínico de ciprofloxacino y 1,0 para ciprofloxacino.] \blacksquare_{1S} (USP30)

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ L) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de ciprofloxacino en cada mL de la Inyección tomada, por la fórmula:

$$\blacksquare_{(331,34/367,81)(50C/V)(r_U/r_S)} \blacksquare_{1S} \text{ (USP30)}$$

en donde 331,34 y 367,81 son los pesos moleculares de ciprofloxacino y clorhidrato de ciprofloxacino anhidro, respectivamente;

C es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP en la *Preparación estándar*; calculada con respecto a la sustancia anhidra; V es el volumen, en mL, de Inyección tomado para preparar la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas correspondientes a los picos de ciprofloxacino obtenidos de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Clorhidrato de Ciprofloxacino

Cambio en la redacción:

Pureza cromatográfica—

Fase móvil, \blacksquare_{1S} (USP30) *Solución de resolución*, *Preparación de valoración* y *Sistema cromatográfico*—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Procedimiento—Proceder como se indica en el *Procedimiento* de la *Valoración*. Calcular el porcentaje de cada pico de impureza en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación de valoración* tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_t)$$

en donde r_i es la respuesta para cada pico de impureza; y r_t es la suma de las respuestas de todos los picos: no se encuentra más de 0,2% de análogo etilendiamínico de ciprofloxacino o de cualquier otra impureza individual; y la suma de todos los picos de impurezas no es más de 0,5%.

Cambio en la redacción:

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de ácido fosfórico 0,025 M, previamente ajustada (con trietilamina) a un pH de $3,0 \pm 0,1$, y acetonitrilo (87:13). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver cuantitativamente en *Fase Móvil* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL.

Solución de resolución—Preparar una solución de 0,025 mg por mL de ER Análogo Etilendiamínico de Ciprofloxacino USP en *Fase móvil*. Transferir 1,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con *Preparación estándar* y mezclar. \blacksquare_{1S} (USP30)

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 25 mg de Clorhidrato de Ciprofloxacino, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 278 nm y una columna de 4,6 mm \times 25 cm \blacksquare_{1S} (USP30) rellena con material L1 y mantener la columna a una temperatura de $30 \pm 1^\circ$. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: \blacksquare_{1S} (USP30) la resolución, R , entre el pico del análogo etilendiamínico de ciprofloxacino y el pico del ciprofloxacino no es menor de 6. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna determinada a partir del pico de ciprofloxacino no es menos de 2500 platos teóricos; el factor de asimetría para el pico de Ciprofloxacino no es mayor de 2,5; \blacksquare_{1S} (USP30) y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,5%. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,7 para el análogo etilendiamínico de ciprofloxacino y 1,0 para ciprofloxacino.] \blacksquare_{1S} (USP30)

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ L) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y

medir las áreas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl$ en la porción de Clorhidrato de Ciprofloxacino tomada, por la fórmula:

$$50C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP en la *Preparación estándar*, calculada con respecto a la sustancia anhidra; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de ciprofloxacino obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente.

Agregar lo siguiente:

■ Ciprofloxacino y Dexametasona, Suspensión Ótica

» La Suspensión Ótica de Ciprofloxacino y Dexametasona es una suspensión acuosa estéril que contiene clorhidrato de ciprofloxacino y dexametasona. Contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de ciprofloxacino ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$), y no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de dexametasona ($C_{22}H_{29}FO_5$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Proteger de la luz. Evitar su congelación.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Análogo de Ciprofloxacino Etilendiamina USP*. *ER Ciprofloxacino Formamida USP*. *ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP*. *ER Dexametasona USP*. *ER Acetato de Dexametasona USP*.

Identificación—

A: El cromatograma de la *Preparación de valoración*, obtenido según se indica en la *Valoración de ciprofloxacino*, presenta un pico principal de ciprofloxacino cuyo tiempo de retención se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar* obtenido según se indica en la *Valoración de ciprofloxacino*.

B: El cromatograma de la *Preparación de valoración*, obtenido según se indica en la *Valoración de dexametasona*, presenta un pico principal de dexametasona cuyo tiempo de retención se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar* obtenido según se indica en la *Valoración de dexametasona*.

Esterilidad (71)—Cumple con los requisitos cuando se analiza según se indica en *Filtración por Membrana en Prueba de Esterilidad del Producto a Examinar*.

pH (791): entre 3,8 y 4,8.

Tamaño de partícula—

Líquido transportador—Calentar Agua Purificada a una temperatura de 40° a 50°, agregar 100 mg de dexametasona por L mientras se mezcla, enfriar a temperatura ambiente mientras se mezcla, pasar a través de un filtro de 0,2 μm y conservar en un envase limpio y cubierto.

Preparación de prueba—Diluir un volumen de aproximadamente 10 μL de Suspensión Ótica con *Líquido transportador* a 25 mL.

Procedimiento—(ver *Prueba de Recuento de Partículas por Oscurecimiento de la Luz en Partículas en Inyecciones* (788)). Analizar la *Preparación de prueba* usando un sistema de recuento electrónico de partículas con soporte líquido que emplea un sensor de oscurecimiento de luz con un dispositivo adecuado para la introducción de muestras. No menos de 99,5% de las partículas son $\leq 25 \mu m$, no menos de 99,95% son $\leq 50 \mu m$ y no menos de 99,995% son $\leq 100 \mu m$.

Osmolalidad (785): entre 270 y 330 mOsmol por kg.

Límite de ciprofloxacino formamida—

Solución amortiguadora—Agregar 6,0 mL de ácido fosfórico a 2,0 L de agua. Ajustar con hidróxido de sodio al 50% a un pH de 3,0.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (73:27). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Transferir aproximadamente 25 mg de ER Ciprofloxacino Formamida USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con metanol. Transferir 3,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,015 mg por mL.

Solución de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 2,5 mg de ER Dexametasona USP y aproximadamente 2,5 mg de ER Ciprofloxacino Formamida USP a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver en 15 mL de metanol, después diluir a volumen con *Fase móvil*.

Solución de prueba—Transferir un volumen, medido con exactitud, de Suspensión Ótica recién mezclada, equivalente aproximadamente a 6 mg de ciprofloxacino, a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 280 nm y una columna de 3,9 mm \times 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna para ciprofloxacino formamida no es menos de 2000 platos teóricos; la resolución, R , entre ciprofloxacino formamida y dexametasona no es menor de 8; y el factor de asimetría para ciprofloxacino formamida no es mayor de 2,0. La desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Solución estándar* no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos en el tiempo de retención de ciprofloxacino formamida. Calcular el porcentaje de ciprofloxacino formamida en la porción de la Suspensión Ótica tomada, por la fórmula:

$$10(C/VL)(r_U/r_S)100$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Ciprofloxacino Formamida USP en la *Solución estándar*; V es el volumen, en mL, de Suspensión Ótica tomado; L es la cantidad declarada, en mg por mL, de ciprofloxacino; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de ciprofloxacino formamida obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente. La ciprofloxacino formamida no es más de 0,5% de la cantidad declarada de ciprofloxacino.

Compuestos relacionados de ciprofloxacino—

Procedimiento—A partir del cromatograma de la *Preparación de valoración*, obtenido según se indica en la *Valoración de ciprofloxacino*, medir las respuestas del análogo ciprofloxacino etilendiamina y los otros picos menores. Calcular el porcentaje de cada compuesto relacionado en la porción de Suspensión Ótica tomada, por la fórmula:

$$(331,34/367,81)25(C/V)(r_U/r_S)100/FL$$

en donde 331,34 y 367,81 son los pesos moleculares de ciprofloxacino y clorhidrato de ciprofloxacino anhidro, respectivamente; C es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP en la *Preparación estándar diluida*, calculada con respecto a la sustancia anhidra; V es el volumen, en mL, de Suspensión Ótica tomado; r_U y r_S son las respuestas de los picos de los compuestos relacionados obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la respuesta del pico de ciprofloxacino obtenido a partir de la *Preparación estándar diluida*, respectivamente; F es el factor de respuesta relativa (1,3 para el análogo de ciprofloxacino etilendiamina y 1,0 supuesto para todos los otros productos de degradación); y L es la cantidad declarada, en mg por mL, de ciprofloxacino. El análogo de ciprofloxacino etilendiamina no es más de 0,4% de la cantidad declarada de ciprofloxacino. Ningún otro

compuesto relacionado individual es más de 0,2%, y la suma de todos los compuestos relacionados encontrados no es más de 0,8%.

Compuestos relacionados de dexametasona—

Procedimiento—A partir del cromatograma de la *Preparación de valoración*, obtenido según se indica en la *Valoración de dexametasona*, medir las respuestas del compuesto relacionado 21-dehidro-17-desoxi, el compuesto relacionado 20-carboxi-17-desoxi y otros picos menores. Calcular el porcentaje de cada compuesto relacionado en la porción de la Suspensión Ótica tomada, por la fórmula:

$$10(C/VL)(r_U/r_S)100$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Dexametasona USP en la *Preparación estándar diluida*; *V* es el volumen, en mL, de Suspensión Ótica tomado; *L* es la cantidad declarada, en mg por mL, de dexametasona; y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos de los compuestos relacionados obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la respuesta del pico de dexametasona obtenido a partir de la *Preparación estándar diluida*, respectivamente. El compuesto relacionado 21-dehidro-17-desoxi no es más de 1,0%, el compuesto relacionado 20-carboxi-17-desoxi no es más de 2,6%, ningún otro compuesto relacionado es más de 0,3%, y la suma de todos los compuestos relacionados encontrados no es más de 3,5%. [NOTA—La identificación de los compuestos relacionados conocidos se lleva a cabo midiendo los tiempos de retención relativos en función de la dexametasona. Los tiempos de retención relativos son aproximadamente de 1,4 a 1,6 para el compuesto relacionado 21-dehidro-17-desoxi y aproximadamente de 2,8 a 3,2 para el compuesto relacionado 20-carboxi-17-desoxi.]

Valoración de ciprofloxacino—

Solución amortiguadora—Agregar 6,0 mL de ácido fosfórico y 8 g de fosfato de dietilamina a 2,0 L de agua. Ajustar con hidróxido de sodio al 50% a un pH de 3,0.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (89:11). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Pesar con exactitud aproximadamente 37 mg de ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP en un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y diluir a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N. Transferir 5,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,13 mg de ciprofloxacino por mL.

Preparación estándar diluida—Transferir 2,0 mL de la *Preparación estándar* a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,0025 mg de ciprofloxacino por mL.

Solución de aptitud del sistema—Pesar aproximadamente 1 mg de ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP y 1 mg de ER Análogo de Ciprofloxacino Etilendiamina USP en un matraz volumétrico de 25 mL y diluir a volumen con *Fase móvil*. Transferir 2,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con *Fase móvil*.

Preparación de valoración—Transferir un volumen medido con exactitud de Suspensión Ótica recién mezclada, equivalente aproximadamente a 3 mg de ciprofloxacino, a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 280 nm y una columna de 3,9 mm × 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre ciprofloxacino y el análogo de ciprofloxacino etilendiamina no es menor de 3,0; la eficiencia de la columna para ciprofloxacino no es menor de 2500 platos teóricos; y el factor de asimetría para ciprofloxacino no es mayor de 2,0. La desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* no es más de 2,0%; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar diluida* no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y

medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de ciprofloxacino (C₁₇H₁₈FN₃O₃) en cada mL de la Suspensión Ótica tomada, por la fórmula:

$$(331,34/367,81)(25C/V)(r_U/r_S)$$

en donde 331,34 y 367,81 son los pesos moleculares de ciprofloxacino y clorhidrato de ciprofloxacino anhidro, respectivamente; *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Ciprofloxacino USP en la *Preparación estándar*; calculada con respecto a la sustancia anhidra; *V* es el volumen, en mL, de Suspensión Ótica tomado; y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos de ciprofloxacino obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Valoración de dexametasona—

Solución amortiguadora y Fase móvil—Preparar según se indica en el *Límite de ciprofloxacino formamida*.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 50 mg de ER Dexametasona USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir a volumen con acetonitrilo y mezclar. Transferir 5,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y diluir con *Fase móvil*, y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 0,2 mg de ER Dexametasona USP por mL.

Preparación estándar diluida—Transferir 2,0 mL de la *Preparación estándar* a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 0,004 mg de ER Dexametasona USP por mL.

Solución de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 2 mg de ER Dexametasona USP y aproximadamente 2 mg de ER Acetato de Dexametasona USP a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Preparación de valoración—Transferir un volumen, medido con exactitud, de Suspensión Ótica recién mezclada, equivalente aproximadamente a 2 mg de dexametasona, a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 3,9 mm × 15 cm rellena de material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna para dexametasona no es menor de 2000 platos teóricos; la resolución, *R*, entre dexametasona y acetato de dexametasona no es menor de 12; el factor de asimetría para dexametasona no es mayor de 2,0; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* no es más de 2,0%; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar diluida* no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de dexametasona (C₂₂H₂₉FO₅) en cada mL de la Suspensión Ótica tomada, por la fórmula:

$$10(C/V)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Dexametasona USP en la *Preparación estándar*; *V* es el volumen, en mL, de Suspensión Ótica tomado; y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos de dexametasona obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■USP30

Cladribina

Cambio en la redacción:

Agua, Método I (921): no más de 4.0%.

Claritromicina, Tabletas de Liberación Prolongada

Cambio en la redacción:

Disolución (711)—

PRUEBA 1—

Medio: solución amortiguadora de fosfato 0,3 M de pH 6,0 (preparada disolviendo 816,5 g de fosfato monobásico de potasio y 48 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 4 L de agua, mezclando y diluyendo con agua a 20 L. Ajustar con ácido fosfórico concentrado o con hidróxido de sodio 1 N a un pH de $6,0 \pm 0,05$); 900 mL.

Aparato 2: 75 rpm.

Tiempos: 30; 45; 60 y 120 minutos.

Determinar los porcentajes de la cantidad declarada de claritromicina ($C_{38}H_{69}NO_{13}$) disuelta utilizando el siguiente método.

Soluciones estándar—Preparar cinco soluciones de ER Claritromicina USP disuelta en acetonitrilo y diluida en **Medio**, con concentraciones conocidas en el intervalo de aproximadamente 60 µg por mL a 600 µg por mL.

Solución de prueba—Usar porciones de la solución en análisis pasadas a través de un filtro de polietileno con un tamaño de poro de 35 µm.

Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de las cinco *Soluciones estándar* y la *Solución de prueba* y medir las respuestas de los picos principales. Realizar un análisis de regresión lineal para generar una curva estándar utilizando el área del pico de cada *Solución estándar* en función de su concentración. Determinar la cantidad de claritromicina ($C_{38}H_{69}NO_{13}$) disuelta en cada intervalo de tiempo especificado usando el área del pico de cada *Solución de prueba* y los datos estadísticos de la regresión lineal para las *Soluciones estándar*.

Tolerancias—Los porcentajes de las cantidades declaradas de claritromicina ($C_{38}H_{69}NO_{13}$) disueltas en los tiempos especificados se ajustan a la siguiente *Tabla de Aceptación*.

PRUEBA 2—Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con la *Prueba de Disolución 2* de la USP.

Medio: solución amortiguadora de fosfato 0,05 M de pH 6,8 que contiene 0,5% de lauril sulfato de sodio; 900 mL, desgasificada por ultrasonido y vacío.

Aparato 1: 100 rpm.

Tiempos: 2, 12 y 24 horas.

Determinar los porcentajes de la cantidad declarada de claritromicina ($C_{38}H_{69}NO_{13}$) disuelta utilizando el siguiente método.

Solución amortiguadora de fosfato 0,067 M de pH 2,5—Disolver 9,2 g de fosfato monobásico de sodio monohidrato en aproximadamente 800 mL de agua. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 2,5. Diluir con agua a 1000 mL.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de metanol y *Solución amortiguadora de fosfato 0,067 M de pH 2,5* (65 : 35). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Transferir aproximadamente 56 mg de ER Claritromicina USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 10 mL de metanol y someter a ultrasonido para disolver. Diluir a volumen con **Medio**.

Solución de prueba—Centrifugar la solución en análisis a 2500 rpm durante 10 minutos.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 210 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 50°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es mayor de 2,0; la eficiencia de la columna no es menos de 2000 platos teóricos; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Determinar la cantidad, en porcentaje, de claritromicina disuelta, por la fórmula:

$$C_u = \frac{r_u \times C_s}{r_s}$$

en donde C_u es la concentración, en mg por mL, de claritromicina en la muestra en cada tiempo de muestreo; r_u y r_s son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente; y C_s es la concentración, en mg por mL, de claritromicina en la *Solución estándar*.

Calcular la cantidad, en porcentaje, de claritromicina disuelta con corrección del volumen:

$$\frac{[C_n \times [900 - V_u(n - 1)]] + [\sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_u]] \times 100}{LC}$$

en donde C_n es la concentración, en mg por mL, de claritromicina en la *Solución de prueba* en cada tiempo de muestreo; 900 es el volumen, en mL, de **Medio**; V_u es el volumen, en mL, de la muestra tomada en cada tiempo de muestreo; n es el número de tiempos de muestreo. [NOTA—La sumatoria de la cantidad de claritromicina retirada a los tiempos de muestreo anteriores se aplica sólo si $n > 1$.]; 100 es el factor de conversión a porcentaje; y LC es el valor declarado, en mg, por Tableta.

Tolerancias—Los porcentajes de las cantidades declaradas de claritromicina ($C_{38}H_{69}NO_{13}$) disueltas en los tiempos especificados se ajustan a la *Tabla de Aceptación 2*.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta
2	no mas de 20%
12	entre 45% y 70%
24	no menos de 80%

PRUEBA 3—Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con la *Prueba de Disolución 3* de la USP.

Medio: solución amortiguadora de acetato de pH 4,75 (preparada disolviendo 3,59 g de acetato de sodio trihidrato y 11,0 mL de ácido acético 2 N en 1000 mL de agua y ajustando con ácido acético 2 N a un pH de 4,75); 1000 mL.

Aparato 1: de malla 10; 50 rpm.

Tiempos: 1, 2, 4, 8 y 12 horas.

Determinar los porcentajes de la cantidad declarada de claritromicina ($C_{38}H_{69}NO_{13}$) disuelta empleando el siguiente método.

Solución amortiguadora de fosfato 0,067 M—Disolver 9,2 g de fosfato monobásico de potasio en 1000 mL de agua y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de metanol y *Solución amortiguadora de fosfato 0,067 M* (65 : 35), mezclar y ajustar con ácido fosfórico a un pH de 4,0. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución madre del estándar—Disolver cuantitativamente una cantidad, pesada con exactitud, de ER Claritromicina USP en metanol, agitando y sometiendo a ultrasonido si fuera necesario para asegurar la disolución, para obtener una solución madre con una

Tabla de Aceptación

Nivel	Tiempo (minutos)	Cantidad disuelta (límites individuales)	Cantidad disuelta (límites promedio)
L ₁	30	no más de 65%	—
	45	entre 55% y 85%	—
	60	no menos de 75%	—
	120	no menos de 85%	—
L ₂	30	no más de 75%	no más de 65%
	45	entre 45% y 95%	entre 55% y 85%
	60	no menos de 65%	no menos de 75%
	120	no menos de 75%	no menos de 85%
L ₃	30	no más de 2 tabletas liberan más de 75% y ninguna tableta individual libera más de 85%	no más de 65%
	45	no más de 2 tabletas están fuera del intervalo de 45% a 95% y ninguna tableta individual está fuera del intervalo de 35% a 105%	entre 55% y 85%
	60	no más de 2 tabletas liberan menos de 65% y ninguna tableta individual libera menos de 55%	no menos de 75%
	120	no más de 2 tabletas liberan menos de 75% y ninguna tableta individual libera menos de 65%	no menos de 85%

concentración conocida de aproximadamente 625 µg de claritromicina por mL, teniendo en cuenta la potencia declarada, en µg por mg, de ER Claritromicina USP.

Solución estándar—Transferir 10,0 mL de la *Solución madre del estándar* a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 125 µg de claritromicina por mL.

Solución de aptitud del sistema—Disolver cuantitativamente una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Claritromicina USP en metanol para obtener una solución que contenga aproximadamente 625 µg del compuesto relacionado A de claritromicina por mL. Transferir 10 mL de esta solución y 10 mL de la *Solución madre del estándar* a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución de prueba—Retirar 10 mL de la solución en análisis. Transferir 3 mL a un matraz volumétrico de 25 mL y diluir a volumen con *Fase móvil*. Pasar porciones de esta dilución a través de un filtro de 0,45 µm. Reemplazar 10 mL de *Medio* en cada recipiente.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 210 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 50°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,75 para claritromicina y 1,0 para el compuesto relacionado A de claritromicina; y la resolución, *R*, entre claritromicina y el compuesto relacionado A de claritromicina no es menor de 2,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna, determinada a partir del pico de claritromicina, no es menos de 750 platos teóricos; el factor de asimetría no es menor de 0,9 y no es mayor de 2; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Determinar la cantidad, en porcentaje, de claritromicina (C₃₈H₆₉NO₁₃) disuelta, por la fórmula:

$$C_U = \frac{r_U \times C_S \times 100}{r_S \times LC}$$

en donde *C_U* es la concentración, en mg por mL, de claritromicina en la muestra en cada tiempo de muestreo; *r_U* y *r_S* son las repuestas de los picos obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente; *C_S* es la concentración, en mg por mL, de claritromicina en la *Solución estándar*; 100 es el factor de

conversión a porcentaje; y *LC* es la cantidad declarada, en mg, por Tableta.

Calcular la cantidad, en porcentaje, de claritromicina disuelta con corrección del volumen a tiempos de muestreo $n \geq 2$:

$$\frac{[C_n \times [1000]] + \left[\sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_u \right] \times 100}{LC}$$

$$C_n = \frac{r_U \times C_S}{r_S}$$

en donde *C_n* es la concentración, en mg por mL, de claritromicina en la *Solución de prueba* a cada tiempo de muestreo; 1000 es el volumen, en mL, de *Medio*; *V_U* es el volumen, en mL, de la muestra retirada a cada tiempo de muestreo; *n* es el tiempo de muestreo (a 2 horas, $n = 2$), la sumatoria de la concentración de la *Solución de prueba* desde el primer tiempo de muestreo hasta el tiempo de muestreo ($n - 1$) (sólo aplica desde $n \geq 2$); 100 es el factor de conversión a porcentaje; y *LC* es la cantidad declarada, en mg, por Tableta.

Tolerancias—Los porcentajes de la cantidad declarada de claritromicina (C₃₈H₆₉NO₁₃) disuelta en los tiempos especificados se ajustan a la *Tabla de Aceptación* 2.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta
1	no más de 15%
2	entre 10% y 30%
4	entre 35% y 55%
8	no menos de 80%
12	no menos de 90%

PRUEBA 4—Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con la *Prueba de Disolución* 4 de la USP.

Medio: solución amortiguadora de fosfato de pH 6,0 (preparada disolviendo 68,0 g de fosfato diácido de potasio y 1,8 g de hidróxido de sodio en 10 L de agua, y ajustando con hidróxido de sodio diluido o ácido fosfórico a un pH de 6,0 ± 0,1); 900 mL.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempos: 2; 4; 8 y 12 horas.

Determinar los porcentajes de la cantidad declarada de claritromicina (C₃₈H₆₉NO₁₃) disuelta empleando el siguiente método.

Solución amortiguadora—Disolver 6,8 g de fosfato diácido de potasio en 1 L de agua. Ajustar con hidróxido de sodio diluido o ácido fosfórico a un pH de $4,5 \pm 0,1$.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de metanol y *Solución amortiguadora* (64:36). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Transferir aproximadamente 20 mg de ER Claritromicina USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar aproximadamente 30 mL de *Medio* y someter a ultrasonido durante aproximadamente 10 minutos hasta que se disuelva. Agregar 2 mL de metanol y diluir a volumen con *Medio*.

Solución de prueba—Usar esta solución en análisis pasada a través de un filtro adecuado de 0,45 µm.

Sistema cromatográfico (see *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 203 nm y una columna de 4,0 mm × 12,5 cm rellena con material L7 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 30°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Determinar la cantidad, en porcentaje, de claritromicina disuelta, por la fórmula:

$$C_U = \frac{r_U \times C_S}{r_S}$$

en donde C_U es la concentración, en mg por mL, de claritromicina en la *Solución de prueba* a cada tiempo de muestreo; r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente; y C_S es la concentración, en mg por mL, de claritromicina en la *Solución estándar*.

Calcular la cantidad, en porcentaje, de claritromicina disuelta a cada tiempo de muestreo, por la fórmula:

$$\frac{C_n \times [900 - (n - 1) \times V_S] + (C_1 + C_2 + \dots + C_{n-1}) \times V_S \times 100}{LC}$$

en donde C_n es la concentración, en mg por mL, de claritromicina en la *Solución de prueba* a cada tiempo de muestreo; 900 es el volumen, en mL, de *Medio*; V_S es el volumen, en mL, de la muestra tomada a cada tiempo de muestreo; y LC es la cantidad declarada, en mg, por Tableta.

Tolerancias—Los porcentajes de la cantidad declarada de claritromicina ($C_{38}H_{69}NO_{13}$) disuelta en los tiempos especificados se ajustan a la *Tabla de Aceptación 2*.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta
2	no más de 25%
4	entre 20% y 40%
8	entre 45% y 75%
12	no menos de 80%

Gluconato de Clorhexidina, Enjuague Oral

Cambio en la redacción:

Valoración—

Diluyente, *Solución A*, *Solución B*, *Fase móvil*, *Solución de aptitud del sistema*, *Preparación estándar* y *Sistema cromatográfico*—Proceder según se indica en *Valoración en Gluconato de Clorhexidina, Solución*.

Preparación de valoración—Transferir 5,0 mL de Enjuague Oral a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Procedimiento—Proceder según se indica en *Valoración en Gluconato de Clorhexidina, Solución*. Calcular el porcentaje (p/v) de gluconato de clorhexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$) en la porción de Enjuague Oral tomada, por la fórmula:

$$\frac{897,76/625,55(C/500)(r_U/r_S)}{1S} \quad (USP30)$$

en donde los términos son los definidos en esa *Valoración*.

Gluconato de Clorhexidina, Solución

Cambio en la redacción:

$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$ ■897,76■1S (USP30)
2,4,11,13-Tetraazatetradecanediimidamide, *N*, *N'*-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconate.
Di-D-gluconato de 1,1'-hexametenobis[5-(*p*-clorofenil)biguanida] [18472-51-0].

Cambio en la redacción:

Valoración—

Diluyente—Preparar una solución de 27,6 g de fosfato monobásico de sodio en aproximadamente 1,5 L de agua. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 3,0; diluir con agua a 2000 mL y mezclar.

Solución A—Preparar una solución de 27,6 g de fosfato monobásico de sodio y 10 mL de trietilamina en aproximadamente 1,5 L de agua. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 3,0; diluir con agua a 2000 mL y mezclar. Preparar una mezcla de esta solución y acetonitrilo (70:30). [NOTA—Pueden hacerse pequeños ajustes al contenido de acetonitrilo para satisfacer criterios de resolución aceptables (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).] Desgasificar antes de usar y burbujear con helio durante el análisis.

Solución B—Usar acetonitrilo.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Preparar una solución en *Diluyente* que contenga aproximadamente 50 µg de ER Acetato de Clorhexidina USP por mL y 1 µg de *p*-cloroanilina por mL.

Preparación estándar—Preparar una solución de ER Acetato de Clorhexidina USP en agua con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL. Diluir cuantitativamente con *Diluyente* un volumen, medido con exactitud, de esta solución madre para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 50 µg por mL.

Preparación de valoración—Transferir 5,0 mL de Solución a un matraz volumétrico de 250 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 5,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 250 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 239 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm desactivado para bases. Mantener la columna a una temperatura constante de aproximadamente 40°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0	100	0	equilibrio
0–9	100	0	isocrática
9–10	100→45	0→55	gradiente lineal
10–15	45	55	isocrática
15–16	45→100	55→0	gradiente lineal
16–21	100	0	re-equilibrio

Injectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre los picos de clorhexidina y *p*-cloroanilina no es menor de 3; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%, determinada a partir del pico de clorhexidina, y no es más de 5,0% determinada a partir del pico de *p*-cloroanilina.

Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos de clorhexidina. Calcular el porcentaje (p/v) de gluconato de clorhexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$) en la porción de Solución tomada, por la fórmula:

$$\frac{■(897,76/625,55(0,25C)(r_U/r_S)■_{1S}}{■_{1S}} \quad (USP30)$$

en donde $■_{897,76}$ y $625,55■_{1S}$ (*USP30*) son los pesos moleculares de gluconato de clorhexidina y de acetato de clorhexidina, respectivamente; *C* es la concentración, en µg por mL, de ER Acetato de Clorhexidina USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las áreas de los picos de clorhexidina obtenidas a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Complejo de Clorofilina–Cobre Sódico

Cambio en la redacción:

Contenido de cobre total—

Solución madre de cobre—Transferir 1,000 g de cobre a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver en 20 mL de ácido nítrico, diluir a volumen con ácido nítrico 0,2 N y mezclar. La solución contiene 1000 µg de cobre por mL. Almacenar en un frasco de polietileno.

Soluciones estándar—Pipetear 5,0 mL de la *Solución madre de cobre* y transferir a un matraz volumétrico de 500 mL, diluir a volumen con agua, y mezclar. Transferir 5,0 mL, 10,0 mL, 15,0 mL y 20,0 mL, respectivamente, de esta solución a distintos matraces volumétricos de 100 mL, diluir el contenido de cada matraz a volumen con agua y mezclar. Estas *Soluciones estándar* contienen, 0,5 µg, 1,0 µg, $■_{1,5}$ µg y $2,0■_{1S}$ (*USP30*) µg de cobre por mL, respectivamente.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 100 mg de Complejo de Clorofilina–Cobre Sódico, previamente secado y pesado con exactitud, a un matraz Kjeldahl. Agregar 2,0 mL de ácido sulfúrico, 1,0 mL de ácido nítrico y 1,0 mL de peróxido de hidrógeno, y calentar cuidadosamente bajo una campana de extracción hasta obtener un color verde claro. [NOTA—Si la solución presenta algún indicio de tinte de color marrón, continuar agregando porciones de 0,5 mL de ácido nítrico hasta obtener un color verde.] Enfriar, transferir cuantitativamente el contenido a un matraz volumétrico de 1000 mL con varias porciones de agua, diluir el contenido del matraz a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Determinar concomitantemente las absorbancias de las *Soluciones estándar* y de la *Solución de prueba* en la línea de emisión del cobre a 324,8 nm, con un espectrofotómetro de absorción atómica (ver *Espectrofotometría y Dispersión de Luz* (851)) equipado con una lámpara de cobre de cátodo hueco y una llama de aire–acetileno, utilizando agua como blanco. Graficar las absorbancias de las *Soluciones estándar* con respecto a la concentración de cobre, en µg por mL, y trazar la recta que mejor se ajuste a los cuatro puntos graficados. A partir del gráfico así obtenido, determinar la concentración de cobre, *C*, en µg por mL, en la *Solución de prueba*. Calcular el porcentaje de cobre en la porción de Complejo de Clorofilina–Cobre Sódico tomada, por la fórmula:

$$500C/W$$

en donde *W* es el peso, en mg, con respecto a la sustancia seca, del Complejo de Clorofilina–Cobre Sódico tomado para preparar la *Solución de prueba*: no se encuentra menos de 4,25%.

Resina de Colestiramina

Cambio en la redacción:

Aminas cuaternarias dializables—

Solución amortiguadora de pH 9,2—Transferir 3,80 g de borato de sodio decahidrato a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar.

Solución de azul de bromotimol—Transferir 150 mg de azul de bromotimol y 405 mg de carbonato de sodio a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución estándar—Diluir en agua, cuantitativamente y en diluciones sucesivas, 1 mL de solución de cloruro de benciltrimetilamonio al 60%, pipeteado con exactitud, para obtener una solución madre con una concentración de $0,2 \pm 0,01$ mg por mL [NOTA—Preparar esta solución al momento de usarla]. Cortar un trozo de 20 a 25 cm* de tubo de celulosa para diálisis que tenga un peso molecular de corte $■_{comprendido}$ dentro del intervalo de 6000 a 14 000 $■_{1S}$ (*USP30*) y un ancho de 5 a 9 cm cuando se lo mide seco y aplanado, y colocar en agua para hidratar hasta que se vuelva flexible, sellando un extremo en forma apropiada. Pipetear 5 mL de la solución madre y transferirla al tubo, agregar 5 mL de agua, sellar bien el extremo abierto, colocar el tubo en un recipiente adecuado con 100 mL de agua, de manera que quede totalmente sumergido y agitar el líquido durante 16 horas para dializar.

Solución de prueba—Cortar un trozo de 20 a 25 cm de tubo de celulosa para diálisis* que tenga un peso molecular de corte $■_{comprendido}$ dentro del intervalo de 6000 a 14 000 $■_{1S}$ (*USP30*) y un ancho de 5 a 9 cm cuando se lo mide seco y aplanado, y colocarlo en agua para hidratar hasta que se vuelva flexible, sellando un extremo en forma apropiada. Pesar $2 \pm 0,01$ g de Resina de Colestiramina y transferir con cuidado la muestra al tubo, asegurándose que no quede nada adherido a las paredes superiores del tubo. Agregar 10 mL de agua al contenido del tubo, sellar el extremo abierto en forma apropiada y colocar el tubo en un recipiente adecuado con 100 mL de agua, de manera que quede totalmente sumergido. Agitar el líquido durante 16 horas para dializar.

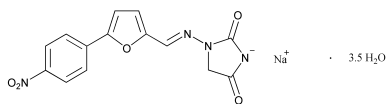
Procedimiento—Pipetear y transferir a tres separadores distintos: Separador 1—5 mL de *Solución estándar*, 5 mL de *Solución amortiguadora de pH 9,2*, 1 mL de *Solución de azul de bromotimol* y 10 mL de cloroformo; Separador 2—5 mL de *Solución de prueba*, 5 mL de *Solución amortiguadora de pH 9,2*, 1 mL de *Solución de azul de bromotimol* y 10 mL de cloroformo; Separador 3—5 mL de agua, 5 mL de *Solución amortiguadora de pH 9,2*, 1 mL de *Solución de azul de bromotimol* y 10 mL de cloroformo. Agitar cada separador vigorosamente durante 1 minuto, dejar que se separen las fases hasta que la fase de cloroformo quede transparente y recoger los extractos clorofórmicos en sendos matraces volumétricos de 25

*Un tubo adecuado es Spectra/Por 1, # de artículo 132 665, disponible de Spectrum Laboratories, Inc. (www.spectrapor.com), o equivalente. $■_{1S}$ (*USP30*)

mL cada uno. Repetir el proceso de extracción con una segunda porción de 10 mL de cloroformo y combinar con los extractos anteriores. Diluir a volumen cada solución con cloroformo, si fuera necesario, y mezclar. Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Solución de prueba* y de la *Solución estándar* a la longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 420 nm, con un espectrofotómetro adecuado, usando como blanco la solución del Separador 3: la absorbancia de la *Solución de prueba* no es mayor que la absorbancia de la *Solución estándar* (0,05% como cloruro de benciltrimetilammonio).

Agregar lo siguiente:

■ Dantroleno Sódico



$C_{14}H_9N_4NaO_5 \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$ 399,29
2,4-Imidazolidinedione, 1-[[[5-(4-nitrophenyl)-2-furanyl]methylene]amino]-, sodium salt, hydrate (2:7).
Sal sódica de 1-[[[5-(*p*-nitrofenil)furfuriliden]amino]hidantoína hidrato [24868-20-0].

» El Dantroleno Sódico contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 96,0 por ciento de $C_{14}H_9N_4O_5$, la forma ácido libre del Dantroleno Sódico, calculada con respecto a la sustancia anhidra.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables y resistentes a la luz. Almacenar a temperatura ambiente.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Dantroleno USP. ER Compuesto Relacionado A de Dantroleno USP. ER Compuesto Relacionado B de Dantroleno USP. ER Compuesto Relacionado C de Dantroleno USP. ER Dantroleno Sódico USP.*

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

C: Incinerar aproximadamente 200 mg; el residuo cumple con los requisitos de la prueba de la llama para *Sodio* (191).

Agua, Método Ia (921): entre 14,5% y 17,0%.

Metales pesados, Método II (231): 0,002%.

Límite de compuesto relacionado A de dantroleno—

Solución madre de prueba—Preparar según se indica en la *Preparación madre de valoración* como se indica en la *Valoración*.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y agua (80:20). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Dantroleno USP y ER Dantroleno Sódico USP en dimetilformamida para obtener una solución con concentraciones conocidas de 17,5 µg por mL del compuesto relacionado A de dantroleno y 50 µg por mL de dantroleno sódico. Diluir con acetonitrilo para obtener una solución con concentraciones de aproximadamente 0,35 µg por mL del compuesto relacionado A de dantroleno y 1 µg por mL de dantroleno sódico.

Solución de prueba—Diluir la *Solución madre de prueba* con acetonitrilo para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 0,175 mg por mL de dantroleno sódico.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 365 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría para el compuesto relacionado A de dantroleno no es mayor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 5% para el compuesto relacionado A de dantroleno. [NOTA—El pico de dantroleno eluye en el volumen muerto aproximadamente a los 1,5 minutos.]

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir la respuesta del pico para el compuesto relacionado A de dantroleno. Calcular el porcentaje del compuesto relacionado A de dantroleno en la porción de Dantroleno Sódico tomada, por la fórmula:

$$100(r_U/r_S)(C_S/C_T)$$

en donde r_U y r_S son las respuestas de los picos del compuesto relacionado A de dantroleno obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente; C_S es la concentración, en mg por mL, del compuesto relacionado A de dantroleno en la *Solución estándar*; y C_T es la concentración, en mg por mL, de Dantroleno Sódico en la *Solución de prueba*: no se encuentra más de 0,15% del compuesto relacionado A de dantroleno.

Compuestos relacionados—

Fase móvil, Solución madre de aptitud del sistema B, Diluyente y Sistema cromatográfico—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Diluir cuantitativamente la *Solución madre de aptitud del sistema B* con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de 0,25 µg por mL del compuesto relacionado B de dantroleno y del compuesto relacionado C de dantroleno.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada uno de los compuestos relacionados de dantroleno pertinentes en la porción de Dantroleno Sódico tomada, por la fórmula:

$$100(C_S/C_T)(r_U/r_S)$$

en donde C_S es la concentración, en mg por mL, del compuesto relacionado B de dantroleno o del compuesto relacionado C de dantroleno en la *Solución estándar*; C_T es la concentración, en mg por mL, de Dantroleno Sódico en la *Solución de prueba*; r_U es la respuesta individual del pico para el compuesto relacionado B de dantroleno o el compuesto relacionado C de dantroleno obtenidos a partir de la *Solución de prueba*; y r_S es la respuesta del pico correspondiente obtenido a partir de la *Solución estándar*. No se encuentra más de 0,50% de compuesto relacionado B de dantroleno; y no se encuentra más de 0,30% de compuesto relacionado C de dantroleno.

Valoración—

Solución amortiguadora—Disolver 3,85 g de acetato de amonio en 1,0 L de agua y ajustar con ácido acético glacial a un pH de 4,5 ± 0,1.

Diluyente—Preparar una mezcla de agua y acetonitrilo (50:50).

Solución A—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de agua, *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (70:20:10).

Solución B—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y *Solución amortiguadora* (80:20).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución madre de aptitud del sistema A—Transferir 62,5 mg de ER Dantroleno Sódico USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL y disolver en 2,5 mL de dimetilformamida. Agregar 2,5 mL de ácido acético glacial y diluir a volumen con acetona para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,25 mg por mL de dantroleno sódico.

Solución madre de aptitud del sistema B—Transferir 6,3 mg de ER Compuesto Relacionado B de Dantroleno USP y de ER Compuesto Relacionado C de Dantroleno USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL y disolver en 2,5 mL de dimetilformamida. Agregar 2,5 mL de ácido acético glacial y diluir a volumen con acetona para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,125 mg por mL del compuesto relacionado B de dantroleno y del compuesto relacionado C de dantroleno.

Solución de aptitud del sistema—Diluir cuantitativamente volúmenes adecuados de *Preparación madre de aptitud del sistema A* y *Preparación madre de aptitud del sistema B* con *Diluyente* para obtener una solución con concentraciones de aproximadamente 0,125 mg por mL de dantroleno sódico y 2,5 µg por mL del compuesto relacionado B de dantroleno y del compuesto relacionado C de dantroleno.

Preparación madre del estándar—Transferir 50 mg de ER Dantroleno USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL y disolver en 2,5 mL de dimetilformamida. Agregar 2,5 mL de ácido acético glacial y diluir a volumen con acetona para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg por mL de dantroleno.

Preparación estándar—Diluir la *Preparación madre del estándar* con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL de dantroleno.

Preparación madre de valoración—Transferir una cantidad, pesada con exactitud, de dantroleno sódico a un matraz volumétrico de 100 mL y disolver en 5 mL de dimetilformamida. Agregar 5 mL de ácido acético glacial y diluir a volumen con acetona para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 1,25 mg por mL de dantroleno sódico.

Preparación de valoración—Diluir la *Preparación madre de valoración* con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 0,125 mg por mL de dantroleno sódico.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 365 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2,0 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)	Elución
0–10	90→60	10→40	gradiente lineal
10–20	60→10	40→90	gradiente lineal
20–25	10	90	isocrática
25–25,1	10→90	90→10	gradiente lineal
25,1–35	90	10	re-equilibrio

Injectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre dantroleno y el compuesto relacionado C de dantroleno no es menor de 8. Injectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es mayor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,0%. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos aproximados son 0,68 para el compuesto relacionado B de dantroleno, 1,24 para el compuesto relacionado C de dantroleno y 1,0 para dantroleno.]

Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de dantroleno. Calcular el porcentaje de dantroleno ($C_{14}H_{10}N_4O_5$) en la porción de Dantroleno Sódico tomada, por la fórmula:

$$100(C_S/C_U)(r_U/r_S)$$

en donde C_S es la concentración, en mg por mL, de dantroleno en la *Preparación estándar*; C_U es la concentración, en mg por mL, de Dantroleno Sódico en la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos para dantroleno obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Dantroleno Sódico para Inyección

» El Dantroleno Sódico para Inyección es una formulación estéril, apirógena, liofilizada que contiene Dantroleno Sódico y uno o más amortiguadores o agentes secuestrantes adecuados. Contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{14}H_9N_4NaO_5 \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a temperatura ambiente controlada. Proteger de la luz.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Dantroleno USP*. *ER Compuesto Relacionado B de Dantroleno USP*. *ER Endotoxina USP*.

Identificación—

A: *Absorción en el Infrarrojo* (197K)—

Muestra de prueba—Agregar 10 mL de ácido clorhídrico 0,1 N y 10 mL de acetato de etilo a 0,5 g de Dantroleno Sódico para Inyección, y mezclar. Dejar que las fases se separen y transferir la fase superior de acetato de etilo a un recipiente de vidrio adecuado. Evaporar el disolvente, secar el residuo a 105° durante 10 minutos y usar el residuo.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Endotoxinas bacterianas (85)—No contiene más de 0,5 Unidades USP de Endotoxinas por mg de dantroleno sódico.

Esterilidad (71): cumple con los requisitos.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumple con los requisitos.

pH (791)—Disolver el contenido de 1 vial en 60 mL de Agua para Inyección USP: el pH está entre 8,8 y 11,0.

Agua, Método Ia (921): no más de 3,0%.

Compuestos relacionados—

Fase móvil y Diluyente—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Transferir 10 mg de ER Compuesto Relacionado B de Dantroleno USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL y disolver en 2,5 mL de dimetilformamida. Agregar 2,5 mL de ácido acético glacial y diluir a volumen con acetona para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,2 mg por mL. Diluir con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,002 mg por mL del compuesto relacionado B de dantroleno.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*. Injectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas para el compuesto relacionado B de dantroleno no es más de 5,0%.

Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de compuesto relacionado B de dantroleno en la porción de Dantroleno Sódico para Inyección tomada, por la fórmula:

$$100(r_U/r_S)(C_S/C_T)$$

en donde r_U es la respuesta del pico para el compuesto relacionado B de dantroleno obtenido a partir de la *Solución de prueba*; r_S es la respuesta del pico correspondiente en la *Solución estándar*; C_S es la concentración, en mg por mL, del compuesto relacionado B de dantroleno en la *Solución estándar*; y C_T es la concentración, en mg por mL, de dantroleno sódico hidratado en la *Solución de prueba*. No se encuentra más de 8% de compuesto relacionado B de dantroleno.

Otros requisitos: cumple con los requisitos en *Injectables* (1).

Valoración—

Solución amortiguadora—Disolver 3,3 mg de acetato de amonio en 1 L de agua y ajustar con ácido acético a un pH de $4,5 \pm 0,1$.

Solución A—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora*, acetonitrilo y ácido acético glacial (120:80:7).

Solución B—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y agua (70:30).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B*, según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de acetonitrilo y agua (60:40).

Preparación estándar—Transferir 40 mg de ER Dantroleno USP pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL y disolver en 2,5 mL de dimetilformamida. Agregar 2,5 mL de ácido acético glacial y diluir a volumen con acetona para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,8 mg por mL. Diluir esta solución con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,08 mg por mL de dantroleno.

Preparación de valoración—Usando 70 mL de agua para cada vial, transferir a un matraz adecuado todo el contenido del número requerido de viales necesarios para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg de dantroleno sódico hidrato por mL. Someter a ultrasonido durante de 2 a 5 minutos para disolver la muestra. Diluir a volumen con *Diluyente*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 365 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Elución
0–8	100	0	isocrática
8–8,1	100→0	0→100	gradiente lineal
8,1–13	0	100	isocrática
13–13,1	0→100	100→0	gradiente lineal
13,1–20	100	0	re-equilibrio

Injectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar*, y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es mayor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas para dantroleno no es más de 1,5%.

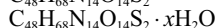
Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos para dantroleno. Calcular el porcentaje de $C_{14}H_9N_4NaO_5 \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$ en la porción de Dantroleno Sódico para inyección tomada, por la fórmula:

$$(399,29/314,25)(r_U/r_S)(C_S/C_U)$$

en donde 399,29 y 314,25 son los pesos moleculares de dantroleno sódico hidrato y dantroleno, respectivamente; r_U y r_S son las respuestas de los picos para dantroleno obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente; C_S es la concentración, en mg por mL, de dantroleno en la *Preparación estándar*; y C_U es la concentración, en mg por mL, de dantroleno sódico hidrato en la *Preparación de valoración*. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Acetato de Desmopresina



(anhidra) 1129,27 [62288-83-9].

Vasopressin, 1-(3-mercaptopropanoic acid)-8-D-arginine-, monoacetate (salt).

Monoacetato (sal) del 1-(3-ácido mercaptopropiónico)-8-D-arginina-vasopresina.

Trihidrato 1183,31 [62357-86-2].

»El Acetato de Desmopresina es una hormona sintética nonapeptídica que tiene propiedades antidiuréticas. Es un análogo sintético de la vasopresina. Contiene no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de desmopresina ($C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$), calculado con respecto a la sustancia anhidra, exenta de ácido acético.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables, preferentemente de vidrio Tipo I, protegidos de la luz. Almacenar a una temperatura que no exceda de 25°, preferiblemente entre 2° y 8°.

Etiquetado—Etiquetar para indicar la potencia de desmopresina, en mg.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Acetato de Desmopresina USP*.

Identificación—

A: *Análisis espectral de masas*—

Diluyente: una mezcla de agua y metanol (1:1).

Solución estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Acetato de Desmopresina USP en *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 5 µg por mL.

Solución de prueba—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de Acetato de Desmopresina en *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 5 µg por mL. [NOTA—La concentración final de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba* se puede ajustar de acuerdo con la sensibilidad del espectrómetro de masas usado en la prueba.]

Sistema espectrométrico de masas (ver *Espectrometría de Masas* (736))—El Espectrómetro LC/MS está equipado con una interfase de electrospray, modo de ión positivo, sistema de infusión y capacidad de MS/MS.

Procedimiento—Infundir por separado la *Solución estándar* y la *Solución de prueba* aproximadamente a 5 µL por minuto en el espectrómetro de masas. Obtener los espectros MS y MS/MS optimizados del pico con relación masa-carga de 1069. Para los espectros MS, se debe observar el pico principal con relación masa-carga de 1069. Para los espectros MS/MS, los iones producto están presentes con relaciones masa-carga de aproximadamente 641, 742 y 995.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Rotación específica (781S): entre -72° y -82° , calculada con respecto a la sustancia anhidra exenta de ácido acético.

Solución de prueba: 5 mg por mL, en ácido acético diluido.

Límites microbianos (61)—El recuento total de microorganismos aerobios no excede de 100 ufc por g.

Agua, Método Ic (921): no más de 6,0%.

Contenido de aminoácidos (ver *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos* (1052))—

NOTA—El método que se describe a continuación se ofrece sólo con fines informativos; se puede usar cualquier método de análisis de aminoácidos validado. Sin embargo, independientemente del método utilizado, se deben cumplir las proporciones relativas de aminoácidos.

Solución A—Preparar una solución con concentraciones finales de 20 mM de acetato de sodio, 0,2% (v/v) de trietilamina y 0,3% (v/v) de tetrahydrofurano.

Solución B—Preparar una solución que contenga 20% (v/v) de acetato de sodio 100 mM, 40% (v/v) de metanol y 40% (v/v) de acetonitrilo.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución amortiguadora de borato—Transferir 12,4 g de ácido bórico a un matraz volumétrico de 500 mL y suspenderlos en 300 mL de agua. Agregar 100 mL de hidróxido de potasio 1 N y mezclar. Ajustar con hidróxido de potasio 1 N a un pH de 10,4, diluir a volumen con agua y mezclar. Almacenar en un envase de plástico cerrado.

Solución de norvalina—Preparar una solución de norvalina 4 mM.

Solución de DTDPA al 2%—Transferir 2 g de ácido ditiodipropiónico a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y diluir a volumen con agua.

Solución de sarcosina—Preparar una solución de sarcosina 4 mM.

Fenol al 0,1%—Preparar una solución que contenga fenol al 0,1% (p/v) en ácido clorhídrico 6 N.

Reactivo OPA—Preparar una solución que contenga 10 mg por mL de *o*-ftalaldehído y 10 mg por mL de ácido 3-mercaptopropiónico en *Solución amortiguadora de borato*.

Reactivo FMOC—Preparar una solución que contenga 2,5 mg por mL de 9-fluorenilmetilcloroformiato en acetonitrilo.

Solución de calibración—Preparar una mezcla donde las concentraciones finales de los aminoácidos son las siguientes: aproximadamente 2,50 mM de glicina; aproximadamente 2,50 mM para la forma L de los aminoácidos lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina, y aproximadamente 1,25 mM de L-cistina. Transferir una alícuota de 1 mL de esta solución a un vial adecuado y agregar 5 µL de *Solución de norvalina* y 5 µL de *Solución de DTDPA al 2%*. Evaporar la alícuota hasta sequedad y agregar 300 µL de *Fenol al 0,1%*. Mezclar y alternar entre el purgado de la cámara gaseosa del vial con gas nitrógeno y la reducción de la presión a 2 mm de mercurio por un total de dos ciclos de purga y vacío. Purgar la muestra con gas nitrógeno una vez más y reducir la presión a 1,5 mm de mercurio. Sellar y calentar la muestra a 110° durante 24 horas. Abrir el vial y evaporar hasta sequedad. Disolver el residuo en 115 µL de *Solución amortiguadora de borato*, y agregar 5 µL de *Solución de sarcosina*. Centrifugar durante 2 minutos y transferir el sobrenadante a un vial limpio. Retirar una alícuota de 6 µL y agregar 1 µL de *Reactivo OPA*. Mezclar y agregar 1 µL de *Reactivo FMOC*. Mezclar, agregar 28 µL de agua y mezclar de nuevo.

Solución de prueba—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de Acetato de Desmopresina en agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,00 mg por mL. Agregar 5 µL de *Solución de norvalina* y 5 µL de *Solución de DTDPA al 2%* a una alícuota de 1 mL, y preparar según se indica en *Solución de calibración*, comenzando donde dice “Evaporar la alícuota a sequedad y agregar 300 µL de *Fenol al 0,1%*”.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un muestreador automático termorregulado, ajustado a 4°, que sea capaz de agregar y mezclar agentes derivatizantes; un detector de longitud de onda variable ajustado a 262 nm y 338 nm; y una columna de 2,1 mm × 20 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,45 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 40°. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0	100	0	equilibrio
0–17	100→40	0→60	gradiente lineal
17–18,10	40→0	60→100	gradiente lineal
18,10–24	0	100	isocrática
24–25	0→100	100→0	gradiente lineal
25–35	100	0	reequilibrio

Procesar e inyectar la *Solución de calibración* y la *Solución de prueba*, y registrar la respuesta de los picos para los derivados de aminoácidos individuales según se indica en el *Procedimiento*: el orden de elución de los derivados de aminoácidos es ácido aspártico, ácido glutámico, serina, histidina, glicina, treonina, cisteína (cistina reducida), alanina, arginina, tirosina, valina, metionina, norvalina, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina y prolina; la resolución, *R*, entre los pares de aminoácidos histidina y glicina, alanina y arginina, y valina y metionina en la *Solución de calibración* no es menor de 1; y la desviación estándar relativa para tres inyecciones repetidas de la *Solución de calibración* no es más de 15% para cisteína, lisina y prolina, y no más de 10% para todos los otros aminoácidos. El área del pico de norvalina en la *Solución de prueba* debe ser no menos de 80% y no más de 120% de la encontrada en la *Solución de calibración*.

Procedimiento—Con el muestreador automático, retirar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 6 µL) de la *Solución de calibración* y de la *Solución de prueba*, y agregar a cada uno 1 µL de *Reactivo OPA*. Mezclar y agregar a cada uno 1 µL de *Reactivo FMOC*. Mezclar, agregar 28 µL de agua a cada uno, mezclar de nuevo e inyectar todo el volumen en el cromatógrafo. Registrar las áreas de los picos principales e identificar los aminoácidos. Con la *Solución de calibración* como estándar, expresar el contenido de cada aminoácido en moles. Considerando el contenido de arginina igual a 1, calcular las proporciones relativas de los aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, glicina y fenilalanina están entre 0,95 y 1,05; tirosina está entre 0,7 y 1,05; cisteína está entre 0,30 y 1,05; lisina, isoleucina y leucina están ausentes; y no se encuentran más que trazas de otros aminoácidos.

Límite de ácido acético—

Solución de estándar interno—Transferir aproximadamente 16 mL de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 1000 mL que contenga aproximadamente 500 mL de agua y mezclar. Agregar aproximadamente 0,5 mL de ácido propiónico, medido con exactitud, diluir a volumen con acetonitrilo y mezclar.

Solución estándar—Transferir aproximadamente 1,049 g de ácido acético, medidos con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL. Diluir a volumen con *Solución de estándar interno* y mezclar. Transferir 2,5 mL de la solución resultante a un matraz volumétrico de 50 mL. Diluir a volumen con *Solución de estándar interno* y mezclar.

Solución de prueba—Disolver aproximadamente 5 mg de Acetato de Desmopresina, pesados con exactitud, en 0,5 mL de *Solución de estándar interno* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama y una columna capilar de sílice fundida de 0,32 mm × 30 m recubierta con una película de 0,25 µm de fase G35. El gas transportador es helio, que fluye a una velocidad de aproximadamente 3 mL por minuto, y la relación de partición de flujo es 20 : 3. Mantener la temperatura de la columna a 120° y las temperaturas del inyector y del detector a 250°. Inyectar en el cromatógrafo seis inyecciones repetidas de la *Solución estándar* y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: el orden de elución es ácido acético seguido por ácido propiónico; la resolución, *R*, entre ácido acético y ácido propiónico no es menor de 5,0; el factor de asimetría para ácido acético no es mayor de 3,0; y la desviación estándar relativa del cociente entre las áreas de los picos de ácido acético y de ácido propiónico no es más de 15%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1,0 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de ácido acético en la porción de Acetato de Desmopresina tomada, por la fórmula:

$$100(C_S/C_U)(R_U/R_S)$$

en donde C_S es la concentración, en mg por mL, de ácido acético en la *Solución estándar*; C_U es la concentración, en mg por mL, de acetato de desmopresina en la *Solución de prueba*; y R_U y R_S son los cocientes entre las áreas de los picos de ácido acético y del estándar interno obtenidas a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: se encuentra no menos de 3% y no más de 8,0%.

Pureza cromatográfica—

Fase móvil y Solución de aptitud del sistema—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Acetato de Desmopresina USP en *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1 µg por mL.

Solución de prueba—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de Acetato de Desmopresina en *Fase Móvil* para preparar una solución con una concentración conocida de aproximadamente 200 µg por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto y la columna se mantiene a 30°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y la *Solución de aptitud del sistema*, y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: el pico de desmopresina eluye antes que el pico de oxitocina; la resolución, R , entre desmopresina y oxitocina no es menor de 1,5; el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa del área del pico de desmopresina para inyecciones repetidas de la *Solución estándar* no es más de 5,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 200 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir la respuesta para cada pico, excepto para el pico principal de desmopresina en el cromatograma de la *Solución de prueba*. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Acetato de Desmopresina tomada, por la fórmula:

$$100(C_S/C_U)(r_i/r_S)$$

en donde C_S es la concentración, en mg por mL, de ER Acetato de Desmopresina USP, calculada con respecto a la sustancia anhidra exenta de ácido acético, en la *Solución estándar*; C_U es la concentración, en mg por mL, de Acetato de Desmopresina, calculada con respecto a la sustancia anhidra exenta de ácido acético, en la *Solución de prueba*; r_i es la respuesta del pico de una impureza individual en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y r_S es la respuesta del pico de desmopresina obtenido a partir de la *Solución estándar*: no se encuentra más de 0,5% de cualquier impureza individual y la suma de todas las impurezas es menos de 1,5%.

Valoración—

Solución amortiguadora—Disolver 3,4 g de fosfato monobásico de potasio y 2,0 g de 1-heptanosulfonato de sodio en 1000 mL de agua. Ajustar el pH a $4,50 \pm 0,05$ con ácido fosfórico o hidróxido de sodio, según sea necesario. Pasar a través de un filtro de 0,45 µm.

Fase móvil—Mezclar 780 mL de *Solución amortiguadora* con 220 mL de acetonitrilo y degasificar. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)). [NOTA—El tiempo de retención de desmopresina es muy sensible a la composición de la *Fase móvil*.]

Preparación estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Acetato de Desmopresina USP en *Fase Móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 20 µg por mL.

Preparación de valoración—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de Acetato de Desmopresina en *Fase Móvil* para preparar una solución con una concentración conocida de aproximadamente 20 µg por mL.

Solución de aptitud del sistema—Disolver aproximadamente 1 mg de oxitocina, pesado con exactitud, en un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Transferir 5,0 mL de la solución resultante y 5,0 mL de *Preparación de valoración* a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. Mantener la temperatura de la columna a 30°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y la *Solución de aptitud del sistema*, y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: el pico de desmopresina eluye antes que el pico de oxitocina; la resolución, R , entre los picos de desmopresina y oxitocina no es menor de 1,5; el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa del área del pico de desmopresina para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, ambas recién preparadas, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos de desmopresina. Calcular el porcentaje de $C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$ en la porción de Acetato de Desmopresina tomada, por la fórmula:

$$100(C_S/C_U)(r_U/r_S)$$

en donde C_S es la concentración, en mg por mL, de ER Acetato de Desmopresina USP, calculada con respecto a la sustancia anhidra exenta de ácido acético, en la *Preparación Estándar*; C_U es la concentración, en mg por mL, de Acetato de Desmopresina, calculada con respecto a la sustancia anhidra exenta de ácido acético, en la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de desmopresina obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■ USP30

Agregar lo siguiente:

■ Acetato de Desmopresina, Inyección

» La Inyección de Acetato de Desmopresina es una solución estéril de Acetato de Desmopresina en un diluyente apropiado. Puede contener conservantes adecuados. Posee una actividad, por mL, que es no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de desmopresina ($C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$), calculados con respecto a la sustancia anhidra, exenta de ácido acético.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Proteger de la luz. Almacenar a una temperatura de entre 2° y 8°.

Etiquetado—Etiquetar indicando la potencia, en mg, de desmopresina.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Acetato de Desmopresina USP. ER Endotoxina USP.*

Identificación—El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el obtenido en el cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Endotoxinas bacterianas (85)—No contiene más de 10 Unidades USP de Endotoxinas por µg de desmopresina.

Esterilidad (71)—Cumple con los requisitos cuando se prueba según se indica en *Filtración por Membrana en Prueba de Esterilidad del Producto a Examinar*.

pH (791): entre 3,5 y 6,0.

Partículas (788): cumple con los requisitos para inyecciones de pequeño volumen.

Otros requisitos—Cumple con los requisitos en *Volumen en Envase en Inyectables* (1).

Valoración—

Solución Amortiguadora—Disolver 4,9 g de ácido fosfórico, pesados con exactitud, en agua. Diluir con agua hasta 1000 mL. Ajustar con trietilamina a un pH de 3,5.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (83,5 : 16,5). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución A—Transferir 9 g de cloruro de sodio, pesados con exactitud, a un matraz de 1000 mL, disolver y diluir a volumen con agua. Ajustar con ácido clorhídrico a un pH entre 3,5 y 5,0.

Solución B—Transferir 9 g de cloruro de sodio, pesados con exactitud, a un matraz de 1000 mL, disolver en agua y agregar 5 g de clorobutanol. Diluir a volumen con agua y ajustar con ácido clorhídrico a un pH entre 3,5 y 5,0.

Preparación estándar—Disolver en una cantidad, pesada con exactitud, de ER Acetato de Desmopresina USP en agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL. Diluir esta solución con *Solución A* o *Solución B*, según se indica en la *Preparación de valoración*, para obtener una solución con una concentración de desmopresina equivalente a la de la *Preparación de valoración*.

Preparación de valoración—Para inyecciones con concentraciones de desmopresina entre 4 µg por mL y 0,1 mg por mL, usar Inyección de Acetato de Desmopresina, no diluida. Para inyecciones con concentraciones que excedan 0,1 mg por mL y sin conservantes, diluir 1000 µL de Inyección de Acetato de Desmopresina, medidos con exactitud, con 10 mL de *Solución A*. Para inyecciones con concentraciones que excedan 0,1 mg por mL y con conservantes, diluir 1000 µL de Inyección de Acetato de Desmopresina, medidos con exactitud, con 10 mL de *Solución B*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 215 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 50 µL de la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es mayor de 1,4; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, recientemente preparadas, y registrar los cromatogramas para un tiempo total que no sea menos de 2,5 veces el tiempo de retención del pico de desmopresina. Calcular la cantidad de desmopresina ($C_{46}H_{64}N_{14}O_{12}S_2$), en mg, en el volumen de Inyección tomado por la fórmula:

$$CD(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración de desmopresina, en mg por mL, en la *Preparación estándar*; D es el factor de dilución usado para preparar la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos para desmopresina obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Desogestrel y Etinil Estradiol, Tabletas

» Las Tabletas de Desogestrel y Etinil Estradiol contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de desogestrel ($C_{22}H_{30}O$) y de etinil estradiol ($C_{20}H_{24}O_2$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Etiquetado—Cuando se especifica más de una prueba de *Disolución*, el etiquetado indica la prueba de *Disolución* usada sólo si no se utiliza la *Prueba 1*.

Estándares de Referencia USP (11)—*ER Desogestrel USP*. *ER Etinil Estradiol USP*.

Identificación—

A: *Prueba de Identificación por Cromatografía en Capa Delgada* (201)—

Solución de prueba—Transferir un número de Tabletas, equivalente a 1,5 mg de desogestrel y 0,3 mg de etinil estradiol a un recipiente adecuado, agregar 50 mL de agua y someter a ultrasonido hasta que las Tabletas se desintegren (si fuera necesario, quitar cualquier recubrimiento con agua antes de someter a ultrasonido). Colocar la muestra en un embudo de separación, agregar 25 mL de éter y agitar bien para extraer los componentes activos. Empleando una pipeta de vidrio, transferir la capa de éter a un vaso de precipitados limpio y evaporar aproximadamente a 10 mL.

Solución estándar—Disolver una cantidad de ER Desogestrel USP y ER Etinil Estradiol USP en éter para obtener una solución que contenga aproximadamente 0,15 mg por mL y 0,03 mg por mL, respectivamente.

Volumen de aplicación: 30 µL.

Fase móvil: una mezcla de cloroformo y alcohol (96 : 4).

Procedimiento—Proceder según se indica en el capítulo y luego secar al aire. Rociar la placa con una mezcla de metanol y ácido sulfúrico (50 : 50), colocar en un horno a 105° durante aproximadamente 5 minutos y examinar la placa: cumple con los requisitos.

B: Los tiempos de retención de los picos principales en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponden con los del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Disolución (711)—

PRUEBA 1—

Medio: lauril sulfato de sodio al 0,05% con un contenido de valoración de no menos de 95%; 500 mL.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempo: 30 minutos.

Determinar las cantidades de desogestrel ($C_{22}H_{30}O$) y de etinil estradiol ($C_{20}H_{24}O_2$) disueltas empleando el siguiente método.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM de pH 6,0 (50 : 50). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución madre del estándar de desogestrel—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Desogestrel USP, y diluir cuantitativamente con metanol, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,25 mg por mL.

Solución madre del estándar de etinil estradiol—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Etinil Estradiol USP, y diluir cuantitativamente con metanol, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,25 mg por mL.

Solución estándar diluida de desogestrel—Transferir 1,0 mL de *Solución madre del estándar de desogestrel* a un matraz volumétrico de 50 mL. Diluir a volumen con *Medio* y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 0,005 mg de ER Desogestrel USP por mL.

Solución estándar diluida de etinil estradiol—Transferir 1,0 mL de *Solución madre del estándar de etinil estradiol* a un matraz volumétrico de 50 mL. Diluir a volumen con *Medio* y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 0,005 mg de ER Etinil Estradiol USP por mL.

Solución estándar—Diluir porciones cuantitativas de *Solución estándar diluida de desogestrel* y de *Solución estándar diluida de etinil estradiol* con *Medio* para obtener una solución que contenga aproximadamente 0,3 µg por mL y 0,06 µg por mL de ER Desogestrel USP y ER Etinil Estradiol USP, respectivamente.

Solución de prueba—Centrifugar una porción de la muestra de disolución y usar el sobrenadante transparente.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 210 nm (para el análisis de desogestrel); un detector espectrofluorométrico (para el análisis de etinil estradiol) con una longitud de onda de excitación de 285 nm y una longitud de onda de emisión de 310 nm; una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L11; y una guarda columna de 4,6 mm × 12,5 mm también rellena con material L11. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,2 para etinil estradiol y 1,0 para desogestrel, y la desviación estándar relativa no es más de 3,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 200 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de $C_{22}H_{30}O$ y de $C_{20}H_{24}O_2$ disueltos, por la fórmula:

$$(0,5C)(100/K)(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en µg por mL, de ER Desogestrel USP o ER Etinil Estradiol USP en la *Solución estándar*; K es la cantidad declarada, en mg por Tableta, de $C_{22}H_{30}O$ o $C_{20}H_{24}O_2$; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de desogestrel o etinil estradiol obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente.

Tolerancias—No menos de 80% (Q) de las cantidades declaradas de $C_{22}H_{30}O$ y de $C_{20}H_{24}O_2$ se disuelve en 30 minutos.

PRUEBA 2—Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con la *Prueba de Disolución 2* de la USP.

Medio: lauril sulfato de sodio al 0,3%; 500 mL.

Aparato 2: 100 rpm.

Tiempo: 30 minutos.

Determinar las cantidades de desogestrel ($C_{22}H_{30}O$) y de etinil estradiol ($C_{20}H_{24}O_2$) disueltas, por el método cromatográfico usado en *Prueba 1*.

Tolerancias—No menos de 80% (Q) de las cantidades declaradas de $C_{22}H_{30}O$ y de $C_{20}H_{24}O_2$ se disuelve en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos de *Uniformidad de Contenido* con respecto al desogestrel y al etinil estradiol.

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM de pH 6,0 (50:50). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de acetonitrilo y agua (50:50).

Solución madre del estándar de desogestrel—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Desogestrel USP, y diluir cuantitativamente con metanol, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,3 mg por mL.

Solución madre del estándar de etinil estradiol—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Etinil Estradiol USP, y diluir cuantitativamente con metanol, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,3 mg por mL.

Preparación estándar—Diluir alícuotas apropiadas de *Solución madre del estándar de desogestrel* y de *Solución madre del estándar de etinil estradiol* con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,6 µg por mL y 0,12 µg por mL de ER Desogestrel USP y ER Etinil Estradiol USP, respectivamente.

Preparación de valoración—Transferir 20 Tabletas a un matraz volumétrico de 200 mL. Agregar aproximadamente 120 mL de *Diluyente* y agitar durante aproximadamente 30 minutos. Diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Centrifugar una porción de la muestra y transferir un volumen, medido con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL para obtener una concentración final de aproximadamente 0,6 µg por mL de desogestrel. Diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 210 nm (para el análisis de desogestrel); un detector espectrofluorométrico (para el análisis de etinil estradiol) con una longitud de onda de excitación de 285 nm y una longitud de onda de emisión de 310 nm; una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L11; y una guarda columna de 4,6 mm × 12,5 mm también rellena con material L11. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,2 para etinil estradiol y 1,0 para desogestrel; el factor de asimetría para ambos analitos no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 200 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de desogestrel ($C_{22}H_{30}O$) y de etinil estradiol ($C_{20}H_{24}O_2$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(C_S/C_U)(r_U/r_S)$$

en donde C_S es la concentración, en mg por mL, de ER Desogestrel USP o ER Etinil Estradiol USP en la *Preparación estándar*; C_U es la concentración, en mg por mL, de desogestrel o etinil estradiol en la *Preparación de valoración* basada en la cantidad declarada; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de desogestrel o etinil estradiol obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Diazepam, Cápsulas de Liberación Prolongada

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—*ER Diazepam USP*. ■*ER Etilparabeno USP*. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Valoración—

Fase móvil y Sistema cromatográfico—Preparar según se indica en *Valoración en Diazepam*.

Solución de estándar interno—■Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Etilparabeno USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,5 mg por mL. ■_{1S} (USP30)

Preparación estándar—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Diazepam USP y diluir cuantitativamente con metanol para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL y mezclar. Transferir 15,0 mL de esta solución y 5,0 mL de *Solución de estándar interno* a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con metanol y mezclar.

Preparación de valoración—Pesar y mezclar el contenido de no menos de 20 Cápsulas. Transferir una porción de la mezcla, pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 15 mg de diazepam, a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 5,0 mL de *Solución de estándar interno* y aproximadamente 45 mL de

metanol. Agitar mecánicamente durante 30 minutos, diluir a volumen con metanol y mezclar. Centrifugar aproximadamente 30 mL de esta solución durante 5 minutos y filtrar.

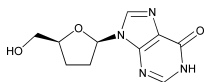
Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales. ■ El factor de asimetría para diazepam no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa del pico de diazepam para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,5 para etilparabeno y 1,0 para diazepam.] ■ ^{1S} (USP30) Calcular la cantidad, en mg, de diazepam (C₁₆H₁₃ClN₂O) en la porción de Cápsulas tomada, por la fórmula:

$$100C(R_U/R_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Diazepam USP en la *Preparación estándar*; y *R_U* y *R_S* son los cocientes de respuesta entre los picos obtenidos de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente.

Agregar lo siguiente:

■ Didanosina



C₁₀H₁₂N₄O₃ 236,23
Inosine, 2',3'-dideoxy-
2',3'-Dideoxiinosina [69655-05-6].

» La Didanosina contiene no menos de 98,0 por ciento y no más de 102,0 por ciento de C₁₀H₁₂N₄O₃, calculado con respecto a la sustancia anhidra.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados y almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Didanosina USP*.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Agua, Método I (921): no más de 2,0%.

Residuo de incineración (281): no más de 0,2%.

Metales pesados, Método II (231): no más de 20 ppm.

Rotación específica (781S): entre –28° y –24°, anhidra.

Solución de prueba: 10 mg por mL, en agua.

Valoración—

Solución amortiguadora de acetato de amonio 0,01M—Disolver 1,54 g de acetato de amonio en un matraz volumétrico de 2000 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora de acetato de amonio 0,01M* y acetonitrilo (21 : 1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en agua una cantidad, pesada con exactitud, de ER Didanosina USP para obtener una solución que contenga 0,1 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir una cantidad, pesada con exactitud, de 50 mg de Didanosina a un matraz volumétrico de 500 mL. Disolver y diluir a volumen con agua. Mezclar la muestra durante 1 hora para disolver por completo antes de usar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 6000 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. [NOTA—A los efectos informativos, el tiempo de retención de didanosina es entre 7 y 11 minutos.]

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de C₁₀H₁₂N₄O₃ en la porción de Didanosina tomada, por la fórmula:

$$500(C/W)(100)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Didanosina USP en la *Preparación estándar*; *W* es el peso, en mg, de Didanosina tomado para la *Preparación de valoración*; 100 es el factor de conversión a porcentaje; y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■ ^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Didanosina para Solución Oral

» La Didanosina para Solución Oral, cuando se reconstituye según se indica en el etiquetado, produce una solución de 10 mg por mL que contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de didanosina (C₁₀H₁₂N₄O₃).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a una temperatura entre 15° y 30°.

Etiquetado—La etiqueta contiene instrucciones para la reconstitución del polvo e indica la cantidad equivalente de C₁₀H₁₂N₄O₃ en un volumen dado de la Solución Oral obtenida después de la reconstitución.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Didanosina USP*. *ER Compuesto Relacionado A de Didanosina USP*.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Agua, Método Ia (921): no más de 3%.

Volumen de entrega (698): cumple con los requisitos.

Compuestos relacionados—

Fase móvil, Sistema cromatográfico y Procedimiento—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Disolver en agua una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Didanosina USP para obtener una solución que contenga 5 µg por mL. Hacer diluciones sucesivas si fuera necesario. [NOTA—Usar esta solución dentro de las 48 horas de su preparación.]

Solución de prueba—Transferir el contenido de 1 envase de Didanosina para Solución Oral a un matraz volumétrico adecuado y disolver en agua para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 4 mg por mL. [NOTA—Usar esta solución dentro de las 24 horas de su preparación.]

Solución de prueba diluida—Diluir cuantitativamente la *Solución de prueba* con agua, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 0,1 mg por mL.

Calcular el porcentaje del compuesto relacionado A de didanosina (hipoxantina) en la Didanosina para Solución Oral en comparación con la cantidad declarada de didanosina, por la fórmula:

$$[100(C/1000)(r_U/r_S)VD]/L$$

en donde 100 es el factor de conversión a porcentaje; C es la concentración del compuesto relacionado A de didanosina en la *Solución estándar*, en μg por mL; 1000 es el factor de conversión (de μg a mg); r_U y r_S son las respuestas de los picos del compuesto relacionado A de didanosina en la *Solución de prueba diluida* y la *Solución estándar*, respectivamente; V es el volumen, en mL, de Didanosina para Solución Oral usado para preparar la *Solución de prueba*; D es el factor de dilución de la *Solución de prueba diluida*; y L es la cantidad declarada de didanosina expresada en mg: no se encuentra más de 1%.

Valoración—

Solución amortiguadora de acetato de amonio 0,01 M—Disolver 1,54 g de acetato de amonio en un matraz volumétrico de 2000 mL, diluir a volumen con agua, mezclar y pasar a través de un filtro de 0,45 μm .

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora de acetato de amonio 0,01 M* y acetonitrilo (24 : 1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en agua una cantidad, pesada con exactitud, de ER Didanosina USP para obtener una solución que contenga 0,1 mg por mL. [NOTA—Usar esta solución dentro de las 24 horas de su preparación.]

Preparación de valoración—Transferir el contenido de 1 frasco de Didanosina para Solución Oral a un matraz volumétrico adecuado y diluir en diluciones sucesivas, si fuera necesario, para obtener una solución en agua de aproximadamente 0,1 mg por mL. [NOTA—Usar esta solución dentro de las 24 horas de su preparación.]

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm, una columna analítica de 4 mm \times 25 cm rellena con material L1 y una guarda columna de 4,6 mm \times 20 mm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el tiempo de retención de didanosina está entre 7 y 11 minutos; la eficiencia de la columna no es menos de 6000 platos teóricos; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,5%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de didanosina ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$) en la porción de Didanosina para Solución Oral tomada, por la fórmula:

$$CD(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Didanosina USP en la *Preparación estándar*; D es el volumen, en mL, de Didanosina para Solución Oral usado para preparar la *Preparación de valoración* multiplicado por el factor de dilución de la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Clorhidrato de Difenoxilato y Sulfato de Atropina, Solución Oral

Cambio en la redacción:

Identificación—■ Los tiempos de retención de los dos picos principales en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponden con los picos de atropina y difenoxilato en el cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*. ■1S (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ **Valoración de clorhidrato de difenoxilato**—Transferir un volumen de Solución Oral medido con exactitud, que equivalga aproximadamente a 100 mg de clorhidrato de difenoxilato, a un separador, agregar 4 mL de ácido clorhídrico 3 N y extraer con seis porciones de cloroformo de 30 mL. Lavar los extractos clorofórmicos combinados con 25 mL de agua y desechar el lavado. Transferir el cloroformo a un vaso de precipitados y evaporar casi hasta sequedad. Agregar 100 mL de ácido acético glacial y 4 mL de acetato mercúrico SR al vaso de precipitados y valorar con ácido perclórico 0,05 N en dioxano SV, determinando potenciométricamente el punto final. Cada mL de ácido perclórico 0,05 N equivale a 24,45 mg de clorhidrato de difenoxilato ($\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$). ■1S (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ Valoración de sulfato de atropina—

Solución amortiguadora de pH 2,8—Disolver 1,9 g de ácido aminoacético y 1,5 g de cloruro de sodio en 250 mL de agua. Ajustar hasta un pH de 2,8 mediante la adición gradual de aproximadamente 85 mL de ácido clorhídrico 0,1 N.

Solución de estándar interno—Transferir aproximadamente 20 mg de bromhidrato de homatropina a un matraz volumétrico de 200 mL, disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 25 mg de ER Sulfato de Atropina USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 200 mL. Disolver y diluir a volumen con agua y mezclar. Pipetear 2 mL de la solución resultante y transferir a un separador de 125 mL que contenga aproximadamente 50 mL de agua. Agregar 2,0 mL de *Solución de estándar interno*, 10,0 mL de *Solución amortiguadora de pH 2,8* y 25 mL de cloruro de metileno saturado con agua. Tapar, agitar durante 2 minutos y permitir que las capas se separen. Desechar la capa inferior orgánica. Repetir la extracción cuatro veces, utilizando porciones de 25 mL de cloruro de metileno saturado con agua cada vez, dejar que las capas se separen y desechar, cada vez, la capa orgánica. Agregar 3 mL de hidróxido de sodio 0,1 N a la capa acuosa restante y agitar brevemente. Utilizando un medidor de pH, ajustar la solución a un pH de $9,0 \pm 0,3$. Inmediatamente, agregar 10 mL de cloruro de metileno saturado con agua, tapar y agitar. Transferir la capa orgánica inferior a un recipiente de 50 mL. Repetir la extracción dos veces más con porciones de 10 mL de cloruro de metileno saturado con agua, combinando los extractos orgánicos. Evaporar los extractos orgánicos hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno. Disolver el residuo en 0,1 mL de cloruro de metileno.

Preparación de valoración—Transferir un volumen de Solución Oral medido con exactitud, que equivalga aproximadamente a 250 μg de sulfato de atropina, a un separador de 125 mL. Proceder según se indica para la *Preparación estándar*, comenzando donde dice “Agregar 2,0 mL de *Solución de estándar interno*.”

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama y una columna de vidrio de 4 mm \times 1,2 m rellena con fase G3 al 3% sobre soporte S1. Mantener la temperatura de la columna a 230° y la temperatura del inyector y del detector a 250°. El gas transportador

es helio, que fluye a una velocidad de 40 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre atropina y el estándar interno no es menor de 2,0 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,5%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 2 μ L) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales. Calcular la cantidad, en μ g, de sulfato de atropina $[(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O]$ por cada mL de la Solución Oral tomada, por la fórmula:

$$2(694,85/676,83)(C/V)(R_U/R_S)$$

en donde 694,85 y 676,83 son los pesos moleculares de sulfato de atropina monohidrato y de sulfato de atropina anhidro, respectivamente; C es la concentración, en μ g por mL, de ER Sulfato de Atropina USP (corregida al monohidrato) en la *Preparación estándar*; V es el volumen, en mL, de la Solución Oral tomada; y R_U y R_S son los cocientes entre la respuesta del pico de atropina y la del estándar interno obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente. ■ 1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Valoración—

Solución A—Transferir 192 mg de 1-pentanosulfonato de sodio monohidrato a un recipiente adecuado, agregar 200 mL de agua y someter a ultrasonido para disolver. Agregar 800 mL de agua y 1,0 mL de ácido fosfórico, y mezclar.

Solución B—Transferir 192 mg de 1-pentanosulfonato de sodio monohidrato a un recipiente adecuado, agregar 200 mL de agua y someter a ultrasonido para disolver. Agregar 800 mL de acetonitrilo, 1,0 mL de ácido fosfórico y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de la *Solución B* y la *Solución A* (66:34). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación madre de atropina—Disolver en alcohol deshidratado una cantidad, pesada con exactitud, de ER Sulfato de Atropina USP, y diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con alcohol deshidratado para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,04 mg por mL.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 20 mg de ER Clorhidrato de Difenoxilato USP a un matraz volumétrico de 200 mL, agregar aproximadamente 100 mL de alcohol deshidratado y someter a ultrasonido para disolver. Agregar con exactitud 5,0 mL de *Preparación madre de atropina* y 34 mL de agua, y mezclar. Dejar que la solución alcance la temperatura ambiente y diluir a volumen con alcohol deshidratado. Esta solución contiene aproximadamente 0,1 mg de clorhidrato de difenoxilato y aproximadamente 0,001 mg de sulfato de atropina por mL.

Preparación de valoración—Transferir un volumen, medido con exactitud, de la Solución Oral, equivalente aproximadamente a 2,5 mg de clorhidrato de difenoxilato, basado en la cantidad declarada, a un matraz volumétrico de 25 mL, lavar el interior de la pipeta con porciones pequeñas de alcohol deshidratado, agregar los lavados al matraz, diluir a volumen con alcohol deshidratado y mezclar. Pasar una porción de la solución obtenida a través de un filtro PTFE con un tamaño de poro de 0,45 μ m, desechando los primeros mL y usar el filtrado transparente.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm \times 25 cm rellena con material L10 de 5 μ m. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,7 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,35 para atropina y 1,0 para difenoxilato; la resolución, R , entre atropina y difenoxilato no es menor de 5,0; el factor de asimetría no es mayor de 1,5 para atropina; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0% para difenoxilato y no más de 5,0% para atropina. [NOTA—Si se observa un factor de asimetría significativo para el pico de difenoxilato (mayor de 2,5), se recomienda mantener la temperatura de la columna a 25° para estabilizar el sistema.]

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ L) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de clorhidrato de difenoxilato $(C_{30}H_{32}N_2O_2 \cdot HCl)$ en la porción de Solución Oral tomada, por la fórmula:

$$25C_D(r_U/r_S)$$

en donde 25 es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración*; C_D es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Difenoxilato USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de difenoxilato obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Calcular la cantidad, en mg, de sulfato de atropina $[(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O]$ en la porción de la Solución Oral tomada, por la fórmula:

$$(694,83/676,83)(25)C_A(r_U/r_S)$$

en donde 694,83 y 676,83 son los pesos moleculares de sulfato de atropina monohidrato y sulfato de atropina anhidro, respectivamente; 25 es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración*; C_A es la concentración, en mg por mL, de ER Sulfato de Atropina USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de atropina obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■ 1S (USP30)

Clorhidrato de Difenoxilato y Sulfato de Atropina, Tabletas

Cambio en la redacción:

Identificación—■ Los tiempos de retención de los dos picos principales en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponden con los picos de atropina y difenoxilato en el cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*. ■ 1S (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■ Valoración de clorhidrato de difenoxilato—

Solución amortiguadora de fosfato de trietilamina de pH 2,7—Transferir aproximadamente 18 mL de trietilamina a un matraz volumétrico de 2000 mL que contenga aproximadamente 1000 mL de agua y mezclar. Agregar aproximadamente 11,4 mL de ácido fosfórico, mezclar y diluir a volumen con agua.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y *Solución amortiguadora de fosfato de trietilamina de pH 2,7* (55:45). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad pesada con exactitud de ER Clorhidrato de Difenoxilato USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,25 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL un número de Tabletas contado con exactitud, que equivalga aproximadamente a 25 mg de clorhidrato de difenoxilato, agregar *Fase móvil* y agitar mecánicamente durante aproximadamente 30 minutos hasta que las Tabletas se hayan desintegrado por completo. Diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm \times 15 cm rellena con material L7. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para clorhidrato de difenoxilato no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de clorhidrato de difenoxilato ($C_{30}H_{32}N_2O_2 \cdot HCl$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$(L/D)C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Difenoxilato USP en la *Preparación estándar*; L es la cantidad declarada, en mg, de clorhidrato de difenoxilato, en cada Tableta; D es la concentración, en mg por mL, de clorhidrato de difenoxilato en la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de difenoxilato obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente. ■^{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■Valoración de sulfato de atropina—

Solución amortiguadora de fosfato de trietilamina de pH 2,7—Preparar según se indica en la *Valoración de clorhidrato de difenoxilato*.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora de fosfato de trietilamina de pH 2,7*, metanol y acetonitrilo (78:18:4). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad pesada con exactitud de ER Sulfato de Atropina USP y diluir cuantitativamente y en diluciones sucesivas con *Fase móvil* hasta obtener una solución que contenga una concentración conocida de aproximadamente 5 µg por mL.

Preparación de valoración—Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL un número de Tabletas contado con exactitud, que equivalga aproximadamente a 0,5 mg de sulfato de atropina, agregar *Fase móvil* y agitar mecánicamente durante aproximadamente 30 minutos hasta que las Tabletas se hayan desintegrado por completo. Diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 206 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L7. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico de atropina no es mayor de 2,5 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de sulfato de atropina [$(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$] en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$(694,85/676,83)(L/D)C(r_U/r_S)$$

en donde 694,85 y 676,83 son los pesos moleculares del sulfato de atropina monohidrato y del sulfato de atropina anhidro, respectivamente; C es la concentración, en µg por mL, de ER Sulfato de Atropina USP en la *Preparación estándar*; L es la cantidad declarada, en mg, de sulfato de atropina, en cada Tableta; D es la concentración, en µg por mL, de sulfato de atropina en la *Preparación de valoración*, basada en la cantidad declarada por Tableta y en el grado de disolución; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de atropina obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Valoración—

Diluyente—Usar una mezcla de acetonitrilo y agua (1:1).

Solución A—Transferir 192 mg de 1-pentanosulfonato de sodio monohidrato a un recipiente adecuado, agregar 200 mL de agua y someter a ultrasonido para disolver. Agregar 800 mL de agua y 1,0 mL de ácido fosfórico, y mezclar.

Solución B—Transferir 192 mg de 1-pentanosulfonato de sodio monohidrato a un recipiente adecuado, agregar 200 mL de agua y someter a ultrasonido para disolver. Agregar 800 mL de acetonitrilo y 1,0 mL de ácido fosfórico, y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de la *Solución B* y la *Solución A* (66:34). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación madre de atropina—Disolver en *Diluyente* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Sulfato de Atropina USP y diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,04 mg por mL.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 20 mg de ER Clorhidrato de Difenoxilato USP a un matraz volumétrico de 200 mL, agregar aproximadamente 100 mL de *Diluyente* y someter a ultrasonido para disolver. Agregar con exactitud 5,0 mL de *Preparación madre de atropina* y mezclar. Dejar que la solución alcance la temperatura ambiente y luego diluir a volumen con *Diluyente*. Esta solución contiene aproximadamente 0,1 mg de clorhidrato de difenoxilato y aproximadamente 0,001 mg de sulfato de atropina por mL.

Preparación de valoración—Transferir una cantidad de Tabletas, contadas con exactitud, equivalente aproximadamente a 25 mg de clorhidrato de difenoxilato, basada en la cantidad declarada, a un matraz volumétrico de 250 mL, agregar aproximadamente 100 mL de *Diluyente* y agitar mecánicamente durante al menos 15 minutos o hasta que las Tabletas se desintegren por completo. Someter a ultrasonido durante 15 minutos adicionales, dejar que la solución alcance la temperatura ambiente, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Pasar una porción de la solución obtenida a través de un filtro PTFE con un tamaño de poro de 0,45 µm, desechando los primeros mL, y usar el filtrado transparente.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L10 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,7 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,35 para atropina y 1,0 para difenoxilato; la resolución, R , entre atropina y difenoxilato no es menor de 5,0; el factor de asimetría no es mayor de 1,5 para atropina; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0% para difenoxilato y no más de 5,0% para atropina. [NOTA—Si se observa un factor de asimetría significativo para el pico de difenoxilato (mayor de 2,5), se recomienda mantener la temperatura de la columna a 25° para estabilizar el sistema.]

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de clorhidrato de difenoxilato ($C_{30}H_{32}N_2O_2 \cdot HCl$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$250C_D(r_U/r_S)$$

en donde 250 es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración*; C_D es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Difenoxilato USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de difenoxilato obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Calcular la cantidad, en mg, de sulfato de atropina [$(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$] en la porción de las Tabletas tomada, por la fórmula:

$$(694,83/676,83)(250)C_A(r_U/r_S)$$

en donde 694,83 y 676,83 son los pesos moleculares de sulfato de atropina monohidrato y sulfato de atropina anhidro, respectivamente; 250 es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración*; C_A es la concentración, en mg por mL, de ER Sulfato de Atropina USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de atropina obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■^{1S} (USP30)

Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio, Tabletas

(Título vigente—no cambiará hasta el 1° de febrero de 2010)
Cambio de título de la monografía—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010
Ver Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio, Tabletas Masticables

Agregar lo siguiente:

■ Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio, Tabletas Masticables

(La Monografía con este nuevo título—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010)
(El título actual de la monografía es Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio, Tabletas)

» Las Tabletas Masticables de Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $\text{CH}_2\text{AlNaO}_5$.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Etiquetado—Etiquetar las Tabletas Masticables indicando que se deben masticar antes de tragar.

Identificación—Una suspensión 1 en 10 de Tabletas Masticables pulverizadas en ácido clorhídrico 3 N cumple con los requisitos de las pruebas para *Aluminio* (191) y para *Sodio* (191).

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

Capacidad neutralizante de ácido (301)—La dosis mínima individual recomendada en el etiquetado consume no menos de 5 mEq de ácido y no menos del número de mEq calculado, por la fórmula:

$$0,8(0,0278D)$$

en donde 0,0278 es la capacidad neutralizante de ácido teórica, en mEq, del $\text{CH}_2\text{AlNaO}_5$ y D es la cantidad, en mg, de $\text{CH}_2\text{AlNaO}_5$ en la muestra analizada, basada en la cantidad declarada.

Valoración—

Solución volumétrica de edetato disódico—Disolver 18,6 g de edetato disódico en agua para obtener 500 mL y normalizar como se indica en *Valoración en Alumbre de Amonio*.

Procedimiento—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir a un vaso de precipitados de 250 mL una porción del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 300 mg de carbonato sódico de dihidroxialuminio, y proceder según se indica en *Valoración en Carbonato Sódico de Dihidroxialuminio*, comenzando donde dice “agregar 10 mL de ácido sulfúrico 2 N”. Cada mL de *Solución volumétrica de edetato disódico* 0,1 M equivale a 14,40 mg de $\text{CH}_2\text{AlNaO}_5$.

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2010) ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Doxazosina, Tabletas

» Las Tabletas de Doxazosina contienen una cantidad de mesilato de doxazosina equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de doxazosina ($\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_5$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Mesilato de Doxazosina USP*.

Identificación—El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

Valoración—

Solución amortiguadora, Fase móvil, Diluyente, Preparación estándar y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en *Valoración en Mesilato de Doxazosina*.

Preparación de valoración—Transferir 10 Tabletas, enteras o molidas, a un matraz volumétrico de 250 mL, agregar 10 mL de agua y someter a ultrasonido hasta que las Tabletas se desintegren. Agregar 150 mL de *Diluyente*, someter a ultrasonido durante 30 minutos, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Diluir cuantitativamente una porción del sobrenadante con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 0,04 mg de doxazosina por mL.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de doxazosina. Calcular la cantidad, en mg, de doxazosina ($\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_5$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$(451,48/547,58)CD(r_U/r_S)$$

en donde 451,48 y 547,58 son los pesos moleculares de doxazosina y mesilato de doxazosina; respectivamente; C es la concentración, en mg por mL, de *ER Mesilato de Doxazosina USP* en la *Preparación estándar*; D es el volumen de dilución, en mL, considerando el matraz inicial de 250 mL y cualquier dilución subsiguiente utilizada para preparar la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Clorhidrato de Doxepina

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—*ER Clorhidrato de Doxepina USP*. ■*ER Compuesto Relacionado A de Doxepina USP*. *ER Compuesto Relacionado B de Doxepina USP*. *ER Compuesto Relacionado C de Doxepina USP*. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:**Identificación—**

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*; según se obtienen en la *Valoración*.

C: Una solución (1 en 100) en una mezcla de agua y alcohol (1 : 1) cumple con los requisitos de la prueba para *Cloruro* (191) en clorhidratos de amina. ■_{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■Intervalo de fusión, *Clase I* (741): entre 185° y 191°. ■_{1S} (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■Contenido de cloruro—Disolver aproximadamente 100 mg, pesados con exactitud, en una mezcla de 100 mL de agua y 100 mL de alcohol. Valorar con nitrato de plata 0,05 N SV, determinando el punto final potenciométricamente utilizando como sensor un electrodo plata/sulfuro de plata y un electrodo de referencia de doble junta que contenga solución de relleno de nitrato de potasio en la camisa externa y una solución de relleno estándar en la camisa interna. Cada mL de nitrato de plata 0,05 N equivale a 1,773 mg de cloruro. Se encuentra no menos de 10,9% y no más de 11,6% de cloruro. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:**■Compuestos relacionados—**

Ácido fosfórico diluido—Preparar una mezcla de agua y ácido fosfórico (10 : 1), y mezclar bien.

Solución amortiguadora—Disolver 1,42 g de fosfato dibásico de sodio en 1 L de agua, ajustar con *Ácido fosfórico diluido* a un pH de 7,7 y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de metanol, *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (50 : 30 : 20). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de *Fase móvil* e hidróxido de sodio 2 N (1000 : 2).

Solución estándar—Disolver en *Diluyente* cantidades, pesadas con exactitud, de ER Clorhidrato de Doxepina USP, ER Compuesto Relacionado A de Doxepina USP, ER Compuesto Relacionado B de Doxepina USP y ER Compuesto Relacionado C de Doxepina USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,001 mg por mL del compuesto relacionado A de doxepina y del compuesto relacionado B de doxepina, y 0,002 mg por mL del compuesto relacionado C de doxepina. [NOTA—Se puede someter a ultrasonido durante aproximadamente 1 minuto para facilitar la disolución inicial de los compuestos.]

Solución de prueba—Disolver en *Diluyente* una cantidad, pesada con exactitud, de Clorhidrato de Doxepina para obtener una solución final con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 215 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 30°. Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 20 µL de la *Solución estándar* y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado A de doxepina y el compuesto relacionado C de doxepina no es menor de 1,5; la resolución entre el compuesto relacionado C de doxepina y el compuesto relacionado B de doxepina no es menor de 1,5; y la relación señal-ruido para todos los picos no es menor de 10. [NOTA—Utilizar los tiempos de

retención relativos aproximados especificados en la *Tabla 1* para identificar los picos. El compuesto relacionado C de doxepina será el pico mayor en el cromatograma de la *Solución estándar*.]

Tabla 1

Nombre	Tiempo de Retención Relativo (TRR)	Límite (%)
Compuesto relacionado A de doxepina	0,48	0,10
Compuesto relacionado C de doxepina	0,55	0,20
Compuesto relacionado B de doxepina	0,63	0,10
Clorhidrato de doxepina	1,0	—
Impureza desconocida	—	0,10 cada uno

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 20 µL) de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma hasta 2,2 veces el tiempo de retención de doxepina y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada compuesto relacionado individual de doxepina en la porción de Clorhidrato de Doxepina tomada, por la fórmula:

$$100(r_U/r_S)(C_S/C_T)$$

en donde r_U es la respuesta del pico individual para cada compuesto relacionado de doxepina obtenido a partir de la *Solución de prueba*; r_S es la respuesta del pico correspondiente obtenido a partir de la *Solución estándar*; C_S es la concentración, en mg por mL, de cada compuesto relacionado de doxepina en la *Solución estándar*; y C_T es la concentración, en mg por mL, de Clorhidrato de Doxepina en la *Solución de prueba*. Los límites de las sustancias relacionadas se especifican en la *Tabla 1*. [NOTA—Descartar cualquier pico con un tiempo de retención relativo menor de 0,25. Este método no está destinado para resolver los isómeros *E* y *Z* de clorhidrato de doxepina. Variaciones menores en la composición de la fase móvil pueden resultar en un hombro en el borde posterior de doxepina. En los casos en que puede haber separación, se deben usar ambos isómeros, *E* y *Z*, en los cálculos apropiados.] Utilizar la respuesta del pico de doxepina obtenido a partir de la *Solución estándar* y la concentración de clorhidrato de doxepina en la *Solución estándar* para calcular el porcentaje de impurezas individuales desconocidas. ■_{1S} (USP30)

Dronabinol

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—■ER Exo-tetrahydrocannabinol USP. ■_{1S} (USP30) ER Δ⁹-Tetrahydrocannabinol USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:**Identificación—**

A: El tiempo de retención del pico principal ■_{1S} (USP30) en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

B: ■_{1S} (USP30)

Agente de visualización—Transferir aproximadamente 100 mg de Sal de Fast Blue B a un matraz adecuado que contenga aproximadamente 100 mL de metanol, mezclar durante aproximadamente 5 minutos y dejar que sedimente. Decantar el líquido transparente en el recipiente del rociador. [NOTA—Preparar a diario.]

Solución de identificación—Usar la *Preparación estándar* preparada según se indica en la *Valoración*.

Solución de prueba—Emplear la *Preparación de valoración*.

Procedimiento—Aplicar por separado porciones de 10 µL de la *Solución de identificación* y de la *Solución de prueba* a una placa para cromatografía en capa delgada adecuada (ver *Cromatografía* (621)) recubierta con una capa de 0,25 mm de gel de sílice para cromatografía. Dejar que las aplicaciones se sequen y desarrollar la placa en una cámara cromatográfica que se haya equilibrado (durante aproximadamente 2 minutos) con vapores de una fase móvil de *n*-hexano y cloruro de metileno (1:1) hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido aproximadamente 10 cm. Retirar la placa de la cámara de desarrollo, marcar rápidamente el frente de la fase móvil y dejar que la placa se seque a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Rociar la placa con el *Agente de visualización* hasta que esté uniformemente húmeda (no saturada). Calentar la placa aproximadamente a 80° hasta que las manchas se desarrollen: el color y el valor R_f de las manchas obtenidas de la *Solución de prueba* se corresponden con los obtenidos a partir de la *Solución de identificación*.

Eliminar lo siguiente:

■ Límite de Δ^8 -tetrahidrocannabinol—

Fase móvil, Solución de aptitud del sistema, Preparación estándar y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en *Valoración*.

Solución de Δ^8 -tetrahidrocannabinol—Diluir con alcohol deshidratado, cuantitativamente y en diluciones sucesivas si fuera necesario, un volumen de ER Δ^8 -Tetrahidrocannabinol USP medido con exactitud, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 4 µg por mL.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución de Δ^8 -tetrahidrocannabinol* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Calcular el porcentaje de Δ^8 -tetrahidrocannabinol en la porción de Dronabinol tomada, por la fórmula:

$$10\,000(C/W)(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Δ^8 -Tetrahidrocannabinol USP en la *Solución de Δ^8 -tetrahidrocannabinol*; W es el peso, en mg, de dronabinol en la porción de Dronabinol tomada para preparar la *Solución de prueba*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de Δ^8 -tetrahidrocannabinol obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y de la *Solución de Δ^8 -tetrahidrocannabinol*, respectivamente: no se encuentra más de 2,0%. ■ 1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Compuestos relacionados—

Fase Móvil, Solución de aptitud del sistema, Preparación estándar y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Diluir un volumen, medido con exactitud, de la *Preparación estándar*, cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con alcohol deshidratado para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,004 mg por mL.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Dronabinol tomada, por la fórmula:

$$100(1/F)(CV/W)(r_U/r_S)$$

en donde F es el factor de respuesta relativa para cada impureza (ver *Tabla 1*); C es la concentración, en mg por mL, de Δ^9 -tetrahidrocannabinol en la *Solución estándar*; V es el volumen, en mL, de la *Solución de prueba*; W es el peso, en mg, de Dronabinol tomado para preparar la *Solución de prueba*; r_U es el área del pico de cada impureza en la *Solución de prueba*; y r_S es el área del pico de

Δ^9 -tetrahidrocannabinol en la *Solución estándar*. Además de no exceder los límites de la *Tabla 1*, no se encuentra más de 5,0% de impurezas totales. ■ 1S (USP30)

Cambio en la redacción:

Valoración—

■ *Fase móvil*—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de metanol, agua, tetrahidrofurano y acetonitrilo (45:25:20:10), haciendo ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Transferir a un matraz volumétrico adecuado volúmenes, medidos con exactitud, de ER Δ^9 -Tetrahidrocannabinol USP y ER Exo-tetrahidrocannabinol USP, y diluir con alcohol deshidratado para preparar una solución que contenga aproximadamente 200 µg de Δ^9 -tetrahidrocannabinol y aproximadamente 10 µg de exo-tetrahidrocannabinol por mL.

Preparación estándar—Diluir cuantitativamente un volumen, medido con exactitud, de ER Δ^9 -Tetrahidrocannabinol USP con alcohol deshidratado para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,2 mg por mL.

Preparación estándar de sensibilidad—Diluir cuantitativamente un volumen, medido con exactitud, de la *Preparación estándar* con alcohol deshidratado para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 0,2 µg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 20 mg de Dronabinol, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con alcohol deshidratado, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 228 nm y una columna analítica de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 4 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 20°. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre Δ^9 -tetrahidrocannabinol y exo-tetrahidrocannabinol no es menor de 1,5; y el factor de asimetría de Δ^9 -tetrahidrocannabinol no es mayor de 2,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar de sensibilidad* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la relación señal-ruido no es menor de 10.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{21}H_{30}O_2$ en la porción de Dronabinol tomada, por la fórmula:

$$CV(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de Δ^9 -tetrahidrocannabinol en la *Preparación estándar*; V es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de Δ^9 -tetrahidrocannabinol obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■ 1S (USP30)

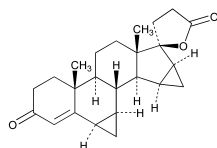
Tabla 1

Nombre	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta Relativa	Límite (%)
Cannabinol	0,78	2,7	1,5
Δ^9 -Tetrahidrocannabinol	1,00	1,0	—
Exo-tetrahidrocannabinol ¹	1,07	0,92	0,5
Δ^8 -Tetrahidrocannabinol	1,18	0,90	2,0
Cualquier otra impureza individual	—	1,0	1,0

¹ (6aR, 10aR)-6,6-dimetil-9-metilen-3-pentil-6a,7,8,9,10,10a-hexahidro-6H-benzo[c]cromen-1-ol.

Agregar lo siguiente:

■ Drospirenona



$C_{24}H_{30}O_3$ 366,49
(6R, 7R, 8R, 9S, 10R, 13S, 14S, 15S, 16S, 17S) -
1,3',4',6,6a,7,8,9,10,11,12,13,14,15,15a,16-Hexadecahidro-
10,13-dimethylspiro-[17H-dicyclopropa[6,7:15,16]cyclopenta[*a*]phenanthrene-17,2'(5'H)-furan]-3,5'(2H)-dione.
Ácido 17-hidroxi-6 β ,7 β : 15 β ,16 β -dimetilen-3-oxo-17 α -pregn-4-
eno-21-carboxílico, γ -lactona [67392-87-4].

» La Drospirenona contiene no menos de 98,0 por ciento y no más de 102,0 por ciento de $C_{24}H_{30}O_3$, calculado con respecto a la sustancia anhidra y exenta de disolvente.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Drospirenona USP*.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197M).

B: El tiempo de retención de los picos principales en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Intervalo de fusión, Clase I (741): entre 198° y 203°. [NOTA—Secar sobre gel de sílice durante no menos de 24 horas antes de realizar las pruebas.]

Rotación específica (781S): entre –186° y –196° con respecto a la sustancia anhidra y exenta de disolvente (10 mg por mL en metanol).

Agua, Método I (921): no más de 0,2%.

Residuo de incineración (281): no más de 0,1%.

Metales pesados, Método II (231): no más de 0,002%.

Límite de 1,2-dimetoxietano y éter diisopropílico (si estuvieran presentes)—

Solución estándar—Preparar una solución de 1,2-dimetoxietano y éter diisopropílico en dimetilformamida para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,1 mg por mL y 0,05 mg por mL, respectivamente.

Solución de prueba—Disolver una porción, pesada con exactitud, de Drospirenona en dimetilformamida para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 50 mg por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de gases con un inyector de fase gaseosa, un detector de ionización a la llama y una columna capilar de 0,25 mm \times 30 m recubierta con una película de 1,4 μ m de fase líquida G43. Programar la temperatura de la columna según los siguientes pasos:

mantener a 40° durante 10 minutos, luego incrementar a una velocidad de 5° por minuto hasta 70°; luego aumentar a una velocidad de 30° por minuto hasta 220°. Mantener la temperatura del inyector a 160° y la temperatura del detector a 250°. El gas transportador es helio, que fluye a una velocidad de 32 ± 8 cm por segundo. [NOTA—Para sistemas de presión controlada, será necesaria una presión de columna de aproximadamente 130 kPa.] Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,6 para éter diisopropílico y 1,0 para 1,2-dimetoxietano; y la desviación estándar relativa para la *Solución estándar* no es más de 4,0%.

Procedimiento—Transferir 2,0 mL de la *Solución de prueba* y de la *Solución estándar* a sendos viales para muestreo de fase gaseosa y sellar. Mantener los viales a 80° durante 60 minutos antes de realizar la inyección de fase gaseosa. Registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos de 1,2-dimetoxietano y éter diisopropílico. Calcular por separado el porcentaje de 1,2-dimetoxietano y éter diisopropílico en la porción de Drospirenona tomada, por la fórmula:

$$100(C_s/C_u)(r_u/r_s)$$

en donde C_s es la concentración, en mg por mL, de 1,2-dimetoxietano o éter diisopropílico en la *Solución estándar*; C_u es la concentración, en mg por mL, de Drospirenona en la *Solución de prueba*; y r_u y r_s son las áreas de los picos de 1,2-dimetoxietano o éter diisopropílico en los cromatogramas obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentran más de 0,2% de 1,2-dimetoxietano y no se encuentra más de 0,1% de éter diisopropílico.

Pureza cromatográfica—

Solución A, Solución B, Fase móvil, Diluyente y Sistema cromatográfico—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Preparar según se indica en la *Preparación estándar* en la *Valoración*.

Solución de prueba—Preparar según se indica en la *Preparación de valoración* en la *Valoración*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 μ L) de la *Solución estándar*, de la *Solución de prueba* y del *Diluyente*, y registrar los cromatogramas. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Drospirenona tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es el área del pico de cada impureza; y r_s es la suma de las respuestas de todos los picos. Descartar los picos que sean menos de 0,05% del pico de drospirenona. No se encuentra más de 0,1% de cualquier impureza individual; y no se encuentra más de 0,4% de impurezas totales.

Valoración—

Solución A—Usar agua.

Solución B—Usar acetonitrilo.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B*, según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla desgasificada de agua y acetonitrilo (1:1).

Preparación estándar—Disolver cantidades, pesadas con exactitud, de ER Drospirenona USP en *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 2 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 20 mg de Drospirenona, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 245 nm y una columna de 4,0 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm que se mantiene a una temperatura constante de aproximadamente 30°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0–28,5	64	36	isocrática
28,5–45	64→10	36→90	gradiente lineal
45–45,5	10→0	90→100	gradiente lineal
45,5–52	0	100	isocrática
52–53	0→64	100→36	gradiente lineal
53–80	64	36	re-equilibrio

Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menor de 7000 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,0%. No debe haber ningún pico con una relación señal-ruido mayor de 10 en el cromatograma del *Diluyente* entre 5 y 45 minutos.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir la respuesta del pico de drospirenona. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{24}H_{30}O_3$ en la porción de Drospirenona tomada, por la fórmula:

$$10C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Drospirenona USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Espironolactona e Hidroclorotiazida, Tabletas

Cambio en la redacción:

Disolución (711)—

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N que contenga lauril sulfato de sodio al 0,1% ; 900 mL.

Aparato 2: 75 rpm.

Tiempo: 60 minutos.

Determinar las cantidades disueltas de espironolactona e hidroclorotiazida empleando el siguiente método.

Solución estándar—Preparar una solución de ER Espironolactona USP y ER Hidroclorotiazida USP en una mezcla de metanol y *Medio* (1:1) con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,0125 mg por mL de cada uno.

Solución de prueba—Transferir 5,0 mL de la solución en análisis a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con metanol y mezclar.

■**Solución A**—Usar acetónitrilo.

Solución B—Transferir aproximadamente 4,5 g de fosfato monobásico de potasio a un matraz volumétrico de 1 L que contenga aproximadamente 500 mL de agua. Disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar.

Fase móvil—Usar cantidades variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud de Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0	25	75	equilibrio
0–10	25→75	75→25	gradiente lineal
10–18	75	25	isocrática
18–25	75→25	25→75	gradiente lineal

Inyectar la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre hidroclorotiazida y espironolactona no es menor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Proceder según se indica en la *Valoración*, inyectando 20 µL de cada solución. ■1S (USP30)

Tolerancias—No menos de 75% (Q) de las cantidades declaradas de $C_{24}H_{32}O_4S$ y $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ se disuelve en 60 minutos.

Agregar lo siguiente:

■Estradiol y Acetato de Noretindrona, Tabletas

» Las Tabletas de Estradiol y Acetato de Noretindrona contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de estradiol ($C_{18}H_{24}O_2$), y no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de acetato de noretindrona ($C_{22}H_{28}O_3$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—ER Estradiol USP. ER Estrona USP. ER Acetato de Noretindrona USP.

Identificación—

A: *Prueba de Identificación por Cromatografía en Capa Delgada* (201)—

Solución de prueba—Colocar 2 Tabletas en un vial de 10 mL y agregar 0,2 mL de agua. Cuando las Tabletas se desintegren parcialmente, agregar unas pocas perlas de vidrio y agitar vigorosamente para desintegrar. Agregar 4,0 mL de alcohol deshidratado y agitar. Centrifugar hasta que el sobrenadante sea transparente antes de la aplicación a la placa.

Solución estándar—Disolver cantidades, pesadas con exactitud, de ER Estradiol USP y ER Acetato de Noretindrona USP en alcohol deshidratado para obtener una solución con concentraciones conocidas de 0,5 mg por mL y 0,25 mg por mL, respectivamente.

Volumen de aplicación: 2 µL.

Fase móvil: una mezcla de cloroformo y acetona (9:1).

Procedimiento—Proceder según se indica en el capítulo, usando la *Fase móvil*. Después de retirar la placa, marcar el frente de la fase móvil y dejar que la fase móvil se evapore. Colocar la placa sobre una placa de calentamiento a 100° durante 15 minutos. Dejar que la placa se enfríe y después sumergir en una mezcla de alcohol deshidratado y ácido sulfúrico concentrado (95:5) Colocar la placa sobre un trozo de papel horizontal grueso hasta que esté casi seca. Calentar la placa a 100° hasta que se haya desarrollado por completo. Examinar bajo luz UV a 365 nm. El color y el valor R_F de las

manchas principales obtenidas a partir de la *Solución de prueba* se corresponden con los de las manchas obtenidas a partir de la *Solución estándar*.

B: El tiempo de retención y el espectro UV de los picos principales en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponden con los del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Pureza cromatográfica—

Solución A—Preparar una mezcla de agua y tetrahidrofurano (200:1).

Solución B—Preparar una solución desgasificada de acetonitrilo, agua y tetrahidrofurano (160:40:1).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes, si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de agua y alcohol deshidratado (1:1).

Solución de aptitud del sistema—Disolver cantidades, pesadas con exactitud, de ER Estradiol USP, ER Acetato de Noretindrona USP y ER Estrona USP en *Diluyente* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 240 µg por mL, 60 µg por mL y 1 µg por mL, respectivamente.

Solución madre del estándar de estradiol—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Estradiol USP en alcohol para obtener una solución con una concentración conocida de estradiol de aproximadamente 250 µg por mL.

Solución madre del estándar de acetato de noretindrona—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Acetato de Noretindrona USP en alcohol para obtener una solución con una concentración conocida de acetato de noretindrona de aproximadamente 150 µg por mL.

Solución estándar—Combinar 250 µL de *Solución madre del estándar de estradiol* y 100 µL de *Solución madre del estándar de acetato de noretindrona*, y diluir con 50,0 mL de *Diluyente*.

Solución de prueba—Pesar con exactitud y reducir a polvo fino 20 Tabletas. Transferir el equivalente de 12 Tabletas a un matraz apropiado y disolver en un volumen conocido de *Diluyente* para obtener una solución con concentraciones conocidas de estradiol y acetato de noretindrona de aproximadamente 240 µg por mL y 120 µg por mL, respectivamente. Filtrar la solución, si fuera necesario.

Sistema cromatográfico—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de doble longitud de onda (235 nm y 254 nm) y una columna de 3,9 mm × 30 cm rellena con material L1 de 4 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,8 mL por minuto. Programar el cromatograma del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Elución
0	80	20	equilibrio
0–2	80→65	20→35	gradiente lineal
2–35	65→20	35→80	gradiente lineal
35–49	20	80	isocrática
49–50	20→80	80→20	gradiente lineal
50–60	80	20	isocrática

Injectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,4 para estrona, aproximadamente 3,0 para acetato de noretindrona y 1,0 para estradiol; y la resolución, *R*, entre estrona y estradiol no es menor de 1,3, medida a 254 nm.

Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cualquier impureza de estradiol en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100F(C_S/C_T)(r_i/r_s)$$

en donde *F* es el factor de respuesta relativa de cualquier impureza de estradiol en relación con el estradiol; *C_S* y *C_T* son las concentraciones de la *Solución estándar* y la *Solución de prueba*, respectivamente; *r_i* es el área del pico de cada impureza a 235 nm obtenida a partir de la *Solución de prueba*; y *r_s* es el área del pico

a 235 nm obtenida a partir de la *Solución estándar*. Las Tabletas cumplen con los requisitos indicados en la *Tabla 1*.

Tabla 1

Compuesto	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta Relativa	Límite (%)
6-α Hidroxil estradiol	aproximadamente 0,47	1,0	0,5
6-β Hidroxil estradiol	aproximadamente 0,51	1,0	0,5
6-Ceto estradiol	aproximadamente 0,62	1,0	0,5
16-Ceto estradiol	aproximadamente 0,65	1,0	0,5
6-Ceto estrona	aproximadamente 0,75	1,0	0,5
β-Equilenol	aproximadamente 0,88	0,04	0,5
6-Dehidro estradiol	aproximadamente 0,95	1,0	0,5
Estradiol	1,0	—	—
α-Estradiol	aproximadamente 1,06	1,0	0,5
Estrona	aproximadamente 1,17	1,0	0,5
4-Metil estradiol	aproximadamente 1,24	1,0	0,5

Calcular el porcentaje de cualquier impureza relacionada de acetato de noretindrona en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100F(C_S/C_T)(r_i/r_s)$$

en donde *F* es el factor de respuesta relativa de cualquier impureza relacionada de acetato de noretindrona en relación con el acetato de noretindrona; *C_S* y *C_T* son las concentraciones de la *Solución estándar* y la *Solución de prueba*, respectivamente; *r_i* es el área del pico de cada impureza a 254 nm obtenida a partir de la *Solución de prueba*; y *r_s* es el área del pico a 254 nm obtenida a partir de la *Solución estándar*. Las Tabletas cumplen con los requisitos indicados en la *Tabla 2*.

Tabla 2

Compuesto	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta Relativa	Límite (%)
Acetato de 6-β hidroxil-noretindrona	aproximadamente 0,58	1,0	0,5
Noretindrona	aproximadamente 0,66	1,0	0,5
Acetato de 6-ceto-noretindrona	aproximadamente 0,79	1,8	0,5
19-Nor-17-alfa-preg-4-eno-3,20-diona	aproximadamente 0,90	1,0	0,5
Acetato de 6-dehidro-noretindrona	aproximadamente 0,97	2,2	0,5
Acetato de noretindrona	1,0	—	—

No se encuentra más de 0,5% de cualquier impureza individual desconocida y no se encuentra más de 1,0% de impurezas totales (de la *Tabla 1* y *Tabla 2*). [NOTA—Para calcular el porcentaje de cualquier impureza individual desconocida, *r_s* es igual a la respuesta del pico más pequeño de los dos principales en la *Solución estándar* y *C_S* es la concentración correspondiente en la *Solución estándar*.]

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y agua (55:45) (ver *Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de agua y alcohol deshidratado (1:1).

Solución madre del estándar de estrona—Transferir aproximadamente 6,00 mg de ER Estrona USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL y disolver en 10 mL de alcohol deshidratado. Diluir a volumen con alcohol deshidratado y mezclar.

Solución madre del estándar de estradiol—Preparar una solución de ER Estradiol USP en alcohol deshidratado con una concentración conocida de 0,25 mg por mL.

Solución madre del estándar de acetato de noretindrona—Preparar una solución de ER Acetato de Noretindrona USP en alcohol deshidratado con una concentración conocida de 0,15 mg por mL.

Preparación de aptitud del sistema—Transferir 800 µL de Solución madre del estándar de estradiol, 600 µL de Solución madre del estándar de acetato de noretindrona y 200 µL de Solución madre del estándar de estrona a un matraz adecuado que contenga 10,0 mL de Diluyente.

Preparación estándar—Preparar una solución de Solución madre del estándar de estradiol y Solución madre del estándar de acetato de noretindrona en Diluyente con una concentración conocida con exactitud de aproximadamente 20 µg por mL y 10 µg por mL, respectivamente.

Preparación de valoración—Agregar 12 Tabletas en una cantidad medida de Diluyente, para obtener una solución con una concentración de estradiol de aproximadamente 20 µg por mL y una concentración de acetato de noretindrona de aproximadamente 10 µg por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de arreglo de diodos y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Llevar a cabo una corrida de investigación para determinar los tiempos de retención de estradiol y acetato de noretindrona. De este modo, la absorción de estradiol a 280 nm y de acetato de noretindrona a 254 nm se pueden incluir en una única corrida modificando la longitud de onda. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación de aptitud del sistema* y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre estradiol y acetato de estrona no es menor de 1,8. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 3%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos de estradiol y acetato de noretindrona. Calcular la cantidad, en mg, de estradiol ($C_{18}H_{24}O_2$) en cada una de las Tabletas tomadas, por la fórmula:

$$(VC/12)(r_U/r_S)$$

en donde V es el volumen, en mL, de Diluyente tomado para preparar la *Preparación de valoración*; C es la concentración, en mg por mL, de ER Estradiol USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las áreas de los picos obtenidas a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. Calcular la cantidad, en mg, de acetato de noretindrona ($C_{22}H_{28}O_3$) en cada una de las Tabletas tomadas, por la fórmula:

$$(VC/12)(r_U/r_S)$$

en donde V es el volumen, en mL, de Diluyente usado en la *Preparación de valoración*; C es la concentración, en mg por mL, de ER Acetato de Noretindrona USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las áreas de los picos obtenidas a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Etotoína, Tabletas

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—ER Etotoína USP. ■ER Etilparabeno USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Valoración—

■**Diluyente**—Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido fosfórico (750:250:1). ■_{1S} (USP30)

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de agua y acetonitrilo (3:1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de estándar interno—Preparar una solución de ■ER Etilparabeno USP. ■_{1S} (USP30) en ■Diluyente. ■_{1S} (USP30) con una concentración de 0,02 mg por mL.

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Etotoína USP y diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg por mL. ■Transferir inmediatamente 5 mL de esta solución y 5 mL de la *Solución de estándar interno* a un recipiente adecuado y mezclar bien. ■_{1S} (USP30)

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 100 mg de etotoína, a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 75 mL de *Fase móvil*, agitar vigorosamente durante 60 minutos, diluir a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar. ■de inmediato. ■_{1S} (USP30). ■Sin demora, transferir 5 mL del filtrado y 5 mL de la *Solución de estándar interno* a un recipiente adecuado y mezclar. ■_{1S} (USP30)

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 3,9 mm × 30 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre los picos del analito y del estándar interno, no es menor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales. ■[NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,5 para etotoína y 1,0 para etilparabeno.] ■_{1S} (USP30) Calcular la cantidad, en mg, de etotoína ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$200C(R_U/R_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Etotoína USP en la *Preparación estándar*; y R_U y R_S son los cocientes de respuesta de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Agregar lo siguiente:**■Famotidina, Inyección**

» La Inyección de Famotidina es una solución concentrada estéril de Famotidina. Contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de famotidina ($C_8H_{15}N_7O_2S_3$). Puede contener conservantes adecuados.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases monodosis o multidosis, preferentemente de vidrio Tipo I. Almacenar en un refrigerador.

Etiquetado—Cumple con los requisitos de *Etiquetado en Inyectables* (1). Etiquetar indicando que la Inyección debe diluirse con un vehículo parenteral adecuado antes de la administración. Etiquetar indicando el nombre y la cantidad de cualquier conservante agregado.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Alcohol Bencílico USP*. *ER Endotoxina USP*. *ER Famotidina USP*.

Identificación—El tiempo de retención del pico de famotidina en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Endotoxinas bacterianas (85)—No contiene más de 16,67 Unidades USP de Endotoxinas por mg de famotidina.

Esterilidad (71): cumple con los requisitos.

pH (791): entre 5,0 y 5,6.

Partículas (788): cumple con los requisitos para inyecciones de pequeño volumen.

Compuestos relacionados—

Solución amortiguadora, Fase móvil y Diluyente—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración* preparada según se indica en la *Valoración*.

Solución madre de aptitud del sistema—Proceder según se indica en la prueba de *Contenido de alcohol bencílico*.

Solución de aptitud del sistema—

SI ESTUVIERA PRESENTE EL ALCOHOL BENCÍLICO—Proceder según se indica en la prueba de *Contenido de alcohol bencílico*.

SI NO ESTUVIERA PRESENTE EL ALCOHOL BENCÍLICO—Transferir 25 mL de la *Solución madre de aptitud del sistema* a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Preparar según se indica en la *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema*, identificar el pico de famotidina y otros picos basándose en los tiempos de retención relativos indicados en la *Tabla 1* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre los picos adyacentes de impureza B, impureza C, famotidina e impureza D no es menor de 1,3 para cada par de picos.

Tabla 1

Nombre	Tiempo de Retención Relativo Aproximado
Alcohol bencílico (si estuviera presente)	0,4
Impureza B ¹	0,7
Impureza C ²	0,8
Famotidina	1,0
Impureza D ³	1,3

¹ Ácido 3-[2-(diaminometilenoamino)-1,3-tiazol-4-ilmetil]propanoico

² 3-[2-(Diaminometilenoamino)-1,3-tiazol-4-ilmetil]-N-sulfamiloilpropanamida

³ 3-[2-(Diaminometilenoamino)-1,3-tiazol-4-ilmetil]propanamida

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 30 µL de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje del total de impurezas B, C y D en la porción de la Inyección tomada, por la fórmula:

$$100(r_U/r_T)$$

en donde r_U es la suma de las áreas de los picos de las impurezas B, C y D obtenidas a partir de la *Solución de prueba*; y r_T es la suma de las áreas de los picos de famotidina, impureza B, impureza C e impureza D obtenidas a partir de la *Solución de prueba*: no se encuentra más de 5,0% de impurezas totales.

Contenido de alcohol bencílico (si estuviera presente)—

Solución amortiguadora, Fase móvil y Diluyente—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración* preparada según se indica en la *Valoración*.

Solución madre de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 10 mg de ER Famotidina USP a un matraz volumétrico de 50 mL y agregar 1 mL de ácido clorhídrico 0,1 N. Calentar a 80° durante 30 minutos. Dejar que se enfríe, agregar 2 mL de hidróxido de sodio 0,1 N y calentar a 80° durante 30 minutos adicionales. Dejar que se enfríe y neutralizar agregando 1 mL de ácido clorhídrico 0,1 N. Diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar (*Solución A*). Transferir aproximadamente 5 mg de ER Famotidina USP a otro matraz volumétrico de 50 mL, agregar 8 mL de metanol y someter a ultrasonido para disolver. Agregar 10 mL de *Solución A*, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Solución de aptitud del sistema—Transferir 25 mL de *Solución madre de aptitud del sistema* a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar 1 gota (aproximadamente 20 mg) de ER Alcohol Bencílico USP, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Solución estándar—Disolver cantidades, pesadas con exactitud, de ER Famotidina USP y ER Alcohol Bencílico USP en *Diluyente* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,1 mg de famotidina por mL y aproximadamente 0,09 mg de alcohol bencílico por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Preparar según se indica en la *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema*, identificar los componentes basándose en sus tiempos de retención relativos indicados en la *Tabla 1* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el pico del alcohol bencílico se resuelve del frente de la fase móvil, y la resolución, *R*, entre los picos adyacentes de alcohol bencílico e impureza B de famotidina no es menor de 1,3. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas es menos de 2,0% para cada pico.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 30 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de alcohol bencílico en cada mL de Inyección tomado, por la fórmula:

$$D(C/V)(r_U/r_S)$$

en donde *D* es el volumen, en mL, de la *Solución de prueba*; *C* es la concentración, en mg por mL, de alcohol bencílico en la *Solución estándar*; *V* es el volumen, en mL, de la Inyección tomado para preparar la *Solución de prueba*; y r_U y r_S son las áreas de los picos de alcohol bencílico obtenidas a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: el contenido de alcohol bencílico cumple con los requisitos para *Sustancias Agregadas en Inyectables* (1).

Otros requisitos—Cumple con los requisitos para *Volumen en Envase en Inyectables* (1).

Valoración—

Solución amortiguadora—Disolver en agua 13,8 g de fosfato monobásico de sodio y diluir con agua a 1 L.

Fase móvil—Preparar una mezcla de agua, metanol y *Solución amortiguadora* (32 : 5 : 3) y ajustar con hidróxido de sodio 1 N a un pH de 5,3.

Diluyente—Disolver 1,36 g de fosfato monobásico de potasio en 800 mL de agua, ajustar con hidróxido de sodio 1 N a un pH de 7,0 y diluir con agua a 1 L.

Preparación estándar—

SI ESTUVIERA PRESENTE EL ALCOHOL BENCÍLICO—Disolver cantidades, pesadas con exactitud, de ER Famotidina USP y ER Alcohol Bencílico USP en *Diluyente* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,1 mg de famotidina por mL y aproximadamente 0,09 mg de alcohol bencílico por mL.

SI NO ESTUVIERA PRESENTE EL ALCOHOL BENCÍLICO—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Famotidina USP en *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg de famotidina por mL.

Preparación de valoración—Transferir un volumen de Inyección, medido con exactitud, equivalente aproximadamente a 20 mg de famotidina, basado en la cantidad declarada, a un matraz volumétrico de 200 mL y diluir a volumen con *Diluyente*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L3 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas para el pico de famotidina es menos de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 30 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de famotidina ($C_8H_{15}N_7O_2S_3$) en cada mL de la Inyección, por la fórmula:

$$D(C/V)(r_U/r_S)$$

en donde *D* es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración*; *C* es la concentración, en mg por mL, de famotidina en la *Preparación estándar*; *V* es el volumen, en mL, de Inyección tomado para preparar la *Preparación de valoración*; y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■ USP30

Fenitoína, Tabletas

(Título vigente—no cambiará hasta el 1° de febrero de 2010)

Cambio de título de la monografía—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010

Ver Fenitoína, Tabletas Masticables

Agregar lo siguiente:

Fenitoína, Tabletas Masticables

(La Monografía con este nuevo título—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010)

(El título actual de la monografía es Fenitoína, Tabletas)

» Las Tabletas Masticables de Fenitoína contienen no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{15}H_{12}N_2O_2$.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Etiquetado—Etiquetar las Tabletas Masticables para indicar que se deben masticar.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Fenitoína USP*.

Identificación—El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del pico principal en el cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Disolución (711)—

Solución amortiguadora de Tris 0,05 M—Disolver 60,5 g de tris(hidroximetil)aminometano en 6 L de agua. Diluir con agua hasta 10 L y ajustar con ácido fosfórico a un pH de $9,0 \pm 0,05$. Disolver 100 g de dodecil sulfato de sodio en aproximadamente 6 L de la solución amortiguadora preparada, transferir esta solución a la solución amortiguadora restante y mezclar.

Medio: *Solución amortiguadora de Tris 0,05 M*; 900 mL.

Aparato 2: 100 rpm.

Tiempo: 120 minutos.

Determinar la cantidad de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ disuelta utilizando el método que se indica a continuación.

Solución de trietilamina, Fase móvil y Sistema cromatográfico—Proceder como se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Disolver una cantidad pesada con exactitud de ER Fenitoína USP en metanol para obtener una solución con una concentración conocida de 3,0 mg por mL. Transferir una porción de esta solución a un recipiente adecuado y diluir cuantitativamente con *Medio de Disolución*, si fuera necesario hacerlo en diluciones sucesivas, para obtener una concentración de 0,06 mg por mL. Transferir 10,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución de prueba—Retirar una porción de la solución en análisis y filtrar, desechando los primeros 3 mL del filtrado. Pipetear 10,0 mL de esta solución, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Procedimiento—Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 25 µL) de *Solución estándar* y de *Solución de prueba* en el cromatógrafo, registrar los cromatogramas y medir las áreas correspondientes a las respuestas de los picos. Determinar la cantidad disuelta de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ comparando las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*.

Tolerancias—No menos de 70% (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ se disuelve en 120 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

Valoración—

Solución de trietilamina—Transferir 1 mL de trietilamina a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de agua, metanol, acetonitrilo, *Solución de trietilamina* y ácido acético (500 : 270 : 230 : 5 : 1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver una cantidad de ER Fenitoína USP pesada con exactitud en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente con *Fase móvil*, si fuera necesario hacerlo en diluciones sucesivas, hasta obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 250 mg de fenitoína, a un matraz volumétrico de 500 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 6500 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 25 µL) de *Preparación estándar* y de *Preparación de valoración* en el cromatógrafo, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{15}H_{12}N_2O_2$ en la porción de Tabletas Masticables tomada, por la fórmula:

$$500C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Fenitoína USP en la *Preparación estándar*; r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidas a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2010)

Agregar lo siguiente:

■ Clorhidrato de Fexofenadina, Tabletas

» Las Tabletas de Clorhidrato de Fexofenadina contienen no menos de 95,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de clorhidrato de fexofenadina ($C_{32}H_{39}NO_4 \cdot HCl$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Clorhidrato de Fexofenadina USP. ER Compuesto Relacionado A de Fexofenadina USP.*

Identificación—

A: *Absorción en el Infrarrojo* (197K)—Pesar y reducir a polvo fino un número suficiente de Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 60 mg de clorhidrato de fexofenadina, a un tubo con tapa. Agregar 10 mL de una mezcla de acetonitrilo y metanol (10:1), y agitar o mezclar en un mezclador por vórtice durante 1 a 2 minutos para dispersar la muestra. Dejar la solución en reposo durante 10 minutos o centrifugar durante 2 a 3 minutos. Pasar el líquido a un vaso de precipitados de 50 mL utilizando un filtro de politetrafluoretileno para jeringa de 0,45 µm. Evaporar el disolvente hasta que quede aproximadamente 0,5 mL usando una corriente de nitrógeno con calentamiento moderado (que no exceda de 75°). Agregar 5 mL de agua y 5 gotas de ácido clorhídrico diluido y revolver para inducir la precipitación. Enfriar en un baño de hielo durante aproximadamente 30 minutos. Filtrar la solución a través de un crisol de vidrio sinterizado de 10 a 15 µm. Secar el precipitado en un horno de aire a 105° durante 1 hora. El espectro de absorción IR de una dispersión en bromuro de potasio del residuo así obtenido presenta máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de una dispersión en bromuro de potasio de una preparación similar usando ER Clorhidrato de Fexofenadina USP. Para preparar la dispersión en bromuro de potasio del estándar de referencia, transferir aproximadamente 60 mg de ER Clorhidrato de Fexofenadina USP a un tubo de ensayo con tapa y proceder según se indica más arriba, comenzando donde dice “Agregar 10 mL de una mezcla de acetonitrilo y metanol (10:1)”.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*; según se obtienen en la *Valoración*.

Disolución (711)—

Medio: ácido clorhídrico 0,001 N; 900 mL, desgasificado.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempos: 10 y 30 minutos.

Procedimiento—Determinar los porcentajes de la cantidad declarada de clorhidrato de fexofenadina ($C_{32}H_{39}NO_4 \cdot HCl$) disuelta utilizando el siguiente método.

Solución amortiguadora—Disolver en 300 mL de agua, 1,0 g de fosfato monobásico de sodio, 0,5 g de perclorato de sodio y 0,3 mL de ácido fosfórico concentrado, y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y *Solución amortiguadora* (7:3). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución estándar—[NOTA—Para disolver el clorhidrato de fexofenadina se puede usar una pequeña cantidad de metanol que no exceda de 0,5% del volumen total.] Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Fexofenadina USP en *Medio* para obtener una solución con una concentración conocida similar a la esperada para la solución en análisis.

Solución de resolución—[NOTA—Para disolver el compuesto relacionado A de fexofenadina, se puede usar una pequeña cantidad de ácido acético que no exceda de 5% del volumen total.] Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Fexofenadina USP en agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,44 mg por mL. Transferir 1,0 mL de esta solución a un vial, agregar 40 mL de la *Solución estándar* y mezclar.

Preparación de prueba—Usar porciones de la solución en análisis pasadas a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,45 µm.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 10 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Cromatografiar la *Solución de resolución* según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre fexofenadina y el compuesto relacionado A de fexofenadina no es menor de 2,0. Cromatografiar la *Solución estándar* según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (carga de columna de aproximadamente 2 a 3 µg de clorhidrato de fexofenadina) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de fexofenadina. Calcular la cantidad, en mg, de clorhidrato de fexofenadina ($C_{32}H_{39}NO_4 \cdot HCl$) disuelta en el *Medio*, por la fórmula:

$$CD(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Fexofenadina USP en la *Solución estándar*; D es el factor de dilución utilizado para preparar la *Preparación de prueba*; y r_U y r_S son las áreas de los picos de fexofenadina obtenidas a partir de la *Preparación de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente.

Tolerancias—No menos de 60% (Q) de la cantidad declarada de $C_{32}H_{39}NO_4 \cdot HCl$ se disuelve en 10 minutos; y no menos de 80% (Q) de la cantidad declarada de $C_{32}H_{39}NO_4 \cdot HCl$ se disuelve en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

Compuestos relacionados—

Diluyente y Fase móvil—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución de sensibilidad—Diluir 4,0 mL de la *Preparación madre del estándar*, preparada según se indica en la *Valoración*, con *Fase móvil* a 100 mL. Diluir 6,0 mL de esta solución con *Fase móvil* a 100 mL.

Solución de compuesto relacionado—Disolver en *Diluyente* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Fexofenadina USP y diluir cuantitativamente con *Diluyente*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,05 mg por mL.

Solución madre del estándar—Usar la *Preparación madre del estándar*, preparada según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Diluir volúmenes iguales de la *Solución de compuesto relacionado* y de la *Solución madre del estándar* con *Fase móvil* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,015 y 0,0045 mg por mL de clorhidrato de fexofenadina y compuesto relacionado A de fexofenadina, respectivamente.

Solución madre de prueba—Usar la *Preparación madre de valoración*.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Proceder según se indica en el *Sistema cromatográfico* en la *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de sensibilidad* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 6%. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,6 para el compuesto relacionado A de fexofenadina y 1,0 para fexofenadina; la resolución, *R*, entre fexofenadina y el compuesto relacionado A de fexofenadina no es menor de 7; el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0% y no es más de 3,0% para fexofenadina y el compuesto relacionado A de fexofenadina, respectivamente.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar*, de la *Solución madre de prueba* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de compuesto relacionado A de fexofenadina en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100CD(r_i/r_s)/NL$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de compuesto relacionado A de fexofenadina en la *Solución estándar*; *D* es el factor de dilución para la preparación de la *Solución madre de prueba*, en mL; *r_i* y *r_s* son las áreas de los picos de compuesto relacionado A de fexofenadina en la *Solución madre de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente; *N* es el número de Tabletas usado para preparar la *Solución madre de prueba*; y *L* es la cantidad declarada, en mg por Tableta, de clorhidrato de fexofenadina. Calcular el porcentaje del producto de degradación descarboxilado [(+)-4-[1-hidroxi-4-[4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]-butil]-isopropilbenceno; el tiempo de retención relativo es 6,7] en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100CD(r_i/r_s)/NLF$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Fexofenadina USP en la *Solución estándar*; *D* es el factor de dilución para la preparación de la *Solución madre de prueba* en mL; *r_i* es el área del pico del producto de degradación descarboxilado en la *Solución madre de prueba*; *r_s* es el área del pico de fexofenadina en la *Solución estándar*; *N* es el número de Tabletas usado para preparar la *Solución madre de prueba*; *L* es la cantidad declarada, en mg por Tableta, de clorhidrato de fexofenadina; y *F* es el factor de respuesta relativa (*F* es 1,1) para el producto de degradación descarboxilado (*F* es 1,0 para todas las otras impurezas conocidas y desconocidas). Calcular el porcentaje de cualquier otra impureza en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100r_i/(D r_s + r_T)$$

en donde *r_i* es el área del pico individual para una impureza individual desconocida en la *Solución madre de prueba*; *D* es el factor de dilución, en mL, de la *Solución de prueba*; *r_s* es el área del pico de fexofenadina en la *Solución de prueba*; y *r_T* es la suma de las áreas de los picos de todas las impurezas desconocidas en la *Solución madre de prueba*: descartar cualquier pico inferior a 0,05%; no se encuentra más de 0,4% de compuesto relacionado A de fexofenadina; no se encuentra más de 0,15% de producto de degradación descarboxilado; no se encuentra más de 0,2% de cualquier otra impureza individual; y no se encuentra más de 0,5% de impurezas totales.

Valoración—

Solución ácida—Diluir 17 mL de ácido acético glacial con agua a 1 L y mezclar. Diluir 100 mL de esta solución con agua a 1 L.

Solución amortiguadora—Diluir 15 mL de una solución que contenga una mezcla de acetonitrilo y trietilamina (1:1) con *Solución ácida* a 1 L. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 5,25.

Diluyente—Preparar una mezcla de acetonitrilo y *Solución ácida* (75:25).

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (64:36). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación madre del estándar—Disolver en *Diluyente* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Fexofenadina USP y diluir cuantitativamente con *Diluyente*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,25 mg por mL.

Preparación estándar—Diluir un volumen exacto de la *Preparación madre del estándar* con *Fase Móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,015 mg por mL.

Preparación madre de valoración—Transferir una cantidad suficiente de Tabletas enteras (no menos de 10) a un matraz volumétrico adecuado, agregar *Solución ácida* (equivalente aproximadamente al 20% del volumen total del matraz) y agitar mecánicamente a alta velocidad durante aproximadamente 30 minutos o hasta que las Tabletas se desintegren por completo y se dispersen finamente. Agregar acetonitrilo (equivalente aproximadamente al 80% del volumen total del matraz) y agitar mecánicamente durante 60 minutos. Diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Pasar una porción de esta solución a través de un filtro de politetrafluoretileno con un tamaño de poro de 0,45 µm o menor y usar el filtrado. Diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Diluyente* para obtener una solución que contenga aproximadamente 1,2 mg de clorhidrato de fexofenadina por mL.

Preparación de valoración—Diluir cuantitativamente una alícuota de la *Preparación madre de valoración*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Fase móvil* para obtener una solución que contenga aproximadamente 0,018 mg de clorhidrato de fexofenadina por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L11 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 35°. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de fexofenadina. Calcular la cantidad, en mg por Tableta, de clorhidrato de fexofenadina (C₃₂H₃₉NO₄ · HCl) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$CD(r_U/r_s)/N$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Fexofenadina USP en la *Preparación estándar*; *D* es el factor de dilución usado para la *Preparación de valoración*; *r_U* y *r_s* son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente; y *N* es el número de Tabletas usadas en la *Preparación de valoración*. ■1S (USP30)

Fluconazol

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—[NOTA—En función de la información referente al proceso de fabricación, llevar a cabo la *Prueba 1* o la *Prueba 2* y la *Prueba 3*.]

PRUEBA 1—

Fase móvil—Preparar una mezcla de agua y acetonitrilo (80:20).

Solución de aptitud del sistema—Utilizar la *Solución estándar*.

Solución estándar—Transferir cantidades pesadas con exactitud de ER Fluconazol USP, ER Compuesto Relacionado A de Fluconazol USP, ER Compuesto Relacionado B de Fluconazol USP y ER Compuesto Relacionado C de Fluconazol USP a un matraz volumétrico adecuado, disolver en acetonitrilo, diluir a volumen cuantitativamente con *Fase móvil*, y si fuera necesario en

diluciones sucesivas, y mezclar hasta obtener una solución con concentraciones conocidas de 10 µg por mL de cada Estándar de Referencia.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 30 mg de Fluconazol, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 260 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 3,5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,5 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 40°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención típicos son aproximadamente 4,9 minutos para el compuesto relacionado A de fluconazol, 8,0 minutos para el compuesto relacionado B de fluconazol, 8,5 minutos para el compuesto relacionado C de fluconazol y 9,9 minutos para el fluconazol; la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado B de fluconazol y el compuesto relacionado C de fluconazol no es menor de 1,5; y la desviación estándar relativa de cada pico para inyecciones repetidas no es más de 5,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales. Calcular el porcentaje de compuesto relacionado A de fluconazol, de compuesto relacionado B de fluconazol, de compuesto relacionado C de fluconazol y de cualquier otra impureza presente en la porción de Fluconazol tomada, por la fórmula:

$$1000(C/W)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Compuesto Relacionado A de Fluconazol USP, ER Compuesto Relacionado B de Fluconazol USP, ER Compuesto Relacionado C de Fluconazol USP o ER Fluconazol USP, respectivamente, en la *Solución estándar*; *W* es el peso, en mg, de Fluconazol tomado para preparar la *Solución de prueba*; *r_U* es la respuesta del pico obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y *r_S* es la respuesta promedio correspondiente a los picos de compuesto relacionado A de fluconazol, de compuesto relacionado B de fluconazol, de compuesto relacionado C de fluconazol o de fluconazol obtenidos a partir de las inyecciones repetidas de la *Solución estándar*: no se encuentra más de 1,0% de cualquier impureza con un tiempo de retención relativo (TRR) de aproximadamente 0,6; no se encuentra más de 0,2% de compuesto relacionado A de fluconazol o compuesto relacionado C de fluconazol; no se encuentra más de 0,1% de compuesto relacionado B de fluconazol; no se encuentra más de 0,1% de cualquier otra impureza individual; no se encuentra más de 0,3% \blacksquare_{1S} (USP30) de impurezas totales $\blacksquare_{desconocidas}$; \blacksquare_{1S} (USP30) y no se encuentra más de 1,5% \blacksquare_{1S} (USP30) de impurezas totales.

PRUEBA 2—

Solución amortiguadora de acetato—Preparar una solución de acetato de sodio anhidro 0,04 M; ajustar con ácido acético 1 N a un pH de 5,0; y mezclar.

Solución A: *Solución amortiguadora de acetato* filtrada y desgasificada.

Solución B: acetonitrilo.

Solución C: metanol.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A*, *Solución B* y *Solución C*, según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del sistema* en *Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de *Solución amortiguadora de acetato* y metanol (84:16).

Solución estándar—Disolver en *Diluyente* una cantidad de ER Fluconazol USP pesada con exactitud y diluir cuantitativamente con *Diluyente*, si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,01 mg por mL.

Solución de aptitud del sistema—Disolver cantidades adecuadas de ER Fluconazol USP y ER Clorhidrato de Desacetil Diltiazem USP en *Diluyente*. Diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 0,02 mg por mL y 0,006 mg por mL, respectivamente.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 200 mg de Fluconazol, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 261 nm y una columna de 4,0 mm × 10 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de 1 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Solución C (%)	Elución
0–10	80	5	15	isocrática
10–20	80→30	5→55	15	gradiente lineal (A y B)
20–23	30	55	15	isocrática
23–25	30→80	55→5	15	reajuste de composición
25–30	80	5	15	re-equilibrio

Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son 1,0 para fluconazol y aproximadamente 1,2 para clorhidrato de desacetil diltiazem; la resolución, *R*, entre fluconazol y clorhidrato de desacetil diltiazem no es menor de 10,0; la eficiencia de la columna para fluconazol no es menor de 30 000 platos teóricos; y el factor de simetría, *T*, no es más de 1,4. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas es menos de 5,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Fluconazol tomada, por la fórmula:

$$10\,000(r_i/r_S)(C/W)(1/F)$$

en donde *r_i* es la respuesta del pico de cada impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*; *r_S* es la respuesta del pico de fluconazol obtenido a partir de la *Solución estándar*; *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Fluconazol USP en la *Solución estándar*; *W* es el peso, en mg, de Fluconazol tomado para preparar la *Solución de prueba*; y *F* es el factor de respuesta relativa según se determina a partir de la siguiente tabla.

Factor de Respuesta Relativa (<i>F</i>)	Tiempo de Retención Relativo (TRR)
0,72	0,17–0,37
0,85	$\blacksquare_{0,48-0,60}$ \blacksquare_{1S} (USP30)
1,21	$\blacksquare_{0,67-0,79}$ \blacksquare_{1S} (USP30)
0,96	1,14–1,18
0,97	$\blacksquare_{1,20-1,32}$ \blacksquare_{1S} (USP30)
1,0	todos los demás picos

No se encuentra más de 0,1% de cualquier impureza individual; y no se encuentra más de 0,5% de impurezas totales.

PRUEBA 3—

Adsorbente: una capa de mezcla de gel de sílice para cromatografía de 0,25 mm de espesor.

Solución de prueba—Disolver una cantidad pesada con exactitud de Fluconazol en metanol para obtener una solución que contenga aproximadamente 50 mg por mL.

Soluciones estándar—Disolver una cantidad pesada con exactitud de ER Fluconazol USP en metanol para obtener la *Solución estándar A* con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL (2,0%). Diluir cuantitativamente porciones de esta solución con metanol para obtener la *Solución estándar B* y la *Solución estándar C* con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,1 mg por mL (0,2%) y 0,05 mg por mL (0,1%), respectivamente.

Fase móvil—Preparar una mezcla de cloroformo, metanol e hidróxido de amonio (80:20:1).

Volumen de aplicación: 10 µL.

Reactivo para rociado A—Disolver aproximadamente 170 mg de nitrato de plata en 100 mL de agua.

Reactivo para rociado B (Solución de yodoplatinato de potasio)—Disolver aproximadamente 375 mg de ácido cloroplático en 5 mL de ácido clorhídrico 1 N. Disolver aproximadamente 5 g de yoduro

de potasio en 50 mL de agua, y almacenar en un envase resistente a la luz. Preparar una mezcla de agua, la solución de yoduro de potasio y la solución de ácido cloroplatinico (20:9:1).

Procedimiento—Proceder según se indica en *Cromatografía en Capa Delgada en Cromatografía* (621). Rociar la placa seca con *Reactivo para rociado A* y exponer la placa a luz UV a 365 nm durante 10 a 20 minutos. Secar la placa durante 20 minutos entre 80° y 90° y después rociar la placa con *Reactivo para rociado B*. Dejar que la placa se seque. Examinar la placa y comparar las intensidades de las manchas secundarias observadas en el cromatograma de la *Solución de prueba* con las intensidades de las manchas principales en los cromatogramas de las *Soluciones estándar*: ninguna mancha del cromatograma de la *Solución de prueba* con un valor R_F entre 0,10 a 0,25 y 0,27 a 0,41 es más grande o más intensa que la que se obtiene de la *Solución estándar B* (0,2%).

Flumazenil

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—*ER Flumazenil USP*. ■ *ER Compuesto Relacionado B de Flumazenil USP*. ■ *ER Compuesto Relacionado C de Flumazenil USP*. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—

PRUEBA 1—
Solución de ninhidrina—Disolver 0,5 g de ninhidrina en 90 mL de alcohol y agregar 10 mL de ácido acético glacial.
Diluyente—Preparar una mezcla de alcohol y cloroformo (1:1).
Adsorbente: Capa de mezcla de gel de sílice para cromatografía de 0,25 mm de espesor (ver *Cromatografía* (621)).
Solución de prueba—Transferir aproximadamente 250 mg de Flumazenil, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 5 mL. Disolver y diluir a volumen con *Diluyente*, y mezclar.
Solución estándar 1—Preparar una solución de ER Flumazenil USP y ■ *ER Compuesto Relacionado C de Flumazenil USP* ■_{1S} (USP30) en *Diluyente* con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,5 mg por mL y aproximadamente 0,6 µL por mL, respectivamente.
Solución estándar 2—Diluir 2,0 mL de la *Solución estándar 1* con *Diluyente* hasta 10,0 mL.
Volumen de aplicación: 10 µL.
Fase móvil: una mezcla de cloroformo, ácido acético glacial, alcohol y agua (75:15:7,5:2,5).
Procedimiento—Proceder según se indica en *Cromatografía en Capa Delgada en Cromatografía* (621). Secar la placa durante 10 minutos en una corriente de aire frío y examinar bajo luz UV de

longitud de onda corta. Rociar la placa con la *Solución de ninhidrina* y calentar durante 15 minutos a 105°. Los valores R_F de los picos de analito son los siguientes.

Compuesto	R_F	Detección
Flumazenil	aproximadamente 0,8	UV
■ Compuesto relacionado C de flumazenil ■ _{1S} (USP30)	aproximadamente 0,04	Ninhidrina

Cualquier mancha con un valor R_F que corresponda al ■ compuesto relacionado C de flumazenil ■_{1S} (USP30) en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de prueba* no es más intensa que la mancha correspondiente en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar 2*: no se encuentra más de 0,2%.

PRUEBA 2—
Ácido fosfórico diluido, pH 2,0, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—■ Diluir la *Preparación estándar* cuantitativamente, ■_{1S} (USP30) con *Fase móvil*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1 µg por mL.
Solución de prueba—■ Usar la *Preparación de valoración*. ■_{1S} (USP30)

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas durante al menos tres veces el tiempo de retención del pico de flumazenil y medir las áreas de los picos principales. Calcular el porcentaje de cualquier impureza en la porción de Flumazenil tomada, por la fórmula:

■100(C_s/C_u)(r_i/r_s)(1/F)

en donde C_s y C_u son las concentraciones, en mg por mL, de flumazenil en la *Solución estándar* y la *Solución de prueba*, respectivamente; r_i es el área del pico para cualquier impureza en la *Solución de prueba*; r_s es el área del pico de flumazenil en la *Solución estándar*; y F es el factor de respuesta relativa para cada una de las impurezas conocidas con respecto al flumazenil. [NOTA—Los valores de F para todas las impurezas y los límites correspondientes, se proveen en la *Tabla adjunta*.] ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Valoración—

Ácido fosfórico diluido, pH 2,0—Ajustar 800 mL de agua con ácido fosfórico a un pH de 2,0 ± 0,05.
Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Ácido fosfórico diluido, pH 2,0*, metanol y tetrahidrofurano (80:13:7). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).
Solución de aptitud del sistema—Disolver en *Fase móvil* cantidades apropiadas de ■_{1S} (USP30) ER Flumazenil USP ■ y ER Compuesto Relacionado B de Flumazenil USP ■_{1S} (USP30) y diluir con *Fase móvil*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 6,4 µg por mL de cada compuesto.

Nombre del compuesto	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta Relativa	Límite (%)
Compuesto relacionado A de Flumazenil	aproximadamente 0,4	1,1	0,2
7-Fluoro-4-metil-3,4-dihidro-2,5H-1,4-benzodiazepina-2,5-diona	aproximadamente 0,5	1,5	0,2
5,6-Dihidro-5-metil-6-oxo-4H-imidazo-[1,5-a][1,4]benzodiazepina-3-carboxilato de etilo	aproximadamente 0,7	1,3	0,2
Compuesto relacionado B de Flumazenil	aproximadamente 0,8	1,1	0,2
Flumazenil	1,0	—	—
8-Cloro-5,6-dihidro-5-metil-6-oxo-4H-imidazo-[1,5-a][1,4]benzodiazepina-3-carboxilato de etilo	aproximadamente 2,2	1,1	0,2
Cualquier impureza desconocida individual	—	1,0	0,1
Total	—	—	0,5

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad pesada con exactitud de ER Flumazenil USP y diluir cuantitativamente con *Fase móvil*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg por mL de flumazenil. \blacksquare_{1S} (USP30)

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 25,0 mg de Flumazenil, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 230 nm y una columna de 4,6 mm \times 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo $\blacksquare_{5\mu L}$ de \blacksquare_{1S} (USP30) la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma: \blacksquare_{1S} (USP30) los tiempos de retención relativos son aproximadamente $\blacksquare_{0,8}$ para el compuesto relacionado B de flumazenil \blacksquare_{1S} (USP30) y 1,0 para flumazenil; la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado B de flumazenil \blacksquare_{1S} (USP30) y flumazenil no es menor de $\blacksquare_{4,0}$; \blacksquare_{1S} (USP30) la eficiencia de la columna no es menos de 1500 platos teóricos para el pico de flumazenil; y el factor de asimetría no es mayor de 1,5 para el pico de flumazenil. Inyectar en el cromatógrafo $\blacksquare_{5\mu L}$ de \blacksquare_{1S} (USP30) la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma: \blacksquare_{1S} (USP30) la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

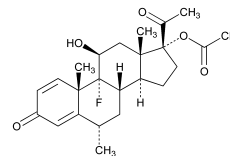
Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 μ L) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos de flumazenil. \blacksquare Calcular el porcentaje de $C_{15}H_{14}FN_3O_3$ en la porción de Flumazenil tomada, por la fórmula:

$$100(C_S/C_U)(r_U/r_S)\blacksquare_{1S} \text{ (USP30)}$$

en donde \blacksquare_{C_S} y C_U son las concentraciones, en mg por mL, de flumazenil en la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración*, respectivamente; \blacksquare_{1S} (USP30) y r_U y r_S son las áreas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Agregar lo siguiente:

■ Acetato de Fluorometolona



$C_{24}H_{31}FO_5$ 418,50

Pregna-1,4-diene-3,20-dione, 17-(acetyloxy)-9-fluoro-11-hydroxy-6-methyl-, (6 α ,11 β)-.

17 Acetato de 9-fluoro-11 β ,17-dihidroxi-6 α -metilpregna-1,4-dien-3,20-diona, [3801-06-7].

» El Acetato de Fluorometolona contiene no menos de 98,0 por ciento y no más de 101,0 por ciento de $C_{24}H_{31}FO_5$, calculado con respecto a la sustancia seca.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Fluorometolona USP*. *ER Acetato de Fluorometolona USP*.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: Absorción en el Ultravioleta (197U).

Solución: 10 μ g por mL.

Medio: metanol.

Rotación específica (781S): entre +25,0° y +31,0°.

Solución de prueba: 20 mg por mL, en cloroformo.

Pérdida por secado (731)—Secar al vacío a 60° durante 3 horas: no pierde más de 1,0% de su peso.

Compuestos relacionados—

Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Fluorometolona USP y diluir cuantitativamente con acetonitrilo, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,03 mg por mL.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Blanco—Usar acetonitrilo.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ L) del *Blanco*, de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y

Impureza	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta Relativa	Límite (%)
Fluorometolona	0,6	1,0 ^a	1,0
Compuesto SOX ¹	0,89	1,0	0,5
Acetato de Fluorometolona	1,0	—	—
Diacetato de Fluorometolona	1,39	0,45 ^a	1,0
Acetato de Fluorometolona, análogo epoxi ²	1,58	1,0	0,5
Acetato de Fluorometolona, Delta 9(11) ³	1,82	1,0	0,2
Acetato de Fluorometolona 7, 9(11) Dieno ⁴	1,77	1,8	0,3
Individual desconocida	—	1,0	0,1
Impurezas totales	—	—	1,5

¹ 19b,11b-Epoxi-17a-hidroxi-6a-metilpregna-1,4-dien-3,20-diona.

² 17a-Acetoxi-9b,11b-epoxi-6a-metilpregna-1,4-dien-3,20-diona.

³ 17a-Acetoxi-6a-metilpregna-1,4,9(11)-trien-3,20-diona.

⁴ 17a-Acetoxi-6a-metilpregna-1,4,7,9(11)-tetraen-3,20-diona.

^a Con respecto a la fluorometolona.

medir las respuestas de los picos. [NOTA—Dejar eluir durante aproximadamente dos veces y media el tiempo de elución del pico de acetato de fluorometolona antes de realizar la inyección siguiente.]

Calcular el porcentaje de fluorometolona o diacetato de fluorometolona en la porción de Acetato de Fluorometolona tomada, por la fórmula:

$$100 \times 50 \times (1/F)(C/W)(r_U/r_S)$$

en donde F es el factor de respuesta relativa (ver los valores en la *Tabla* adjunta); C es la concentración, en mg por mL, de ER Fluorometolona USP en la *Solución estándar*; W es el peso, en mg, tomado para preparar la *Solución de prueba*; r_U es la altura del pico de fluorometolona o diacetato de fluorometolona obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y r_S es la altura del pico de fluorometolona obtenido a partir de la *Solución estándar*.

Calcular el porcentaje de todas las otras impurezas de acetato de fluorometolona en la porción de Acetato de Fluorometolona tomada, por la fórmula:

$$100(1/F)(r_i/r_T)$$

en donde F es el factor de respuesta relativa (ver los valores en la *Tabla* adjunta); r_i es el área del pico de cada impureza (excepto fluorometolona y diacetato de fluorometolona) obtenida a partir de la *Solución de prueba*; y r_T es la suma de las áreas de los picos de todas las impurezas más el pico de acetato de fluorometolona obtenidas a partir de la *Solución de prueba*.

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de agua y acetonitrilo (60:40). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en acetonitrilo una cantidad, pesada con exactitud, de ER Acetato de Fluorometolona USP y diluir cuantitativamente con acetonitrilo, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg por mL.

Solución de aptitud del sistema—Preparar una solución de ER Fluorometolona USP disolviendo una cantidad en metanol y diluyendo con acetonitrilo a una concentración final de aproximadamente 1 mg por mL. Mezclar volúmenes iguales de esta solución y de la *Preparación estándar*, y diluir con acetonitrilo a una concentración final de aproximadamente 0,03 mg por mL de fluorometolona y de acetato de fluorometolona.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 50 mg de Acetato de Fluorometolona, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y diluir a volumen con acetonitrilo, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre fluorometolona y acetato de fluorometolona no es menor de 10. La eficiencia de la columna para acetato de fluorometolona no es menos de 10 000 platos teóricos y el factor de asimetría de acetato de fluorometolona no es mayor de 2,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{24}H_{31}FO_5$ en la porción de Acetato de Fluorometolona tomada, por la fórmula:

$$50C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Acetato de Fluorometolona USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■^{1S} (USP30)

Propionato de Fluticasona

Cambio en la redacción:

» El Propionato de Fluticasona contiene no menos de 98,0 por ciento y no más de ■101,0■^{1S} (USP30) por ciento de $C_{25}H_{31}F_3O_5S$, calculado con respecto a la sustancia anhidra exenta de disolventes.

Eliminar lo siguiente:

■Contenido de bromofluorometano—

Solución madre del estándar—Transferir aproximadamente 20 µL de bromofluorometano a un recipiente con 10 mL de dimetilformamida y mezclar. Diluir 10 µL de esta solución con 1 mL de dimetilformamida (0,002% v/v).

Solución estándar—Diluir 10 µL de *Solución madre del estándar* con 1 mL de dimetilformamida y mezclar (0,0002% v/v).

Solución de prueba—Disolver 200 mg de Propionato de Fluticasona en 1,0 mL de dimetilformamida.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de gases con un detector de captura de electrones, una columna capilar de 0,32 mm × 25 m recubierta con una capa de 5 µm de fase G27 y un sistema de inyección dividida. El gas transportador es nitrógeno, que fluye a una velocidad de aproximadamente 2,8 mL por minuto. El gas de compensación es nitrógeno, que fluye a una velocidad de 30 mL por minuto. Programar la temperatura de la columna del siguiente modo. Equilibrar la temperatura de la columna inicialmente a 40° durante 3,5 minutos; luego aumentar la temperatura a una velocidad de 30° por minuto hasta 200° y mantener a 200° durante 10 minutos. Mantener la temperatura del sistema de inyección dividida (70:1) a 85° y la temperatura del detector a 250°. Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en el *Procedimiento*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba* y medir las respuestas de los picos de bromofluorometano. La intensidad del pico de bromofluorometano en el cromatograma de la *Solución de prueba* es menor que la intensidad del pico de bromofluorometano en el cromatograma de la *Solución estándar*. ■^{1S} (USP30)

Maleato de Fluvoxamina

Eliminar lo siguiente:

■**Ácido maleico**—Transferir aproximadamente 800,0 mg de Maleato de Fluvoxamina, pesados con exactitud, a un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenga 50 mL de agua. Valorar con hidróxido de sodio 0,1 N SV, usando 0,5 mL de fenolftaleína SR como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver *Volumetría* (541)). Cada mL de hidróxido de sodio 0,1 N SV equivale a 5,805 mg de ácido maleico ($C_4H_4O_4$). Se encuentra entre 26,0% y 27,5% de ácido maleico. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:**Valoración—**

Solución amortiguadora—Disolver aproximadamente 5 g de sal sódica del ácido 1-pentanosulfónico y 0,7 g de fosfato monobásico de potasio en 620 mL de agua. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de $3,00 \pm 0,05$.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de **Solución amortiguadora** y acetonitrilo (62:38). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de resolución—Transferir aproximadamente 6 mg de Maleato de Fluvoxamina a un matraz volumétrico de 50 mL. Calentar la muestra a 120° durante 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y agregar 3,0 mL de ácido clorhídrico 0,1 N. Calentar la solución en un baño de agua durante 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, agregar 50 mg de Maleato de Fluvoxamina y disolver en 25 mL de **Fase móvil**. Diluir a volumen con **Fase móvil** y mezclar.

Preparación estándar—Disolver en **Fase móvil** una cantidad, pesada con exactitud, de ER Maleato de Fluvoxamina USP y diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con **Fase móvil** para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,05 mg por mL.

Preparación madre de valoración—Transferir una cantidad, pesada con exactitud, de aproximadamente 50 mg de Maleato de Fluvoxamina a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y diluir a volumen con **Fase móvil**, y mezclar.

Preparación de valoración—Transferir 5,0 mL de la **Preparación madre de valoración** a un matraz volumétrico de 100 mL. Diluir a volumen con **Fase móvil** y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 234 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L7. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,7 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 40°. Inyectar en el cromatógrafo la **Solución de resolución** y registrar el cromatograma según se indica en el **Procedimiento**. ■^{1S} (USP30) la resolución, R , entre el isómero Z y el maleato de fluvoxamina no es menor de 3,0; y no es menor de 5,0 entre 5-metoxi-1-[4-(trifluorometil)fenil]-1-pentanona-(E)- O -[2-(2-succinil)amino]etil]oxima y el isómero Z . Inyectar en el cromatógrafo la **Preparación estándar** y registrar el cromatograma según se indica en el **Procedimiento**: la eficiencia de la columna no es menos de 5000 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. ■[NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos aproximados se indican en la *Tabla 1*.] ■^{1S} (USP30)

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la **Preparación estándar** y de la **Preparación de valoración**, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de maleato de fluvoxamina. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{15}H_{21}F_3N_2O_2 \cdot C_4H_4O_4$ en la porción de Maleato de Fluvoxamina tomada, por la fórmula:

$$1000C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Maleato de Fluvoxamina USP en la **Preparación estándar**; y r_U y r_S son las áreas de los picos obtenidas a partir de la **Preparación de valoración** y la **Preparación estándar**, respectivamente.

Maleato de Fluvoxamina, Tabletas**Cambio en la redacción:**

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a ■temperatura ambiente. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Etiquetado**—Si se usa una prueba de *Compuestos relacionados* diferente de la *Prueba 1*, el etiquetado declara la prueba de *Compuestos relacionados* con la cual cumple el artículo. ■^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:**Disolución** (711)—

Medio: agua desgasificada; 900 mL.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempo: 30 minutos.

Procedimiento—Determinar la cantidad de $C_{15}H_{21}F_3N_2O_2 \cdot C_4H_4O_4$ disuelta empleando absorción UV a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 246 nm, en porciones de la solución ■pasada a través de un filtro adecuado con un tamaño de poro de 0,45 µm. ■^{1S} (USP30) diluidas apropiadamente con **Medio**, si fuera necesario, en comparación con una **Solución estándar** con una concentración conocida de ER Maleato de Fluvoxamina USP en el mismo **Medio**. ■Cuando existen interferencias conocidas debidas a excipientes, se pueden aplicar correcciones de interferencia de excipientes, si fuera necesario. ■^{1S} (USP30)

Tolerancias—No menos de 80% (Q) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{21}F_3N_2O_2 \cdot C_4H_4O_4$ se disuelve en 30 minutos.

Agregar lo siguiente:

■**Compuestos relacionados**—[NOTA—Si (E)-5-metoxi-4'-difluorometilvalerofenona- O -2-aminoetiloxima es una impureza conocida, se recomienda la *Prueba 2*.]

PRUEBA 1—

Solución amortiguadora, **Fase móvil**, **Solución de resolución** y **Sistema cromatográfico**—Proceder según se indica en la **Valoración**.

Solución de identificación—Disolver en **Fase móvil** una cantidad de ácido maleico y diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con **Fase móvil** para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 0,35 mg por mL.

Solución estándar—Usar la **Preparación estándar** preparada según se indica en la **Valoración**.

Solución de prueba—Usar la **Preparación madre de valoración** preparada según se indica en la **Valoración**.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la **Solución estándar**, de la **Solución de prueba** y de la **Solución de identificación**, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de impurezas en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(C/D)F(r_i/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Maleato de Fluvoxamina USP en la **Solución estándar**; D es la concentración esperada, en mg por mL, de maleato de fluvoxamina teniendo en cuenta la cantidad declarada y la cantidad de la muestra tomada para preparar la **Solución de prueba**; F es el factor de respuesta de cada impureza según se indica en la *Tabla 1*; r_i es el área del pico individual de cada impureza en la **Solución de prueba**; y r_S es el área del pico de maleato de fluvoxamina en la **Solución estándar**. Los límites de impurezas se especifican en la *Tabla 1*. [NOTA—Descartar cualquier pico debido al ácido maleico o al blanco del reactivo.]

PRUEBA 2—

Diluyente—Preparar una mezcla de metanol y agua (60:40).

Solución amortiguadora de acetato—Disolver aproximadamente 13,6 g de acetato de sodio trihidrato en 1000 mL de agua.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de **Solución amortiguadora de acetato**, acetonitrilo y metanol (550:300:150). Agregar 2 mL de trietilamina. Ajustar con ácido acético glacial a un pH de 4,5. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Tabla 1

Nombre del Compuesto	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta	Límite %
Ácido maleico	aproximadamente 0,19	—	—
5-Metoxi-1-[4-(trifluorometil)fenil]-1-pentanona-(E)-O-[2-[(2-succinil)amino]etil]oxima	aproximadamente 0,50	1,0	0,8
Maleato de 5-metoxi-4'-(trifluorometil)valerofenona(E)-O-(2-aminoetil)aminoetil oxima	aproximadamente 0,67	1,4	0,2
Z-isómero	aproximadamente 0,79	1,0	0,5
Fluvoxamina	1,0	—	—
Maleato de 4'-(trifluorometil)valerofenona(E)-O-2-(2-aminoetil)aminoetil oxima	aproximadamente 1,18	1,0	0,2
Maleato de (E)-O-2-(2-aminoetil)-4-(trifluorometil)-α-fenil-acetofenona oxima	aproximadamente 1,74	1,0	0,2
Maleato de 4'-(trifluorometil)valerofenona(E)-O-(2-aminoetil) oxima	aproximadamente 2,00	1,0	0,2
5-Metoxi-4'-(trifluorometil)valerofenona oxima	aproximadamente 3,45	0,6	0,2
Monomaleamida de (E)-O-(2-aminoetil)oxima de 5-metoxi-1-[4-(trifluorometil)fenil]-1-pentanona	aproximadamente 4,3	1,0	0,2
5-Metoxi-4'-(trifluorometil)valerofenona cetona	aproximadamente 4,2	0,3	0,2
Impurezas desconocidas	—	1,0	0,1
Total	—	—	1,8

Solución estándar—Diluir cuantitativamente la *Preparación estándar*; preparada según se indica en la *Valoración*, con *Diluyente* para obtener una solución final con una concentración conocida de aproximadamente 0,001 mg por mL de maleato de fluvoxamina.

Solución de prueba—Transferir 5 mL de la *Preparación madre de valoración* (el sobrenadante después de la centrifugación), preparada según se indica en la *Valoración*, a un matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con *Diluyente*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L7. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2,0 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 40°. Inyectar en el cromatógrafo 20 µL de la *Solución de resolución* y registrar la respuesta de los picos según se indica en el *Procedimiento*. Identificar los picos empleando los tiempos de retención relativos que se indican en la *Tabla 2*; la resolución, *R*, entre el *Z*-isómero y maleato de fluvoxamina no es menor de 1,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 5,0%.

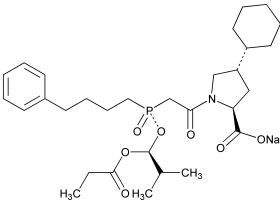
Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 100 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas para todas las impurezas y maleato de fluvoxamina. Calcular el porcentaje de las impurezas en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

100(C/D)(1/F)(r₁/r_s)

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Maleato de Fluvoxamina USP en la *Solución estándar*; *D* es la concentración esperada, en mg por mL, de maleato de fluvoxamina teniendo en cuenta la cantidad declarada y la cantidad de la muestra tomada para preparar la *Solución de prueba*; *F* es el factor de respuesta para cada impureza según se indica en la *Tabla 2*; *r*₁ es el área del pico individual de cada impureza en la *Solución de prueba*; y *r*_s es el área del pico de maleato de fluvoxamina en la *Solución estándar*. Los límites de impurezas se especifican en la *Tabla 2*.

Agregar lo siguiente:

■ Fosinopril Sódico



C₃₀H₄₅NNaO₇P 585,64
L-Proline, 4-cyclohexyl-1-[[[2-methyl-1-(1-oxopropoxy)propoxy](4-phenylbutyl)phosphinyl]acetyl]-, sodium salt, [1[S*(R*)],2α,4β]-.
Sal sódica del propionato (éster) de (4S)-4-ciclohexil-1-[(R)-[(S)-1-hidroxi-2-metilpropoxi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil-L-prolina [8889-14-9].

» El Fosinopril Sódico contiene no menos de 97,5 por ciento y no más de 102,0 por ciento de C₃₀H₄₅NNaO₇P, calculado con respecto a la sustancia anhidra.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables y almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Fosinopril Sódico USP. ER Compuesto Relacionado A de Fosinopril USP. ER Compuesto Relacionado B de Fosinopril USP. ER Compuesto Relacionado C de Fosinopril USP. ER Compuesto Relacionado D de Fosinopril USP. ER Compuesto Relacionado E de Fosinopril USP. ER Compuesto Relacionado F de Fosinopril USP.*

Identificación, Absorción en el Infrarrojo (197M).

Agua, Método I (921): no más de 0,2%.

Metales pesados, Método II (231): 0,002%.

Compuestos relacionados—

PRUEBA 1—
Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*.
Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Tabla 2

Nombre del Compuesto	Tiempo de Retención Relativo Aproximado	Factor de Respuesta	Límite %
(E)-5-Metoxi-4'-difluorometilvalerofenona-O-2-aminoetiloxima	0,58	1,0	0,2
Ácido (E)-N-[2[[[α-(4-metoxibutil)-4-(trifluorometil)benziliden]amino]oxi]etil]aspártico	0,70	1,0	0,5
(E)-5-Metoxi-4'-trifluorometilvalerofenona-O-[2-N-(aminoetil)aminoetil]oxima	0,75	1,0	0,2
Z-isómero	0,85	0,5	0,5
Fluvoxamina	1,0	—	—
(E)-4'-Trifluorometil-valerofenona-O-2-aminoetiloxima	1,86	1,0	0,2
5-Metoxi-4'-trifluorometilvalerofenona oxima	aproximadamente 1,99	1,0	0,2
5-Metoxi-4-trifluorometilvalerofenona	aproximadamente 2,17	1,0	0,2
Impurezas desconocidas	—	1,0	0,2
Total	—	—	1,5

Procedimiento—Proceder según se indica en la *Valoración* y medir las áreas de cada componente en el cromatograma obtenido, llevando a cabo la cromatografía hasta cuatro veces el tiempo de retención del pico de fosinopril sódico. Calcular el porcentaje de cada compuesto relacionado individual, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la respuesta de cualquier pico individual diferente del pico de fosinopril sódico; y r_s es la suma de las respuestas de todos los picos. [NOTA—Si estuvieran presentes, es posible que dos diastereoisómeros más no puedan resolverse del compuesto relacionado B de fosinopril por este método. Estos picos, que aparecen a un tiempo de retención relativo de 0,7, se deben integrar juntos para determinar su conformidad con el límite de la *Tabla 1*.]

Tabla 1

Tiempo de Retención Relativo	Compuesto Relacionado de Fosinopril	Prueba	Límite (%)
2,0	A ¹	1	0,3
0,7	B ²	1	1,0
1,2	C ³	2	0,3
1,3	D ⁴	2	0,3
0,8	E ⁵	3	0,3
0,9	F ⁶	3	0,3
0,53	Impureza 1 ⁷	1	0,3
0,67	Impureza 2 ⁸	1	0,2

¹ (4S)-4-Ciclohexil-1-[(4-fenilbutil)fosfinil]acetil-L-prolina

² Propionato (éster) de (4S)-4-ciclohexil-1-[(R)-[(S)-1-hidroxi-2-metilpropoxi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil-D-prolina

³ Mezcla de sal sódica del propionato (éster) de (4S)-4-ciclohexil-1-[(S)-[(S)-1-hidroxi-2-metilpropoxi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil-L-prolina y sal sódica del propionato (éster) de (4S)-4-ciclohexil-1-[(R)-[(R)-1-hidroxi-2-metilpropoxi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil-L-prolina

⁴ Sal sódica del propionato (éster) de (4R)-4-ciclohexil-1-[(R)-[(S)-1-hidroxi-2-metilpropoxi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil-L-prolina

⁵ Sal sódica del propionato (éster) de (4S)-4-fenil-1-[(R)-[(S)-1-hidroxi-2-metilpropoxi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil-L-prolina

⁶ Sal sódica del propionato (éster) de (4S)-4-ciclohexil-1-[(R)-[(S)-1-hidroxi-propoxi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil-L-prolina

⁷ Ácido (2S,4S)-4-ciclohexil-1-pivaloilpirrolidin-2-carboxílico

⁸ Ácido 2-((RS)-(SR)-2-metil-1-(propioniloxi)propoxi)(4-fenilbutil)fosfinil acético

PRUEBA 2—

Fase móvil—Preparar una mezcla desgasificada de acetonitrilo, agua y ácido fosfórico (4000 : 15 : 2). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Usar la *Preparación estándar*, preparada según se indica en la *Valoración*.

Solución de resolución—Transferir aproximadamente 1 mg de ER Fosinopril Sódico USP, de ER Compuesto Relacionado C de Fosinopril USP y de ER Compuesto Relacionado D de Fosinopril USP a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y diluir a volumen con *Solución estándar* y mezclar.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 214 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L12. Mantener la temperatura de la columna a 45°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,9 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el fosinopril sódico y el compuesto relacionado C de fosinopril no es menor de 1,5.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 20 µL de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las áreas de los picos, llevando a cabo la cromatografía hasta dos veces el tiempo de retención del pico de fosinopril sódico. Calcular sólo los porcentajes del compuesto relacionado C de fosinopril y del compuesto relacionado D de fosinopril por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la respuesta del pico del compuesto relacionado C de fosinopril o compuesto relacionado D de fosinopril; y r_s es la suma de las respuestas de todos los picos.

PRUEBA 3—

Solución de ácido fosfórico al 0,2%—Preparar una solución de ácido fosfórico 1 en 500.

Fase móvil—Preparar una mezcla desgasificada de acetonitrilo y *Solución de ácido fosfórico al 0,2%* (560 : 440). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de resolución—Transferir aproximadamente 1 mg de ER Fosinopril Sódico USP, de ER Compuesto Relacionado E de Fosinopril USP y de ER Compuesto Relacionado F de Fosinopril USP a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 10 mg de Fosinopril Sódico, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 205 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L11. Mantener la temperatura de la columna a 45°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el compuesto relacionado F de fosinopril y fosinopril sódico no es menor de 1,5; y la resolución entre el compuesto relacionado E de fosinopril y el compuesto relacionado F de fosinopril no es menor de 1,5.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 20 µL de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las áreas de los picos, llevando a cabo la cromatografía hasta cuatro

veces el tiempo de retención del pico de fosinopril sódico. Calcular sólo los porcentajes de compuesto relacionado E de fosinopril y de compuesto relacionado F de fosinopril, usando la siguiente fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la respuesta del pico del compuesto relacionado E de fosinopril o del compuesto relacionado F de fosinopril; y r_s es la suma de las respuestas de todos los picos. Además de no exceder los límites para impurezas de la *Tabla 1*, no se encuentra más de 0,1% de cualquier otra impureza individual (calculado según se indica en el *Procedimiento* en la PRUEBA 1); y no se encuentra más de 1,5% de impurezas totales.

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla desgasificada de acetonitrilo, agua y ácido fosfórico (2000 : 10 : 1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 10 mg de ER Fosinopril Sódico USP y aproximadamente 1 mg de ER Compuesto Relacionado A de Fosinopril USP y de ER Compuesto Relacionado B de Fosinopril USP a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Preparación estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Fosinopril Sódico USP en *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,10 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 25 mg de Fosinopril Sódico, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 250 mL. Disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 214 nm y una columna de 3,9 mm × 15 cm rellena con material L3. Mantener la temperatura de la columna a 33°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el compuesto relacionado B de fosinopril y fosinopril sódico no es menor de 2,0; y la desviación estándar relativa de la respuesta del pico de fosinopril sódico para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{30}H_{45}NNaO_7P$ en la porción de Fosinopril Sódico tomada, por la fórmula:

$$250C_s(r_U/r_s)$$

en donde C_s es la concentración, en mg por mL, de ER Fosinopril Sódico USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_s son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Fosinopril Sódico, Tabletas

» Las Tabletas de Fosinopril Sódico contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de fosinopril sódico ($C_{30}H_{45}NNaO_7P$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Fosinopril Sódico USP*. *ER Compuesto Relacionado A de Fosinopril USP*. *ER Compuesto Relacionado G de Fosinopril USP*.

Identificación—

A: *Absorción en el Infrarrojo* (197F)—

Muestra de prueba—Transferir una porción de Tabletas reducidas a polvo fino, equivalente aproximadamente a 25 mg de fosinopril sódico, a un vaso de precipitados de 100 mL con 40 mL de agua. Calentar a 25° durante 5 minutos mezclando y pasar a través de un embudo con un disco sinterizado de porosidad media. Centrifugar el filtrado a 2500 rpm durante 30 minutos. Ajustar el filtrado con ácido fosfórico a un pH de 3 para precipitar el fosinopril y pasar a través de un embudo con disco sinterizado. Disolver el precipitado pasando cloroformo a través del filtro y evaporar hasta sequedad la solución cloroformica en una corriente de aire. Proceder según se indica, usando el residuo aceitoso así obtenido y un residuo preparado de manera similar a partir de 25 mg de ER Fosinopril Sódico USP.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el de la *Preparación estándar*; según se obtienen en la *Valoración*.

Disolución (711)—

Medio: agua; 900 mL.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempo: 30 minutos.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y ácido fosfórico al 0,2% (64 : 36). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de resolución—Preparar una solución en *Fase móvil* que contenga aproximadamente 0,02 mg por mL de ER Fosinopril Sódico USP y de ER Compuesto Relacionado G de Fosinopril USP.

Solución de prueba—Usar porciones de la solución en análisis pasadas a través de un filtro de acrílico de 1,2 µm. [NOTA—No usar filtros de vidrio.]

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 215 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm, rellena con material L1 de 5 µm, mantenida a una temperatura de 40°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 3 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y la *Solución estándar*, y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el pico de fosinopril sódico y el pico del compuesto relacionado G de fosinopril no es menor de 1,7; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Solución estándar* no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución de prueba* y de una *Solución estándar* con una concentración conocida de ER Fosinopril Sódico USP en el mismo *Medio*, y registrar los cromatogramas. Medir las respuestas de los picos principales y calcular la cantidad de $C_{30}H_{45}NNaO_7P$ disuelta.

Tolerancias—No menos de 80% (Q) de la cantidad declarada de $C_{30}H_{45}NNaO_7P$ se disuelve en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación: cumplen con los requisitos.

Límite de compuesto relacionado A—

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

Solución estándar—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Fosinopril USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL. Diluir con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración final conocida de 0,0025 mg por mL.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de compuesto relacionado A de fosinopril en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$1000C(r_U/r_s)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, del compuesto relacionado A de fosinopril en la *Solución estándar*; y r_U y r_s son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente. No se encuentra más de 4%.

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla desgasificada de metanol y ácido fosfórico al 0,2% (78:22). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de solución de urea 0,2 M y acetonitrilo (80:20).

Solución de resolución—Preparar una solución en *Diluyente* que contenga 30 µg de ER Compuesto Relacionado A de Fosinopril USP y 70 µg de ER Fosinopril Sódico USP por mL.

Preparación estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Fosinopril Sódico USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir no menos de 10 Tabletas a un matraz volumétrico de 500 mL, agregar 400 mL de *Diluyente* y mezclar durante 40 minutos. Diluir a volumen con *Diluyente*, mezclar y centrifugar. Diluir cuantitativamente un volumen (V_S mL), medido con exactitud, del sobrenadante transparente con *Diluyente* para obtener una solución (V_A mL) que contenga aproximadamente 0,1 mg de fosinopril sódico por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 215 nm y una columna de 4,0 mm × 30 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y la *Preparación estándar*; y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el tiempo de retención relativo es 0,4 para el compuesto relacionado A de fosinopril y 1,0 para fosinopril sódico; la resolución, R , entre los picos de fosinopril sódico y el compuesto relacionado A de fosinopril no es menor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Continuar la cromatografía hasta 1,5 veces el tiempo de retención del pico de fosinopril sódico. Calcular la cantidad, en mg, de fosinopril sódico ($C_{30}H_{45}NNaO_7P$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$50C(V_A/V_S)(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Fosinopril Sódico USP en la *Preparación estándar*; V_A es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración*; V_S es el volumen, en mL, del sobrenadante tomado para la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:**■ Fosinopril Sódico e Hidroclorotiazida, Tabletas**

» Las Tabletas de Fosinopril Sódico e Hidroclorotiazida contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de fosinopril sódico ($C_{30}H_{45}NNaO_7P$) y de hidroclorotiazida ($C_7H_8ClN_3O_4S_2$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina USP. ER Fosinopril Sódico USP. ER Compuesto Relacionado A de Fosinopril USP. ER Compuesto Relacionado H de Fosinopril USP. ER Hidroclorotiazida USP.*

Identificación—

A: *Absorción en el Infrarrojo* (197F)—

FOSINOPRIL SÓDICO—Transferir una porción de Tabletas reducidas a polvo fino, equivalente aproximadamente a 25 mg de fosinopril sódico, a un vaso de precipitados de 100 mL con 40 mL de agua, calentar a 30° durante 5 minutos mezclando y pasar a través de un embudo con un disco sinterizado de porosidad media. Centrifugar el filtrado a 2500 rpm durante 30 minutos. Ajustar el filtrado con ácido clorhídrico a un pH de 1 para precipitar el fosinopril y pasar a través de un embudo con disco sinterizado. Disolver el precipitado pasando metil isobutil cetona a través del filtro y evaporar hasta sequedad el filtrado en una corriente de nitrógeno. Proceder según se indica, usando el residuo aceitoso así obtenido y un residuo preparado de manera similar a partir de 25 mg de ER Fosinopril Sódico USP.

HIDROCLOROTIAZIDA—Transferir una porción de Tabletas reducidas a polvo fino, equivalente aproximadamente a 37,5 mg de hidroclorotiazida, a un vaso de precipitados de 250 mL con 120 mL de agua, calentar a 30° durante 5 minutos mezclando y pasar a través de un embudo con un disco sinterizado de porosidad media. Lavar el precipitado con 60 mL de una mezcla de cloruro de metileno y ácido acético glacial (90:10) y desechar el filtrado. Disolver el precipitado pasando 10 mL de metil isobutil cetona a través del filtro y evaporar hasta sequedad el filtrado en una corriente de nitrógeno. Proceder según se indica, usando el residuo ceroso así obtenido y un residuo preparado de manera similar a partir de 37 mg de ER Hidroclorotiazida USP.

B: Los tiempos de retención de los picos de fosinopril sódico y de hidroclorotiazida en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponden con los de la *Preparación estándar*; según se obtienen en la *Valoración de fosinopril sódico* y la *Valoración de hidroclorotiazida*, respectivamente.

Disolución (711)—

Medio: agua; 900 mL.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempo: 30 minutos.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de fosfato monobásico de potasio 0,01 M (pH 3,0), metanol y acetonitrilo (45:35:20). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Soluciones madre del estándar—Disolver por separado aproximadamente 20 mg de ER Fosinopril Sódico USP y de ER Hidroclorotiazida USP, pesados con exactitud, en 6 mL de metanol y diluir con agua para obtener soluciones (*Solución madre del estándar A y B*) con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,1 mg por mL de ER Fosinopril Sódico USP y ER Hidroclorotiazida USP, respectivamente.

Solución estándar—Mezclar 25 mL de *Solución madre del estándar B* y x25 mL de *Solución madre del estándar A* y diluir con agua a 200 mL, donde x es el cociente entre las respectivas cantidades declaradas, en mg, de fosinopril sódico e hidroclorotiazida por Tableta.

Solución de resolución—Transferir 5 mg de ER Compuesto Relacionado H de Fosinopril USP a un matraz volumétrico de 100 mL y disolver en 5 mL de metanol. Agregar 2,0 mL de *Solución madre del estándar B*, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución de prueba—Usar porciones de la solución en análisis pasadas a través de un filtro de acrílico de 1,2 µm. [NOTA—No usar filtros de vidrio.]

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de longitud de onda variable ajustado a 210 nm y 272 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm, rellena con material L10 de 5 µm, mantenida a 40°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,3 mL por minuto. Con el detector ajustado a 215 nm, inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y la *Solución estándar*; y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el pico del compuesto relacionado H de fosinopril y el pico de hidroclorotiazida no es menor de 1,5 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Solución estándar* no es más de 1,5%.

Procedimiento—Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución de prueba* y de la *Solución estándar* y registrar los cromatogramas con el detector ajustado a 272 nm de 0 a 5 minutos y a 210 de 5 a 9 minutos, para hidrocortiazida y fosinopril sódico, respectivamente. Medir las respuestas de los picos principales y calcular la cantidad de $C_{30}H_{45}NNaO_7P$ y de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ disuelta.

Tolerancias—No menos de 80% (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{30}H_{45}NNaO_7P$ y no menos de 75% (*Q*) de la cantidad declarada de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ se disuelven en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación: cumplen con los requisitos.

Compuestos relacionados—

PRUEBA 1—

Fase móvil, Diluyente y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración de fosinopril sódico*.

Solución estándar—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Fosinopril USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL. Diluir una alícuota (5 en 200) en *Diluyente* para obtener una solución que contenga 0,0025 mg por mL.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*, preparada según se indica en la *Valoración de fosinopril sódico*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Descartar el pico de hidrocortiazida. Calcular el porcentaje de compuesto relacionado A de fosinopril en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$20C(D/L)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de compuesto relacionado A de fosinopril en la *Solución estándar*; *D* es el volumen, en mL, de la *Solución de prueba*; *L* es la cantidad declarada, en mg por Tableta, de fosinopril sódico; y r_U y r_S son las respuestas de los picos del compuesto relacionado A de fosinopril obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente. No se encuentra más de 4% de compuesto relacionado A de fosinopril sódico. Calcular el porcentaje de cualquier otra impureza en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_S)$$

en donde r_i es la respuesta del pico de cada impureza; y r_S es la suma de las respuestas de todos los picos: no se encuentra más de 0,1% de cualquier otra impureza individual y no se encuentra más de 5,0% de impurezas totales.

PRUEBA 2—

Fase móvil y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración de hidrocortiazida*.

Solución estándar—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,2 mg por mL. Diluir una alícuota (2 en 100) en *Fase móvil* para obtener una solución que contenga 0,004 mg por mL.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*, preparada según se indica en la *Valoración de hidrocortiazida*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Descartar el pico de fosinopril. Calcular el porcentaje de compuesto relacionado A de benzotiadiazina en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$20C(D/L)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de compuesto relacionado A de benzotiadiazina en la *Solución estándar*; *D* es el volumen, en mL, de la *Solución de prueba*; *L* es la cantidad declarada, en mg por Tableta, de hidrocortiazida; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de compuesto relacionado A de benzotiadiazina obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente. No se encuentra más de 0,5% de compuesto relacionado A de benzotiadiazina.

Valoración de fosinopril sódico—

Fase móvil—Preparar una mezcla desgasificada de metanol y ácido fosfórico al 0,2% (75:25). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Diluyente: una mezcla de urea 0,2 M y acetonitrilo (80:20).

Solución de resolución—Preparar una solución en *Fase móvil* con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL de ER Compuesto Relacionado A de Fosinopril USP y de ER Fosinopril Sódico USP.

Preparación estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Fosinopril Sódico USP en *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL.

Preparación de valoración—Colocar 5 Tabletas por matraz en dos matraces volumétricos de 500 mL, agregar 400 mL de *Diluyente* a cada matraz, agitar durante 45 minutos, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Centrifugar una porción de la solución a 2000 rpm durante 20 minutos. Mezclar volúmenes iguales del sobrenadante, medidos con exactitud, y diluir, si fuera necesario, para producir una concentración esperada de fosinopril sódico de aproximadamente 0,1 mg por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de longitud de onda variable ajustado a 215 nm y una columna de 3,9 mm × 30 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son 0,4 para el compuesto relacionado A de fosinopril y 1,0 para fosinopril sódico; la resolución, *R*, entre los picos de fosinopril sódico y el compuesto relacionado A de fosinopril no es menor de 4,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* no es más de 1,5%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Continuar la cromatografía hasta 1,5 veces el tiempo de retención del pico de fosinopril sódico. Calcular la cantidad, en mg, de fosinopril sódico ($C_{30}H_{45}NNaO_7P$) en la porción de cada Tableta tomada, por la fórmula:

$$100(CD)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Fosinopril Sódico USP en la *Preparación estándar*; *D* es el factor de dilución de la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Valoración de hidrocortiazida—

Fase móvil—Preparar una mezcla desgasificada de ácido fosfórico al 0,2% y metanol (85:15). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de resolución—Preparar una solución en *Fase móvil* con una concentración conocida de aproximadamente 12,5 µg por mL de ER Hidrocortiazida USP y 10 µg por mL de ER Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina USP.

Preparación estándar—Disolver una cantidad pesada con exactitud de ER Hidrocortiazida USP en *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 12,5 µg por mL.

Preparación de valoración—Colocar 5 Tabletas por matraz en dos matraces volumétricos de 500 mL, agregar 50 mL de agua a cada matraz y agitar durante 15 minutos para desintegrar las Tabletas. Agregar aproximadamente 350 mL de metanol, agitar durante 45 minutos, diluir a volumen con metanol y mezclar. Mezclar 5,0 mL de cada sobrenadante, diluir con *Fase móvil* a 100 mL y mezclar para producir una concentración esperada de hidrocortiazida de aproximadamente 12,5 µg por mL. Centrifugar una porción de la solución a 2000 rpm durante 20 minutos.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de longitud de onda variable ajustado a 271 nm y una columna de 3,9 mm × 30 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y la *Preparación estándar*, y registrar el cromatograma

según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son 0,7 para el compuesto relacionado A de benzotiadiazina y 1,0 para hidrocortizida; la resolución, *R*, entre los picos de hidrocortizida y el compuesto relacionado A de benzotiadiazina no es menor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* no es más de 1,5%.

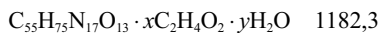
Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Continuar la cromatografía hasta 1,5 veces el tiempo de retención del pico de hidrocortizida. Calcular la cantidad, en mg, de hidrocortizida ($C_7H_5ClN_3O_4S_2$) en la porción de cada Tableta tomada, por la fórmula:

$$100(CD)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Hidrocortizida USP en la *Preparación estándar*; *D* es el factor de dilución de la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■ *USP30*

Agregar lo siguiente:

■ Acetato de Gonadorelina



Luteinizing hormone-releasing factor acetate (salt) hydrate.

Acetato (sal) de 5-oxo-L-prolil-L-histidil-L-triptofil-L-seril-L-tirosil-glicil-L-leucil-L-arginil-L-prolilglicinamida hidrato [52699-48-6; 33515-09-2].

» El Acetato de Gonadorelina es una hormona polipeptídica sintética que tiene la propiedad de estimular la liberación de la hormona luteinizante desde el hipotálamo. Contiene no menos de 80 por ciento en peso de $C_{55}H_{75}N_{17}O_{13}$, y el resto es ácido acético y agua.

NOTA—El Acetato de Gonadorelina es sumamente higroscópico. Evitar la exposición a la humedad y almacenar en un desecador.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables, bien sellados y protegidos de la humedad. Almacenar a una temperatura de no más de 8°.

Etiquetado—Etiquetar indicando que está destinado sólo al uso veterinario.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Acetato de Gonadorelina USP. ER Compuesto Relacionado A de Acetato de Gonadorelina USP.*

Identificación—

A: La masa monoisotópica por *Espectrometría de Masa* (736) es $1181,6 \pm 1$ unidades de masa.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Solución de prueba* se corresponde con el del cromatograma de la *Solución estándar*, según se obtienen en la prueba de *Compuestos relacionados*.

Rotación específica (781S): entre –54° y –66°, a 20°, calculada con respecto al contenido de péptido determinado en la *Valoración*.

Solución de prueba: 10 mg por mL, en ácido acético al 1% (v/v).

Agua, Método Ic (921): no más de 7,0%, determinada introduciendo directamente no menos de 2 mg de la sustancia sólida en el titulador.

Límite de fluoruro—[NOTA—Usar recipientes de polipropileno para la preparación de soluciones y estándares.]

Soluciones estándar—Preparar una serie de estándares de calibración que contengan 10, 1, 0,1 y 0,05 ppm de fluoruro disuelto en una solución amortiguadora para ajuste de la fuerza iónica adecuada para el electrodo en uso (pH aproximadamente 5).

Solución de prueba—Disolver entre 3 y 5 mg de Acetato de Gonadorelina en 1,375 mL de la misma solución amortiguadora usada para la preparación de las *Soluciones estándar*.

Procedimiento—Usando un electrodo selectivo para el ión fluoruro conectado a un medidor de pH/iones, medir el potencial de cada *Solución estándar*, y graficar la respuesta en función del logaritmo de la concentración. Determinar la línea de regresión por el método de mínimos cuadrados. La prueba se considera válida si la pendiente de la curva está en el intervalo de –54 a –60 mV por década y la curva de regresión tiene un cuadrado del coeficiente de correlación, r^2 , no menor de 0,995. A partir de la curva de calibración y de la concentración de la *Solución de prueba*, determinar la cantidad de fluoruro en la muestra: no se encuentra más de 0,1% (p/p).

Ácido acético y ácido trifluoroacético—

Solución A—Agregar 7,0 mL de ácido fosfórico y 5,0 mL de amoníaco concentrado a 900 mL de agua. Mezclar y diluir con agua a 1000 mL, pasar a través de un filtro de 0,45 µm y desgasificar. Agregar 20 mL de metanol, mezclar y desgasificar durante 2 minutos adicionales.

Solución B—Preparar una mezcla desgasificada de acetonitrilo y agua (1 : 1).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B*, según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Diluyente—Diluir 5,0 mL de ácido fosfórico con agua hasta 1000 mL y mezclar bien.

Solución madre de ácido trifluoroacético—Agregar aproximadamente 50 mL de agua a un matraz volumétrico de 100 mL con tapón. Tarar el matraz tapado en una balanza analítica hasta que no haya una variación importante en la lectura. Agregar cuidadosamente 670 µL de ácido trifluoroacético al matraz, tapar inmediatamente y pesar. Diluir a volumen con agua.

Soluciones estándar—Pesar con exactitud 150, 75 y 10 mg de acetato de sodio trihidrato en sendos matraces volumétricos de 100 mL. Agregar a los matraces 10 mL, 2 mL y 100 µL, respectivamente, de la *Solución madre de ácido trifluoroacético* y diluir cada uno con *Diluyente* hasta la marca de 100 mL. Calcular la concentración, en mg por mL, de ácido acético en cada *Solución estándar* usando la siguiente ecuación:

$$0,00434W_A$$

en donde W_A es el peso, en mg, de acetato de sodio trihidrato tomado. Calcular la concentración, en mg por mL, de ácido trifluoroacético en cada *Solución estándar* usando la siguiente ecuación:

$$0,0001(W_T/V)$$

en donde W_T es el peso, en mg, de ácido trifluoroacético usado para la preparación de la *Solución madre de ácido trifluoroacético*; y V es el volumen, en mL, de *Solución madre de ácido trifluoroacético* usado para preparar la *Solución estándar*.

Solución de prueba—Preparar muestras por duplicado pesando con exactitud dos alícuotas de aproximadamente 4,0 mg de Acetato de Gonadorelina y disolviendo cada una en 1 mL de *Diluyente*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 210 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es aproximadamente 1,5 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A %	Solución B %	Elución
0–5	100	0	isocrática
5–6	100→0	0→100	lineal
6–14	0	100	isocrática
14–15	0→100	100→0	volver al valor inicial
15–25	100	0	reequilibrio

Inyectar en el cromatógrafo las *Soluciones estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 2000 platos teóricos para el pico del ácido trifluoroacético y no es menos de 10 000 para el pico del ácido acético; y la desviación estándar relativa para seis inyecciones repetidas de la *Solución estándar* más concentrada no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por duplicado volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de cada una de las *Soluciones estándar* seguido de las *Soluciones de prueba* duplicadas. Graficar las áreas de los picos de cada uno de los componentes de las *Soluciones estándar* en función de la concentración, en mg por mL y determinar la línea de regresión por el método de mínimos cuadrados. La prueba se considera válida si las curvas de regresión para el ácido acético y el ácido trifluoroacético tienen un cuadrado del coeficiente de correlación, r^2 , no menor de 0,995. A partir de la gráfica resultante, determinar los porcentajes de ácido acético y ácido trifluoroacético en la *Solución de prueba*: se encuentra entre 8% y 12,5% de ácido acético y no se encuentra más de 0,25% de ácido trifluoroacético.

Compuestos relacionados—

Solución estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Acetato de Gonadorelina USP en agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL.

Solución de aptitud del sistema—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Acetato de Gonadorelina USP en agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL. Mezclar volúmenes iguales de esta solución y de la *Solución estándar*.

Solución de prueba—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de Acetato de Gonadorelina en agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL.

SISTEMA 1—

Disolvente 1—Mezclar 1 mL de ácido trifluoroacético con 1 L de agua. Pasar a través de un filtro de 0,45 µm y desgasificar.

Disolvente 2—Mezclar 1 mL de ácido trifluoroacético con 1 L de acetonitrilo.

Solución A—Preparar una mezcla de *Disolvente 1* y *Disolvente 2* (95 : 5).

Solución B—Preparar una mezcla de *Disolvente 2* y *Disolvente 1* (60 : 40).

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un HPLC con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es aproximadamente 1,5 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0	91	9	inicial
0–25	91→45	9→55	lineal
25	45→91	55→9	volver al valor inicial
25–30	91	9	reequilibrio

SISTEMA 2—

Fase móvil—Agregar 47 mL de ácido fosfórico y 55 mL de trietilamina a 4 L de agua, y ajustar con ácido fosfórico o trietilamina a un pH de 2,5, según corresponda. Pasar a través de un filtro de 0,45 µm y desgasificar. Agregar acetonitrilo para obtener una concentración de acetonitrilo de 13% (v/v).

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un HPLC con un detector a 215 nm y una columna de 4,6 mm × 10 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es aproximadamente 1,5 mL por minuto usando elución isocrática y con un tiempo de corrida de 50 minutos.

Usando el *Sistema 1* y el *Sistema 2* inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en el *Procedimiento*. La *Solución estándar* se usa sólo para identificar el pico de acetato de gonadorelina. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre acetato de gonadorelina y el compuesto relacionado A de acetato de gonadorelina no es menor de 2,0; la eficiencia de la columna no es menos de 75 000 platos teóricos para el *Sistema 1* y no es menos de 3000 platos teóricos para el *Sistema 2*; el factor de asimetría no es mayor de 2,0 para el *Sistema 1* ni para el *Sistema 2*; y la desviación estándar relativa para cinco inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar*, de la *Solución de aptitud del sistema* y de la *Solución de prueba*, seguido de una co-inyección de la *Solución de prueba* con la *Solución estándar*, en el *Sistema 1* y en el *Sistema 2*. Incluir inyecciones de un blanco entre las diferentes soluciones. Integrar todos los picos para obtener una línea base similar a la de los cromatogramas del blanco, descartando cualquier pico debido al disolvente, el contra-ión y los artefactos en la línea base. Usando las áreas de los picos e incluyendo todos los picos de más de 0,05%, calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Acetato de Gonadorelina tomada: no se encuentra más de 1% de cualquier impureza individual y no se encuentra más de 2% de impurezas totales.

Análisis de aminoácidos—Proceder según se indica en la *Valoración*. Expresar el contenido de cada aminoácido en µmoles y calcular el número total de µmoles de Acetato de Gonadorelina en la muestra de prueba según se indica en la *Valoración*. Dividiendo el número de µmoles de cada aminoácido por el número total de µmoles de Acetato de Gonadorelina en la muestra de prueba, se encuentran las proporciones relativas de aminoácidos: serina, de 0,7 a 1,05; ácido glutámico, de 0,95 a 1,05; prolina, de 0,95 a 1,05; glicina, de 1,9 a 2,1; leucina, de 0,9 a 1,1; tirosina, de 0,7 a 1,05; histidina, de 0,95 a 1,05; y arginina, de 0,95 a 1,05. La isoleucina y la lisina están ausentes; no se detectan más que trazas de otros aminoácidos excepto triptófano.

Valoración—(ver *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos* (1052)). [NOTA—El siguiente método se proporciona con fines informativos; se puede usar cualquier método de análisis de aminoácidos validado.]

Estandarizar el instrumento con una mezcla que contenga las mismas cantidades molares por volumen (excepto de L-cistina que estará en la mitad de la cantidad molar) de glicina y de la forma L de los siguientes aminoácidos: lisina, treonina, alanina, leucina, histidina, serina, valina, tirosina, arginina, ácido glutámico, metionina, fenilalanina, ácido aspártico, prolina, isoleucina, triptófano y cistina.

Preparación de valoración (ver *Hidrólisis de Proteínas, Método 1* (1052))—Pesar con exactitud entre 0,4 y 1,0 mg de Acetato de Gonadorelina en ampollas de vidrio. Agregar un mínimo de 1,0 mL de *Solución de Hidrólisis* que contenga 4% de fenol, congelar la ampolla de muestra y sellar a la llama al vacío. Hidrolizar a 110° durante aproximadamente 22 horas. Después de la hidrólisis, secar la muestra de prueba al vacío para eliminar cualquier ácido residual. Agregar a la ampolla 2 mL de una solución amortiguadora adecuada para el analizador de aminoácidos y pasar a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm.

Procedimiento—Preparar una co-inyección de la *Solución estándar* y la muestra de prueba. Inyectar un volumen adecuado en el analizador de aminoácidos y registrar y medir las respuestas de los picos de cada aminoácido. Expresar el contenido de cada aminoácido en µmoles. El número total de µmoles de acetato de gonadorelina en la muestra de prueba se calcula sumando el número de µmoles de

ácido glutámico, prolina, glicina, leucina, tirosina, histidina y arginina y dividiendo por ocho. Calcular el porcentaje de $C_{55}H_{75}N_{17}O_{13}$ en la porción de Acetato de Gonadorelina tomada, por la fórmula:

$$118,23(N/W)$$

en donde *N* es el número total de μ moles de acetato de gonadorelina; y *W* es el peso de la muestra en mg. ■1S (USP30)

Bitartrato de Hidrocodona

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—*ER Bitartrato de Dihidrocodeína USP. ER Bitartrato de Hidrocodona USP.* ■ER Compuesto Relacionado A de Bitartrato de Hidrocodona USP. ■1S (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■Impurezas comunes (466)—

Solución de prueba: una mezcla de metanol y agua (1 : 1).

Solución estándar: una mezcla de metanol y agua (1 : 1).

Fase móvil: una mezcla de hexanos, acetona, metanol e hidróxido de amonio (60 : 40 : 20 : 1,5).

Visualización: 3, seguida de un rociado con peróxido de hidrógeno SR. [NOTA—Cubrir la placa para cromatografía en capa delgada con una placa de vidrio para reducir la velocidad de desaparición de las manchas. Excluir la mancha del origen, si estuviera presente, de la determinación de las impurezas totales.] ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Bitartrato de Hidrocodona y Metilbromuro de Homatropina, Tabletas

» Las Tabletas de Bitartrato de Hidrocodona y Metilbromuro de Homatropina contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de bitartrato de hidrocodona disesquihidrato ($C_{18}H_{21}NO_3 \cdot C_4H_6O_6 \cdot 2\frac{1}{2} H_2O$) y de metilbromuro de homatropina ($C_{17}H_{24}BrNO_3$).

NOTA—Se requiere el uso de viales silanizados para muestreadores automáticos, como los viales tratados con dimetildiclorosilano,* para la prueba de *Disolución*, las pruebas de *Límite* y la *Valoración* para evitar la degradación de los fármacos.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables y resistentes a la luz.

* Se puede obtener un grado adecuado de Analytical Research and Testing, Somerville, NJ; Fax: 908-725-8848.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Bitartrato de Dihidrocodeína USP. ER Metilbromuro de Homatropina USP. ER Bitartrato de Hidrocodona USP.*

Identificación—

A: *Prueba de Identificación por Cromatografía en Capa Delgada* (201)—

Solución A—Disolver 850 mg de subnitrito de bismuto en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua.

Solución B—Disolver 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua.

Solución madre: una mezcla de *Solución A* y *Solución B* (1 : 1).

Disolvente: una mezcla de metanol y agua (9 : 1).

Reactivo para rociado 1—[NOTA—Preparar inmediatamente antes de usar.] Preparar una mezcla de agua, ácido acético glacial y *Solución madre* (50 : 10 : 5).

Reactivo para rociado 2: peróxido de hidrógeno SR.

Solución estándar 1—Transferir una cantidad, pesada con exactitud, de aproximadamente 30 mg de ER Metilbromuro de Homatropina USP a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Disolvente*, y mezclar.

Solución estándar 2—Transferir una cantidad, pesada con exactitud, de aproximadamente 25 mg de ER Bitartrato de Hidrocodona USP a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y diluir a volumen con *Disolvente*, y mezclar.

Solución de prueba—Transferir una porción de 20 Tabletas reducidas a polvo fino, equivalente al peso promedio de las Tabletas, a un tubo de centrifuga, agregar 5,0 mL de *Disolvente*, centrifugar y usar el sobrenadante.

Fase móvil: una mezcla de acetato de etilo, agua y ácido fórmico (134 : 33 : 33).

Procedimiento—Aplicar 50 μ L de *Solución estándar 1*, *Solución estándar 2* y *Solución de prueba*, y proceder según se indica en el capítulo. Retirar la placa y secar a 105°. Rocíar la placa con *Reactivo para rociado 1* y después con *Reactivo para rociado 2*: los valores *R_F* de las manchas principales en el cromatograma de la *Solución de prueba* se corresponden con los de las *Soluciones estándar*.

B: Los tiempos de retención de los picos principales en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponden con los del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

Límite de bitartrato de dihidrocodeína, hidrocodona diol y sustancias relacionadas—

Solución de par iónico—Preparar 1-octanosulfonato de sodio 0,005 M y ajustar con ácido acético glacial a un pH de $2,5 \pm 0,1$.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución de par iónico* y metanol (6 : 4). Agregar 0,5 mL de trietilamina por L. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Disolver aproximadamente 2 mg de hidrocodona diol y de ER Bitartrato de Dihidrocodeína USP en 35 mL de *Fase móvil* en un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con *Fase móvil*. Diluir cuantitativamente esta solución, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 μ g por mL de cada uno.

Solución estándar—Usar la *Preparación estándar*, preparada según se indica en la *Valoración*.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 280 nm y una columna de 4,6 mm \times 25 cm rellena con material L7 de 5 μ m. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,67 para hidrocodona diol, 0,75 para bitartrato de dihidrocodeína y 1,0 para bitartrato de hidrocodona; la resolución, *R*, entre hidrocodona diol y bitartrato de dihidrocodeína no es menor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de cada uno de estos compuestos no es más de 5,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 200 μ L) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las

áreas de los picos. Calcular los porcentajes de hidrocodona diol y de bitartrato de dihidrocodeína en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(r_D/r_S)$$

en donde r_D es la respuesta del pico individual de hidrocodona diol o de dihidrocodeína en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y r_S es la respuesta del pico de bitartrato de hidrocodona en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*: no se encuentra más de 0,5% de hidrocodona diol y no se encuentra más de 1,0% de bitartrato de dihidrocodeína. Calcular el porcentaje de las sustancias relacionadas de cada uno en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_S)$$

en donde r_i es la respuesta del pico para cualquier sustancia relacionada individual con un tiempo de retención mayor de 5 minutos; y r_S es la suma de las respuestas de todos los picos: no se encuentra más de 0,5% de cualquier sustancia relacionada individual. La suma de todas las impurezas no es más de 1,5%.

Límite de bromhidrato de homatropina y sustancias relacionadas—

Solución amortiguadora—Preparar una solución de fosfato dibásico de potasio 0,005 M y ajustar con ácido fosfórico a un pH de $6,4 \pm 0,1$.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (17:3). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad, pesada con exactitud, de bromhidrato de homatropina y diluir cuantitativamente con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,6 µg por mL.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 210 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L7 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 5,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de bromhidrato de homatropina en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(r_H/r_S)$$

en donde r_H es la respuesta del pico individual de bromhidrato de homatropina en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y r_S es la respuesta del pico para metilbromuro de homatropina en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*: no se encuentra más de 0,5% de bromhidrato de homatropina. Calcular el porcentaje de las sustancias relacionadas de cada uno en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_S)$$

en donde r_i es la respuesta del pico para cualquier sustancia relacionada individual con un tiempo de retención relativo menor de 0,44 en relación con el tiempo de retención del bitartrato de hidrocodona; y r_S es la suma de las respuestas de todos los picos: no se encuentra más de 0,5% de cualquier sustancia relacionada individual. La suma de todas las impurezas no es más de 1,5%.

Límite de tropina—

Adsorbente: capa de gel de sílice para cromatografía de 0,25 mm de espesor.

Diluyente: éter dietílico.

Solución de prueba—Reducir a polvo fino 25 Tabletas y agregar a un tubo de centrifuga. Pipetear 5,0 mL de éter dietílico y transferir al tubo de centrifuga, mezclar en un mezclador por vórtice durante 5 minutos, centrifugar y usar el sobrenadante.

Solución madre del estándar—Disolver en *Diluyente* una cantidad, pesada con exactitud, de tropina y diluir cuantitativamente con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 150 µg por mL.

Soluciones estándar—Transferir 5,0 mL de la *Solución madre del estándar* a un matraz volumétrico de 10 mL y diluir a volumen cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Diluyente* para obtener *Soluciones estándar A, B, C y D* con concentraciones conocidas de aproximadamente 75 µg por mL, 37,5 µg por mL, 18,75 µg por mL y 9,38 µg por mL, respectivamente.

Reactivo para rociado—Disolver 300 mg de ácido platinico en 3 mL de ácido clorhídrico diluido, agregar 97 mL de agua y 100 mL de yoduro de potasio al 6% en agua, y mezclar.

Fase móvil: una mezcla de alcohol e hidróxido de amonio (400:100).

Procedimiento—Aplicar volúmenes iguales (aproximadamente 500 µL) de la *Solución madre del estándar*, de *Soluciones estándar A, B, C y D*, y de la *Solución de prueba* a una placa para cromatografía en capa delgada (ver *Cromatografía* (621)), y proceder según se indica en el capítulo. Después de que la placa se haya secado, colocarla en una cámara saturada con vapor de yodo durante aproximadamente 30 minutos, después colocarla en una campana para permitir que el yodo sublime de la placa y rociar la placa con *Reactivo para rociado* hasta que aparezcan las manchas. Cualquier mancha de la *Solución de prueba* que aparezca a un valor R_F correspondiente a tropina no es mayor en tamaño ni en intensidad que la mancha correspondiente obtenida a partir de la *Solución estándar B* (0,5%): no se encuentra más de 0,5% de tropina.

Valoración—

Solución amortiguadora—Preparar una solución de fosfato dibásico de potasio 0,005 M y ajustar con ácido fosfórico a un pH de $6,4 \pm 0,01$.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (17:3).

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Bitartrato de Hidrocodona USP y ER Metilbromuro de Homatropina USP y diluir cuantitativamente con *Fase móvil* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,2 mg por mL y 0,06 mg por mL, respectivamente.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, a un matraz volumétrico de 25 mL equivalente aproximadamente a 5 mg de bitartrato de hidrocodona y 1,5 mg de metilbromuro de homatropina. Pipetear 15 mL de la *Fase móvil* y transferir al matraz volumétrico, someter a ultrasonido durante 15 minutos y después agitar con agitador de movimiento tipo muñeca (wrist-action) durante 15 minutos adicionales. Pipetear otros 10 mL de *Fase móvil* y transferir al matraz volumétrico y mezclar. Pasar esta solución a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm antes de inyectarla en el cromatógrafo.

Sistema cromatográfico—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 230 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L7 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,44 para metilbromuro de homatropina y 1,0 para bitartrato de hidrocodona; la resolución, R , entre bitartrato de hidrocodona y metilbromuro de homatropina no es menor de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 3,0% para cada analito.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de metilbromuro de homatropina ($C_{17}H_{24}BrNO_3$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$(LC_S/C_U)(r_U/r_S)$$

en donde L es la cantidad declarada, en mg, de metilbromuro de homatropina en cada Tableta; C_S es la concentración, en mg por mL, de ER Metilbromuro de Homatropina USP en la *Preparación estándar*; C_U es la concentración, en mg por mL, de metilbromuro de homatropina en la *Preparación de valoración*, basada en la cantidad declarada por Tableta y el grado de dilución; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de metilbromuro de homatropina obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. Calcular la cantidad, en mg, de bitartrato de

hidrocodona disesquihidrato ($C_{18}H_{21}NO_3 \cdot C_4H_6O_6 \cdot 2\frac{1}{2} H_2O$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$(494,50/449,46)(LC_s/C_u)(r_u/r_s)$$

en donde 494,50 y 449,46 son los pesos moleculares de bitartrato de hidrocodona disesquihidrato y bitartrato de hidrocodona anhidro, respectivamente; L es la cantidad declarada, en mg, de bitartrato de hidrocodona disesquihidrato en cada Tableta; C_s es la concentración, en mg por mL, de ER Bitartrato de Hidrocodona USP en la *Preparación estándar*; C_u es la concentración, en mg por mL, de bitartrato de hidrocodona disesquihidrato en la *Preparación de valoración*, basada en la cantidad declarada por Tableta y el grado de dilución; y r_u y r_s son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Ibuprofeno

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—*ER Ibuprofeno USP*. ■_{ER} *Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP*. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Límite de ■compuesto relacionado C de ibuprofeno—■_{1S} (USP30) Usando los cromatogramas de la *Preparación de valoración* y la *Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno*; ■_{1S} (USP30) obtenidos según se indica en la *Valoración*, calcular el porcentaje de ■compuesto relacionado C de ibuprofeno ■_{1S} (USP30) ($C_{12}H_{16}O$) en la porción de Ibuprofeno tomada, por la fórmula:

$$10\,000\,(C/W)(R_u/R_s)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ■ER Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP ■_{1S} (USP30) en la *Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno*; ■_{1S} (USP30) W es el peso, en mg, del Ibuprofeno tomado para preparar la *Preparación de valoración*; y R_u y R_s son los cocientes de las respuestas entre los picos del ■compuesto relacionado C de ibuprofeno ■_{1S} (USP30) y de la valerofenona, obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno*, ■_{1S} (USP30) respectivamente; no se encuentra más de 0,1%.

Cambio en la redacción:

Valoración—

Fase móvil—Disolver 4,0 g de ácido cloroacético en 400 mL de agua y ajustar con hidróxido de amonio a un pH de 3,0. Agregar 600 mL de acetonitrilo, filtrar y desgasificar. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de estándar interno—Preparar una solución de valerofenona en *Fase móvil* con una concentración de aproximadamente 0,35 mg por mL.

Preparación estándar—Disolver en la *Solución de estándar interno* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Ibuprofeno USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 12 mg por mL.

■**Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno**—■_{1S} (USP30) Disolver cuantitativamente en acetonitrilo una cantidad, pesada con exactitud, de ■ER Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP ■_{1S} (USP30) para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,6 mg por mL. Agregar 2,0 mL de esta solución madre a 100,0 mL de *Solución*

de estándar interno y mezclar para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,012 mg de ■compuesto relacionado C de ibuprofeno ■_{1S} (USP30) por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 1200 mg de Ibuprofeno, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con la *Solución de estándar interno* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son de aproximadamente 1,4 para el estándar interno y 1,0 para el ibuprofeno; la resolución, R , entre ibuprofeno y el estándar interno no es menor de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno*, ■_{1S} (USP30) y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,0 para la valerofenona y 1,2 para el ■compuesto relacionado C de ibuprofeno; ■_{1S} (USP30) la resolución, R , entre el pico de la valerofenona y el del ■compuesto relacionado C de ibuprofeno ■_{1S} (USP30) no es menor de 2,5; los factores de asimetría para los picos individuales no son mayores de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µL) de la *Preparación estándar*, de la *Preparación de valoración* y de la *Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno* ■_{1S} (USP30), registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{13}H_{18}O_2$ en la porción de Ibuprofeno tomada, por la fórmula:

$$100C(R_u/R_s)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Ibuprofeno USP en la *Preparación estándar*; y R_u y R_s son los cocientes de respuesta obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Ibuprofeno, Suspensión Oral

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—*ER Ibuprofeno USP*. ■_{ER} *Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP*. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Límite de ■compuesto relacionado C de ibuprofeno—■_{1S} (USP30)

Fase móvil y Diluyente—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Disolver cuantitativamente una cantidad, pesada con exactitud, de ■ER Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP ■_{1S} (USP30) en acetonitrilo para obtener una solución madre con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL. Transferir 3,0 mL de esta solución madre a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 2,0 mL de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 50 mL, agregar 18 mL de *Diluyente*, diluir a volumen con acetonitrilo, mezclar y pasar a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm. Esta *Solución estándar* contiene aproximadamente 0,0012 mg del ■compuesto relacionado C de ibuprofeno ■_{1S} (USP30) por mL.

Solución de prueba—Transferir 20,0 mL de la porción de solución madre reservada de la *Preparación de valoración* en la *Valoración* a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con acetonitrilo, mezclar y pasar a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μm .

Solución de aptitud del sistema—Transferir 1,5 mL de la solución madre de ■ER Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP_{■IS (USP30)} preparada según se indica en la *Solución estándar* y 9 mL de la solución madre de ER Ibuprofeno USP preparada según se indica en la *Preparación estándar* en la *Valoración* a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir a volumen con acetonitrilo, mezclar y pasar a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μm . Esta solución contiene aproximadamente 0,03 mg del ■compuesto relacionado C de ibuprofeno_{■IS (USP30)} y aproximadamente 0,4 mg de ibuprofeno por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm \times 15 cm rellena con material L7 de 5 μm . La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,3 para ■compuesto relacionado C de ibuprofeno_{■IS (USP30)} y 1,0 para ibuprofeno; la resolución, R , entre ibuprofeno y el ■compuesto relacionado C de ibuprofeno_{■IS (USP30)} no es menor de 1,5; el factor de asimetría no es mayor de 2,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 35 μL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos principales. Calcular el porcentaje del ■compuesto relacionado C de ibuprofeno_{■IS (USP30)} en la Suspensión Oral tomada, basado en el contenido de ibuprofeno declarado, por la fórmula:

$$(12\,500C/DL)(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ■ER Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP_{■IS (USP30)} en la *Solución estándar*; D es la cantidad, en mL, de Suspensión Oral tomada para preparar la solución madre para la *Preparación de valoración*; L es la cantidad declarada, en mg, de ibuprofeno en cada mL de Suspensión Oral; y r_U y r_S son las áreas de los picos del ■compuesto relacionado C de ibuprofeno_{■IS (USP30)} obtenidas a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente. No se encuentra más de 0,25%.

Cambio en la redacción:

Valoración—

Fase móvil—Diluir 0,7 mL de ácido fosfórico con agua para obtener 1000 mL de ácido fosfórico 0,01 M. Preparar una mezcla de esta solución y acetonitrilo (63 : 37). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de acetonitrilo y agua (1 : 1).

Solución de estándar interno—Preparar una solución de benzo-fenona en acetonitrilo que contenga aproximadamente 3,2 mg por mL.

Preparación estándar—Disolver cuantitativamente una cantidad, pesada con exactitud, de ER Ibuprofeno USP en *Diluyente* para obtener una solución madre con una concentración conocida de aproximadamente 1,2 mg por mL. Transferir 20,0 mL de esta solución madre y 5,0 mL de *Solución de estándar interno* a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con acetonitrilo, mezclar y filtrar. Esta solución contiene aproximadamente 0,48 mg de ibuprofeno por mL.

Densidad—En un matraz volumétrico tarado de 50 mL, pesar 50 mL de Suspensión Oral que haya sido bien agitada previamente para garantizar la homogeneidad, dejar en reposo hasta que el aire atrapado suba y, finalmente, invertir con cuidado antes de la transferencia al matraz volumétrico. A partir del peso observado de 50 mL de Suspensión Oral, calcular la densidad, en g por mL, de la Suspensión Oral.

Preparación de valoración—Transferir una porción de Suspensión Oral, pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 60 mg de ibuprofeno, a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar (solución madre). Transferir 20,0 mL de esta solución madre y 5,0 mL de la *Solución de estándar interno* a un segundo matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con acetonitrilo, mezclar y filtrar. [NOTA—Reservar una porción de la solución madre para usar en la prueba del ■*Límite de compuesto relacionado C de ibuprofeno*._{■IS (USP30)}.]

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm \times 15 cm rellena con material L7 de 5 μm . La velocidad de flujo es aproximadamente de 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,9 para benzofenona y 1,0 para ibuprofeno; la resolución, R , entre benzofenona y ibuprofeno no es menor de 1,5; el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 μL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas correspondientes a los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_2$ en cada mL de la Suspensión Oral tomada, por la fórmula:

$$125C(D/W_U)(R_U/R_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Ibuprofeno USP en la *Preparación estándar*; D es la densidad, en g por mL, de Suspensión Oral; W_U es el peso, en g, de la porción de Suspensión Oral tomada para preparar la *Preparación de valoración*; y R_U y R_S son los cocientes de las áreas entre los picos de ibuprofeno y de la benzofenona obtenidas de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Ibuprofeno, Tabletas

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—ER Ibuprofeno USP. ■ER Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP_{■IS (USP30)}

Cambio en la redacción:

Límite de ■compuesto relacionado C de ibuprofeno—_{■IS (USP30)} Usando los cromatogramas de la *Preparación de valoración* y la ■*Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno*_{■IS (USP30)} obtenidos según se indica en la *Valoración*, calcular el porcentaje de ■compuesto relacionado C de ibuprofeno_{■IS (USP30)} ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}$) en las Tabletas tomadas, por la fórmula:

$$10\,000C(A/W_I)(R_U/R_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ■ER Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP_{■IS (USP30)} en la ■*Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno*_{■IS (USP30)} A es el peso promedio, en mg, de una Tableta; W es el peso del polvo de las Tabletas tomado para preparar la *Preparación de valoración*; I es la cantidad, en mg, de ibuprofeno por Tableta según lo obtenido en la *Valoración*; y R_U y R_S son los cocientes de respuesta entre los picos del ■compuesto relacionado C de ibuprofeno_{■IS (USP30)} y de la valerofenona obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente: no se encuentra más de 0,1% por Tableta.

Cambio en la redacción:**Valoración—**

Fase móvil, Solución de estándar interno y Preparación estándar—Preparar según se indica en *Valoración en Ibuprofeno*.

■*Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno*—^{1S} (USP30) Disolver cuantitativamente una cantidad, pesada con exactitud, de ■ER Compuesto Relacionado C de Ibuprofeno USP^{1S} (USP30) en acetonitrilo para obtener una solución ■madre^{1S} (USP30) con una concentración conocida de aproximadamente 0,6 mg por mL. Agregar 2,0 mL de esta solución madre a ■100 mL de *Solución de estándar interno* y mezclar.^{1S} (USP30)

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente a 1200 mg de ibuprofeno, a un recipiente adecuado, agregar 100,0 mL de *Solución de estándar interno* y agitar durante 10 minutos. [NOTA—En el caso de Tabletas recubiertas, colocar un número de Tabletas, contado con exactitud, equivalente a no menos de 1200 mg de ibuprofeno, en un recipiente; agregar un volumen, medido con exactitud, de *Solución de estándar interno* suficiente para obtener una *Preparación de valoración* que contenga aproximadamente 12 mg de ibuprofeno por mL y aproximadamente 15 perlas de vidrio, y agitar hasta la desintegración total de las Tabletas.] Centrifugar una porción de la suspensión así obtenida y usar el sobrenadante transparente como *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,75 para ibuprofeno y 1,0 para valerofenona; la resolución, *R*, entre ibuprofeno y valerofenona no es menor de 2,5; los factores de asimetría para los picos individuales no son mayores de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. Inyectar en el cromatógrafo la ■*Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno*^{1S} (USP30) y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,0 para valerofenona y 1,2 para el ■compuesto relacionado C de ibuprofeno;^{1S} (USP30) la resolución, *R*, entre valerofenona y el ■compuesto relacionado C de ibuprofeno^{1S} (USP30) no es menor de 2,5; los factores de asimetría para los picos individuales no son mayores de 2,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µL) de la *Preparación estándar*, de la *Preparación de valoración* y de la ■*Solución estándar de compuesto relacionado C de ibuprofeno*^{1S} (USP30) registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de ibuprofeno (C₁₃H₁₈O₂) en cada Tableta tomada, por la fórmula:

$$100C(A/W)(R_U/R_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Ibuprofeno USP en la *Preparación estándar*; *A* es el peso promedio, en mg, de una Tableta; *W* es el peso, en mg, del polvo de las Tabletas tomado para preparar la *Preparación de valoración*; y *R_U* y *R_S* son los cocientes de respuesta entre los picos de ibuprofeno y valerofenona, obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente; o en el caso de tomar Tabletas intactas, calcular la cantidad, en mg, de C₁₃H₁₈O₂ en cada Tableta tomada, por la fórmula:

$$(CV/N)(R_U/R_S)$$

en donde *V* es el volumen, en mL, de *Solución de estándar interno* usado para preparar la *Preparación de valoración*; *N* es el número de Tabletas tomadas; y los otros términos son los definidos anteriormente.

Sulfato de Indinavir**Eliminar lo siguiente:**

■**Metales pesados, Método I** (231): 0,001%.^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■**Metales pesados** (231)—

Solución estándar—Pipetear y transferir 2 mL de *Solución Estándar de Plomo* (10 µg por mL) a un tubo para comparación de color de 50 mL y diluir con agua hasta 25 mL. Utilizando un medidor de pH o un papel indicador de pH de intervalo corto como indicador externo, ajustar con ácido acético 1 N o hidróxido de amonio 6 N a un pH entre 3,0 y 4,0, diluir con agua hasta 40 mL y mezclar.

Solución de prueba—Disolver 2,0 g de Sulfato de Indinavir en 25 mL de agua en un tubo para comparación de color de 50 mL. Utilizando un medidor de pH o un papel indicador de pH de intervalo corto como indicador externo, ajustar con ácido acético 1 N o hidróxido de amonio 6 N a un pH entre 3,0 y 4,0, diluir con agua hasta 40 mL y mezclar.

Solución blanco—Agregar 25 mL de agua a un tubo para comparación de color de 50 mL. Utilizando un medidor de pH o un papel indicador de pH de intervalo corto como indicador externo, ajustar con ácido acético 1 N o hidróxido de amonio 6 N a un pH entre 3,0 y 4,0, diluir con agua hasta 40 mL y mezclar.

Procedimiento—Agregar 10 mL de sulfuro de hidrógeno SR a cada tubo, mezclar, dejar en reposo durante 5 minutos, y observar hacia abajo sobre una superficie blanca: el color de la *Solución de prueba* no es más oscuro que el de la *Solución estándar*. La intensidad del color de la *Solución blanco* es menor o igual a la intensidad del color de la *Solución de prueba*.^{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:**Pureza cromatográfica—**

Solución A—Disolver 0,54 g de fosfato monobásico de potasio y 2,79 g de fosfato dibásico de potasio en 2 L de agua.

Solución B— Usar acetonitrilo.

Diluyente—Preparar una mezcla de *Solución A* y *Solución B* (1:1).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B*, según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 40 mg de ER Aptitud del Sistema de Indinavir USP a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 50 mg de Sulfato de Indinavir, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0–40	80→30	20→70	gradiente lineal
40–45	30	70	isocrática
45–47	30→80	70→20	gradiente lineal
47–52	80	20	isocrática

Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*:
■^{1S} (USP30) la resolución, *R*, entre indinavir y el compuesto

relacionado C es mayor de 1,8; y el factor de asimetría, determinado a partir del pico de indinavir, es mayor de 0,95 y menor de 2,0.

■ 1S (USP30)

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 20 µL de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Sulfato de Indinavir tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es el área de pico para cada impureza; y r_s es la suma de las respuestas de todos los picos: no se encuentra más de 0,1% de cualquier impureza individual especificada en la *Tabla 1*, ni más de 0,5% de impurezas totales.

■ **Tabla 1**

Compuesto Relacionado de Indinavir	Tiempo de Retención Relativo Aproximado
A	0,18
B	0,80
C	0,98
D	1,14
E	1,30

■ 1S (USP30)

Cambio en la redacción:

Valoración—

Solución amortiguadora de fosfato de dibutilamonio—Transferir 20 mL de fosfato de dibutilamonio a 1000 mL de agua. Mientras se mezcla, ajustar con hidróxido de sodio SR a un pH de 6,5 ± 0,5. ■ 1S (USP30)

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora de fosfato de dibutilamonio* y acetonitrilo (11 : 9). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad adecuada de ER Indinavir USP, pesada con exactitud, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 60 mg de Sulfato de Indinavir, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 260 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L7 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 40°. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menor de 4000 platos teóricos, el factor de asimetría es menor de 2,0 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{36}H_{47}N_5O_4 \cdot H_2SO_4$ en la porción de Sulfato de Indinavir tomada, por la fórmula:

$$(1,1598)DC(r_U/r_S)$$

en donde D es el factor de dilución, en mL, para la *Preparación de valoración*; C es la concentración, en mg por mL, de ER Indinavir USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente. [NOTA—1,1598 = PM del Sulfato de Indinavir (711,87 g/mol)/PM del Indinavir (613,80 g/mol).]

Verde de Indocianina

Cambio en la redacción:

» El Verde de Indocianina contiene no menos de •89,0₅ por ciento y no más de •100,0₅ por ciento de $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$, calculado con respecto a la sustancia seca. Contiene no más de 5,0 por ciento de yoduro de sodio, calculado con respecto a la sustancia seca.

Agregar lo siguiente:

■ Suspensión de Insulina Humana Isófana e Inyección de Insulina Humana

» La Suspensión de Insulina Humana Isófana e Inyección de Insulina Humana es una suspensión amortiguada estéril de Insulina Humana, complejada con Sulfato de Protamina, en una solución de Insulina Humana. Su potencia, basada en la suma de los componentes insulina y desamido insulina, según se determina en la *Valoración*, no es menos de 95,0 por ciento y no es más de 105,0 por ciento de la potencia declarada en la etiqueta, expresada en Unidades USP de Insulina Humana por cada mL.

Envasado y almacenamiento—Conservar en el envase multidosis, sin abrir, provisto por el fabricante. Almacenar en un refrigerador, proteger de la luz solar y evitar su congelación.

Etiquetado—La etiqueta del envase de la Inyección indica que la Inyección se debe resuspender adecuadamente antes de su uso. Etiquetar indicando que se ha preparado con Insulina Humana de origen semisintético (es decir, obtenida por modificación enzimática de insulina de páncreas porcino) o con Insulina Humana de origen ADN recombinante (es decir, obtenida por síntesis microbiana), según corresponda. Etiquetar especificando que debe almacenarse en un refrigerador y que debe evitarse la congelación. La etiqueta indica la potencia en Unidades USP de Insulina Humana por mL y la relación porcentual entre la suspensión de insulina humana isófana y la inyección de insulina humana soluble.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Endotoxina USP*. *ER Insulina Humana USP*.

Identificación—El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Endotoxinas bacterianas (85)—No contiene más de 80 Unidades USP de Endotoxinas por cada 100 Unidades USP de Insulina Humana.

Esterilidad (71)—Cumple con los requisitos de la prueba de *Esterilidad en Insulina Isófana, Suspensión*.

pH (791): entre 7,0 y 7,8, determinado potenciométricamente.

Determinación de cinc (591): entre 0,02 mg y 0,04 mg por cada 100 Unidades USP de Insulina Humana.

Límite de proteínas de alto peso molecular—Proceder según se indica en la prueba para *Límite de proteínas de alto peso molecular* en *Insulina*, *Inyección*: no se encuentra más de 3,0%.

Contenido de insulina humana soluble—[NOTA—Usar uno de los dos métodos indicados a continuación.]

MÉTODO 1—

Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en *Valoración en Insulina*.

Solución de prueba de insulina soluble—Mantener la temperatura a $25 \pm 1^\circ$ durante todo el procedimiento. Transferir 5,0 mL de la *Inyección* a un tubo de centrifuga. Agregar 20 μ L de hidróxido de sodio 1 N y ajustar con ácido clorhídrico 0,05 N o hidróxido de sodio 0,05 N a un pH de $8,20 \pm 0,02$ si la concentración total de cinc es de aproximadamente 20 μ g por mL o ajustar a un pH de $8,35 \pm 0,02$ si la concentración total de cinc es de aproximadamente 30 μ g por mL. Registrar el volumen, en μ L, de ácido o base necesario para ajustar el pH. Mezclar y dejar en reposo durante 1 hora. Centrifugar, transferir el sobrenadante a otro tubo de centrifuga y repetir la centrifugación. Transferir 2 mL del sobrenadante a otro tubo, agregar 5 μ L de ácido clorhídrico 9,6 N y mezclar.

Solución de prueba de insulina total—Transferir 2 mL de *Inyección* a un recipiente adecuado, agregar 5 μ L de ácido clorhídrico 9,6 N y dejar que la suspensión clarifique. Diluir la solución resultante con ácido clorhídrico 0,01 N a la misma concentración teórica de insulina de la *Solución de prueba de insulina soluble* (por ejemplo, si se declara que la *Inyección* contiene 20% de insulina soluble, el factor de dilución es $100/20 = 5$).

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ L) de la *Solución de prueba de insulina soluble* y de la *Solución de prueba de insulina total*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de insulina y desamido insulina A-21. Calcular la cantidad de insulina humana soluble como un porcentaje del contenido total de insulina de la *Inyección*, por la fórmula:

$$(100/D)[(5020 + V_A)/5000](r_S/r_T)$$

en donde D es el factor de dilución de la *Solución de prueba de insulina total*; V_A es el número de μ L agregado para ajustar el pH de la *Solución de prueba de insulina soluble*; y r_S y r_T son las respuestas de la *Solución de prueba de insulina soluble* y de la *Solución de prueba de insulina total*, respectivamente. El porcentaje de insulina humana soluble está en el intervalo $L \pm 5$, donde L es el porcentaje de insulina humana soluble declarado en la etiqueta del producto.

MÉTODO 2—

Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en *Valoración en Insulina*.

Solución amortiguadora de Tris 0,1 M—Disolver $3,54 \pm 0,01$ g de clorhidrato de Tris(hidroximetil)aminometano y $3,34 \pm 0,01$ g de Tris(hidroximetil)aminometano en 500 mL de agua. El pH de la *Solución amortiguadora de Tris 0,1 M* debe estar entre 8,0 y 8,4. Si el pH está fuera de este intervalo, desechar la solución y preparar una nueva; no ajustar el pH. [NOTA—Esta solución es estable durante dos semanas y debe almacenarse alejada de la luz solar directa.]

Solución de prueba de insulina soluble—Mezclar bien 2,0 mL de *Inyección* con 2,0 mL de *Solución amortiguadora de Tris 0,1 M*. Sumergir el recipiente en un baño de agua a $25 \pm 2^\circ$ durante 30 ± 2 minutos. Pasar inmediatamente esta solución a través de un filtro de 0,2 μ m usando una jeringa desechable. Transferir 2 mL del filtrado a un recipiente adecuado y agregar 1 mL de ácido clorhídrico 0,2 N y 2 mL de ácido clorhídrico 0,01 N.

Solución de prueba de insulina total—Agregar 3,0 μ L de ácido clorhídrico 9,6 N por cada mL de *Inyección*, mezclar y dejar que la suspensión clarifique. Diluir la solución resultante con ácido clorhídrico 0,01 N a la misma concentración teórica de insulina de la *Solución de prueba de insulina soluble* (por ejemplo, si se declara que la *inyección* contiene 20% de insulina soluble, el factor de dilución es $2/1 \times 5/2 \times 100/20 = 25$).

Procedimiento—Inyectar por separado volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ L) de la *Solución de prueba de insulina soluble* y de la *Solución de prueba de insulina total*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de insulina y

desamido insulina A-21. Calcular la cantidad de insulina humana soluble como un porcentaje del contenido de insulina humana total de la *Inyección*, por la fórmula:

$$(500/D)(r_S/r_T)$$

en donde D es el factor de dilución de la *Solución de prueba de insulina total*; y r_S y r_T son las respuestas de los picos de insulina humana obtenidos a partir de la *Solución de prueba de insulina soluble* y la *Solución de prueba de insulina total*, respectivamente. El porcentaje de insulina humana soluble está en el intervalo $L \pm 5$, donde L es el porcentaje de insulina humana soluble declarado en la etiqueta del producto.

Valoración—Proceder según se indica en *Valoración en Insulina Humana*, *Inyección*. ■1S (USP30)

Irbesartán

Cambio en la redacción:

Límite de azida—

Fase móvil—Preparar una solución de hidróxido de sodio 0,1 N filtrada y desgasificada (ver *Aptitud del sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Transferir aproximadamente 25 mg de azida sódica, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar. Pipetear 250 μ L de esta solución y transferir a un matraz volumétrico de 200 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 0,312 μ g de azida sódica por mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 100 mg de Irbesartán, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 5 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector conductimétrico y una columna de 4,0 mm \times 25 cm rellena con material ■L31. ■1S (USP30) La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la relación señal-ruído para el pico de azida no es menor de 10.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 200 μ L) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos de azida. Calcular la cantidad de azida, en ppm, en la porción de Irbesartán tomada, por la fórmula:

$$1000(C_S/C_T)(42,02/65,01)(r_U/r_S)$$

en donde C_S es la concentración, en μ g por mL, de azida sódica en la *Solución estándar*; C_T es la concentración, en mg por mL, de Irbesartán en la *Solución de prueba*; r_U es el área del pico de azida obtenida a partir de la *Solución de prueba*; y r_S es el área del pico de azida obtenida a partir de la *Solución estándar*: no se encuentra más de 10 ppm de azida.

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—

Solución amortiguadora de fosfato de pH 3,2 y Fase móvil ■1S (USP30)—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Preparar según se indica en la *Solución de aptitud del sistema* en la *Valoración*.

■*Solución de prueba*—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de Irbesartán en metanol para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL. ■1S (USP30)

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Proceder según se indica en la *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir el área del pico del compuesto relacionado A de irbesartán. Calcular el porcentaje del compuesto relacionado A de irbesartán en la porción de Irbesartán tomada, por la fórmula:

$$100(C_s/C_T)(r_U/r_S)$$

en donde C_s es la concentración, en mg por mL, de ER Compuesto relacionado A de Irbesartán USP en la *Solución estándar*; C_T es la concentración, en mg por mL, de Irbesartán en la *Solución de prueba*; r_U es la respuesta del pico del compuesto relacionado A de irbesartán obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y r_S es la respuesta del pico del compuesto relacionado A de irbesartán obtenido a partir de la *Solución estándar*.

■ Calcular el porcentaje de otras impurezas en la porción de Irbesartán tomada, por la fórmula:

$$100(C_s/C_T)(r_U/r_S)$$

en donde C_s es la concentración, en mg por mL, de ER Irbesartán USP en la *Solución estándar*; C_T es la concentración, en mg por mL, de Irbesartán en la *Solución de prueba*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos para cada una de las otras impurezas y ER Irbesartán USP obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente; ■_{1S} (USP30) no se encuentra más de 0,2% del compuesto relacionado A de irbesartán; no se encuentra más de 0,1% de cualquier otra impureza; y no se encuentra más de 0,5% de impurezas totales.

Cambio en la redacción:

Valoración—

Solución amortiguadora de fosfato de pH 3,2—Mezclar 5,5 mL de ácido fosfórico con aproximadamente 950 mL de agua y ajustar con trietilamina a un pH de 3,2.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de solución amortiguadora de fosfato de pH 3,2 y acetonitrilo (67 : 33). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Disolver cantidades, pesadas con exactitud, de ER Irbesartán USP y ER Compuesto Relacionado A de Irbesartán USP en metanol para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,05 mg por mL de cada Estándar de Referencia USP.

■_{1S} (USP30)

Preparación estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Irbesartán USP en metanol para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 50 mg de Irbesartán, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con metanol, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,0 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,8 para el compuesto relacionado A de irbesartán y 1,0 para irbesartán; la resolución, R , entre irbesartán y el compuesto relacionado A de irbesartán no es menor de 2,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{25}H_{28}N_6O$ en la porción de Irbesartán tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Irbesartán USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Agregar lo siguiente:

■ Irbesartán, Tabletas

» Las Tabletas de Irbesartán contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de irbesartán ($C_{25}H_{28}N_6O$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Estándares de referencia USP (11)—ER Irbesartán USP. ER Compuesto Relacionado A de Irbesartán USP.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K)—

Muestra de prueba: Transferir 1 Tableta a un vial adecuado. Agregar 10 mL de metanol y someter a ultrasonido durante 10 minutos. Pasar la solución a través de un filtro de membrana de microfibras de vidrio con un tamaño de poro de 0,45 µm o menor y evaporar hasta sequedad usando una corriente de nitrógeno. Mezclar aproximadamente 1 mg del residuo con aproximadamente 250 mg de bromuro de potasio y mezclar bien para obtener una mezcla homogénea. El espectro de absorción IR de una dispersión de bromuro de potasio del residuo así obtenido presenta máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de una dispersión de bromuro de potasio de una preparación similar usando ER Irbesartán USP.

B: El tiempo de retención relativo del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Disolución (711)—

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 1000 mL.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempo: 20 minutos.

Procedimiento—Determinar la cantidad disuelta de $C_{25}H_{28}N_6O$ empleando absorción UV a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 244 nm, en porciones de la solución en análisis pasadas a través de un filtro de 0,45 µm de copolímero de acrílico sobre un soporte de nailon* y adecuadamente diluidas con *Medio*, si fuera necesario, en comparación con una

* Un filtro adecuado es Acrodisc, fabricado por Gelman Sciences y distribuido por Pall Corp. (www.pall.com).

Solución estándar con una concentración conocida de ER Irbesartán USP en el mismo *Medio*. Calcular la cantidad disuelta de $C_{25}H_{28}N_6O$, en porcentaje, por la fórmula:

$$\frac{A_U \times C_S \times 1000 \times 100}{A_S \times L}$$

en donde A_U y A_S son las absorbancias obtenidas a partir de la solución en análisis y la Solución estándar, respectivamente; C_S es la concentración, en mg por mL, de la Solución estándar; 1000 es el volumen, en mL, de *Medio*; 100 es el factor de conversión a porcentaje; y L es la cantidad declarada, en mg, de irbesartán.

Tolerancias—No menos de 80% (Q) de la cantidad declarada de $C_{25}H_{28}N_6O$ se disuelve en 20 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

Compuestos relacionados—

Solución amortiguadora, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Usar la *Preparación estándar*, preparada según se indica en la *Valoración*.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen de aproximadamente 15 μ L de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la respuesta del pico de cada impureza; y r_s es la suma de las respuestas de todos los picos: no se encuentra más de 0,2% del compuesto relacionado A de irbesartán; no se encuentra más de 0,2% de cualquier impureza individual; y no se encuentra más de 0,5% de impurezas totales.

Valoración—

Solución amortiguadora—Diluir aproximadamente 5,5 mL de ácido fosfórico en aproximadamente 950 mL de agua y agregar trietilamina, lentamente y gota a gota, para ajustar a un pH de 3,0. Diluir adicionalmente esta solución con agua a un volumen final de 1 L.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (60:40). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación de aptitud del sistema—Disolver en metanol cantidades, pesadas con exactitud, de ER Irbesartán USP y de ER Compuesto Relacionado A de Irbesartán USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL de cada uno de los Estándares de Referencia USP.

Preparación estándar—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Irbesartán USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,15 mg por mL.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 5 Tabletas. Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 15 mg de irbesartán. Agregar metanol hasta tres cuartas partes del volumen del matraz. Someter a ultrasonido durante 15 minutos, revolviendo a intervalos de 5 minutos. Diluir a volumen con metanol y pasar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de microfibras de vidrio con un tamaño de poro de 0,45 μ m o menor.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm \times 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre irbesartán y el compuesto relacionado A de irbesartán no es menor de 2,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para cinco inyecciones repetidas no es más de 1,5%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 15 μ L) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de irbesartán ($C_{25}H_{28}N_6O$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Irbesartán USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Irbesartán e Hidroclorotiazida, Tabletas

» Las Tabletas de Irbesartán e Hidroclorotiazida contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de irbesartán ($C_{25}H_{28}N_6O$) e hidroclorotiazida ($C_7H_8ClN_3O_4S_2$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Irbesartán USP*. *ER Hidroclorotiazida USP*.

Identificación—Los tiempos de retención relativos de los picos principales en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponden con los del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Disolución (711)—

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

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempo: 45 minutos.

Determinar las cantidades disueltas de irbesartán ($C_{25}H_{28}N_6O$) e hidroclorotiazida ($C_7H_8ClN_3O_4S_2$) empleando el siguiente método.

Fase móvil y Sistema cromatográfico—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 μ L) de la Solución estándar y de porciones filtradas de las soluciones en análisis, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos principales. Calcular las cantidades disueltas de irbesartán ($C_{25}H_{28}N_6O$) e hidroclorotiazida ($C_7H_8ClN_3O_4S_2$) en comparación con una Solución estándar con concentraciones conocidas de ER Irbesartán USP y ER Hidroclorotiazida USP en el mismo *Medio* y cromatografiada de manera similar.

Tolerancias—No menos de 75% (Q) de las cantidades declaradas de $C_{25}H_{28}N_6O$ y $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ se disuelve en 45 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

Valoración—

Solución de trietilamina—Agregar 1,0 mL de trietilamina a 1000 mL de agua, mezclar y ajustar con ácido fosfórico a un pH de 3,5.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución de trietilamina* y acetonitrilo (1:1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 25 mg de ER Hidroclorotiazida USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 25J mg de ER Irbesartán USP, pesados con exactitud, en donde J es el cociente entre la cantidad

declarada, en mg, de irbesartán y la cantidad declarada, en mg, de hidroclorotiazida por Tableta. Disolver y diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 25 mg de hidroclorotiazida. Agregar aproximadamente 80 mL de *Fase móvil* y mezclar sobre una placa de agitación magnética durante 15 minutos. Diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar. Centrifugar una porción de esta solución durante 10 minutos y usar el sobrenadante transparente.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre hidroclorotiazida e irbesartán no es menor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, y registrar las áreas de los picos principales. Calcular las cantidades, en mg, de irbesartán ($C_{25}H_{28}N_6O$) e hidroclorotiazida ($C_7H_8ClN_3O_4S_2$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, del Estándar de Referencia USP apropiado en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos del analito correspondiente obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Mononitrato de Isosorbida, Tabletas

» Las Tabletas de Mononitrato de Isosorbida contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de mononitrato de isosorbida ($C_6H_8NO_6$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a una temperatura entre 20° y 30°.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Isosorbida USP*. [NOTA—Los siguientes Estándares de Referencia son mezclas secas de un componente activo con excipientes adecuados que permitan una manipulación segura. Para aplicaciones cuantitativas, calcular la concentración del componente activo basada en el contenido declarado en la etiqueta.] *ER Dinitrato de Isosorbida Diluido USP*. *ER Mononitrato de Isosorbida Diluido USP*. *ER Compuesto Relacionado A de Mononitrato de Isosorbida Diluido USP*.

Identificación—

A: *Prueba de Identificación por Cromatografía en Capa Delgada* (201)—

Solución de prueba—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 120 mg de mononitrato de isosorbida, a un recipiente adecuado, agregar 50,0 mL de alcohol absoluto, someter a ultrasonido durante 10 minutos y centrifugar. Diluir cuantitativamente el sobrenadante (10 en 50) con alcohol absoluto.

Solución estándar: una solución de ER Mononitrato de Isosorbida Diluido USP en alcohol absoluto que contenga 0,5 mg de mononitrato de isosorbida por mL.

Volumen de aplicación: 20 µL.

Fase móvil: una mezcla de cloroformo y metanol (95 : 5).

Reactivo para rociado—Disolver 1 g de almidón soluble en 100 mL de agua en ebullición. Enfriar, agregar 0,5 g de yoduro de potasio y mezclar para disolver.

Procedimiento—Examinar la placa bajo luz UV de longitud de onda corta, marcando cualquier mancha observada. Visualizar los nitratos en la placa rociando con el *Reactivo para rociado* e iluminando con luz UV de longitud de onda corta durante aproximadamente 10 minutos. El mononitrato de isosorbida y otros nitratos aparecen como una mancha violeta sobre un fondo de color blanco a violeta claro.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos de *Uniformidad de Contenido*.

Compuestos relacionados—

PRUEBA 1—

Adsorbente, Solución estándar 1, Solución estándar 2, Solución estm.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos de *Uniformidad de Contenido*.

Compuestos relacionados—

PRUEBA 1—

Adsorbente, Solución estándar 1, Solución estándar 2, Solución estándar 3, Volumen de aplicación y Fase móvil—Preparar según se indica en *Compuestos relacionados, Prueba 1* en *Mononitrato de Isosorbida Diluido*.

Solución de prueba—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir a un recipiente adecuado una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 100 mg de mononitrato de isosorbida, agregar 20,0 mL de alcohol absoluto, someter a ultrasonido durante 10 minutos y centrifugar. Emplear el sobrenadante.

Procedimiento—Proceder según se indica en *Cromatografía en Capa Delgada* en *Cromatografía* (621). Después del desarrollo, secar la placa con aire caliente durante aproximadamente 10 minutos, sumergir la placa en una solución preparada disolviendo 1,25 g de permanganato de potasio y 10,0 g de hidróxido de sodio en 500 mL de agua (recién preparada para cada placa), y calentar a 105° durante 5 minutos. Cualquier mancha en el cromatograma obtenida a partir de la *Solución de prueba* cuyo valor R_F se corresponda con el de las manchas obtenidas a partir de las *Soluciones estándar* no es más intensa que la mancha en el cromatograma obtenida a partir de la *Solución estándar 3*: no se encuentra más de 1,0% de cualquier impureza individual. Si la mancha en el cromatograma obtenida a partir de la *Solución de prueba* es casi tan intensa como la mancha obtenida a partir de la *Solución estándar 3*, volver a diluir la *Solución de prueba* (1 : 1) con alcohol absoluto, repetir la prueba y comparar la intensidad de la mancha de isosorbida en la *Solución de prueba* diluida con la intensidad de las manchas obtenidas a partir de las *Soluciones estándar*, corrigiendo el nivel de porcentaje para la dilución adicional de la *Solución de prueba*.

PRUEBA 2—

Fase móvil y Solución de resolución—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución madre del estándar del compuesto relacionado A de mononitrato de isosorbida—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado A de Mononitrato de Isosorbida Diluido USP y diluir cuantitativamente con metanol, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg de compuesto relacionado A de mononitrato de isosorbida por mL.

Solución madre del estándar de dinitrato de isosorbida—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Dinitrato de Isosorbida Diluido USP y diluir cuantitativamente con metanol, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg de dinitrato de isosorbida por mL.

Solución estándar—Transferir una cantidad, pesada con exactitud, de ER Mononitrato de Isosorbida Diluido USP a un matraz volumétrico adecuado. Disolver en agua, agregar cuantitativamente un volumen de *Solución madre del estándar del compuesto relacionado A de mononitrato de isosorbida* y un volumen de *Solución madre del estándar de dinitrato de isosorbida*, y diluir a volumen con agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg de mononitrato de isosorbida por mL, 0,0005 mg del compuesto relacionado A de mononitrato de isosorbida por mL y 0,0005 mg de dinitrato de isosorbida por mL. Filtrar una porción de la solución, desechando los primeros mL del filtrado.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*, preparada según se indica en la *Valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el compuesto relacionado A de mononitrato de isosorbida y mononitrato de isosorbida no es menor de 1,5. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 10% para los picos del compuesto relacionado A de mononitrato de isosorbida y de dinitrato de isosorbida.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos principales. Comparar las áreas de los picos de la impureza correspondiente obtenidas a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente. El área promedio del pico de la impureza en la *Solución de prueba* es menor o igual que el área promedio del pico correspondiente en la *Solución estándar*: no se encuentra más de 0,5% del compuesto relacionado A de mononitrato de isosorbida; y no se encuentra más de 0,5% de dinitrato de isosorbida.

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de agua y metanol (7:3). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de resolución—Preparar una solución de ER Mononitrato de Isosorbida Diluido USP y ER Compuesto Relacionado A de Mononitrato de Isosorbida Diluido USP con una concentración de 0,0005 mg de mononitrato de isosorbida y del compuesto relacionado A de mononitrato de isosorbida por mL.

Preparación estándar—Disolver en agua una cantidad, pesada con exactitud, de ER Mononitrato de Isosorbida Diluido USP y diluir cuantitativamente con agua, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg de mononitrato de isosorbida por mL. Pasar una porción de esta solución a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm o menor y usar el filtrado.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir a un matraz volumétrico de 200 mL una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 20 mg de mononitrato de isosorbida, agregar 100 mL de agua y someter a ultrasonido durante aproximadamente 10 minutos. Diluir a volumen con agua y mezclar. Pasar una porción de esta solución a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm o menor y usar el filtrado.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el compuesto relacionado A de mononitrato de isosorbida y mononitrato de isosorbida no es menor de 1,5. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,5%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y

medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de mononitrato de isosorbida ($C_6H_9NO_6$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$200C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de mononitrato de isosorbida en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Lamivudina

Cambio en la redacción:

Valoración—

Solución de acetato de amonio 0,025 M—Transferir aproximadamente 1,9 g de acetato de amonio a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver en aproximadamente 900 mL de agua, ajustar con ácido acético a un pH de $3,8 \pm 0,2$; diluir a volumen con agua y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución de acetato de amonio 0,025 M* y metanol (95:5). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—■ Disolver en *Fase móvil* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Mezcla de Resolución B de Lamivudina USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,25 mg por mL. ■_{1S} (USP30)

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Lamivudina USP y diluir cuantitativamente con *Fase móvil*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,25 mg por mL.

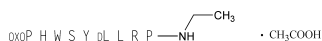
Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 25 mg de Lamivudina, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 277 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 35°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre lamivudina y el diastereómero de lamivudina no es menor de 1,5. [NOTA—Los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,0 para lamivudina y 0,9 para el diastereómero de lamivudina.] Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de lamivudina. Calcular la cantidad, en mg, de $C_8H_{11}N_3O_3S$ en la porción de Lamivudina tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Lamivudina USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Agregar lo siguiente:**■ Acetato de Leuprolida**

$C_{59}H_{84}N_{16}O_{12} \cdot (C_2H_4O_2)_n$, $n = 1 \text{ ó } 2$ 1209,41 (como base libre)
Luteinizing hormone-releasing factor, 6-D-leucine-9-(N-ethyl-L-prolinamide)-10-deglycinamide acetate (salt).

Acetato (sal) de 5-oxo-L-prolil-L-histidil-L-triptofil-L-seril-L-tirosil-D-leucil-L-leucil-L-arginil-N-etil-L-prolinamida [74381-53-6].

» El Acetato de Leuprolida es un análogo agonista nonapéptido sintético del factor liberador de hormona luteinizante. Contiene no menos de 97,0 por ciento y no más de 103,0 por ciento de leuprolida ($C_{59}H_{84}N_{16}O_{12}$), calculada con respecto a la base anhidra, exenta de ácido acético.

NOTA—Debido a la naturaleza higroscópica de este material, los análisis se realizan inmediatamente después de abierto el envase en una cámara cerrada con guantes bajo una purga de nitrógeno seco.

Precaución—El Acetato de Leuprolida es un potente manipulador hormonal. Evitar el contacto con la piel y la inhalación de polvos y nieblas.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a temperatura que no exceda de 30°.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Endotoxina USP. ER Acetato de Leuprolida USP.*

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Rotación específica (781S): entre $-38,0^\circ$ y $-42,0^\circ$; expresada con respecto a la sustancia anhidra exenta de ácido acético.

Solución de prueba: 10,0 mg por mL, en ácido acético al 1%.

Endotoxinas bacterianas (85)—No contiene más de 166,7 Unidades USP de Endotoxinas por mg de acetato de leuprolida.

Agua, Método Ic (921): no más de 8,0%.

Residuo de incineración (281): no más de 0,3%.

Pureza cromatográfica—

*Solución amortiguadora, Solución de modificador orgánico, Fase móvil, Preparación madre del estándar y Preparación estándar de degradación—*Preparar según se indica en la *Valoración*.

*Solución estándar—*Transferir 1,0 mL de la *Preparación madre del estándar* a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

*Solución de prueba—*Transferir aproximadamente 100 mg de Acetato de Leuprolida, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

*Sistema cromatográfico—*Proceder según se indica en la *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de prueba* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,80 para D-Ser-leuprolida; 0,90 para D-His-leuprolida; 1,00 para leuprolida; 1,2 para L-Leu⁶-leuprolida; y 1,5 para acetileuprolida.

*Procedimiento—*Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ L) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas durante 90

minutos y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Acetato de Leuprolida tomada, por la fórmula:

$$0,01(W_s/W_u)(r_i/r_s)P$$

en donde W_s es el peso de ER Acetato de Leuprolida USP en la *Preparación madre del estándar*; W_u es el peso, en mg, de Acetato de Leuprolida en la *Solución de prueba*; r_i es la respuesta del pico para cada impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*; r_s es la respuesta del pico de leuprolida obtenido a partir de la *Solución estándar*; y P es la pureza designada, en porcentaje, de ER Acetato de Leuprolida USP: no se encuentra más de 1,0% de acetileuprolida; no se encuentra más de 0,5% de D-His-leuprolida, de L-Leu⁶-leuprolida y de D-Ser-leuprolida; no se encuentra más de 0,5 % de cualquier otra impureza individual; y no se encuentra más de 2,5% de impurezas totales.

Contenido de ácido acético—

*Diluyente—*Usar metanol y ajustar con ácido fosfórico a un pH de 2,5.

*Solución estándar—*Pipetear 2,0 mL de ácido acético glacial y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Diluyente*, y mezclar. Transferir 4,0 mL de la solución así obtenida a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Transferir 10,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,08 mg por mL.

*Solución de prueba—*Transferir aproximadamente 100 mg de Acetato de Leuprolida, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama y una columna capilar de sílice fundida de 0,53 mm \times 30 m con una película de 1,2 μ m de fase G35. El gas transportador es helio, que fluye a una velocidad de aproximadamente 10 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna aproximadamente a 100°, la del inyector aproximadamente a 200° y la del detector aproximadamente a 250°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: el tiempo de retención del ácido acético es de aproximadamente 5 a 7 minutos; la eficiencia de la columna no es menos de 15 000 platos teóricos; el factor de asimetría no es menor de 0,8 y no es mayor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. Inyectar en el cromatógrafo el *Diluyente* y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: asegurarse de que no haya picos que interfieran.

*Procedimiento—*Inyectar por separado en el cromatógrafo (modalidad sin división) volúmenes iguales (aproximadamente 1,0 μ L) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de ácido acético. Calcular el porcentaje de ácido acético ($C_2H_4O_2$) en la porción de Acetato de Leuprolida tomada, por la fórmula:

$$(839,2/W_u)(r_u/r_s)$$

en donde W_u es el peso, en mg, de Acetato de Leuprolida tomado para preparar la *Solución de prueba*; y r_u y r_s son las áreas de los picos de ácido acético obtenidas a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentra menos de 4,7% y no más de 9,0%.

Contenido de aminoácidos—Usar un procedimiento validado, adecuado (ver *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Análisis de Aminoácidos* (1052)).

*Soluciones estándar—*Preparar una solución con cantidades equimolares conocidas de L-alanina, L-arginina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina y L-valina con la mitad de la cantidad equimolar de L-cistina. Para la validación del método, se utiliza un estándar interno apropiado, como norleucina. Preparar por separado una solución equimolar de L-triptófano.

*Solución de prueba—*Transferir aproximadamente 64 mg de Acetato de Leuprolida, pesados con exactitud, a un recipiente adecuado y disolver en 1,0 mL de agua. Transferir 0,10 mL de esta solución a un tubo de hidrólisis al vacío, agregar 2,0 mL de ácido

clorhídrico 6N, aplicar vacío y calentar a 120° durante 16 horas. Transferir 0,10 mL del hidrolisado así obtenido a un recipiente adecuado, agregar 1 mL de agua y liofilizar. Disolver y diluir a un volumen adecuado en una solución amortiguadora adecuada para análisis de aminoácidos.

Procedimiento—Inyectar en el analizador de aminoácidos volúmenes iguales de las *Soluciones estándar* y de la *Solución de prueba*, y registrar y medir las respuestas de cada pico de aminoácido. Expresar el contenido de cada aminoácido en moles. Calcular las proporciones relativas de los aminoácidos en la *Solución de prueba*, tomar la séptima parte de la suma del número de moles de histidina, ácido glutámico, leucina, prolina, tirosina y arginina como igual a uno: se encuentran entre 0,85 y 1,1 moles de cada uno de los aminoácidos ácido glutámico, prolina, tirosina, histidina y arginina por mol de Acetato de Leuprolida; se encuentran entre 1,8 y 2,2 moles de leucina por mol de Acetato de Leuprolida. También se hallan presentes serina y triptófano.

Valoración—

Solución amortiguadora—Disolver aproximadamente 15,2 g de trietilamina en 800 mL de agua, ajustar con ácido fosfórico a un pH de 3,0 y diluir con agua hasta 1000 mL.

Solución de modificador orgánico—Preparar una mezcla de acetonitrilo y alcohol *n*-propílico (3 : 2).

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y *Solución de modificador orgánico* (85 : 15). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación madre del estándar—Transferir aproximadamente 100 mg de ER Acetato de Leuprolida USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Preparación estándar—Transferir 5,0 mL de la *Solución madre del estándar* a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Preparación estándar de degradación—Transferir 5 mL de la *Preparación madre del estándar* a un matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con agua. Transferir 5 mL de la solución así obtenida a un vial de centelleo. Agregar 100 µL de solución de hidróxido de sodio 1N, tapar herméticamente y agitar vigorosamente. Colocar en un horno a 100° durante 60 minutos, retirar, dejar que se enfríe, agregar 50 µL de ácido fosfórico 1M, volver a tapar y agitar vigorosamente para mezclar.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 100 mg de Acetato de Leuprolida, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar. Transferir 5,0 mL de la solución así obtenida a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4,6 mm × 10 cm rellena con material L1 de 3 µm. La velocidad de flujo está entre 1,0 y 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar de degradación* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el tiempo de retención de leuprolida está entre 41 y 49 minutos; los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,90 para el producto de degradación y 1,0 para la leuprolida; y la resolución, *R*, entre leuprolida y el producto de degradación no es menor de 1,5. Inyectar en el cromatógrafo la *Fase móvil* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: verificar que no haya picos extraños. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es menor de 0,8 y no es mayor de 1,5; la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,5%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas durante 60 minutos y medir las áreas de los picos de leuprolida. Calcular el porcentaje de leuprolida ($C_{39}H_{84}N_{16}O_{12}$) en la porción de Acetato de Leuprolida tomada, por la fórmula:

$$\left[\frac{(W_s / W_u)(r_u / r_s)(P)(0,9527)(100)}{(100 - \text{contenido de ácido acético} - \text{contenido de agua})} \right]$$

en donde W_s es el peso, en mg, de ER Acetato de Leuprolida USP en la *Preparación estándar*; W_u es el peso, en mg, de Acetato de Leuprolida en la *Preparación de valoración*; r_u y r_s son las áreas de

los picos obtenidas a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente; y *P* es la pureza designada, en porcentaje, de ER Acetato de Leuprolida USP. ■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Lidocaína y Prilocaína, Crema

» La Crema de Lidocaína y Prilocaína contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de lidocaína ($C_{14}H_{22}N_2O$) y prilocaína ($C_{13}H_{20}N_2O$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en tubos depresibles o en envases impermeables. No almacenar a una temperatura superior a 30°. No congelar.

Estándares de referencia USP (11)—ER Lidocaína USP. ER Clorhidrato de Prilocaína USP. ER Compuesto Relacionado B de Prilocaína USP.

Identificación—Los tiempos de retención de los picos principales en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponden con los del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Límites microbianos (61)—Cumple con los requisitos de las pruebas para ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El recuento total de microorganismos aerobios no excede de 100 ufc por g, y el recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras no excede de 50 ufc por g.

Llenado mínimo (755): cumple con los requisitos.

pH (791): entre 8,7 y 9,7, determinado en una solución (1 en 10) o en la Crema sin diluir.

Valoración—

Solución A—Disolver aproximadamente 2,73 g de fosfato monobásico de potasio en 630 mL de agua y ajustar con hidróxido de sodio 5N a un pH de $7,20 \pm 0,02$. Diluir con acetonitrilo a 1 L.

Solución B—Disolver aproximadamente 2,73 g de fosfato monobásico de sodio en 900 mL de agua y ajustar con hidróxido de sodio 5N a un pH de $7,20 \pm 0,02$. Diluir con acetonitrilo a 1 L.

Fase móvil—Usar mezclas variables, filtradas y desgasificadas de *Solución A* y *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en *Solución A* cantidades, pesadas con exactitud, de ER Lidocaína USP y ER Clorhidrato de Prilocaína USP y diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Solución A* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,2 mg por mL de cada compuesto. Almacenar esta solución inmediatamente a 10° o menos.

Solución de aptitud del sistema—Disolver en la *Preparación estándar* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Compuesto Relacionado B de Prilocaína USP y diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con la *Preparación estándar* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,08 mg por mL de compuesto relacionado B de prilocaína.

Preparación de valoración—Transferir una porción de la Crema, que equivalga aproximadamente a 20 mg de lidocaína y de prilocaína, pesada con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 5 mL de hidróxido de sodio 5N para dispersar la Crema y mezclar. Agregar 5 mL de ácido clorhídrico 5N, diluir a volumen con *Solución A* y mezclar. Pasar una porción a través de

un filtro de nylon con tamaño de poro de 0,2 µm o menor, desechando el primer 1 mL y usar el filtrado. Almacenar esta solución inmediatamente a 10° o menos.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 232 nm y una columna de 4,6 mm × 10 cm rellena con material L1 de 3 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 40°. Mantener las muestras a 10° o menos. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0	67	33	equilibrio
0–11,0	67	33	isocrática
11,0–22,0	67→100	33→0	gradiente lineal
22,0–32,0	100	0	isocrática

Injectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son de 1,00 para prilocaína, 1,09 para el compuesto relacionado B de prilocaína y 2,14 para lidocaína; y la resolución, *R*, entre prilocaína y el compuesto relacionado B de prilocaína no es menor de 1,4. Injectar en el cromatógrafo como mínimo cinco veces la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 5000 platos teóricos, basado en el pico de prilocaína; el factor de asimetría no es mayor de 1,5, basado en el pico de prilocaína; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de lidocaína y prilocaína. Calcular el porcentaje declarado de lidocaína ($C_{14}H_{22}N_2O$) y de prilocaína ($C_{13}H_{20}N_2O$) en la porción de Crema tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)(V/W)(100/L)(220,31/256,77)$$

en donde *C* es la concentración individual, en mg por mL, de ER Lidocaína USP o ER Clorhidrato de Prilocaína USP en la *Preparación estándar*; r_U y r_S son las respuestas individuales de los picos de lidocaína o prilocaína obtenidos de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente; *V* es el volumen, en mL, de la *Preparación de valoración*; *W* es el peso, en mg, de la Crema tomado para preparar la *Preparación de valoración*; *L* es el valor individual declarado, como porcentaje, de lidocaína o prilocaína; y 220,31 y 256,77 son los pesos moleculares de prilocaína y de clorhidrato de prilocaína respectivamente (sólo se utilizan para calcular el porcentaje de prilocaína en la Crema). ■^{1S} (USP30)

Clorhidrato de Loperamida, Solución Oral

Cambio en la redacción:

Valoración—

Solución amortiguadora—Transferir 3,0 g de fosfato monobásico de potasio a un matraz volumétrico de 1 L, disolver y diluir a volumen con agua, y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla de *Solución amortiguadora* y acetonitrilo (63 : 37) y ajustar con ácido fosfórico 0,9 M hasta un pH de 3,0. Mezclar, filtrar y desgasificar. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—■ Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Loperamida USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 2 mg por mL. Diluir cuantitativamente esta solución con agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL. Diluir adicionalmente esta

solución con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 10 µg de clorhidrato de loperamida por mL. ■^{1S} (USP30)

Preparación de valoración—Transferir un volumen, medido con exactitud, de Solución Oral que equivalga aproximadamente a 1,0 mg de clorhidrato de loperamida a un matraz volumétrico de 100 mL. Diluir a volumen con *Fase móvil*, mezclar y filtrar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 214 nm y una columna de 4,0 mm × 8,0 cm rellena con material L7 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Injectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar la áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de clorhidrato de loperamida ($C_{29}H_{33}ClN_2O_2 \cdot HCl$) en cada mL de la Solución Oral tomada, por la fórmula:

$$100(C/V)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Loperamida USP en la *Preparación estándar*; *V* es el volumen de Solución Oral tomado para preparar la *Preparación de valoración*; r_U y r_S son las áreas de los picos obtenidas a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Magaldrato y Simeticona, Tabletas

(*Título vigente no cambiará hasta el 1° de febrero de 2010*)

Cambio de título de la monografía—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010

Ver Magaldrato y Simeticona, Tabletas Masticables

Agregar lo siguiente:

■ Magaldrato y Simeticona, Tabletas Masticables

(*La Monografía con este nuevo título—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010*)

(*El título actual de la monografía es Magaldrato y Simeticona, Tabletas*)

» Las Tabletas Masticables de Magaldrato y Simeticona contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de magaldrato [$Al_5Mg_{10}(OH)_{31}(SO_4)_2$] y una cantidad de polidimetilsiloxano [$-(CH_3)_2SiO-$]_n que no es menos de 85,0 por ciento y no es más de 115,0 por ciento de la cantidad declarada de simeticona.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Etiquetado—Etiquetar las Tabletas Masticables indicando que deben masticarse antes de tragarlas.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Magaldrato USP. ER Polidimetilsiloxano USP.*

Identificación—

A: Transferir a un tubo de centrifuga de 100 mL una cantidad de Tabletas Masticables pulverizadas que equivalga aproximadamente a 2 g de magaldrato. Agregar aproximadamente 60 mL de agua, tapar y agitar durante 3 minutos. Centrifugar la suspensión y desechar el sobrenadante. Repetir el lavado con tres porciones adicionales de 60 mL de agua. Transferir el residuo a un vaso de precipitados de 250 mL y calentar en un baño de vapor hasta sequedad: el residuo así obtenido cumple con los requisitos de las pruebas de *Identificación en Magaldrato*.

B: El espectro de absorción IR en la región comprendida entre 7 y 11 μm , determinado en una celda de 0,5 mm, de la *Preparación de valoración*, preparada según se indica en la *Valoración de polidimetilsiloxano*, presenta máximos sólo a las mismas longitudes de onda que el de la *Preparación estándar*, la cual contiene aproximadamente 2 mg de ER Polidimetilsiloxano USP por mL y se prepara según se indica en la *Valoración de polidimetilsiloxano*.

Límites microbianos (61)—Las Tabletas Masticables cumplen con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos de *Variación de Peso* con respecto al magaldrato.

Capacidad neutralizante de ácido—Proceder según se indica en *Capacidad Neutralizante de Ácido* (301). La dosis mínima individual recomendada en el etiquetado consume no menos de 5 mEq de ácido y no menos del número de mEq calculado por la fórmula:

$$0,8(0,0282M)$$

en donde 0,0282 es la capacidad neutralizante de ácido teórica, en mEq por mg, de magaldrato, y *M* es la cantidad declarada, en mg, de magaldrato.

Actividad antiespumante—

Solución espumante y Pruebas de aptitud del sistema—Proceder según se indica en la prueba de *Actividad antiespumante en Magaldrato y Simeticona, Suspensión Oral*.

Procedimiento—[NOTA—En cada prueba, emplear un recipiente cilíndrico de 250 mL limpio (diámetro interno de 50 mm \times altura interna de 110 mm) que tenga una abertura de 50 mm, y una tapa bien ajustada y con revestimiento inerte.] Transferir una cantidad de Tabletas Masticables reducidas a polvo fino que equivalga a 20 mg de simeticona a un recipiente cilíndrico de 250 mL que contenga 50 mL de ácido clorhídrico 0,6 N y se haya entibiado a 37°, y proceder según se indica para la prueba de *Actividad antiespumante en Magaldrato y Simeticona, Suspensión Oral*, comenzando donde dice “Tapar el recipiente”. Registrar el tiempo, en segundos, que la espuma tarda en colapsar hasta el punto en que su espesor sea de 1,0 cm, medido desde la superficie del líquido. El tiempo de actividad antiespumante no es superior a 45 segundos.

Contenido de hidróxido de magnesio—

Preparación de prueba—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL una porción del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 1 g de magaldrato, agregar 30 mL de ácido clorhídrico diluido (1 en 10), agitar durante 15 minutos, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Transferir 10,0 mL de la *Preparación de prueba* a un vaso de precipitados de 400 mL y proceder según se indica en la prueba de *Contenido de hidróxido de magnesio en Magaldrato*, comenzando donde dice “y diluir con agua aproximadamente a 200 mL”. No se encuentra menos de 492 mg ni más de 666 mg de hidróxido de magnesio $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$ por g de la cantidad declarada de magaldrato.

Contenido de hidróxido de aluminio—

Solución volumétrica de edetato disódico—Preparar y estandarizar según se indica en *Valoración en Alumbre de Amonio*.

Preparación de prueba—Preparar según se indica en la prueba de *Contenido de hidróxido de magnesio*.

Procedimiento—Transferir 10,0 mL de la *Preparación de prueba* y 20 mL de agua a un vaso de precipitados de 250 mL y proceder según se indica en *Procedimiento en la prueba de Contenido de hidróxido de aluminio en Magaldrato*, comenzando donde dice

“Agregar, mezclando, 25,0 mL de *Edetato disódico*”. No se encuentra menos de 321 mg ni más de 459 mg de hidróxido de aluminio $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ por g de la cantidad declarada de magaldrato.

Valoración de magaldrato—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir a un matraz volumétrico de 200 mL una porción del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 6 g de magaldrato. Agregar 100,0 mL de ácido clorhídrico 2 N SV y agitar mecánicamente por rotación moderada durante 30 minutos. Diluir a volumen con agua, mezclar y filtrar. Transferir 100,0 mL del filtrado a un vaso de precipitados. Valorar el exceso de ácido con hidróxido de sodio 1 N SV hasta un pH de 3,0 determinado potenciométricamente. Realizar una determinación con un blanco (ver *Valoraciones Volumétricas Residuales en Volumetría* (541)). Cada mL de ácido clorhídrico 2 N equivale a 70,80 mg de $\text{Al}_2\text{Mg}_{10}(\text{OH})_{31}(\text{SO}_4)_2$.

Valoración de polidimetilsiloxano—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir a un separador de 60 mL una porción del polvo, pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 20 mg de simeticona. Agregar 10,0 mL de hexanos y 25 mL de ácido clorhídrico 6 N, tapar el separador y agitar mecánicamente durante no menos de 2 horas. Dejar en reposo durante 10 minutos aproximadamente y escurrir tanto como sea posible la capa inferior acuosa sin eliminar ninguna porción de la interfase que no se haya separado. Agregar al separador 25 mL de hidróxido de sodio 4 N, taparlo y agitar mecánicamente durante 1 hora. Transferir la mezcla del separador a un tubo de centrifuga de 50 mL, taparlo y centrifugar para obtener capas transparentes. Transferir no menos de 5 mL de la capa superior transparente de hexanos a un tubo de ensayo que contenga aproximadamente 0,5 g de sulfato de sodio anhidro. Tapar el tubo, agitar vigorosamente y dejar en reposo hasta obtener un sobrenadante transparente (*Preparación de valoración*). Preparar tres *Preparaciones estándar* en hexanos que tengan una concentración conocida de aproximadamente 1,6; 2,0 y 2,4 mg de ER Polidimetilsiloxano USP por mL, respectivamente. Determinar concomitantemente con un espectrofotómetro IR las absorbancias de la *Preparación de valoración* y de las *Preparaciones estándar* en una celda de 0,5 mm, a la longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 1260 cm^{-1} , empleando hexanos como blanco. [NOTA—Entre una y otra medición, enjuagar la celda con heptano, vaciarla y secarla.] Graficar las absorbancias de las *Preparaciones estándar* en función de la concentración, en mg por mL, de ER Polidimetilsiloxano USP y trazar la recta que mejor se ajuste a los tres puntos graficados. A partir de la gráfica obtenida, determinar la concentración, *C*, en mg por mL, de polidimetilsiloxano en la *Preparación de valoración*. Calcular la cantidad, en mg, de $[-(\text{CH}_3)_2\text{SiO}-]_n$ en la porción de Tabletas Masticables tomada multiplicando *C* por 10.

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2010).■^{1S} (USP30)

Leche de Magnesias

Eliminar lo siguiente:

■ Límite de calcio—

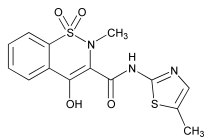
Ácido clorhídrico diluido, Solución de lantano, Preparaciones estándar y Solución blanco—Proceder según se indica para la prueba de *Límite de calcio en Carbonato de magnesio*.

Preparación de prueba—Transferir la cantidad equivalente a 1,4 g de Leche de Magnesias de concentración normal a un vaso de precipitados, agregar 60 mL de *Ácido clorhídrico diluido* y mezclar hasta que se disuelva, calentándolo si es necesario. Transferir la solución así obtenida a un matraz volumétrico de 200 mL con 4 mL de *Solución de lantano*, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Proceder según se indica en la prueba para *Límite de calcio en Carbonato de Magnesio*. Calcular el porcentaje de calcio en la Leche de Magnesias tomada multiplicando la concentración, en μg por mL, de calcio encontrado en la *Preparación de prueba* por 0,014: el límite es 0,07%.■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

Meloxicam



C₁₄H₁₃N₃O₄S₂ 351,40
4-Hydroxy-2-methyl-*N*-(5-methyl-2-thiazolyl)-2*H*-1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide
4-Hidroxi-2-metil-*N*-(5-metil-2-tiazolil)-2*H*-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dióxido [71125-38-7].

» El Meloxicam contiene no menos de 99,0 por ciento y no más de 100,5 por ciento de C₁₄H₁₃N₃O₄S₂, calculado con respecto a la sustancia seca.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados. Almacenar a temperatura ambiente.

Etiquetado—El etiquetado indica la prueba de *Compuestos relacionados* con la que cumple el artículo si se usa una prueba diferente de la *Prueba 1*.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Meloxicam USP*. *ER Compuesto Relacionado A de Meloxicam USP*. *ER Compuesto Relacionado B de Meloxicam USP*. *ER Compuesto Relacionado C de Meloxicam USP*. *ER Compuesto Relacionado D de Meloxicam USP*.

Identificación—

- A: Absorción en el Infrarrojo (197K).
- B: Absorción en el Ultravioleta (197U).
- Intervalo espectral: 240 a 450 nm.
- Solución: 10 µg por mL.
- Medio: metanol.

Pérdida por secado (731)—Secar a 105° durante 4 horas: no pierde más de 0,5% de su peso.

Residuo de incineración (281): no más de 0,1%.

Metales pesados, Método II (231): no más de 0,001%.

Compuestos relacionados—[NOTA—Realizar la *Prueba 1* o la *Prueba 2*, de acuerdo con el proceso de fabricación que se utilice.]
PRUEBA 1—
Solución A: una solución de fosfato monobásico de potasio al 0,1% (p/v) ajustada con hidróxido de sodio 1 N a un pH de 6,0.

Solución B: metanol.
Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).
Solución de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 4 mg de ER Meloxicam USP, 4 mg de ER Compuesto Relacionado A de Meloxicam USP y 4 mg de ER Compuesto Relacionado B de Meloxicam USP a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver en 5 mL de metanol y 0,3 mL de hidróxido de sodio 1 N, diluir a volumen con metanol y mezclar.
Solución estándar—Transferir aproximadamente 12 mg de ER Meloxicam USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 20 mL, disolver en 5 mL de metanol y 0,3 mL de hidróxido de sodio 1 N, diluir a volumen con metanol y mezclar. Transferir 2 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con metanol y mezclar.
Solución de prueba—Transferir aproximadamente 80 mg de Meloxicam, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 20 mL, disolver en 5 mL de metanol y 0,3 mL de hidróxido de sodio 1 N, diluir a volumen con metanol y mezclar.
Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de longitud de onda UV variable o múltiple y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. Mantener la temperatura de la columna a 45°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y las longitudes de onda de detección son 260 nm y 350 nm. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0–2	60	40	isocrática
2–10	60→30	40→70	gradiente lineal
10–15	30	70	isocrática
15–15,1	30→60	70→40	gradiente lineal
15,1–18	60	40	equilibrio

Injectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos, basándose en el pico de meloxicam, aproximadamente a 7 minutos, se enumeran en la *Tabla 1*. A 350 nm, la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado A de meloxicam y meloxicam no es menor de 3,0; a 260 nm, la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado B de meloxicam y meloxicam no es menor de 3,0. Injectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 10%.
Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas a las longitudes

Tabla 1

Compuesto	Tiempo de Retención Relativo Aproximado	Longitud de onda (nm)	Factor de Respuesta Relativa (F)	Límite (p/p, %)
Etiléster del ácido 4-hidroxi-2-metil-2 <i>H</i> -1,2-benzotiazina-3-carboxílico 1,1-dióxido (compuesto relacionado A de meloxicam)	1,4	350	0,5	0,1
2-Amino-5-metil-tiazol (compuesto relacionado B de meloxicam)	0,4	260	1,0	0,1
4-Hidroxi-2-metil- <i>N</i> -(<i>N</i> '-metil-5-metil-2-tiazolil)-2 <i>H</i> -1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido	1,9	350	1,0	0,05
4-Hidroxi-2-metil- <i>N</i> -(<i>N</i> '-etil-5-metil-2-tiazolil)-2 <i>H</i> -1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido	1,7	350	1,0	0,05
Impureza individual desconocida	—	260/350	1,0	0,1
Impurezas totales	—	—	—	0,3

de onda de detección de 260 nm y 350 nm, y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Meloxicam tomada, por la fórmula:

$$100(C_s / C_T)(1 / F)(r_U / r_S)$$

en donde C_s es la concentración, en mg por mL, de ER Meloxicam USP en la *Solución estándar*; C_T es la concentración, en mg por mL, de Meloxicam en la *Solución de prueba*; F es el factor de respuesta relativa (ver la *Tabla 1*); r_U es la respuesta del pico para cada impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y r_S es la respuesta del pico de meloxicam a 350 nm obtenido a partir de la *Solución estándar*. [NOTA—Para las impurezas especificadas, calcular el contenido porcentual de cada impureza usando las respuestas de los picos de la *Solución de prueba* registrados a la longitud de onda de detección indicada en la *Tabla 1*. Para una impureza desconocida, calcular el contenido porcentual usando las respuestas de los picos registrados a la longitud de onda que produce la mayor respuesta.]

PRUEBA 2—Si un artículo cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con los requisitos de la *Prueba 2* en *Compuestos relacionados*.

Solución A y *Solución B*—Preparar según se indica en la *Prueba 1*.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y de *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Diluyente A: una mezcla de *Diluyente B* e hidróxido de sodio 0,4 N (50:3).

Diluyente B: una mezcla de agua y metanol (60:40).

Solución madre del estándar 1—Preparar una solución con una concentración conocida de aproximadamente 50 µg por mL de ER Meloxicam USP en *Diluyente A*. Transferir 2 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con *Diluyente B* y mezclar.

Solución madre del estándar 2—Transferir aproximadamente 5 mg de ER Compuesto Relacionado B de Meloxicam USP, 5 mg de ER Compuesto Relacionado C de Meloxicam USP y 5 mg de ER Compuesto Relacionado D de Meloxicam USP a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 6 mL de hidróxido de sodio 0,4 N y someter a ultrasonido durante aproximadamente 2 minutos. Agregar 40 mL de metanol a la solución resultante, someter a ultrasonido durante aproximadamente 2 minutos, diluir a volumen con agua y mezclar.

Solución estándar—Transferir 1 mL de *Solución madre del estándar 1* y 1 mL de *Solución madre del estándar 2* a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con *Diluyente B* y mezclar.

Solución madre de aptitud del sistema—Preparar una solución que contenga aproximadamente 2 mg por mL de ER Meloxicam USP en *Diluyente A*.

Solución de aptitud del sistema—Transferir 5 mL de la *Solución madre de aptitud del sistema* y 1 mL de la *Solución madre del estándar 2* a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con *Diluyente B* y mezclar.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 20 mg de Meloxicam, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 20 mL, disolver en 10 mL de *Diluyente A*, diluir a volumen con *Diluyente B* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de longitud de onda UV variable o múltiple y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. Mantener la temperatura de la columna a 45°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto y las longitudes de onda de detección son 260 nm y 350 nm. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Elución
0–25	45	55	isocrática
25–30	45→30	55→70	gradiente lineal
30–40	30	70	isocrática
40–45	30→45	70→55	gradiente lineal
45–50	45	55	equilibrio

Injectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos, basándose en el pico de meloxicam, aproximadamente a 5 minutos, se enumeran en la *Tabla 2*; y la resolución, R , entre el compuesto relacionado D de meloxicam y meloxicam a 350 nm no es menor de 5,0. Injectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 5,0% para el compuesto relacionado C de meloxicam y el compuesto relacionado D de meloxicam a 350 nm; y no es más de 5,0% para el compuesto relacionado B de meloxicam a 260 nm.

Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas a las longitudes de onda de detección de 260 nm y 350 nm, y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Meloxicam tomada, por la fórmula:

$$100(C_s / C_T)(r_U / r_S)$$

en donde C_s es la concentración, en mg por mL, de ER Compuesto Relacionado USP en la *Solución estándar* [NOTA—Usar la concentración de ER Meloxicam USP para impurezas desconocidas.]; C_T es la concentración, en mg por mL, de Meloxicam en la *Solución de prueba*; r_U es la respuesta del pico de cada impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y r_S es la respuesta del pico del compuesto relacionado correspondiente obtenido a partir de la *Solución estándar*. [NOTA—Usar la respuesta del pico de ER Meloxicam USP para las impurezas desconocidas; para las impurezas especificadas, calcular el contenido porcentual de cada impureza con las respuestas de los picos de la *Solución de prueba* registrados a la longitud de onda de detección indicada en la *Tabla 2*. Para una impureza desconocida, calcular el contenido porcentual con las respuestas de los picos registrados a la longitud de onda que produce la mayor respuesta.]

Valoración—

Solución amortiguadora: una mezcla de una solución de acetato de amonio al 0,1% (p/v) ajustada con solución de amoníaco al 10% a un pH de 9,1.

Tabla 2

Compuesto	Tiempo de Retención Relativo Aproximado	Longitud de onda (nm)	Límite (p/p, %)
2-Amino-5-metil-tiazol (compuesto relacionado B de meloxicam)	0,8	260	0,1
Isopropil-4-hidroxil-2-metil-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxilato-1,1-dióxido (compuesto relacionado C de meloxicam)	3,2	350	0,1
4-Metoxi-2-metil-N-(5-metil-1,3-tiazol-2il)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido (compuesto relacionado D de meloxicam)	2,4	350	0,1
Impureza individual desconocida	—	260/350	0,1
Impurezas totales	—	—	0,3

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora* y metanol (58:42). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 4 mg de ER Meloxicam USP y aproximadamente 4 mg de ER Compuesto Relacionado A de Meloxicam USP a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver en 25 mL de metanol y 0,1 mL de hidróxido de sodio 1N, diluir a volumen con agua y mezclar.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 20 mg de ER Meloxicam USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver en 50 mL de metanol y 0,2 mL de hidróxido de sodio 1N, diluir a volumen con agua y mezclar.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 20 mg de Meloxicam, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver en 50 mL de metanol y 0,2 mL de hidróxido de sodio 1N, diluir a volumen con agua y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 360 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L1. Mantener la temperatura de la columna a 45°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,7 para el compuesto relacionado A y 1,0 para meloxicam; la resolución, *R*, entre los dos picos no es menor de 3,0; el factor de asimetría para el pico de meloxicam no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas, calculada para el pico de meloxicam, no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas del pico de meloxicam. Calcular la cantidad, en mg, de C₁₄H₁₃N₃O₄S₂ en la porción de Meloxicam tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Meloxicam USP en la *Preparación estándar*; y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Metildopa, Suspensión Oral

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—ER *Metildopa USP*. ■1S (USP30)

Eliminar lo siguiente:

■**Límite del producto de reacción de metildopa-glucosa** [A DETERMINAR SI HUBIERA SACAROSA PRESENTE]—

Fase móvil—Preparar según se indica en *Valoración*.

Solución A—Disolver una cantidad adecuada, pesada con exactitud, de ER Producto de Reacción de Metildopa-glucosa USP en ácido sulfúrico 0,1N para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,45 mg por mL.

Solución estándar—Transferir a un matraz volumétrico de 25 mL aproximadamente 25 mg de ER Metildopa USP, pesados con exactitud, agregar 1,0 mL de *Solución A*, diluir a volumen con ácido sulfúrico 0,1N y mezclar. La *Solución estándar* tiene una concentración conocida de aproximadamente 18 µg de ER Producto de Reacción de Metildopa-glucosa USP por mL.

Solución de prueba—Preparar según se indica para la *Preparación de valoración* en *Valoración*.

Sistema cromatográfico—Utilizar el sistema descrito en *Sistema cromatográfico* en la *Valoración*. Los tiempos de retención relativos de metildopa y del producto de reacción de metildopa-glucosa son

aproximadamente 1,0 y 0,8, respectivamente. Cromatografiar tres inyecciones repetidas de la *Solución estándar*: el factor de resolución, *R*, entre metildopa y el producto de reacción de metildopa-glucosa no es menor de 2,0. Las desviaciones estándar relativas para tres inyecciones repetidas de la *Solución estándar* no son más de 2,0% y 3,0% para metildopa y para el producto de reacción de metildopa-glucosa, respectivamente.

Procedimiento—Proceder según se indica en el *Procedimiento* en la *Valoración*. Calcular la cantidad, en µg, de metildopa equivalente al producto de reacción de metildopa-glucosa en cada mL de la Suspensión Oral tomada, por la fórmula:

$$(211,22/373,35)(250)(C/W)(r_U/r_S)$$

en donde 211,22 y 373,35 son los pesos moleculares de metildopa anhidra y del producto de reacción de metildopa-glucosa, respectivamente; *C* es la concentración, en µg por mL, de ER Producto de Reacción de Metildopa-glucosa USP en la *Solución estándar*; *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos del producto de reacción de metildopa-glucosa obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y de la *Solución estándar*, respectivamente; y los otros términos son los que se definen en la *Valoración*. El límite es de 10,0%, basado en el contenido de metildopa de la Suspensión Oral según se determina en la *Valoración*. ■1S (USP30)

Metilprednisolona

Cambio en la redacción:

Pureza cromatográfica—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de agua, tetrahidrofurano, dimetil sulfoxido y butanol (149:40:10:1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de dilución—Preparar una mezcla filtrada de agua, tetrahidrofurano y ácido acético glacial (72:25:3).

Solución estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Metilprednisolona USP en *Solución de dilución*. Diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Solución de dilución* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,01 mg por mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 25 mg de Metilprednisolona, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y diluir a volumen con *Solución de dilución*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 20 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 800 platos teóricos; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 5,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Metilprednisolona tomada, por la fórmula:

$$25 \times 100(C/W)(r_i/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Metilprednisolona USP en la *Solución estándar*; *W* es el peso, en mg, de la muestra tomada para preparar la *Solución de prueba*; *r_i* es la respuesta del pico para cada impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*; y *r_S* es la respuesta del pico para metilprednisolona en la *Solución estándar*. ■1S (USP30) no se encuentra más de 1,0% de cualquier impureza individual y no se encuentra más de 2,0% de impurezas totales.

Mitoxantrona, Inyección

Cambio en la redacción:

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases monodosis o multidosis, \blacksquare_{1S} (USP30) preferentemente de vidrio Tipo I.

Tartrato de Morantel

Cambio en la redacción:

pH (791): entre 2,8 y $\blacksquare_{3,9}$, \blacksquare_{1S} (USP30)

Solución—Disolver y diluir 0,25 g a 25,0 mL en agua exenta de dióxido de carbono.

Agregar lo siguiente:

■Mupirocina, Crema

» La Crema de Mupirocina contiene una cantidad de Mupirocina Cálcica equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 120,0 por ciento de la cantidad declarada de mupirocina ($C_{26}H_{44}O_9$). Puede contener uno o más amortiguadores, dispersantes y conservantes adecuados.

Envasado y almacenamiento—Conservar en tubos depresibles o en envases bien cerrados. Almacenar a 25°, con excursiones permitidas entre 15° y 30°.

Etiquetado—Etiquetar indicando que contiene Mupirocina Cálcica y su contenido equivalente de mupirocina.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Mupirocina de Litio USP*.

Identificación—El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Llenado mínimo (755): cumple con los requisitos.

pH (791): entre 6,0 y 8,0.

Compuestos relacionados—

Acetato de amonio 0,1 M, Solución A, Solución B, Fase móvil, Solución amortiguadora de fosfato de pH 6,3 y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución de acetato de sodio—Agregar 5,8 mL de ácido acético glacial a 900 mL de agua, ajustar con hidróxido de sodio SR a un pH de 4,0, diluir con agua hasta 1000 mL y mezclar.

Solución de tetrahidrofurano—Mezclar 750 mL de tetrahidrofurano y 250 mL de agua.

Solución de acetato de sodio y tetrahidrofurano—Preparar una mezcla de *Solución de acetato de sodio* y *Solución de tetrahidrofurano* (50 : 50).

Solución estándar—Disolver una porción, pesada con exactitud, de ER Mupirocina de Litio USP en una *Solución amortiguadora de fosfato de pH 6,3*. Diluir cuantitativamente un volumen, medido con exactitud, de esta solución para obtener una solución que contenga 0,1 mg de mupirocina por mL.

Solución madre de prueba—Transferir a un tubo de centrifuga con tapa de rosca una cantidad de Crema, pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 50 mg de mupirocina. Agregar 5,0 mL de *Solución de tetrahidrofurano*, tapar y dispersar la Crema mezclando y agitando en un mezclador por vórtice. Agregar 5,0 mL de *Solución de acetato de sodio*, tapar y mezclar. Centrifugar durante aproximadamente 15 minutos. Retirar la capa inferior del tubo, pasarla a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,5 μ m o menor y usar el filtrado.

Solución de prueba—Transferir 1,0 mL de la *Solución madre de prueba* a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Solución de acetato de sodio y tetrahidrofurano*, mezclar y pasar a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,5 μ m o menor.

Solución amortiguadora de acetato de pH 4—Transferir aproximadamente 13,6 g de acetato de sodio a un matraz volumétrico de 1000 mL y disolver en aproximadamente 900 mL de agua. Ajustar con ácido acético glacial a un pH de 4,0 y diluir a volumen con agua.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma, según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención típicos son de aproximadamente 16 minutos para el ácido pseudomónico D y 21 minutos para la mupirocina; los tiempos de retención relativos son 0,36 para el ácido pseudomónico F, 0,6 para el producto de degradación A de mupirocina, 0,63 para el producto de degradación B de mupirocina, 0,74 para el ácido pseudomónico D, 0,9 para el ácido pseudomónico B, 1,0 para la mupirocina, 1,15 para el compuesto relacionado A de mupirocina, 1,23 para el compuesto relacionado B de mupirocina, 2,03 para el ácido pseudomónico C, y entre 2,15 y 2,33 para el ácido pseudomónico E; la resolución, *R*, entre el ácido pseudomónico D y la mupirocina no es menor de 3; la eficiencia de la columna para el pico de mupirocina no es menos de 7000 platos teóricos; el factor de asimetría para el pico de mupirocina no es mayor de 1,75; y la desviación estándar relativa del pico de mupirocina para inyecciones repetidas no es más de 2%.

Procedimiento—[NOTA—Asegurarse de que las soluciones amortiguadoras, los dispersantes o los conservantes de la formulación no interfieran con la cuantificación de las impurezas ni de los productos de degradación.] Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ L) de la *Solución madre de prueba* y de la *Solución de prueba*, y medir la respuesta de todos los picos que no correspondan a soluciones amortiguadoras, dispersantes o conservantes. Calcular el porcentaje de cada compuesto relacionado y producto de degradación en relación con la mupirocina en la porción de Crema tomada, por la fórmula:

$$2(r_i/r_m)$$

en donde r_i es la respuesta del pico para cada compuesto relacionado o producto de degradación obtenido a partir de la *Solución madre de prueba*; y r_m es la respuesta del pico de mupirocina obtenido a partir de la *Solución de prueba*: no se encuentra más de 3,0% de ácido pseudomónico D; no se encuentra más de 8,5% de producto de degradación A de mupirocina; no se encuentra más de 16% de producto de degradación B de mupirocina; no se encuentra más de 1,2% de cualquier otra impureza individual o producto de degradación; y no se encuentra más de 30% de impurezas y productos de degradación totales.

Valoración—

Acetato de amonio 0,1 M—Preparar según se indica en *Valoración en Mupirocina Cálcica*.

Solución A—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Acetato de amonio 0,1 M* y tetrahidrofurano (75 : 25).

Solución B—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Acetato de amonio 0,1 M* y tetrahidrofurano (70 : 30).

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A* y *Solución B*, según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución amortiguadora de fosfato de pH 6,3—Disolver 69 g de fosfato monobásico de sodio en 800 mL de agua, ajustar con hidróxido de sodio SR a un pH de 6,3, diluir con agua a 1000 mL y mezclar.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 21 mg de ER of Mupirocina de Litio USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 200 mL, disolver y diluir a volumen con *Solución amortiguadora de fosfato de pH 6,3*.

Preparación de valoración—Transferir una cantidad de Crema pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 10 mg de mupirocina, a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 50 mL de *Solución amortiguadora de fosfato de pH 6,3* y 25 mL de tetrahidrofurano. Tapar el matraz, mezclar en un mezclador por vórtice y agitar durante un periodo de 1 a 3 minutos. Diluir a volumen con *Solución amortiguadora de fosfato de pH 6,3*. Dejar en reposo hasta que se separe la capa de aceite, luego diluir a volumen la capa acuosa con *Solución amortiguadora de fosfato de pH 6,3*. Repetir 2 ó 3 veces hasta que se haya separado la mayor cantidad posible de la capa de aceite. Después de la dilución final, pasar la solución final (capa inferior) a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,5 µm o menor.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 240 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L7 de 7 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Mantener la columna a una temperatura constante hasta 35°. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0	100	0	equilibrio
0–6	100	0	isocrática
6–35	100→0	0→100	gradiente lineal
35–55	0	100	isocrática
55–55,01	0→100	100→0	inmediata
55,01–65	100	0	isocrática

Injectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma, según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención típicos son aproximadamente 16 minutos para el ácido pseudomónico D y 21 minutos para la mupirocina; la resolución, *R*, entre el ácido pseudomónico D y la mupirocina no es menor de 3; la eficiencia de la columna para el pico de mupirocina no es menos de 7000 platos teóricos; el factor de asimetría para el pico de mupirocina no es mayor de 1,75; y la desviación estándar relativa del pico de mupirocina para inyecciones repetidas no es más de 2%.

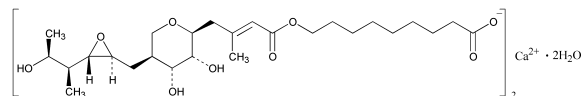
Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos principales. Calcular el porcentaje de peso de mupirocina en la porción de Crema tomada, por la fórmula:

$$0,05E (M_S / M_U)(r_U / r_S)$$

en donde *M_S* es el peso, en mg, de ER Mupirocina de Litio USP tomado para preparar la *Preparación estándar*; *E* es el equivalente designado de mupirocina, en µg, de mupirocina en cada mg de ER Mupirocina de Litio USP; *M_U* es el peso, en mg, de Crema tomado para preparar la *Preparación de valoración*; y *r_U* y *r_S* son las áreas de los picos de mupirocina obtenidas a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■ Mupirocina Cálcica



C₅₂H₈₆CaO₁₈ · 2H₂O 1075,34

Nonanoic acid, 9-[[[3-Methyl-1-oxo-4-[tetrahydro-3,4-dihydroxy-5-[[[3-(2-hydroxy-1-methylpropyl)oxiranyl]methyl]-2H-pyran-2-yl]-2-butenyl]oxy-, calcium salt (2:1), dihydrate, [2S-[2α(*E*),3β,4β,5α[2*R**,3*R**(1*R**,2*R**)]]]-

Ácido (α*E*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-5-[(2*S*,3*S*,4*S*,5*S*)-2,3-epoxi-5-hidroxi-4-metilhexil]tetrahydro-3,4-dihidroxi-β-metil-2*H*-piran-2-crotonico, éster con ácido 9-hidroxinonanoico, sal cálcica (2:1), dihidrato [115074-43-6].

» La Mupirocina Cálcica contiene el equivalente a no menos de 865 µg y no más de 936 µg de mupirocina (C₂₆H₄₄O₉) por mg.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a 25°, con excursiones permitidas entre 15° y 30°.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Mupirocina Cálcica USP*. *ER Mupirocina de Litio USP*.

Identificación—

A: *Absorción en el Infrarrojo* (197M)—[NOTA—No secar ni triturar extensivamente.]

B: *Absorción en el Ultravioleta* (197U)—

Solución: 20 µg por mL.

Medio: metanol.

C: Al humedecer con ácido clorhídrico, cumple con los requisitos de la prueba a la llama para *Calcio* (191).

Rotación específica (781S): entre –16° y –20°.

Solución de prueba: 50 mg por mL, en metanol.

Agua, Método I (921): no menos de 3,0% y no más de 4,5%.

Cloruros (221)—Disolver 50 mg en una mezcla de 1 mL de ácido nítrico 2 N y 15 mL de metanol. Agregar 1 mL de nitrato de plata SR: la turbidez no excede la producida por 0,70 mL de ácido clorhídrico 0,020 N (0,5%).

Compuestos relacionados—

Acetato de amonio 0,1 M—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Acetato de amonio 0,1 M* y tetrahidrofurano (70:30). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución amortiguadora de acetato de pH 4—Transferir aproximadamente 13,6 g de acetato de sodio a un matraz volumétrico de 1000 mL y disolver en aproximadamente 900 mL de agua. Ajustar con ácido acético glacial a un pH de 4,0 y diluir a volumen con agua.

Diluyente—Preparar una mezcla de *Solución amortiguadora de acetato de pH 4* y metanol (1:1).

Solución estándar—Transferir aproximadamente 25 mg de ER Mupirocina de Litio USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 200 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente*, y mezclar.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 50 mg de Mupirocina Cálcica, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente*, y mezclar.

Solución de resolución—Ajustar 10 mL de la *Solución estándar* con ácido clorhídrico 6 N a un pH de 2,0, dejar en reposo durante 20 horas y ajustar con hidróxido de sodio 5 N a un pH de 4,0.

Sistema cromatográfico (621)—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 240 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L7 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Injectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre el

segundo de los dos picos correspondiente a los productos de hidrólisis y el pico correspondiente a la mupirocina no es menor de 7,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,75 (6 minutos) para el ácido pseudomónico D y 1,0 (14 minutos) para mupirocina; la eficiencia de la columna para el pico de mupirocina no es menor de 3000 platos teóricos; el factor de asimetría para el pico de mupirocina no es mayor de 2; y la desviación estándar relativa del pico de mupirocina para inyecciones repetidas no es más de 5%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba* y medir las áreas de todos los picos. Calcular el porcentaje de cada compuesto relacionado en la porción de Mupirocina Cálcula tomada, por la fórmula:

$$(E/200)(W_s/W_u)(r_i/r_s)$$

en donde *E* es el equivalente de mupirocina, en µg por mg, de ER Mupirocina de Litio USP; *W_s* es el peso, en mg, de ER Mupirocina de Litio USP, tomado para preparar la *Solución estándar*; *W_u* es el peso, en mg, de Mupirocina Cálcula tomada para preparar la *Solución de prueba*; *r_i* es el área del pico para cualquier impureza obtenida a partir de la *Solución de prueba*; y *r_s* es el área del pico para mupirocina obtenida a partir de la *Solución estándar*: el área de cualquier pico correspondiente al ácido pseudomónico D no es más de 2,5%; el área de cualquier pico, excluyendo el pico de mupirocina y cualquier pico correspondiente al ácido pseudomónico D, no es más de 1%; y la suma de las áreas de todos los picos, excluyendo el pico principal, no es más de 4,5%. Descartar cualquier pico con un área menor de 0,05 veces el área del pico de mupirocina en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar*.

Valoración—

Acetato de amonio 0,1 M—Transferir aproximadamente 7,7 g de acetato de amonio a un matraz volumétrico de 1000 mL, disolver en aproximadamente 900 mL de agua, ajustar con ácido acético glacial a pH de 5,7 y diluir a volumen con agua.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Acetato de amonio 0,1 M* y tetrahidrofurano (68 : 32). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 25 mg de ER Mupirocina de Litio USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 200 mL, disolver en 5 mL de metanol, diluir a volumen con *Acetato de amonio 0,1 M* y mezclar.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 25 mg de Mupirocina Cálcula, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 200 mL, disolver en 5 mL de metanol, diluir a volumen con *Acetato de amonio 0,1 M* y mezclar.

Solución de resolución—Ajustar 10 mL de la *Preparación estándar* con ácido clorhídrico 6N a un pH de 2,0 y dejar en reposo durante 20 horas.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector a 230 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L7 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, del segundo de los dos picos correspondiente a los productos de hidrólisis y el pico correspondiente a mupirocina no es menor de 7,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 1,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración* y medir las áreas de los picos principales. Calcular la cantidad, en µg, de mupirocina (*C₂₆H₄₄O₉*) en cada mg de Mupirocina Cálcula tomada, por la fórmula:

$$E(M_s/M_u)(r_u/r_s)$$

en donde *E* es el equivalente designado de mupirocina, en µg, de mupirocina en cada mg de ER Mupirocina de Litio USP; *M_s* es el peso, en mg, de ER Mupirocina de Litio USP tomado para preparar la *Preparación estándar*; *M_u* es el peso, en mg, de Mupirocina Cálcula tomada para preparar la *Preparación de valoración*; y *r_u* y *r_s* son las áreas de los picos de mupirocina obtenidas a partir de la

Preparación de valoración y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■^{1S} (USP30)

Clorhidrato de Nefazodona

Agregar lo siguiente:

■ Compuestos relacionados—

Diluyente—Preparar una solución de agua y acetonitrilo (50 : 50).

Solución A—Disolver 0,77 g de acetato de amonio en aproximadamente 950 mL de agua. Ajustar con trietilamina a un pH de 7,10 ± 0,05. Diluir con agua hasta 1 L. Filtrar y degasificar.

Solución B—Usar acetonitrilo filtrado y degasificado.

Fase móvil—Usar mezclas variables de la *Solución A* y la *Solución B* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución madre del estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Nefazodona USP en *Diluyente* para obtener una solución que contenga 0,1 mg de clorhidrato de nefazodona por mL.

Solución madre del compuesto relacionado A de nefazodona y Solución madre del compuesto relacionado B de nefazodona—Transferir aproximadamente 20 mg de ER Compuesto Relacionado A de Nefazodona USP y 20 mg de ER Compuesto Relacionado B de Nefazodona USP, pesados con exactitud, a sendos matraces volumétricos de 200 mL. Disolver y diluir a volumen con *Diluyente*.

Solución de resolución—Pipetear 5,0 mL de la *Solución madre del compuesto relacionado A de nefazodona* y 5,0 mL de la *Solución madre del compuesto relacionado B de nefazodona* y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL. Diluir a volumen con *Solución madre del estándar* y mezclar. Esta solución contiene aproximadamente 90 µg de clorhidrato de nefazodona por mL y aproximadamente 5 µg por mL del compuesto relacionado A de nefazodona y del compuesto relacionado B de nefazodona.

Solución estándar—Pipetear 2,0 mL de la *Solución madre del estándar*, 2,0 mL de la *Solución madre del compuesto relacionado A de nefazodona* y 2,0 mL de la *Solución madre del compuesto relacionado B de nefazodona* y transferir a un matraz volumétrico de 200 mL. Diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar bien para obtener una concentración final de 1 µg por mL de clorhidrato de nefazodona, del compuesto relacionado A de nefazodona y del compuesto relacionado B de nefazodona.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 100 mg de Clorhidrato de Nefazodona, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 250 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,7 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0	50	50	equilibrio
0–10	50→45	50→55	gradiente lineal
10–16	45→35	55→65	gradiente lineal
16–25	35	65	isocrática
25–26	35→50	65→50	gradiente lineal
26–35	50	50	reequilibrio

Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado A de nefazodona y clorhidrato de nefazodona no es menor de 4,0 y no es menor de 1,5 entre clorhidrato de nefazodona y el compuesto relacionado B de nefazodona. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y medir las respuestas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 5,0% para el compuesto relacionado A de

nefazodona y el compuesto relacionado B de nefazodona. [NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 1,2 para el compuesto relacionado A de nefazodona, 1,0 para clorhidrato de nefazodona y 0,94 para el compuesto relacionado B de nefazodona.]

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada compuesto relacionado de nefazodona en la porción de Clorhidrato de Nefazodona tomada, por la fórmula:

$$100(C_S/C_T)(r_U/r_S)$$

en donde C_S es la concentración, en mg por mL, del Estándar de Referencia USP pertinente en la *Solución estándar*; C_T es la concentración de Clorhidrato de Nefazodona, en mg por mL, en la *Solución de prueba*; y r_U y r_S son las áreas de los picos del compuesto relacionado correspondiente obtenidas a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentra más de 0,2% del compuesto relacionado A de nefazodona; no se encuentra más de 0,2% del compuesto relacionado B de nefazodona; no se encuentra más de 0,1% de cualquier impureza desconocida; y no se encuentra más de 0,5% de impurezas totales. [NOTA—Usar el área del pico para clorhidrato de nefazodona en la *Solución estándar* como r_S para calcular cualquier impureza desconocida.] ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Clorhidrato de Nefazodona, Tabletas

» Las Tabletas de Clorhidrato de Nefazodona contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de clorhidrato de nefazodona ($C_{25}H_{32}ClN_5O_2 \cdot HCl$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP <11>—*ER Clorhidrato de Nefazodona USP*. *ER Compuesto Relacionado A de Nefazodona USP*. *ER Compuesto Relacionado B de Nefazodona USP*.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo <197K>.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Disolución <711>—

Medio: ácido clorhídrico 0,1 N; 900 mL, desgasificado.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempo: 30 minutos.

Solución madre del estándar—Transferir aproximadamente 70 mg de ER Clorhidrato de Nefazodona USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar 2,5 mL de metanol, diluir a volumen con *Medio* y mezclar.

Solución estándar—Diluir la *Solución madre del estándar* con *Medio* de tal modo que la concentración final sea similar a la esperada en la *Solución de prueba*.

Solución de prueba—Usar porciones de la solución en análisis pasadas a través de un filtro de PVDF con un tamaño de poro de 0,45 µm, descartando los primeros 5 mL.

Procedimiento—Determinar el porcentaje de la cantidad declarada de clorhidrato de nefazodona disuelta empleando absorción UV, con un espectrofotómetro adecuado, a la longitud de onda de máxima

absorbancia aproximadamente a 246 nm, en la *Solución de prueba*, en comparación con la *Solución estándar*, usando *Medio* como blanco. Calcular el porcentaje disuelto de clorhidrato de nefazodona ($C_{25}H_{32}ClN_5O_2 \cdot HCl$), por la fórmula:

$$\frac{A_U \times C_S \times 900 \times 100}{A_S \times LC}$$

en donde A_U y A_S son las absorbancias obtenidas a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente; C_S es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Nefazodona USP en la *Solución estándar*; 900 es el volumen, en mL, de *Medio*; 100 es el factor de conversión a porcentaje; y LC es la cantidad declarada, en mg, por tableta.

Tolerancias—No menos de 75% (Q) de la cantidad declarada de $C_{25}H_{32}ClN_5O_2 \cdot HCl$ se disuelve en 30 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación <905>: cumplen con los requisitos.

Compuestos relacionados—

Ácido acético diluido, *Solución amortiguadora* y *Fase móvil*—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución madre del compuesto relacionado A de nefazodona—Preparar una solución de ER Compuesto Relacionado A de Nefazodona USP en *Fase móvil* con una concentración conocida de aproximadamente 80 µg por mL.

Solución madre del compuesto relacionado B de nefazodona—Preparar una solución de ER Compuesto Relacionado B de Nefazodona USP en *Fase móvil* con una concentración conocida de aproximadamente 80 µg por mL.

Solución de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 10 mg de ER Clorhidrato de Nefazodona USP a un matraz volumétrico de 10 mL. Agregar 2,0 mL de *Solución madre del compuesto relacionado A de nefazodona* y 2,0 mL de *Solución madre del compuesto relacionado B de nefazodona* y mezclar para disolver el clorhidrato de nefazodona. Diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Solución estándar—Usar la *Preparación estándar*, preparada según se indica en la *Valoración*.

Solución de prueba—Usar la *Preparación madre de valoración*, preparada según se indica en la *Valoración*.

Sistema cromatográfico—Preparar según se indica en la *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar las respuestas de los picos según se indica en el *Procedimiento*. Identificar los picos mediante los tiempos de retención relativos proporcionados en la *Tabla 1*: la resolución, R , entre el compuesto relacionado A de nefazodona y clorhidrato de nefazodona no es menor de 2,0; y la resolución, R , entre el compuesto relacionado B de nefazodona y clorhidrato de nefazodona no es menor de 1,5. [NOTA—Los tiempos de retención relativos aproximados se proporcionan en la *Tabla 1* únicamente con fines informativos.]

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de compuestos relacionados individuales de la nefazodona en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(r_U/r_S)(C_S/C_T)(1/F)$$

en donde r_U es la respuesta del pico individual para cada compuesto relacionado de la nefazodona obtenido a partir de la *Solución de prueba*; r_S es la respuesta del pico correspondiente en la *Solución estándar*; C_S y C_T son las concentraciones, en mg por mL, de clorhidrato de nefazodona en la *Solución estándar* y la *Solución de prueba*, respectivamente; y F es el factor de respuesta relativa

obtenido a partir de la *Tabla 1*. Los requisitos del compuesto relacionado se indican en la *Tabla 1*.

Tabla 1

Compuesto Relacionado	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta Relativa (F)	Límite (%)
Compuesto relacionado A de nefazodona	1,4	1,2	0,2
Compuesto relacionado B de nefazodona	0,9	1,0	0,2
Cualquier impureza individual desconocida	—	1,0	0,2 cada una
Total conocidas y desconocidas	—	—	0,5

Valoración—

Ácido acético diluido—Preparar una mezcla de ácido acético y agua (1 : 1).

Solución amortiguadora—Disolver 0,77 g de acetato de amonio en 1 L de agua. Agregar 1,0 mL de trietilamina y mezclar bien. Ajustar con **Ácido acético diluido** a un pH de $7,10 \pm 0,05$ y mezclar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y **Solución amortiguadora** (58 : 42). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Preparar una solución de ER Clorhidrato de Nefazodona USP en **Fase móvil** con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL.

Preparación madre de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente a aproximadamente 250 mg de clorhidrato de nefazodona, basada en la cantidad declarada, a un matraz volumétrico de 250 mL, agregar aproximadamente 125 mL de **Fase móvil** y someter a ultrasonido durante aproximadamente 10 minutos agitando ocasionalmente. Diluir a volumen con **Fase móvil** y mezclar para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 1 mg de clorhidrato de nefazodona por mL. Pasar una porción de esta solución a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm o menor y usar el filtrado, que tiene una concentración de aproximadamente 1 mg de clorhidrato de nefazodona por mL.

Preparación de valoración—Transferir 5,0 mL de la **Preparación madre de valoración** a un matraz volumétrico de 50 mL. Diluir a volumen con **Fase móvil** y mezclar para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 0,1 mg de clorhidrato de nefazodona por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 250 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 30°. Inyectar la **Preparación estándar** y registrar el cromatograma según se indica en el **Procedimiento**: el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas es no más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la **Preparación estándar** y de la **Preparación de valoración**, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en porcentaje declarado, de clorhidrato de nefazodona ($C_{23}H_{33}ClN_3O_2 \cdot HCl$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(C_S / C_U)(r_U / r_S)$$

en donde C_S y C_U son las concentraciones, en mg por mL, de clorhidrato de nefazodona en la **Preparación estándar** y la **Preparación de valoración**, respectivamente; y r_U y r_S son las áreas de los picos obtenidas a partir de la **Preparación de valoración** y la **Preparación estándar**, respectivamente. ■1S (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Nevirapina, Tabletas

» Las Tabletas de Nevirapina contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de nevirapina ($C_{15}H_{14}N_4O$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados. Almacenar a 25°, con excursiones permitidas entre 15° y 30°.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Nevirapina Anhidra USP*. *ER Compuesto Relacionado A de Nevirapina USP*.

Identificación—

A: *Absorción en el Infrarrojo* (197K)—

Muestra de prueba—Transferir una porción de Tabletas pulverizadas, equivalente a 25 mg de nevirapina, a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver en 10 mL de cloruro de metileno. Agitar la solución por rotación suave durante aproximadamente de 30 a 60 segundos y pasarla a través de un embudo para filtración al vacío de vidrio sinterizado de porosidad media. Con una jeringa de vidrio, pasar el filtrado a través de un filtro de teflón con un tamaño de poro de 0,45 µm. Secar el extracto a una temperatura de 105° durante un mínimo de 1 hora.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la **Preparación de valoración** se corresponde con el del cromatograma de la **Preparación estándar**, según se obtienen en la **Valoración**.

Disolución (711)—

Medio: solución amortiguadora de fosfato 0,1 M de pH de 2,0, preparada transfiriendo 3,9 mL de ácido fosfórico concentrado y 5,73 g de fosfato monobásico de sodio monohidrato a un matraz volumétrico de 1 L, disolviendo y diluyendo a volumen con agua, y si fuera necesario, ajustando con ácido fosfórico a un pH de $2,0 \pm 0,02$; 900 mL.

Aparato 2: 50 rpm. Usar únicamente paletas de acero inoxidable. No usar paletas recubiertas con politetrafluoroetileno.

Tiempo: 60 minutos.

Determinar la cantidad disuelta de $C_{15}H_{14}N_4O$ empleando el siguiente método.

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

Solución madre del estándar 1—Transferir 27 mg de ER Nevirapina Anhidra USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 500 mL. Agregar 50 mL de alcohol, seguido de 250 mL de **Medio**. Someter a ultrasonido para disolver durante aproximadamente 20 minutos, dejar que se enfríe a temperatura ambiente y diluir a volumen con **Medio**.

Solución madre del estándar 2—Transferir 7 mg de ER Compuesto Relacionado A de Nevirapina USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 250 mL. Agregar aproximadamente 2 mL de **Diluyente**, someter a ultrasonido hasta que se disuelva por completo y diluir a volumen con **Medio**.

Solución estándar—Transferir 25,0 mL de **Solución madre del estándar 1** a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con **Medio** y mezclar bien.

Solución de resolución—Transferir 25,0 mL de **Solución madre del estándar 1** a un matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con **Medio**. Transferir 25,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con **Solución madre del estándar 2** y mezclar bien.

Solución de prueba—Pasar 20 mL de la solución en análisis a través de un filtro de nailon o fibra de vidrio de 0,45 µm, y diluir con **Medio** para obtener una solución con una concentración final de aproximadamente 0,0135 mg de nevirapina por mL.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Determinar la cantidad disuelta de $C_{15}H_{14}N_4O$, por la fórmula:

$$\frac{r_U \times W_S \times D_S \times 900 \times 100}{r_S \times D_U \times LC}$$

en donde r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente; W_S es la cantidad, en mg, de ER Nevirapina Anhidra USP tomada; D_S es el factor de dilución para la *Solución estándar*; 900 es el volumen, en mL, del Medio; 100 es el factor de conversión a porcentaje; D_U es el factor de dilución para la *Solución de prueba*; y LC es la cantidad declarada en mg por Tableta.

Tolerancias—No menos de 75% (Q) de la cantidad declarada de $C_{15}H_{14}N_4O$ se disuelve en 60 minutos.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

Pureza cromatográfica—

Fase móvil, *Diluyente*, *Solución de resolución*, *Solución madre del estándar 1* y *Solución madre del estándar 2*—Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Diluir cuantitativamente la *Solución madre del estándar 1* con *Diluyente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,125 µg de nevirapina por mL.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración* según se obtiene en la *Valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Proceder según se indica en la *Valoración*, excepto que la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Solución estándar* no es más de 5,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas durante al menos 13 minutos y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza/producto de degradación en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$8000(C/W)(A/L)(r_i/r_s)(100)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Nevirapina Anhidra USP en la *Solución estándar*; W es el peso, en mg, de las Tabletas pulverizadas tomado para preparar la *Solución de prueba*; A es el peso promedio, en mg, de cada Tableta; L es la cantidad declarada de nevirapina, en mg, en cada Tableta; r_i es la respuesta del pico obtenido para cada impureza/producto de degradación en la *Solución de prueba*; y r_s es la respuesta del pico para nevirapina en la *Solución estándar*. Descartar todos los picos debidos al disolvente o a los excipientes y todos los picos de impurezas que sean menos de 0,1%. No se encuentra más de 0,1% de cualquier impureza/producto de degradación individual desconocido; y no se encuentra más de 0,2% de impurezas/productos de degradación desconocidos totales.

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de agua y acetonitrilo (77 : 23). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del sistema* en *Cromatografía* (621)).

Diluyente—Preparar una mezcla de alcohol deshidratado y agua (1 : 1).

Solución madre del estándar 1—Transferir aproximadamente 25 mg de ER Nevirapina Anhidra USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 250 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente*.

Solución madre del estándar 2—Transferir aproximadamente 5 mg de ER Compuesto Relacionado A de Nevirapina USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente*.

Preparación estándar—Transferir 25,0 mL de *Solución madre del estándar 1* a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con *Diluyente*. La concentración final es aproximadamente 0,025 mg de nevirapina por mL.

Solución de resolución—Transferir 25,0 mL de *Solución madre del estándar 1* y 25,0 mL de *Solución madre del estándar 2* a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar bien.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente a 200 mg of nevirapina, a un matraz volumétrico de 200 mL y agregar aproximadamente 150 mL de *Diluyente*. Someter a ultrasonido la solución durante aproximadamente 20 minutos y luego agitar durante aproximadamente 20 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. Centrifugar una porción de la solución resultante aproximadamente a 1500 rpm durante aproximadamente 5 minutos. Transferir 5,0 mL del sobrenadante a un matraz volumétrico de 200 mL y diluir a volumen con *Diluyente*. Filtrar y desechar los primeros 2 mL del filtrado.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 214 nm y una columna de 3,9 mm × 15 cm rellena con material L1. Mantener la columna a temperatura ambiente. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* (aproximadamente 20 µL) y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre nevirapina y el compuesto relacionado A de nevirapina no es menor de 3,0. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas para el pico de nevirapina. Calcular la cantidad, en mg, de nevirapina ($C_{15}H_{14}N_4O$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$8000C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Nevirapina Anhidra USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Nimodipino

Cambio en la redacción:

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Solución de prueba* se corresponde con el del cromatograma de la *Solución estándar 1*, según se obtienen en la prueba para ■Compuestos relacionados. ■1S (USP30)

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de agua, metanol y tetrahydrofurano (3 : 1 : 1).

Solución estándar 1—■Transferir una cantidad, pesada con exactitud, de ER Nimodipino USP a un matraz volumétrico adecuado, disolver en un volumen de tetrahydrofurano equivalente aproximadamente a 10% del volumen del matraz volumétrico, y diluir a volumen con *Fase móvil* para obtener una solución que contenga aproximadamente 1,6 mg por mL. Diluir una alícuota de esta solución con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 3,2 µg por mL. ■1S (USP30)

Solución estándar 2—Transferir cantidades, pesadas con exactitud, de ER Nimodipino USP y ER Compuesto Relacionado A de Nimodipino USP a un matraz volumétrico adecuado, disolver en un volumen de tetrahidrofurano equivalente aproximadamente a 10% del volumen del matraz volumétrico, y diluir a volumen con *Fase móvil* para obtener una solución que contenga 0,8 mg por mL de ER Nimodipino USP y de ER Compuesto Relacionado A de Nimodipino USP. Diluir una alícuota de esta solución con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,6 µg por mL de cada uno de los estándares de referencia, ER Nimodipino USP y ER Compuesto Relacionado A de Nimodipino USP. **■_{1S} (USP30)**

■_{1S} (USP30)
Solución de prueba—Transferir aproximadamente 40 mg de Nimodipino, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver en 2,5 mL de tetrahidrofurano, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 235 nm y una columna de 4,6 mm × 12,5 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 40°. Inyectar en el cromatógrafo la **■_{1S} (USP30)** y registrar el cromatograma según se indica en el **Procedimiento**: **■_{1S} (USP30)** la resolución, R , entre el compuesto relacionado A de nimodipino y nimodipino no es menor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. **[NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,9 para el compuesto relacionado A de nimodipino y 1,0 para nimodipino.]** **■_{1S} (USP30)**

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la **Solución estándar 1**, de la **■_{1S} (USP30)** y de la **Solución de prueba**, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. **[NOTA—Registrar el cromatograma de la **Solución de prueba** durante un período de tiempo equivalente a cuatro veces el tiempo de retención de nimodipino.]** **■_{1S} (USP30)** Calcular el porcentaje de compuesto relacionado A de nimodipino en la porción de Nimodipino tomada, por la fórmula:

$$(100/1000)(C_S / C_T)(r_U / r_S)$$

en donde C_S es la concentración, en µg por mL, de ER Compuesto Relacionado A de Nimodipino USP en la **Solución estándar 2**; C_T es la concentración, en mg por mL, de Nimodipino en la **Solución de prueba**; y r_U y r_S son las respuestas de los picos del compuesto relacionado A de nimodipino obtenidos a partir de la **Solución de prueba** y **Solución estándar 2**, respectivamente: no se encuentra más de 0,1% de compuesto relacionado A de nimodipino. Calcular el porcentaje de cualquier otra impureza en la porción de Nimodipino tomada, por la fórmula:

$$(100/1000)(C_S / C_T)(r_i / r_S)$$

en donde C_S es la concentración, en µg por mL, de ER Nimodipino USP en **Solución estándar 1**; C_T es la concentración, en mg por mL, de Nimodipino en la **Solución de prueba**; r_i es la respuesta de los picos de cada impureza obtenidos a partir de la **Solución de prueba**; y r_S es la respuesta del pico de nimodipino obtenido a partir de **Solución estándar 1**: no se encuentra más de 0,2% de cualquier otra impureza; y no se encuentra más de 0,5% de impurezas totales. **■_{1S} (USP30)**

Nitrofurantoína, Cápsulas

Cambio en la redacción:

Disolución (711)—

PRUEBA 1 (cuando se declara que contienen macrocristales de nitrofurantoína)—

Medio: solución amortiguadora de fosfato de pH 7,2 ($\pm 0,05$); 900 mL.

Aparato 1: 100 rpm.

Tiempos: 1; 3 y 8 horas.

Procedimiento—Determinar la cantidad disuelta de $C_8H_6N_4O_5$ empleando absorción UV a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 375 nm, en porciones filtradas de la solución en análisis diluidas apropiadamente con **Medio**, si fuera necesario, en comparación con una **Solución estándar** con una concentración conocida de ER Nitrofurantoína USP en el mismo **Medio**.

Tolerancias—El porcentaje de la cantidad declarada de $C_8H_6N_4O_5$ disuelta en 1 hora se ajusta a la **Tabla de Aceptación 2**, y los porcentajes disueltos a las 3 y 8 horas se ajustan a los criterios para el momento final de la prueba en la **Tabla de Aceptación 2**.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta
1	entre 20% y 60%
3	no menos de 45%
8	no menos de 60%

PRUEBA 2 (cuando se declara que contienen ambas formas de nitrofurantoína, macrocristalina y monohidrato)—Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con la **Prueba de Disolución 2** de la USP.

Medio ácido: ácido clorhídrico 0,01 N durante 1 hora; 900 mL.

Medio de solución amortiguadora de pH 7,5—Preparar un concentrado de solución amortiguadora de pH 7,5 disolviendo en agua 62,2 g de hidróxido de potasio y 129,3 g de fosfato monobásico de potasio, diluir a 1 L con agua y mezclar. Después de 1 hora cambiar el **Medio ácido** a **Medio de solución amortiguadora de pH 7,5** agregando 50 mL de concentrado de solución amortiguadora de pH 7,5, durante 6 horas adicionales.

Aparato 2: 100 rpm, usando dispositivos de sumersión de alambre de acero recubierto con teflón, preparados formando una bobina de aproximadamente 22 mm de largo a partir de un alambre calibre 20 de 13 cm de longitud (ver **Figura 1**).

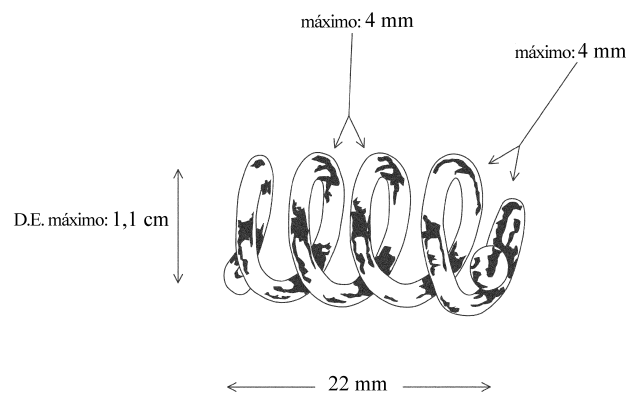


Fig. 1. Dispositivo de sumersión.

Tiempos: 1; 3 y 7 horas.

Solución estándar de la etapa ácida—Preparar una solución de ER Nitrofurantoína USP en **Medio ácido** para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,025 mg por mL.

Solución estándar de la etapa amortiguada—Preparar una solución de ER Nitrofurantoína USP en **Medio de solución amortiguadora de pH 7,5** para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,075 mg por mL.

Procedimiento—Determinar la cantidad disuelta de $C_8H_6N_4O_5$ a partir de las absorbancias UV a la longitud de onda isosbética, aproximadamente a 375 nm, en porciones filtradas de cada solución en análisis, diluidas adecuadamente si fuera necesario, con **Medio ácido** o **Medio de solución amortiguadora de pH 7,5**, según corresponda, en comparación con la **Solución estándar** apropiada.

Tolerancias—Los porcentajes de la cantidad declarada de $C_8H_6N_4O_5$ disuelta en los tiempos especificados se ajustan a la siguiente *Tabla de Aceptación*.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta (individual)	Cantidad disuelta (promedio)
1	entre 2% y 16%	entre 5% y 13%
3	entre 27% y 69%	entre 39% y 56%
7	no menos de 68%	no menos de 81%

Tabla de Aceptación

Nivel	Número de Unidades Analizadas	Criterios
L ₁	12	El porcentaje promedio de la cantidad declarada disuelta se encuentra dentro del intervalo de los promedios para cada intervalo y no es menor que la cantidad declarada al momento final de la prueba. Todos los valores individuales se encuentran dentro de los intervalos de los valores individuales para cada intervalo y no son menores que la cantidad declarada al momento final de la prueba.
L ₂	12	El porcentaje promedio de la cantidad declarada disuelta se encuentra dentro del intervalo de los promedios para cada intervalo y no es menor que la cantidad declarada al momento final de la prueba. No más de 2 de los 24 valores individuales se encuentran fuera de los intervalos especificados para los valores individuales en cada intervalo, y no más de 2 de los 24 son menores que la cantidad declarada al momento final de la prueba.

•PRUEBA 3 (cuando se declara que contienen ambas formas de nitrofurantoína, macrocristalina y monohidrato)—Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que cumple con la *Prueba de Disolución* 3 de la USP.

Medio ácido, Medio de solución amortiguadora de pH 7,5, Aparato 2, Tiempos, Solución estándar de la etapa ácida, Solución estándar de la etapa amortiguada, y Procedimiento—Proceder según se indica en la *Prueba* 2.

Tolerancias—Los porcentajes de la cantidad declarada de $C_8H_6N_4O_5$ disuelta en los tiempos especificados se ajustan a la *Tabla de Aceptación* 2.

Tiempo (horas)	Cantidad disuelta (individual)	Cantidad disuelta (promedio)
1	entre 2% y 16%	entre 5% y 13%
3	entre 50% y 80%	entre 55% y 75%
7	no menos de 85%	no menos de 90%

•5

Agregar lo siguiente:

■Norgestimato y Etinil Estradiol, Tabletas

» Las Tabletas de Norgestimato y Etinil Estradiol contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de las cantidades declaradas de norgestimato ($C_{23}H_{31}NO_3$) y etinil estradiol ($C_{20}H_{24}O_2$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases bien cerrados.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Etinil Estradiol USP. ER Norgestimato USP.*

Identificación—Los tiempos de retención de los picos principales en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponden con los del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Desintegración (701): 15 minutos.

Disolución (711)—[NOTA—Tener cuidado al filtrar y manipular soluciones que contengan etinil estradiol para evitar la pérdida del fármaco por adsorción. Se puede centrifugar en lugar de filtrar con filtros de membrana no adsorbentes. Retirar las alícuotas de disolución con pipetas de vidrio o teflón, o con jeringas probadas contra pérdida por adsorción. Utilizar vasos de disolución de vidrio y paletas de teflón o recubiertas con teflón.]

Medio: polisorbato 20 al 0,05%; 600 mL.

Aparato 2: 75 rpm.

Tiempo: 20 minutos para Tabletas que declaran contener 180 µg de $C_{23}H_{31}NO_3$ y 35 µg de $C_{20}H_{24}O_2$; 20 minutos para Tabletas que declaran contener 215 µg de $C_{23}H_{31}NO_3$ y 35 µg de $C_{20}H_{24}O_2$; y 30 minutos para Tabletas que declaran contener 250 µg de $C_{23}H_{31}NO_3$ y 35 µg de $C_{20}H_{24}O_2$.

Determinar la cantidad de norgestimato ($C_{23}H_{31}NO_3$) y etinil estradiol ($C_{20}H_{24}O_2$) disuelta, empleando el siguiente método.

Fase móvil—Preparar una mezcla desgasificada de agua y alcohol isopropílico (13 : 7). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución estándar—Disolver en *Medio* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Norgestimato USP y ER Etinil Estradiol USP y diluir cuantitativamente con *Medio*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con concentraciones conocidas similares a las esperadas en la *Solución de prueba*. [NOTA—Se puede utilizar un volumen de metanol que no exceda 4% del volumen total de la *Solución estándar* para disolver los estándares antes de diluirlos con *Medio*.]

Solución de prueba—Usar una porción filtrada o centrifugada de la solución en análisis.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm (para el análisis de norgestimato), un detector espectrofluorométrico (para el análisis de etinil estradiol) con una longitud de onda de excitación a 234 nm y una longitud de onda de emisión de 304 nm, y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L10. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,2 mL por minuto. Mantener la temperatura de la columna a 40°. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención son aproximadamente 7,5 minutos para etinil estradiol y 9,5 minutos para norgestimato; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 3,0% para los picos de etinil estradiol y norgestimato.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 200 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de cada fármaco disuelta, por la fórmula:

$$600C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, del analito apropiado en la *Solución estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente.

Tolerancias—No menos de 80% (Q) de las cantidades declaradas de $C_{23}H_{31}NO_3$ y $C_{20}H_{24}O_2$ se disuelven en 20 minutos para Tabletas que declaran contener 180 µg de $C_{23}H_{31}NO_3$ y 35 µg de $C_{20}H_{24}O_2$, y para Tabletas que declaran contener 215 µg de $C_{23}H_{31}NO_3$ y 35 µg de $C_{20}H_{24}O_2$. No menos de 80% (Q) de las cantidades declaradas de $C_{23}H_{31}NO_3$ y $C_{20}H_{24}O_2$ se disuelven en 30 minutos para Tabletas que declaran contener 250 µg de $C_{23}H_{31}NO_3$ y 35 µg de $C_{20}H_{24}O_2$.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

Pureza cromatográfica—

Fase móvil—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Usar la *Preparación estándar*, preparada según se indica en la *Valoración*.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*, preparada según se indica en la *Valoración*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector capaz de detectar a 230 nm y 254 nm simultáneamente, y una columna de 4,6 mm × 10 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,5 para etinil estradiol, 1,0 para (*Z*)-norgestimato y 1,2 para (*E*)-norgestimato; la resolución, R , entre (*Z*)-norgestimato y (*E*)-norgestimato no es menor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de los picos de etinil estradiol y norgestimato no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 50 µL) de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos principales. Calcular el porcentaje de la impureza con un tiempo de retención relativo de aproximadamente 0,6, en relación con el pico de (*Z*)-norgestimato y detectado a 230 nm en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(1,31)(r_i/r_s)$$

en donde 1,31 es el factor de respuesta relativa de esta impureza; r_i es la respuesta del pico de la impureza; y r_s es la suma de las respuestas de los picos de (*E*)-norgestimato y (*Z*)-norgestimato: no se encuentra más de 7,5%. Calcular el porcentaje de cualquier impureza que tenga un tiempo de retención relativo de aproximadamente 0,2 ó 0,4, en relación con el pico de (*Z*)-norgestimato y detectado a 254 nm en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100(1,54)(C_Z/C_E)(r_i/r_Z)$$

en donde 1,54 es el factor de respuesta relativa de los picos de impureza; C_Z y C_E son las cantidades, en mg, de (*Z*)-norgestimato y etinil estradiol, respectivamente, según se determina en la *Valoración*; r_i es la respuesta del pico para cada impureza; y r_Z es la respuesta del pico para (*Z*)-norgestimato: la suma de las impurezas con tiempos de retención relativos de aproximadamente 0,2 y 0,4, no es más de 4,0%.

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla desgasificada de agua, tetrahydrofurano y metanol (13 : 5 : 2). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de estándar interno—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ftalato de dibutilo en metanol para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 0,05 mg por mL.

Preparación estándar—Disolver en *Solución de estándar interno* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Norgestimato USP y ER Etinil Estradiol USP y diluir cuantitativamente con *Solución de estándar interno*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 7 µg por mL de etinil estradiol y una concentración conocida similar a la que se espera en la *Preparación de valoración*. Mezclar y pasar a través de un filtro de 0,45 µm.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, a un tubo de centrifuga de vidrio de 50 mL que equivalga aproximadamente a 0,175 mg de etinil estradiol, y agregar dos perlas de vidrio. Agregar 25,0 mL de la *Solución de estándar interno*, insertar el tapón y mezclar en un mezclador por vórtice durante al menos 15 minutos. Someter a ultrasonido durante al menos 5 minutos para asegurar una disolución completa de los fármacos, mezclar y pasar a través de un filtro de 0,45 µm.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 230 nm y una columna de 4,6 mm × 5 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2,1 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,5 para etinil estradiol, 1,0 para (*Z*)-norgestimato, 1,2 para (*E*)-norgestimato y 1,5 para ftalato de dibutilo; la resolución, R , entre (*Z*)-norgestimato y (*E*)-norgestimato no es menor de 1,5; y la desviación estándar relativa del cociente de respuesta del pico de etinil estradiol, (*Z*)-norgestimato y (*E*)-norgestimato con respecto al ftalato de dibutilo a partir de inyecciones repetidas, no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 25 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de etinil estradiol ($C_{20}H_{24}O_2$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$25C(R_U/R_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Etinil Estradiol USP en la *Preparación estándar*; y R_U y R_S son los cocientes de respuesta entre los picos de etinil estradiol y de ftalato de dibutilo obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. Calcular la cantidad, en mg, de norgestimato ($C_{23}H_{31}NO_3$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$25C[P_A(R_{UA}/R_{SA}) + P_S(R_{US}/R_{SS})]$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Norgestimato USP en la *Preparación estándar*; P_A y P_S son las fracciones correspondientes a (*E*) y (*Z*) de ER Norgestimato USP; R_{UA} y R_{SA} son los cocientes de respuesta entre los picos de (*E*)-norgestimato y de ftalato de dibutilo obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente; y R_{US} y R_{SS} son los cocientes de respuesta entre los picos de (*Z*)-norgestimato y de ftalato de dibutilo obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Ondansetrón

Agregar lo siguiente:

■**Envasado y almacenamiento**—Conservar en envases impermeables resistentes a la luz, a temperatura ambiente. ■_{1S} (USP30)

Cloruro de Oxibutinina

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—

Solución amortiguadora de fosfato y Fase móvil—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución madre de aptitud del sistema—Disolver en *Fase móvil* cantidades pesadas con exactitud de ER Compuesto Relacionado B de Oxibutinina USP y ER Compuesto Relacionado C de Oxibutinina USP para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 100 µg de cada Estándar de Referencia USP por mL.

Solución madre del estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad de ER Cloruro de Oxibutinina USP pesada con exactitud para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg por mL.

Solución de aptitud del sistema—Transferir 10,0 mL de la *Solución madre de aptitud del sistema* a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 10,0 mL de la *Solución madre del estándar* y diluir a volumen con *Fase móvil*.

Solución estándar—Transferir 15,0 mL de la *Solución madre del estándar* a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con *Fase móvil*. Transferir 5,0 mL de la solución obtenida a otro matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con *Fase móvil*. Esta solución contiene aproximadamente 7,5 µg de ER Cloruro de Oxibutinina USP por mL.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 50 mg de Cloruro de Oxibutinina, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*, y mezclar.

Sistema cromatográfico—Preparar según se indica en *Valoración*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado B de oxibutinina y el compuesto relacionado C de oxibutinina no es menor de 1,1; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas, determinada a partir del pico de oxibutinina, no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas por un tiempo total no menor al doble del tiempo de retención del pico de oxibutinina y medir las respuestas de los picos (ver impurezas conocidas en *Tabla 1*). Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Cloruro de Oxibutinina tomada, por la fórmula:

$$(C/W)(1/F)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en µg por mL, de ER Cloruro de Oxibutinina USP en la *Solución estándar*; *W* es el peso, en mg, de Cloruro de Oxibutinina tomado para preparar la *Solución de prueba*; *F* es el factor de respuesta relativa para cada impureza (ver valores en *Tabla 1*); y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos de cada impureza obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y del pico de oxibutinina en la *Solución estándar*, respectivamente. [NOTA—Para impurezas desconocidas, usar el factor de respuesta relativa de ■1,0■_{1S (USP30)}.]

Tabla 1

Nombre del compuesto	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta Relativa (<i>F</i>)	Límite (%)
Compuesto relacionado A de oxibutinina ¹	0,08	1,4	0,5
Análogo difenílico de cloruro de oxibutinina ²	0,37	2,7	0,1
Compuesto relacionado B de oxibutinina ³	0,65	1,3	1,0

Tabla 1 (Continuación)

Nombre del compuesto	Tiempo de Retención Relativo	Factor de Respuesta Relativa (<i>F</i>)	Límite (%)
Compuesto relacionado C de oxibutinina ⁴	0,79	1,0	1,0
Análogo ciclohexenílico de cloruro de oxibutinina ⁵	1,8	0,4	1,0
Análogo etilpropílico de cloruro de oxibutinina ⁶	1,9	1,0	0,1

¹ ácido fenilciclohexilglicólico (ácido ciclohexilmandélico o CHMA)
² 4-(dietilamino)but-2-inil 2-hidroxi-2,2-difenilacetato
³ éster metílico de ácido fenilciclohexilglicólico (éster metílico de ácido ciclohexilmandélico o CHMME)
⁴ análogo metiletilico de cloruro de oxibutinina (4-(etilmetilamino) but-2-inil (±)-2-ciclohexil-2-hidroxi-2-fenilacetato)
⁵ 4-(dietilamino)but-2-inil (±)-2-(ciclohex-3-enil)-2-ciclohexil-2-hidroxiacetato
⁶ 4-(etilpropilamino)but-2-inil (±)-2-ciclohexil-2-hidroxi-2-fenilacetato

Además de no exceder los límites de cada impureza indicados en *Tabla 1*, no se encuentra más de 0,1% de cualquier otra impureza individual y no se encuentra más de 1,0% de impurezas totales.

Clorhidrato de Paroxetina

Cambio en la redacción:

Valoración—

Solución amortiguadora de acetato—Preparar una solución de acetato de amonio 0,05 M en agua, ajustar con ácido acético glacial a un pH de 4,5, mezclar y filtrar.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora de acetato*, acetonitrilo y trietilamina ■(70:30:1). [NOTA—Se puede variar la relación de *Solución amortiguadora de acetato*–acetonitrilo–trietilamina entre 70:40:1 y 75:25:1 para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema.■_{1S (USP30)} Ajustar con ácido acético glacial a un pH de 5,5. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Disolver en agua cantidades adecuadas de ER Compuesto Relacionado B de Paroxetina USP y ER Clorhidrato de Paroxetina USP para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,5 mg de cada Estándar de Referencia USP por mL.

Preparación estándar—Disolver en agua una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Paroxetina USP y diluir cuantitativamente con agua, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 50 mg de Clorhidrato de Paroxetina, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con agua y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 295 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L13. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: ■_{1S (USP30)} la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado B de paroxetina y paroxetina no es menor de 2,0; ■el factor de asimetría para el pico de paroxetina no es mayor de 2,0; ■_{1S (USP30)} y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. ■[NOTA—Para

finés informativos, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,9 para el compuesto relacionado B de paroxetina y 1,0 para paroxetina.】^{1S (USP30)}

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{19}H_{27}NO_3 \cdot HCl$ en la porción de Clorhidrato de Paroxetina tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Paroxetina USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente.

Agregar lo siguiente:

■ Pentazocina y Acetaminofeno, Tabletas

(La Monografía con este título—será oficial a partir del 1° de febrero de 2009)

» Las Tabletas de Pentazocina y Acetaminofeno contienen una cantidad de Clorhidrato de Pentazocina equivalente a no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de pentazocina ($C_{19}H_{27}NO$), y no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de acetaminofeno ($C_9H_8NO_2$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables y resistentes a la luz.

Estándares de referencia USP (11)—ER Acetaminofeno USP. ER Pentazocina USP.

Prueba de identificación por cromatografía en capa delgada (201)—

Solución de prueba—Transferir una cantidad de Tabletas reducidas a polvo fino, equivalente aproximadamente a 5 mg de pentazocina y 130 mg de acetaminofeno a un matraz adecuado, y agregar 5 mL de una mezcla de cloroformo y metanol (1 : 1), agitar y dejar que sedimenten los sólidos. Usar el sobrenadante.

Soluciones estándar—Preparar una solución de ER Pentazocina USP en una mezcla de cloroformo y metanol (1 : 1) que contenga 1 mg por mL (*Solución estándar A*). Empleando el mismo disolvente, preparar una solución de ER Acetaminofeno USP que contenga 26 mg por mL (*Solución estándar B*).

Fase móvil: una mezcla de acetato de etilo, metanol y ácido fórmico (90 : 5 : 5).

Procedimiento—Evaporar los disolventes en aire frío circulante. Después de desarrollar y examinar las manchas, rociar la placa con un reactivo yodoplatinato preparado disolviendo 300 mg de cloruro platínico en 100 mL de agua y agregando 100 mL de una solución de yoduro de potasio (6 en 100): el cromatograma obtenido con la *Solución de prueba* muestra dos manchas principales que se corresponden con los valores R_F , tamaño e intensidad del color con las manchas obtenidas a partir de las *Soluciones estándar A* y *B*.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

PROCEDIMIENTO PARA UNIFORMIDAD DE CONTENIDO DE PENTAZOCINA Y ACETAMINOFENO—

Disolvente—Preparar una mezcla de acetonitrilo y ácido sulfúrico 0,035 N (6 : 4).

Fase móvil—Preparar una mezcla de fosfato monobásico de sodio 0,005 M, tetrahidrofurano y ácido fosfórico (950 : 50 : 1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Solución madre del estándar de pentazocina—Disolver en *Disolvente* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Pentazocina USP y diluir cuantitativamente con *Disolvente* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,25 mg por mL.

Solución estándar—Transferir una cantidad de ER Acetaminofeno USP, pesada con exactitud, a un matraz volumétrico adecuado, agregar un volumen suficiente de *Solución madre del estándar de pentazocina*, y mezclar para disolver el acetaminofeno. Diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar para obtener concentraciones conocidas de aproximadamente 0,0125 mg y 0,325 mg de pentazocina y acetaminofeno por mL, respectivamente.

Solución de prueba—Transferir 1 Tableta a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de *Disolvente*, y someter a ultrasonido durante aproximadamente 30 minutos. Diluir a volumen con *Disolvente* y mezclar. Pasar una porción de esta solución a través de un filtro de papel, cubriendo el embudo con un vidrio de reloj y desechar los primeros mL de filtrado. Diluir 5,0 mL del filtrado con *Fase móvil* hasta 100 mL y pasar esta solución a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,5 µm o menor.

Solución de aptitud del sistema—Transferir aproximadamente 32,5 mg de ER Acetaminofeno USP a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con *Disolvente*, y mezclar. Transferir 1,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 5,0 mL de *Solución madre del estándar de pentazocina*, diluir a volumen con *Fase móvil* y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 9,4 mm × 10 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,2 para acetaminofeno y 1,0 para pentazocina; la resolución, R , entre pentazocina y acetaminofeno no es menor de 7; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0% para los picos de pentazocina y acetaminofeno.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo de líquidos volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, y medir las respuestas de los picos de pentazocina y acetaminofeno. Calcular la cantidad, en mg, de pentazocina ($C_{19}H_{27}NO$) y de acetaminofeno ($C_9H_8NO_2$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$2000C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, del Estándar de Referencia USP adecuado en la *Solución estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos del analito correspondiente obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente.

Valoración de pentazocina—

Fase móvil—Preparar una mezcla de cloroformo, metanol e isopropilamina (96 : 4 : 0,2).

Diluyente—Preparar una mezcla de metanol y ácido sulfúrico 0,035 N (1 : 1).

Preparación estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Pentazocina USP en *Diluyente* y diluir cuantitativamente con el mismo disolvente para obtener una solución madre con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por mL. Transferir 10,0 mL de esta solución madre a un separador de 125 mL. Agregar 30 mL de agua y 5 mL de solución de carbonato de sodio (1 : 10), y mezclar. Extraer con 60 mL de cloroformo, pasar la capa clorofórmica a través de un filtro de papel, recolectando el filtrado en un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con cloroformo y mezclar.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 25 mg de pentazocina a una probeta de 50 mL con tapón de vidrio, agregar 50,0 mL de *Diluyente* y agitar de manera intermitente durante aproximadamente 15 minutos. Someter a ultrasonido durante aproximadamente 2 minutos, dejar que los sólidos sedimenten y transferir 10,0 mL

del sobrenadante a un separador de 125 mL. [NOTA—Reservar el remanente de sobrenadante para utilizarlo en la *Valoración de acetaminofeno*.] Agregar 30 mL de agua y 5 mL de solución de carbonato de sodio (1:10) al separador y mezclar. Extraer con 60 mL de cloroformo, pasar la capa clorofórmica a través de un filtro de papel, recolectando el filtrado en un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con cloroformo y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 280 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L3 de 10 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 1000 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 3,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo de líquidos volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de pentazocina. Calcular la cantidad, en mg, de pentazocina ($C_{19}H_{27}NO$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$50C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Pentazocina USP en la solución madre utilizada para preparar la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Valoración de acetaminofeno—

Fase móvil y Diluyente—Proceder según se indica en la *Valoración de pentazocina*.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 130 mg de ER Acetaminofeno USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y diluir a volumen con *Diluyente*, y mezclar. Transferir 2,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 200 mL, diluir a volumen con acetato de etilo y mezclar.

Preparación de valoración—Transferir 2,0 mL del sobrenadante reservado de la *Valoración de pentazocina* a un matraz volumétrico de 200 mL, diluir a volumen con acetato de etilo y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L3 de 10 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,4 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 1000 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 3,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de acetaminofeno. Calcular la cantidad, en mg, de acetaminofeno ($C_8H_9NO_2$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$100C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Acetaminofeno USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Pentobarbital Sódico, Inyección

Cambio en la redacción:

Identificación—■El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*. ■1S (USP30)

Cambio en la redacción:

Valoración—

■**Fase móvil**—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de fosfato monobásico de potasio 0,01 M y acetonitrilo (65:35) de pH 3,5. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Pentobarbital USP y diluir cuantitativamente, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL.

Preparación de valoración—Diluir cuantitativamente un volumen adecuado de Inyección con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 214 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de capacidad, k' , no es menor de 2,5; la eficiencia de la columna no es menos de 1500 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el porcentaje de $C_{11}H_{17}N_2NaO_3$ en la porción de Inyección tomada, por la fórmula:

$$100(248,25/226,27)(C_S/C_U)(r_U/r_S)$$

en donde 248,25 y 226,27 son los pesos moleculares de pentobarbital sódico y pentobarbital, respectivamente; C_S es la concentración, en mg por mL, de ER Pentobarbital USP en la *Preparación estándar*; C_U es la concentración final, en mg por mL, de la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las áreas de los picos obtenidas a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■1S (USP30)

Clorhidrato de Piridoxina, Inyección

Cambio en la redacción:

Valoración—

Solución amortiguadora 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, diluir con agua a 100 mL, mezclar y filtrar.

Solución de clorimida—Disolver 40 mg de 2,6-dicloroquinona-clorimida en 100 mL de alcohol isopropílico. Conservar la solución en un refrigerador y usarla dentro del mes de preparada. No usar la solución si se ha tornado rosada.

Solución madre del estándar—Disolver una cantidad adecuada de ER Clorhidrato de Piridoxina USP, pesada con exactitud, en ácido clorhídrico 0,1 N, diluir cuantitativamente con el mismo disolvente hasta obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL y mezclar. Conservar la solución en un frasco color ámbar, en un lugar fresco.

Preparación estándar—En un matraz volumétrico de 100 mL diluir a volumen con agua 10,0 mL de *Solución madre del estándar* y mezclar. Preparar esta solución en el día de uso según sea necesario.

Preparación de valoración—Diluir cuantitativamente y en diluciones sucesivas con agua un volumen de Inyección, medido con exactitud, que equivalga aproximadamente a 100 mg de clorhidrato de piridoxina hasta obtener una concentración de aproximadamente 10 µg de clorhidrato de piridoxina por mL.

Procedimiento—

(a) Pipetear 5 mL de la *Preparación de valoración* transparente, transferir a un matraz, agregar 25,0 mL de alcohol isopropílico y mezclar. Pipetear 5 mL de la dilución en alcohol isopropílico, transferir a una probeta graduada de 25 mL con tapón de vidrio o a un tubo de ensayo con las mismas características, y agregar sucesivamente, mezclando después de cada agregado, 1,0 mL de *Solución amortiguadora 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. Enfriar hasta aproximadamente 25°, luego agregar 1,0 mL de *Solución de clorimida* y agitar vigorosamente durante 10 segundos cronometrados con exactitud. ■Noventa■_{1S} (USP30) segundos, cronometrados con exactitud, después de agregar la *Solución de clorimida*, determinar la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 650 nm, con un espectrofotómetro adecuado, utilizando agua como blanco. [NOTA—Realizar la lectura rápidamente para evitar errores causados por la desaparición del color.] Designar la absorbancia como A_U .

(b) Repetir el procedimiento (a), pero utilizar 1,0 mL de solución de ácido bórico (1 en 20) en lugar de 1,0 mL de agua. Designar la absorbancia como A_U' .

(c) Repetir el procedimiento (a), pero utilizar 5,0 mL de la *Preparación estándar* en lugar de 5,0 mL de la *Preparación de valoración*. Designar la absorbancia como A_S .

(d) Repetir el procedimiento (c), pero utilizar 1,0 mL de solución de ácido bórico (1 en 20) en lugar de 1,0 mL de agua. Designar la absorbancia como A_S' .

Calcular la cantidad, en mg, de clorhidrato de piridoxina ($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$) en cada mL de Inyección tomada, por la fórmula:

$$10(C/V)(A_U - A_U')/(A_S - A_S')$$

en donde C es la concentración, en µg por mL, de ER Clorhidrato de Piridoxina USP en la *Preparación estándar*; V es el volumen, en mL, de Inyección tomado; y los otros términos son los definidos anteriormente.

Perclorato de Potasio

Eliminar lo siguiente:

■Estándares de referencia USP <11>—ER Perclorato de Potasio USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Valoración—

Fase móvil—Transferir 16,6 g de ácido ftálico a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y diluir a volumen con metanol, y mezclar. Transferir 10,0 mL de esta solución a un matraz de 1000 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Ajustar con aproximadamente 450 mg de hidróxido de litio a un pH de 4,5, filtrar y desgasificar.

Preparación estándar—Transferir aproximadamente 50 mg de ■perclorato de potasio, ■_{1S} (USP30) pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua y mezclar para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por mL.

Preparación de valoración—Empleando aproximadamente 50 mg de Perclorato de Potasio, pesados con exactitud, proceder según se indica en la *Preparación estándar*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* <621>)—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de conductividad y una columna de 4,6 mm × 7,5 cm rellena con material L23 de 6 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría no es mayor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $KClO_4$ en la porción de Perclorato de Potasio tomada, por la fórmula:

$$500C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ■perclorato de potasio, ■_{1S} (USP30) en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Agregar lo siguiente:

■Prednicarbato, Crema

» La Crema de Prednicarbato contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de prednicarbato ($C_{27}H_{36}O_8$). Puede contener un conservante adecuado.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables y resistentes a la luz. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP <11>—ER Prednicarbato USP. ER Compuesto Relacionado A de Prednicarbato USP. ER Compuesto Relacionado B de Prednicarbato USP. ER Compuesto Relacionado C de Prednicarbato USP.

Identificación—El tiempo de retención del pico de prednicarbato en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Consistencia—A temperatura ambiente, un cordón de Crema de 2 cm de longitud conserva su forma en una placa de vidrio durante al menos 10 minutos. Se puede esparcir fácilmente y no contiene grumos visibles.

Límites microbianos <61>—Cumple con los requisitos de las pruebas para determinar la ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El recuento total de bacterias aerobias no excede de 100 ufc por g.

Llenado mínimo (755): cumple con los requisitos.

pH (791): entre 3,5 y 5,0, en una solución preparada de la siguiente manera. Agregar 15 mL de agua en ebullición a 3,5 g de Crema en un tubo de centrifuga de 50 mL y agitar vigorosamente hasta que se forme una emulsión. Aflojar la tapa y colocar en un baño de vapor durante 5 minutos. Centrifugar la solución caliente. Después de enfriar a temperatura ambiente, recolectar la solución acuosa inferior en un tubo de vidrio y determinar el pH.

Compuestos relacionados—

Solución A, Solución B, Fase móvil, Solución 1, Solución 2 y Solución de resolución—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución madre del estándar—Preparar según se indica en la *Preparación madre del estándar* en la *Valoración*.

Solución estándar—Preparar según se indica en *Preparación estándar* en la *Valoración*.

Solución de sensibilidad del sistema—Diluir 1,0 mL de la *Solución estándar* con alcohol deshidratado a 50,0 mL. Diluir 1,0 mL de la solución así obtenida con *Solución A* a 20,0 mL.

Solución de prueba—Preparar según se indica en la *Preparación de valoración*.

Sistema cromatográfico—Proceder según se indica en la *Valoración*. Cromatografiar la *Solución de sensibilidad del sistema*: la relación señal-ruido no es menor de 3. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente de 0,57 para el compuesto relacionado B de prednicarbato, 0,64 para el compuesto relacionado C de prednicarbato, 1,0 para prednicarbato y 1,04 para el compuesto relacionado A de prednicarbato.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 60 µL) de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada compuesto relacionado e impureza desconocida en la porción de Crema tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la respuesta de cada pico de impureza individual obtenido a partir de la *Solución de prueba*, y r_s es la suma de las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Solución de prueba*: no se encuentra más de 2,0% del compuesto relacionado B de prednicarbato y no se encuentra más de 2,0% del compuesto relacionado C de prednicarbato; no se encuentra más de 0,5% de cualquier compuesto relacionado individual; y no se encuentra más de 5,0% de los compuestos relacionados totales.

Valoración—

Solución A—Preparar una solución 0,01 M de fosfato monobásico de potasio en agua.

Solución B—Preparar una mezcla de acetonitrilo y alcohol deshidratado (2:1).

Fase móvil—Usar mezclas variables de la *Solución A* y de la *Solución B*, según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema* en *Cromatografía* (621)).

Preparación madre del estándar—Disolver en alcohol deshidratado una cantidad de ER Prednicarbato USP, pesada con exactitud, diluir cuantitativamente con alcohol deshidratado, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de 0,3 mg por mL.

Preparación estándar—Transferir 10,0 mL de la *Preparación madre del estándar* a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 15 mL de tetrahydrofurano y 30 mL de *Solución B*, y diluir a volumen con *Solución A*.

Preparación de valoración—Transferir una cantidad de Crema, pesada con exactitud, equivalente aproximadamente a 3,0 mg de prednicarbato, a un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 15 mL de tetrahydrofurano, agitar vigorosamente y dejar en reposo en un baño de ultrasonido hasta que la muestra se haya disuelto. Agregar 20 mL de alcohol deshidratado y agitar vigorosamente. Agregar 20 mL de acetonitrilo y agitar vigorosamente. Diluir inmediatamente a volumen con *Solución A* y agitar vigorosamente. Dejar en reposo en un baño de hielo durante aproximadamente 15 minutos. Agitar vigorosamente las muestras y pasarlas a través de un filtro de papel plegado. Pasar el filtrado a través de un filtro de membrana de 0,45 µm.

Solución 1—Preparar una solución con 0,3 mg por mL de ER Compuesto Relacionado B de Prednicarbato USP y 0,3 mg por mL de ER Compuesto Relacionado C de Prednicarbato USP en alcohol deshidratado.

Solución 2—Transferir aproximadamente 15 mg de ER Compuesto Relacionado A de Prednicarbato USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL; agregar 1,0 mL de *Solución 1* y diluir a volumen con alcohol deshidratado.

Solución de resolución—Transferir 10,0 mL de la *Preparación estándar* a un matraz volumétrico; agregar 1,0 mL de *Solución 2*, 1 mL de tetrahydrofurano y 2 mL de acetonitrilo; y diluir con *Solución A* a 20,0 mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar el cromatógrafo de líquidos con un detector a 243 nm y una columna de 4,0 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. Mantener la temperatura de la columna a 40°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Elución
0–5	67	33	equilibrio
5–45	67→40	33→60	gradiente lineal
45–50	40	60	isocrática
50–55	40→20	60→80	gradiente lineal
55–70	20	80	isocrática
70–75	20→67	80→33	gradiente lineal
75–85	67	33	isocrática

Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre prednicarbato y el compuesto relacionado A de prednicarbato no es menor de 1,5. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico de prednicarbato es entre 0,7 y 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 60 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular la cantidad, en mg, de prednicarbato ($C_{27}H_{36}O_8$) en cada g de Crema tomada, por la fórmula:

$$100(C/W)(r_u/r_s)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Prednicarbato USP en la *Preparación estándar*; W es el peso, en g, de Crema tomada; y r_u y r_s son las respuestas de los picos de prednicarbato obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■ USP30

Agregar lo siguiente:

■ Prednicarbato, Ungüento

» El Ungüento de Prednicarbato contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de prednicarbato ($C_{27}H_{36}O_8$), en una base para ungüento adecuada.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables y resistentes a la luz. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP <11>—*ER Prednicarbato USP. ER Compuesto Relacionado A de Prednicarbato USP. ER Compuesto Relacionado B de Prednicarbato USP. ER Compuesto Relacionado C de Prednicarbato USP.*

Identificación—Cumple con los requisitos de la prueba de *Identificación en Prednicarbato, Crema*.

Consistencia—A temperatura ambiente, un cordón de Ungüento de 2 cm de longitud conserva su forma en una placa de vidrio durante al menos 10 minutos. Se puede esparcir fácilmente y no contiene grumos visibles.

Límites microbianos <61>—Cumple con los requisitos de las pruebas para determinar la ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El recuento bacteriano aerobio total no excede de 100 ufc por g.

Llenado mínimo <755>: cumple con los requisitos.

Compuestos relacionados—

Solución A, Solución B, Fase móvil, Solución 1, Solución 2 y Solución de resolución—Preparar según se indica en *Valoración en Prednicarbato, Crema*.

Solución madre del estándar—Preparar según se indica en *Preparación madre del estándar en Valoración en Prednicarbato, Crema*.

Solución de sensibilidad del sistema—Preparar según se indica en la prueba de *Compuestos relacionados en Prednicarbato, Crema*.

Solución de prueba—Preparar según se indica en *Preparación de valoración en Prednicarbato, Crema*.

Sistema cromatográfico—Preparar según se indica en *Valoración en Prednicarbato, Crema*. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de sensibilidad del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la relación señal-ruido no es menor de 3. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,57 para el compuesto relacionado B de prednicarbato, 0,64 para el compuesto relacionado C de prednicarbato, 1,0 para prednicarbato y 1,04 para el compuesto relacionado A de prednicarbato.

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo un volumen (aproximadamente 60 µL) de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de cada compuesto relacionado e impureza desconocida en la porción de Ungüento tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la respuesta del pico para cada impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*, y r_s es la suma de todas las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Solución de prueba*: no se encuentra más de 2,0% de compuesto relacionado B de prednicarbato ni más de 2,0% de compuesto relacionado C de prednicarbato; no se encuentra más de 0,5% de cualquier compuesto relacionado individual; y no se encuentra más de 5,0% de los compuestos relacionados totales.

Valoración—

Solución A, Solución B, Fase móvil, Preparación madre del estándar, Preparación estándar, Preparación de valoración, Solución 1, Solución 2 y Solución de resolución—Preparar según se indica en *Valoración en Prednicarbato, Crema*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* <621>)—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 243 nm y una columna de 4,0 mm × 25 cm rellena con material L1 de 5 µm. Mantener la temperatura de la columna a 40°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0–5	67	33	equilibrio
5–45	67→40	33→60	gradiente lineal
45–50	40	60	isocrática
50–55	40→20	60→80	gradiente lineal
55–70	20	80	isocrática
70–75	20→67	80→33	gradiente lineal
75–85	67	33	isocrática

Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de resolución* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre prednicarbato y el compuesto relacionado A de prednicarbato no es menor de 1,5. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: el factor de asimetría para el pico de prednicarbato está entre 0,7 y 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 60 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular la cantidad, en mg, de prednicarbato ($C_{27}H_{36}O_8$) en cada g de Ungüento tomado, por la fórmula:

$$100(C/W)(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Prednicarbato USP en la *Preparación estándar*; W es el peso, en g, de Ungüento tomado; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de prednicarbato obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Fosfato Sódico de Prednisolona

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP <11>—*ER Prednisolona USP. ■ER Fosfato Sódico de Prednisolona USP. ■_{1S} (USP30)*

Cambio en la redacción:

Identificación—

A: ■*Absorción en el Infrarrojo* <197K>. ■_{1S} (USP30)

B: El residuo de incineración de aproximadamente 20 mg cumple con los requisitos de las pruebas para *Sodio* <191> y para *Fosfato* <191>.

Quazepam, Tabletas

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP <11>—■*ER Etilparabeno USP. ■_{1S} (USP30) ER Quazepam USP. ER Compuesto Relacionado A de Quazepam USP.*

Cambio en la redacción:

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de metanol y agua (7:3). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* <621>).

Solución de estándar interno—Disolver en metanol una cantidad, pesada con exactitud, de ■ER Etilparabeno USP, ■_{1S} (USP30) y diluir cuantitativamente con metanol, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución que contenga aproximadamente 0,19 mg por mL.

Preparación estándar—Disolver en *Solución de estándar interno* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Quazepam USP y diluir cuantitativamente con la *Solución de estándar interno*, y si fuera

necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,5 mg de quazepam por mL.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 10 Tabletas. Transferir una porción del polvo, pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 15 mg de quazepam, a un tubo de centrifuga de 50 mL con tapa de rosca. Agregar 10,0 mL de la *Solución de estándar interno* y centrifugar durante 30 minutos.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 254 nm y una columna de 4,6 mm × 25 cm rellena con material L7. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: ■_{1S} (USP30) la resolución, *R*, entre etilparabeno y quazepam no es menor de 5,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

■[NOTA—A los efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,4 para etilparabeno y 1,0 para quazepam.]■_{1S} (USP30)

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de quazepam (C₁₇H₁₁ClF₄N₂S) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$10C(R_U/R_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Quazepam USP en la *Preparación estándar*; y *R_U* y *R_S* son los cocientes de respuesta entre los picos de quazepam y etilparabeno obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Quinapril, Tabletas

Agregar lo siguiente:

■**Envasado y almacenamiento**—Conservar en envases bien cerrados. Almacenar a temperatura ambiente controlada.■_{1S} (USP30)

Ritonavir

Cambio en la redacción:

Identificación—

A: ■*Absorción en el Infrarrojo* (197)—■_{1S} (USP30)

Muestra de prueba—Disolver 50 mg de Ritonavir en 1,0 mL de cloroformo. Depositar una gota de esta solución sobre la superficie de un disco de bromuro de potasio o cloruro de sodio y evaporar hasta sequedad.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* está dentro del 2% del tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtiene en la *Valoración*.

C: *Difracción de rayos X* (941)—El patrón de difracción de rayos X se ajusta al del ER Ritonavir USP.

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—[NOTA—El Ritonavir es sensible al álcali.■_{1S} (USP30) Todo el material de vidrio debe enjuagarse previamente con agua destilada antes de usar para eliminar la contaminación residual con detergente.]

Solución de fosfato monobásico de potasio (0,03M), Diluyente, Solución A, Solución B y Fase móvil—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución madre del estándar y Solución madre intermedia—Preparar según se indica en *Preparación madre del estándar y Preparación estándar intermedia* en la *Valoración*.

Solución estándar de identidad de Ritonavir—Transferir aproximadamente 50 mg de ER Mezcla de Compuestos Relacionados de Ritonavir USP, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y diluir a volumen con *Diluyente*, y mezclar.

Solución estándar—Transferir 5,0 mL de la *Solución estándar intermedia* a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar. [NOTA—Se puede usar esta solución durante 48 horas siempre que se almacene a temperatura ambiente.]

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 50 mg de Ritonavir, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 50 mL. Disolver y diluir a volumen con *Diluyente*, y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 240 nm y una columna de 4,6 mm × 15 cm rellena con material L26 de 3 µm, y mantener a una temperatura constante de aproximadamente 60°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0	100	0	equilibrio
0–60	100	0	isocrática
60–120	100→0	0→100	gradiente
120,1	0→100	100→0	gradiente escalonado
120,1–155	100	0	isocrática

El tiempo de corrida de la *Solución estándar* es de 40 minutos y el tiempo de corrida de la *Solución de prueba* es de 155 minutos. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar de identidad de Ritonavir* y la *Solución estándar*, y registrar las respuestas según se indica en el *Procedimiento*: el tiempo de retención de ritonavir está entre 30 minutos y 35 minutos; la resolución, *R*, entre la impureza E y la impureza F (ver la *Tabla 1*) en la *Solución estándar de identidad de Ritonavir* no es menor de 1,0; el cociente entre el pico (*H_p*) y el valle (*H_v*) de ■Ritonavir e■_{1S} (USP30) impureza N (regioisómero) no es menor de 1; el factor de capacidad, *k'*, utilizando el pico del componente principal de la primera inyección de *Solución estándar* no es menor de 13; la eficiencia de la columna, utilizando el pico del componente principal de la primera inyección de *Solución estándar*, no es menos de 5000 platos teóricos; el factor de asimetría, utilizando el pico del componente principal de la primera inyección de *Solución estándar*, está entre 0,8 y 1,2; y la desviación estándar relativa del área del pico del componente principal, para inyecciones repetidas de la *Solución estándar*, no es más de 3,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de *Diluyente*, de la *Solución estándar de identidad de Ritonavir*, de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos. Calcular el porcentaje de cada impureza en la porción de Ritonavir tomada, por la fórmula:

$$0,0025(W_s/W_T)(R_T/R_S)(1/F)P$$

donde W_s es el peso, en mg, de ER Ritonavir USP tomado para preparar la *Solución estándar*; W_T es el peso, en mg, de Ritonavir tomado para preparar la *Solución de prueba*; R_T es el área correspondiente al pico de impureza obtenido a partir de la *Solución de prueba*; R_S es el área promedio de los picos de ritonavir obtenidos de las seis inyecciones de la *Solución estándar*; F es el factor de respuesta para la impureza (ver valores en *Tabla 1*); y P es la pureza, en porcentaje, de ER Ritonavir USP tomada para preparar la *Solución estándar*. No se encuentra más de 0,3% de impureza E y O; no se encuentra más de 0,2% de impureza T; no se encuentra más de 0,1% de cualquier otra impureza; y no se encuentra más de 1,0% de impurezas totales.

Agregar lo siguiente:

■ Clorhidrato de Ropivacaína, Inyección

» La Inyección de Clorhidrato de Ropivacaína es una solución estéril de Clorhidrato de Ropivacaína en Agua para Inyección. Contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de clorhidrato de ropivacaína ($C_{17}H_{26}N_2O \cdot HCl$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases monodosis o multidosis, preferentemente de vidrio Tipo 1 o de plástico adecuado.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Endotoxina USP*. *ER Clorhidrato de Ropivacaína USP*. *ER Compuesto Relacionado A de Ropivacaína USP*. *ER Compuesto Relacionado B de Ropivacaína USP*.

Identificación—

A: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Solución de prueba* se corresponde con el del cromatograma de la *Solución de aptitud del sistema*, según se obtienen en la prueba de *Pureza enantiomérica*.

Endotoxinas bacterianas (85)—No contiene más de 60 Unidades USP de Endotoxinas por g de clorhidrato de ropivacaína.

Partículas (788): cumple con los requisitos para inyecciones.

Esterilidad (71)—Cumple con los requisitos cuando se analiza según se indica en *Filtración por Membrana en Prueba de Esterilidad del Producto a Examinar*.

pH (791): entre 4,0 y 6,0.

Límite de 2,6-dimetilanilina (compuesto relacionado A de ropivacaína, base)—

Solución amortiguadora de pH 8,0 y Fase móvil—Preparar según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar—Preparar según se indica en la *Preparación estándar* en la *Valoración*.

Solución de prueba—Diluir exactamente la Inyección con *Fase móvil* para obtener una concentración de 2,0 mg por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 240 nm y una columna de 3,9 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre el compuesto relacionado A de ropivacaína y ropivacaína no es menor de 5; y la relación señal-ruido para el compuesto relacionado A de ropivacaína no es menor de 10.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. La respuesta del pico del compuesto relacionado A de ropivacaína obtenido a partir de la *Solución de prueba* no es mayor que la respuesta correspondiente obtenida a partir de la *Solución estándar* (no se encuentra más de 0,01% del compuesto relacionado A de ropivacaína base).

Tabla 1. Tiempo de Retención Relativo Aproximado (RRT) de Impurezas Conocidas Relacionadas

Identidad de impureza	Nombre común	Factor de respuesta	RRT
A + B	Mezcla de ácido 2,4-Wing y monoacil valina	—	0,07
C	Monoacilacetamida	—	0,15
D	5-Wing diacilo	1,37	0,24
E	Impureza de oxidación	—	0,36
F	Producto de hidrólisis ácida	0,73	0,39
G	Hidroperóxido de Ritonavir	—	0,45
H	Subproducto ácido/base	0,76	0,47
I	Análogo de etilo	—	0,64
J + K	Mezcla de Boc-monoacil y monoacil isobutil carbamato	0,74	0,81
L	Producto base por ciclado	0,53	0,87
M	Éster 2,4-Wing isobutílico	—	0,94
N	Regioisómero	—	1,05
O	Isómero #2	—	1,11
P	Dimonoacil urea	—	1,14
Q	Isómero #4	—	1,23
R	Isómero #1	—	1,32
S	Dimonoacil valina urea	—	1,62
T	2,4-Wing diacilo	0,73	2,87
U	Impureza de triacilo	—	3,20

Pureza enantiomérica—

Solución amortiguadora de pH 7,2—Transferir 7,5 mL de solución de fosfato monobásico de sodio 1 M y 28,5 mL de solución de fosfato dibásico de sodio dihidrato 0,5 M a un matraz volumétrico de 1 L y diluir a volumen con agua. Ajustar la solución resultante a un pH de 7,2 si fuera necesario.

Fase móvil—Transferir 35 mL de alcohol isopropílico a un matraz volumétrico de 500 mL, diluir a volumen con *Solución amortiguadora de pH 7,2*, mezclar y degasificar. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución de aptitud del sistema—Disolver en agua cantidades adecuadas de ER Clorhidrato de Ropivacaína USP y ER Compuesto Relacionado B de Ropivacaína USP, y diluir cuantitativamente, y en diluciones sucesivas, para obtener una solución que contenga aproximadamente 75 µg por mL y 0,75 µg por mL, respectivamente.

Solución de prueba—Diluir la Inyección con *Fase móvil* a una concentración de aproximadamente 75 µg por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 220 nm y una columna de 4 mm × 10 cm rellena con material L41. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado B de ropivacaína (enantiómero *R*) y ropivacaína (enantiómero *S*) no es menor de 1,5. [NOTA—A efectos de la identificación, los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,75 para el compuesto relacionado B de ropivacaína y 1,0 para ropivacaína.]

Procedimiento—Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 20 µL de la *Solución de prueba*, registrar el cromatograma y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de compuesto relacionado B de ropivacaína (enantiómero *R*) en la porción de Inyección tomada, por la fórmula:

$$100(r_i/r_s)$$

en donde r_i es la respuesta del pico del compuesto relacionado B de ropivacaína (enantiómero *R*); y r_s es la suma de las respuestas de los picos de ropivacaína (enantiómero *S*) y del compuesto relacionado B de ropivacaína (enantiómero *R*) obtenidos a partir de la *Solución de prueba*: no se encuentra más de 2,0% de compuesto relacionado B de ropivacaína (enantiómero *R*).

Otros requisitos—Cumple con los requisitos en *Injectables* (1).

Valoración—

Solución amortiguadora de pH 8,0—Transferir 1,3 mL de solución de fosfato monobásico de sodio 1 M y 32,5 mL de solución de fosfato dibásico de sodio dihidrato 0,5 M a un matraz volumétrico de 1 L. Diluir a volumen con agua y mezclar. Ajustar la solución resultante a un pH de 8,0 si fuera necesario.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y degasificada de acetonitrilo y *Solución amortiguadora de pH 8,0* (60:40). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver cantidades, pesadas con exactitud, de ER Clorhidrato de Ropivacaína USP y ER Compuesto Relacionado A de Ropivacaína USP en *Fase móvil* y diluir cuantitativamente, y en diluciones sucesivas, con *Fase móvil* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 0,25 mg por mL de ER Clorhidrato de Ropivacaína USP y aproximadamente 0,26 µg por mL de ER Compuesto Relacionado A de Ropivacaína USP.

Preparación de valoración—Diluir exactamente la Inyección con *Fase móvil* para obtener una concentración de aproximadamente 0,25 mg por mL.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 240 nm y una columna de 3,9 mm × 15 cm rellena con material L1 de 5 ó 10 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,2 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas, calculada para el pico de ropivacaína, no es más de 1,0%; y la resolución, *R*, entre el compuesto relacionado A de ropivacaína y ropivacaína no es menor de 5.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de clorhidrato de ropivacaína ($C_{17}H_{26}N_2O \cdot HCl$) en cada mL de Inyección tomado, por la fórmula:

$$CD(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Ropivacaína USP en la *Preparación estándar*; *D* es el factor de dilución, en mL, de la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. ■_{1S} (USP30)

Saquinavir, Cápsulas

Cambio en la redacción:**Disolución** (711)—

Solución amortiguadora de citrato—■ Transferir 5,82 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y 16,7 g de ácido cítrico monohidrato a un matraz volumétrico de 1 L. Disolver y diluir a volumen con agua. ■_{1S} (USP30)

Medio: *Solución amortiguadora de citrato*; 900 mL.

Aparato 2: 50 rpm.

Tiempo: 45 minutos.

Procedimiento—Determinar la cantidad disuelta de $C_{38}H_{50}N_6O_5$ empleando absorción UV a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 240 nm, en porciones filtradas de la solución en análisis, diluidas apropiadamente con *Medio*, en comparación con una *Solución estándar* con una concentración conocida de ER Mesilato de Saquinavir USP en el mismo *Medio*.

Tolerancias—No menos de 75% (*Q*) de la cantidad declarada de $C_{38}H_{50}N_6O_5$ se disuelve en 45 minutos.

Eliminar lo siguiente:

■ Fluoruro de Sodio y Ácido Fosfórico, Solución Tópica

» La *Solución Tópica* de Fluoruro de Sodio y Ácido Fosfórico contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de ión fluoruro.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables de plástico.

Etiquetado—Etiquetar la *Solución Tópica* en términos del contenido de fluoruro de sodio (NaF) y en términos del contenido de ión fluoruro.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Fluoruro de Sodio USP*.

pH (791)—Utilizando 40 mL de *Solución Tópica*, proceder según se indica en la prueba de pH en *Fluoruro de Sodio y Ácido Fosfórico*, *Gel*: el pH está entre 3,0 y 4,5.

Otros requisitos—Responde a las pruebas de *Identificación en Fluoruro de Sodio y Ácido Fosfórico, Gel*.

Valoración—[NOTA—Almacenar todas las soluciones, salvo la *Solución amortiguadora*, en envases de plástico.]

Solución amortiguadora y Preparaciones estándar—Preparar según se indica en la *Valoración en Fluoruro de Sodio, Solución Oral*.

Preparación de valoración—Transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL un volumen de Solución Tópica medido con exactitud, que equivalga aproximadamente a 20 mg de ión fluoruro, agregar agua para disolver, diluir a volumen con agua y mezclar.

Procedimiento—Proceder según se indica en el *Procedimiento de la Valoración en Fluoruro de Sodio, Solución Oral*. Calcular la cantidad, en mg, de ión fluoruro en cada mL de la Solución Tópica tomada, por la fórmula:

$$C/V$$

en donde *C* es la concentración determinada de ión fluoruro, en µg por mL, en la *Preparación de valoración* y *V* es el volumen tomado, en mL, de la Solución Tópica. ■^{1S} (USP30)

Salicilato de Sodio, Tabletas

Cambio en la redacción:

Disolución (711)—

Medio: agua; 900 mL.

Aparato 1: 100 rpm.

Tiempo: 45 minutos.

Procedimiento—Determinar la cantidad de $C_7H_5NaO_3$ disuelta a partir de las absorbancias UV a la longitud de onda de máxima absorbancia, aproximadamente a 230 nm, ■^{1S} (USP30) usando porciones filtradas de la solución en análisis, diluidas con agua, si fuera necesario, en comparación con una Solución estándar con una concentración conocida de ER Salicilato de Sodio USP en el mismo Medio.

Tolerancias—No menos de 75% (*Q*) de la cantidad declarada de $C_7H_5NaO_3$ se disuelve en 45 minutos.

Tiabendazol, Tabletas

(Título vigente—no cambiará hasta el 1° de febrero de 2010)
Cambio de título de la monografía—será oficial a partir del 1° de febrero de 2010

Ver Tiabendazol, Tabletas Masticables

Agregar lo siguiente:

■Tiabendazol, Tabletas Masticables

(La Monografía con este nuevo título: será oficial a partir del 1° de febrero de 2010)

(El título actual de la monografía es *Tiabendazol, Tabletas*)

» Las Tabletas Masticables de Tiabendazol contienen no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de tiabendazol ($C_{10}H_7N_3S$).

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables.

Etiquetado—Etiquetar las Tabletas Masticables indicando que se deben masticar antes de tragar.

Estándares de referencia USP (11)—*ER Tiabendazol USP*.

Identificación—

A: Triturar una cantidad de Tabletas Masticables pulverizadas, que equivalga aproximadamente a 0,5 g de tiabendazol, con aproximadamente 20 mL de agua y filtrar. Lavar el residuo con 20 mL de agua, desechar el lavado, disolver el residuo en 30 mL de ácido clorhídrico 0,1 N y filtrar. Recoger el filtrado en un separador, alcalinizarlo con hidróxido de sodio 1 N y extraer con 10 mL de disulfuro de carbono. Pasar la capa de disulfuro de carbono a través de un filtro seco, recogiendo el filtrado en una cápsula de evaporación. Evaporar el disolvente con calor moderado y una corriente de nitrógeno. [Precaución—No sobrecalentar el residuo.] El residuo así obtenido cumple con los requisitos a la prueba de Identificación *A* en *Tiabendazol*.

B: El tiempo de retención del pico principal del cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar* según se obtienen en la *Valoración*.

Uniformidad de unidades de dosificación (905): cumplen con los requisitos.

PROCEDIMIENTO PARA UNIFORMIDAD DE CONTENIDO—

Preparación estándar—Disolver en ácido clorhídrico 0,1 N una cantidad pesada con exactitud de ER Tiabendazol USP, y diluir cuantitativamente en diluciones sucesivas con ácido clorhídrico 0,1 N, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 5 µg por mL.

Preparación de prueba—Transferir 1 Tableta Masticable a un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar aproximadamente 75 mL de ácido clorhídrico 0,1 N y calentar en un baño de vapor durante aproximadamente 1 hora. Enfriar a temperatura ambiente, diluir a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N, mezclar y filtrar una porción de la solución, desechando los primeros 20 mL del filtrado. Pipetear 5 mL del filtrado y transferir a un matraz volumétrico de 500 mL, diluir a volumen con ácido clorhídrico 0,1 N y mezclar.

Procedimiento—Determinar concomitantemente las absorbancias de la *Preparación estándar* y la *Preparación de prueba* a la longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 302 nm, con un espectrofotómetro adecuado, usando ácido clorhídrico 0,1 N como blanco. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{10}H_7N_3S$ en la Tableta Masticable tomada, por la fórmula:

$$(TC/D)(A_U/A_S)$$

en donde *T* es la cantidad declarada, en mg, de Tiabendazol en la Tableta Masticable; *C* es la concentración, en µg por mL, de ER Tiabendazol USP en la *Preparación estándar*; *D* es la concentración, en µg por mL, de tiabendazol en la *Preparación de prueba*, basada en la cantidad declarada por Tableta Masticable y el grado de dilución; y *A_U* y *A_S* son las absorbancias de la *Preparación de prueba* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Valoración—

Preparación estándar y Sistema cromatográfico—Preparar según se indica en *Valoración en Tiabendazol, Suspensión Oral*.

Solución amortiguadora de fosfato de pH 3,5—Disolver 13,8 g de fosfato monobásico de sodio en agua para obtener 2000 mL de solución. Ajustar esta solución con ácido fosfórico a un pH de $3,5 \pm 0,05$.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Solución amortiguadora de fosfato pH 3,5* y metanol (54 : 46). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas Masticables. Transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL una porción del polvo, pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 200 mg de tiabendazol, agregar 100 mL de ácido clorhídrico 0,1 N, mezclar y entibiar la solución durante al menos 30 minutos. Dejar que se enfríe a temperatura ambiente, diluir a volumen con agua, mezclar y filtrar, desechando los primeros 20 mL del filtrado.

Procedimiento—Proceder según se indica en *Procedimiento en Valoración en Tiabendazol, Suspensión Oral*. Calcular la cantidad, en mg, de tiabendazol ($C_{10}H_7N_3S$) en la porción de Tabletas Masticables tomada, por la fórmula:

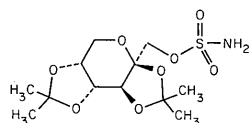
$$1000C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Tiabendazol USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

(Oficial a partir del 1° de febrero de 2010)■^{1S} (USP30)

Agregar lo siguiente:

■Topiramato



$C_{12}H_{21}NO_8S$ 339,36

β -D-Fructopyranose, 2,3:4,5-bis-*O*-(1-methylethylidene)-, sulfamate.

Sulfamato de 2,3:4,5-di-*O*-isopropiliden- β -D-fructopiranososa [97240-79-4].

» El Topiramato contiene no menos de 98,0 por ciento y no más de 102,0 por ciento de $C_{12}H_{21}NO_8S$, calculado con respecto a la sustancia anhidra.

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz y almacenar a temperatura ambiente controlada.

Estándares de referencia USP (11)—ER Topiramato USP. ER Compuesto Relacionado A de Topiramato USP.

Identificación—

A: Absorción en el Infrarrojo (197K).

B: El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

Rotación específica (781S): entre -29° y -35° , medida a 20° .

Solución de prueba: 4 mg por mL, en metanol.

Agua, Método I (921): no más de 0,5%.

Residuo de incineración (281): no más de 0,2%.

Límite de sulfamato y sulfato—

Diluyente—Preparar una mezcla de agua de alta pureza y acetonitrilo (80:20).

Solución A—Transferir aproximadamente 4 g de hidróxido de sodio a un matraz volumétrico de 1000 mL. Disolver y diluir a volumen con *Agua de Alta Pureza* (ver *Reactivos en Resistencia Química—Envases de Vidrio en Envases* (661)), filtrar y desgasificar.

Solución B—Usar *Agua de Alta Pureza* filtrada y desgasificada.

Solución C—Diluir 50 mL de *Solución A* hasta 100 mL con *Agua de Alta Pureza*, filtrar y desgasificar.

Fase móvil—Usar mezclas variables de *Solución A*, *Solución B* y *Solución C* según se indica en el *Sistema cromatográfico*. Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Solución madre de ácido sulfámico—Transferir aproximadamente 60 mg, pesados con exactitud, de ácido sulfámico a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y diluir a volumen con *Diluyente*.

Solución madre de sulfato—Transferir aproximadamente 90,7 mg, pesados con exactitud, de sulfato de potasio a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y diluir a volumen con *Diluyente*.

Solución estándar—Transferir 3,0 mL de *Solución madre de ácido sulfámico* y de *Solución madre de sulfato* a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con *Diluyente* y mezclar.

Solución de prueba—Transferir aproximadamente 100 mg de Topiramato, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 10 mL. Disolver y diluir a volumen con *Agua de Alta Pureza*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de conductividad, una guarda columna de 4,0 mm \times 5 cm rellena con material L46 y una columna de 4,0 mm \times 25 cm rellena con material L46. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2,0 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Solución C (%)	Elución
0	0	95	5	equilibrio
0–7,0	0	95	5	isocrática
7,0–15,0	0→20	95→0	5→80	gradiente lineal
15,0–20,0	20	0	80	isocrática
20,0–20,1	20→0	0→95	80→5	gradiente lineal
20,1–25,0	0	95	5	reequilibrio

Injectar en el cromatógrafo la *Solución estándar* y registrar las áreas de los picos según se indica en el *Procedimiento*: el tiempo de retención relativo es 1,0 para el pico de sulfato y aproximadamente 0,27 para el pico de sulfamato; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0% para los picos de sulfato y sulfamato.

Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ L) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos de sulfato y sulfamato. Calcular el porcentaje de sulfato y sulfamato en la porción de Topiramato tomada, por la fórmula:

$$1000F(C/W)(r_i/r_s)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de sulfato de potasio o ácido sulfámico en la *Solución estándar*; F es el factor de corrección y es igual a 0,551 para sulfato y 0,989 para sulfamato; W es el peso, en mg, de Topiramato tomado; y r_i y r_s son las áreas de los picos de los iones sulfato o sulfamato obtenidas a partir de la *Solución de prueba* y la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentra más de 0,10% de ión sulfato; y no se encuentra más de 0,10% de ión sulfamato.

Valoración—

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de acetonitrilo y agua (1:1). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)).

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad de ER Topiramato USP, pesada con exactitud, y diluir cuantitativamente con *Fase móvil*, y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 2,0 mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 50 mg de Topiramato, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y diluir a volumen con *Fase móvil*.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de índice de refracción y una columna de 4,6 mm \times 25 cm rellena con material L1 de 5 μ m. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,6 mL por minuto. Mantener la temperatura del detector y de la columna a 50° . Injectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la eficiencia de la columna no es menos de 1500 platos teóricos; el factor de asimetría no es mayor de 2,0; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Injectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 μ L) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y

medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{12}H_{21}NO_8S$ en la porción de Topiramato tomada, por la fórmula:

$$25C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Topiramato USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las áreas de los picos obtenidas a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente. \blacksquare_{1S} (USP30)

Triclosán

Cambio en la redacción:

Valoración—

Preparación estándar—Disolver en \blacksquare acetato de etilo \blacksquare_{1S} (USP30) una cantidad, pesada con exactitud, de ER Triclosán USP y diluir cuantitativamente con \blacksquare acetato de etilo \blacksquare_{1S} (USP30), y si fuera necesario en diluciones sucesivas, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente $\blacksquare 0,4 \blacksquare_{1S}$ (USP30) mg por mL.

Preparación de valoración—Transferir aproximadamente 40 mg de Triclosán, pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de $\blacksquare 100$ mL \blacksquare_{1S} (USP30), disolver y diluir a volumen con \blacksquare acetato de etilo \blacksquare_{1S} (USP30), y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama y una columna capilar de 0,53 mm \times 15 m con fase G3. El gas transportador es helio mantenido aproximadamente a 6 psi. La temperatura del inyector se mantiene a 34° y se aumenta rápidamente a 200° inmediatamente después de la inyección, la temperatura de la columna se mantiene a 34° y la temperatura del detector se mantiene a 260°. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente $\blacksquare 2,0 \blacksquare_{1S}$ (USP30) μ L) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, incrementar la temperatura de la columna a razón de 20° por minuto hasta alcanzar 140°, luego incrementar la temperatura de la columna a razón de 4° por minuto hasta alcanzar 240°, mantener esta temperatura durante no menos de 5 minutos, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de $C_{12}H_7Cl_3O_2$ en la porción de Triclosán tomada, por la fórmula:

$$\blacksquare 100C(r_U/r_S) \blacksquare_{1S} \text{ (USP30)}$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Triclosán USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente.

Tripsina Cristalizada

Cambio en la redacción:

» La Tripsina Cristalizada es una enzima proteolítica cristalizada proveniente de un extracto del \blacksquare páncreas de animales sanos, bovinos, porcinos o ambos. \blacksquare_{1S} (USP30) Cuando se valora según se indica aquí, contiene no menos de 2500 Unidades USP de Tripsina por mg,

calculadas con respecto a la sustancia seca, y no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la potencia declarada.

NOTA—Determinar la aptitud de los sustratos y verificar el ajuste del espectrofotómetro llevando a cabo la *Valoración* con el Estándar de Referencia de Tripsina Cristalizada USP.

Agregar lo siguiente:

■Ácido Valproico, Inyección

(Título para esta nueva monografía—será oficial a partir del 1° de octubre de 2008)

» La Inyección de Ácido Valproico es una solución acuosa estéril de valproato sódico, formada por la interacción de Ácido Valproico e Hidróxido de Sodio, en Agua para Inyección, y uno o más amortiguadores o agentes secuestrantes adecuados. Contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de ácido valproico ($C_8H_{16}O_2$). No contiene agentes antimicrobianos.

Envasado y almacenamiento—Conservar en *Envases para Inyecciones* monodosis según se describe en *Inyectables* (1), preferentemente de vidrio de Tipo I. Almacenar a temperatura ambiente controlada, excursiones permitidas entre 15° y 30°.

Etiquetado—Etiquetar indicando el nombre y la cantidad de cualquier amortiguador o agente secuestrante usado.

Estándares de referencia USP (11)—ER Endotoxina USP. ER Ácido Valproico USP.

Identificación—

A: El tiempo de retención relativo del pico principal en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

B: Cumple con los requisitos de las pruebas para Sodio (191).

Endotoxinas bacterianas (85)—No contiene más de 23 Unidades USP de Endotoxinas por mL de Inyección.

Esterilidad (71)—Cumple con los requisitos cuando se realiza la prueba según se indica en *Filtración por Membrana* en *Prueba de Esterilidad del Producto a Examinar*.

pH (791): entre 7,0 y 9,0.

Partículas (788)—Cumple con los requisitos para inyecciones de pequeño volumen.

Otro requisitos—Cumple con los requisitos en *Inyectables* (1).

Valoración—

Solución de estándar interno—Disolver una cantidad de bifenilo en cloruro de metileno para obtener una solución que contenga 5 mg por mL.

Preparación madre del estándar—Preparar una solución de ER Ácido Valproico USP en *Solución de estándar interno* con una concentración de aproximadamente 8 mg por mL.

Preparación estándar—Transferir 5,0 mL de la *Preparación madre del estándar* a un matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con cloruro de metileno.

Preparación de valoración—Transferir un volumen, medido con exactitud, de Inyección equivalente a 400 mg de ácido valproico a un recipiente adecuado; agregar aproximadamente 20 mL de ácido

clorhídrico al 5% (v/v); agitar mecánicamente durante 2 minutos; agregar 50,0 mL de la *Solución de estándar interno*; y agitar mecánicamente durante 1 hora. Dejar que las capas se separen (aproximadamente 1 hora). La capa orgánica inferior permanece turbia y de vez en cuando se puede persistir una leve emulsión. Si forma una emulsión, deshacerla revolviendo con una varilla de vidrio. Pipetear 5 mL del extracto de la capa orgánica inferior y transferir a un matraz volumétrico 50 mL, y diluir con cloruro de metileno.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar el cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama y una columna de vidrio de 2 mm × 1,8 m rellena con fase G34 al 10% sobre soporte S1A de malla de 80 a 100. Mantener la temperatura de la columna aproximadamente a 155°, la temperatura del inyector aproximadamente a 275° y la temperatura del detector aproximadamente a 300°. Utilizar helio seco como gas transportador a una velocidad de flujo de aproximadamente 20 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Preparación estándar* según se indica en el *Procedimiento*: la resolución, R , entre los picos de ácido valproico y bifenilo no es menor de 3,0; y la desviación estándar relativa de los cocientes de área de los picos para inyecciones repetidas no es más de 2,0%.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 2 µL) de la *Preparación estándar* y de la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos de ácido valproico y de bifenilo. Calcular la cantidad, en mg, de ácido valproico en el volumen de Inyección tomado, por la fórmula:

$$C(R_U/R_S)D$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Ácido Valproico USP en la *Preparación estándar*; R_U y R_S son los cocientes de área de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente; y D es el factor de dilución apropiado usado para preparar la *Preparación de valoración*. ■_{1S} (USP30)

Vasopresina

Cambio en la redacción:

Identificación—

A: El tiempo de retención del pico de vasopresina en el cromatograma de la *Preparación de valoración* se corresponde con el del cromatograma de la *Preparación estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

■**B:** *Análisis espectral de masas*—

Solución de infusión—Preparar una mezcla de acetonitrilo, agua y ácido de trifluoroacético (80 : 20 : 0,08).

Solución estándar—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Vasopresina USP en agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL.

Solución de prueba—Disolver una cantidad, pesada con exactitud, de ER Vasopresina USP en agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1 mg por mL. [NOTA—Las concentraciones finales de la *Solución estándar* y la *Solución de prueba* se pueden ajustar dependiendo de la sensibilidad del espectrómetro de masas utilizado en las pruebas.]

Sistema de espectrómetro de masas (ver *Espectrometría de Masas* (736))—Equipar un espectrómetro LC/MS con un sistema de infusión conectado a una interfase de electrospray. El espectrómetro de masas se hace funcionar en el modo de iones positivos. [NOTA—Se puede ajustar la velocidad de flujo del sistema de infusión si fuera necesario. Para ayudar en la nebulización el sistema de infusión puede contener un flujo de gas envolvente.]

Procedimiento—Inyectar por separado en el sistema de infusión volúmenes iguales de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba* (aproximadamente 10 µL). La velocidad de flujo del sistema de infusión es de aproximadamente 0,3 mL por minuto. Obtener un espectro de masas optimizado después de la inyección. Los espectros de masas de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba* deben contener los picos con cocientes masa-carga de 1084 y 543. ■_{1S} (USP30)

Clorhidrato de Verapamilo, Inyección

Cambio en la redacción:

Estándares de referencia USP (11)—ER Endotoxina USP. ER Clorhidrato de Verapamilo USP. ER Compuesto Relacionado A de Verapamilo USP. ■ER Compuesto Relacionado B de Verapamilo USP. ER Compuesto Relacionado E de Verapamilo USP. ER Compuesto Relacionado F de Verapamilo USP. ■_{1S} (USP30)

Cambio en la redacción:

Compuestos relacionados—

Mezcla de disolventes acuosa, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica ■en la *Valoración*. ■_{1S} (USP30)

Solución estándar—Disolver cantidades, pesadas con exactitud, de ER Clorhidrato de Verapamilo USP, ER Compuesto Relacionado A de Verapamilo USP, ■ER Compuesto Relacionado E de Verapamilo USP y ER Compuesto Relacionado F de Verapamilo USP ■_{1S} (USP30) en *Fase móvil* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 2,5 mg por mL de ER Clorhidrato de Verapamilo USP y 0,0075 mg por mL de ER Compuesto Relacionado A de Verapamilo USP, de ■ER Compuesto Relacionado E de Verapamilo USP y de ER Compuesto Relacionado F de Verapamilo USP. ■_{1S} (USP30).

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba*, y dejar que la *Solución de prueba* eluya durante no menos de cuatro veces el tiempo de retención de clorhidrato de verapamilo. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. Los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,4 para ■compuesto relacionado F de verapamilo, ■_{1S} (USP30) 0,5 para compuesto relacionado A de verapamilo, 0,7 para ■compuesto relacionado E de verapamilo, ■_{1S} (USP30) y 1,0 para verapamilo. Calcular la cantidad, en mg, de cada impureza individual en cada mL de la Inyección tomado, por la fórmula:

$$C(L/D)(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ■compuesto relacionado A de verapamilo, compuesto relacionado E de verapamilo o compuesto relacionado F de verapamilo, ■_{1S} (USP30) en la *Solución estándar* ■[NOTA—Para calcular cualquier otra impureza no especificada, C es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Verapamilo USP en la *Solución Estándar*.]; ■_{1S} (USP30) L es la cantidad declarada, en mg por mL, de clorhidrato de verapamilo en la Inyección; D es la concentración, en mg por mL, de clorhidrato de verapamilo en la *Solución de prueba*, basada en la cantidad declarada por cada mL y en el grado de dilución; y r_U y r_S son las respuestas de los picos de la impureza apropiada obtenidos a partir de la *Solución de prueba* y de la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentra más de 0,3% de cualquier impureza especificada y la suma de todas las impurezas no es más de 1,0%.

Cambio en la redacción:**Valoración—**

■ *Mezcla de disolventes acuosa*—Preparar una solución de acetato de sodio 0,015 N que contenga aproximadamente 33 mL de ácido acético glacial por L.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Fase móvil acuosa*, acetonitrilo y 2-aminoheptano (70:30:0,5). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)). ■^{1S (USP30)}

Preparación estándar—Disolver ■ una cantidad pesada ■^{1S (USP30)} con exactitud de ER Clorhidrato de Verapamilo USP en *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 2,5 mg por mL.

Preparación de valoración—Diluir la Inyección, si fuera necesario cuantitativamente, con *Fase móvil* para obtener una solución con una concentración de no más de 2,5 mg de clorhidrato de verapamilo por mL.

■ *Solución de aptitud del sistema*—Disolver cantidades adecuadas de ER Clorhidrato de Verapamilo USP y ER Compuesto Relacionado B de Verapamilo USP en *Fase móvil* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 1,9 mg por mL y 1,5 mg por mL, respectivamente.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 278 nm y una columna de 4,6 mm × 12,5 a 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,9 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,88 para compuesto relacionado B de verapamilo y 1,0 para verapamilo; la resolución, *R*, entre los picos correspondientes a compuesto relacionado B de verapamilo y verapamilo no es menor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. ■^{1S (USP30)}

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración*, y dejar que la *Preparación de valoración* eluya durante no menos de cuatro veces el tiempo de retención del verapamilo. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas para todos los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de clorhidrato de verapamilo ($C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$), en cada mL de la Inyección tomado, por la fórmula:

$$C(L/D)(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Verapamilo USP en la *Preparación estándar*; *L* es la cantidad declarada, en mg por mL, de clorhidrato de verapamilo en la Inyección; *D* es la concentración, en mg por mL, de clorhidrato de verapamilo en la *Preparación de valoración*, basada en la cantidad declarada en cada mL y en el grado de dilución; y *r_U* y *r_S* son las respuestas correspondientes a los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente.

Clorhidrato de Verapamilo, Tabletas**Cambio en la redacción:**

Estándares de referencia USP (11)—ER Clorhidrato de Verapamilo USP. ER Compuesto Relacionado A de Verapamilo USP. ■ ER Compuesto Relacionado B de Verapamilo USP. ER Compuesto Relacionado E de Verapamilo USP. ER Compuesto Relacionado F de Verapamilo USP. ■^{1S (USP30)}

Cambio en la redacción:**Compuestos relacionados—**

Mezcla de disolventes acuosa, Fase móvil, Solución de aptitud del sistema y Sistema cromatográfico—Proceder según se indica ■ en la *Valoración*. ■^{1S (USP30)}

Solución estándar—Disolver en *Fase móvil* cantidades, pesadas con exactitud, de ER Clorhidrato de Verapamilo USP, ER Compuesto Relacionado A de Verapamilo USP, ■ ER Compuesto Relacionado E de Verapamilo USP y ER Compuesto Relacionado F de Verapamilo USP. ■^{1S (USP30)} para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 1,6 mg de ER Clorhidrato de Verapamilo USP por mL y 0,0048 mg de ER Compuesto Relacionado A de Verapamilo USP, de ■ ER Compuesto Relacionado E de Verapamilo USP y de ER Compuesto Relacionado F de Verapamilo USP. ■^{1S (USP30)} por mL.

Solución de prueba—Usar la *Preparación de valoración*.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Solución estándar* y de la *Solución de prueba* y dejar que la *Solución de prueba* eluya durante no menos de cuatro veces el tiempo de retención de verapamilo. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos. [NOTA—Los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,4 para el ■ compuesto relacionado F de verapamilo; ■^{1S (USP30)} 0,5 para el compuesto relacionado A de verapamilo; 0,7 para el ■ compuesto relacionado E de verapamilo. ■^{1S (USP30)} y 1,0 para verapamilo.] Calcular la cantidad, en mg, de cada impureza individual en cada mL de la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$25C(r_U/r_S)$$

en donde *C* es la concentración, en mg por mL, del ■ compuesto relacionado A de verapamilo, del compuesto relacionado E de verapamilo o del compuesto relacionado F de verapamilo. ■^{1S (USP30)} en la *Solución estándar*. ■ [NOTA—Para calcular cualquier otra impureza no especificada, *C* es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Verapamilo USP en la *Solución Estándar*.] ■^{1S (USP30)} y *r_U* y *r_S* son las respuestas de los picos de la impureza apropiada obtenidos a partir de la *Solución de prueba*, y la *Solución estándar*, respectivamente: no se encuentra más de 0,3% de cualquier impureza especificada y la suma de todas las impurezas no es más de 1,0%.

Cambio en la redacción:**Valoración—**

■ *Mezcla de disolventes acuosa*—Preparar una solución de acetato de sodio 0,015 N que contenga aproximadamente 33 mL de ácido acético glacial por L.

Fase móvil—Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de *Fase móvil acuosa*, acetonitrilo y 2-aminoheptano (70:30:0,5). Hacer ajustes si fuera necesario (ver *Aptitud del Sistema en Cromatografía* (621)). ■^{1S (USP30)}

Preparación estándar—Disolver en *Fase móvil* una cantidad, pesada con exactitud, de ER Clorhidrato de Verapamilo USP para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,6 mg por mL.

Preparación de valoración—Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir a un tubo de centrifuga con tapón una porción del polvo, pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 40 mg de clorhidrato de verapamilo y agregar 25 mL de *Fase móvil*. Agitar mecánicamente durante 15 minutos, centrifugar y, si fuera necesario, filtrar el sobrenadante.

■ *Solución de aptitud del sistema*—Disolver cantidades adecuadas de ER Clorhidrato de Verapamilo USP y ER Compuesto Relacionado B de Verapamilo USP en *Fase móvil* para obtener una solución con concentraciones conocidas de aproximadamente 1,9 mg por mL y 1,5 mg por mL, respectivamente.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 278 nm y una columna de 4,6 mm × 12,5 a 15 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 0,9 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de

retención relativos son aproximadamente 0,88 para el compuesto relacionado B de verapamilo y 1,0 para verapamilo; la resolución, R , entre los picos del compuesto relacionado B de verapamilo y verapamilo no es menor de 1,5; y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es más de 2,0%. ■^{1S} (USP30)

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración* y dejar que la *Preparación de valoración* eluya durante no menos de cuatro veces el tiempo de retención de verapamilo. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de clorhidrato de verapamilo ($C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$25C(r_U/r_S)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Clorhidrato de Verapamilo USP en la *Preparación estándar*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y de la *Preparación estándar*, respectivamente.

Vinorelbina, Inyección

Cambio en la redacción:

» La Inyección de Vinorelbina es una solución estéril de Tartrato de Vinorelbina en Agua para Inyección. Contiene no menos de •90,0₅ por ciento y no más de •110,0₅ por ciento de la cantidad declarada de vinorelbina ($C_{45}H_{54}N_4O_8$).

Precaución—Manipular la Inyección de Vinorelbina con sumo cuidado ya que es un potente agente citotóxico.

Cambio en la redacción:

Valoración—

Solución amortiguadora de fosfato, Fase móvil y Solución de aptitud del sistema—Proceder según se indica en la prueba de *Compuestos relacionados* en *Tartrato de Vinorelbina*.

Preparación estándar—Disolver en agua una cantidad de ER Tartrato de Vinorelbina USP, pesada con exactitud, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente •0,14 mg₅ de vinorelbina por mL.

Preparación de valoración—Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL un volumen de Inyección, medido con exactitud, que equivalga aproximadamente a 10 mg de vinorelbina, diluir a volumen con agua y mezclar.

Sistema cromatográfico (ver *Cromatografía* (621))—Equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector de arreglo de diodos y una columna de 3,9 mm × 15 cm rellena con material L1. Mantener la temperatura de la columna a 40°. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto. Inyectar en el cromatógrafo la *Solución de aptitud del sistema* y registrar el cromatograma según se indica en el *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,8 para el producto de la fotodegradación, 1,0 para la vinorelbina y aproximadamente 1,2 para el compuesto relacionado A de vinorelbina; y la retención relativa, α , entre el tartrato de vinorelbina y el compuesto relacionado A de vinorelbina no es menor de 1,1.

Procedimiento—Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación estándar* y la *Preparación de valoración*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de vinorelbina con un detector de arreglo de diodos. Calcular la cantidad, en mg, de vinorelbina ($C_{45}H_{54}N_4O_8$) en cada mL de la Inyección tomada, por la fórmula:

$$\bullet(778,93/1079,11)C(L/D)(r_U/r_S)$$

en donde 778,93 y 1079,11 son los pesos moleculares de vinorelbina y tartrato de vinorelbina, respectivamente; ₅ C es la concentración, en mg por mL, de ER Tartrato de Vinorelbina USP en la *Preparación estándar*; L es la cantidad declarada, en mg, de vinorelbina en cada mL de la Inyección tomada; D es la concentración, en mg por mL, de vinorelbina en la *Preparación de valoración*; y r_U y r_S son las respuestas de los picos a 267 nm obtenidos a partir de la *Preparación de valoración* y la *Preparación estándar*, respectivamente.