



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANTEPROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PARA:
OXITETRACICLINA, CLORHIDRATO DE
OXITETRACICLINA, PIRROLIDIN METIL
TETRACICLINA, NITRATO DE PIRROLIDIN
METIL TETRACICLINA, CITRATO DE
PIRROLIDIN METIL TETRACICLINA.

T E S I S

Que para Obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a :
ARTURO LOPEZ ANAYA

MEXICO, D. F. 1977.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CLAS Tesis 1977
ABO M-228
FECHA 23/4
REC 23/4
• _____



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Q.F.B. RAMON ULACIA ESTEVE
Vocal	Q.F.B. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES
Secretario	Q.F.B. BICE V. NOVI AVILA
1er. Suplente	Q.F.B. ANDRES ZUÑIGA PADILLA
2do. Suplente	Q.F.B. MARIO MIRANDA CASTRO

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorios Sanfer, S.A.

Sustentante:

ARTURO LOPEZ ANAYA

Asesor del tema:

Q.F.B. BICE V. NOVI AVILA

CON TODO CARIÑO

A MIS PADRES:

JUAN Y MARIA

A MIS HERMANOS:

LUCIA

RODOLFO

CLARA

A MI AMOR:

MARIA

A MIS MAESTROS

A MIS COMPAÑEROS

A MIS AMIGOS

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE HICIERON POSIBLE
CON SU COOPERACION Y AYUDA LA REALIZACION DE -
ESTE TRABAJO:

Q.F.B. BICE V. NOVI AVILA
Q.F.B. RAMON ULACIA ESTEVE
Q.F.B. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES
DR. EUGENIO TISELI
DR. LUIS E. SANCHEZ TORRES
DR. JULIO GALIMBERTI
JUAN MENDEZ VIVAR

INTRODUCCION

En la vida moderna, la mayor parte de los productos que la sociedad consume (entre ellos los de origen agrícola) provienen de la industria y se nos ofrecen después de un proceso muchas veces complicado y lento. El control de calidad de todo producto industrial es de fundamental importancia; entendiéndose -- por calidad de un producto el conjunto de especificaciones físicas, químicas o biológicas o sus combinaciones, que satisfacen las necesidades del uso a que están destinados.

En la industria de la transformación la calidad final del artículo, es el producto de la calidad de cada uno de sus constituyentes. En la Industria Químico Farmacéutica es de vital importancia la calidad de las materias primas que se emplean en la fabricación de una forma farmacéutica para asegurar la efectividad e inocuidad.

Para mantener la calidad uniforme de los productos se elaboran Normas que sirven de base para establecer patrones de comparación, para rectificar y elevar la calidad. Se establecen, además; métodos de --- prueba oficiales que deben aplicarse evitando así la posibilidad de obtener discrepancias en los resultados.

En este trabajo se presentan Anteproyectos de Normas Oficiales Mexicanas para cinco antibióticos, pertenecientes al grupo de las tetraciclinas, de fabricación nacional; en las que se mencionan características y especificaciones, además de los métodos de prueba.

La industria Químico-Farmacéutica consume gran -- variedad de materias primas, de las cuales las importadas constituyen un porcentaje elevado; esto debido entre otras causas; que no hay fabricación nacional, -- el precio del producto nacional es más caro que el de importación y la calidad ofrecida por los fabricantes

nacionales no es la requerida por la Industria Farmacéutica. La Secretaría de Industria y Comercio consciente de estos problemas, trata de disminuir las importaciones, superando la calidad por medio de la normalización.

"La normalización contempla la realidad científica y tecnológica del país". Los anteproyectos presentados en este trabajo contienen las especificaciones de las materias primas nacionales acordes con la tecnología, y son las mismas que los laboratorios farmacéuticos requieren en la elaboración de sus medicamentos. Al cumplir los fabricantes con esta calidad en sus materias primas los consumidores no tienen por que seguir importando.

La normalización surgió desde el momento mismo en que se presentó la necesidad de intercambiar ideas conocimientos y mercancías y fué preciso establecer reglas que permitieran este intercambio.

La máxima autoridad en este sentido es la Organización Internacional de la Normalización (I.S.O.) habiendo en cada país un organismo encargado de esta tarea, en México, es la Dirección General de Normas (D.G.N.), de la Secretaría de Industria y Comercio (S.I.C.) quien desempeña tan importante función.

La normalización es el proceso de formular y aplicar reglas para un acercamiento metódico a una determinada actividad en beneficio de los interesados y con la cooperación de los mismos y especialmente para la promoción óptima de la economía total, tomando en cuenta condiciones fundamentales y los requisitos de seguridad y se basa en los resultados de la ciencia y la tecnología y la experiencia. No solo determina la base para el desarrollo actual sino para el futuro y debe estar al nivel del progreso.

En resumen, la normalización es el proceso de formulación y establecimiento de especificaciones, así como la creación de normas, siendo una norma un dato de referencia que resulta de una elección colectiva razonada que sirve de base a entendimientos en-

la solución de problemas repetitivos.

Las normas precisan definiciones, características, dimensiones, calidades, métodos de ensayo, reglas de empleo, etc. Estos elementos de normalización pueden formularse separadamente o combinados en una misma norma.

Productores, distribuidores, usuarios, oficinas-públicas, organismos científicos, técnicos, personalidades calificadas, todos ellos concurren en la elaboración y aprobación de una norma para que esta tenga sentido.

El proceso a seguir para la elaboración de una norma en la S.I.C. en México es el siguiente:

En primer lugar, se presenta una solicitud a la D.G.N. encargada de clasificarla y quien, juntamente con el Comité Consultivo de la Normalización la estudia. Si el estudio es aprobado se incluye en el Plan de Normalización y es enviada al subcomite respectivo el cual esta integrado por técnicos especializados -- que disponen de elementos de juicio suficientes (material, documentos, experiencia propia, Etc.); este subcomite tiene a su cargo la elaboración del Anteproyecto de Norma Oficial, el cual después de un estudio--- EXHAUSTIVO si lo aprueba, lo envía en carácter de --- Proyecto al consejo directivo del comité este promueve una encuesta sobre el mismo haciendolo circular entre fabricantes, usuarios e instituciones que de una u -- otra forma intervienen en el campo.

Las encuestas con las opiniones y comentarios son recibidos por el Consejo Directivo del Comité y enviadas para su discusión al subcomité del cual provino, y se estudian los posibles cambios, estando de acuerdo las partes interesadas. Finalmente, y una vez corregido el Proyecto de Norma es enviado a la D.G.N. para su aprobación y publicación en el Diario Oficial de la Federación.

La normalización ofrece innumerables ventajas a un gran número de sectores, entre ellos productores y consumidores, y en general a la economía nacional-

Entre la ventajas mencionadas tenemos:

Para la producción: La planeación de producción de las materias primas hasta la terminación del producto, la eliminación de desperdicios, el movimiento de inventarios, el incremento del uso de métodos de producción en gran escala y abatimiento de costos.

Para el comprador: garantías precisas de calidad, confianza seguridad e intercambiabilidad, datos técnicos accesibles antes dispersos y desconocidos y facilidad para ordenar compras y reducción de retrasos en los envíos.

Para la Economía Nacional: Mejoramiento de la producción nacional, en lo que a la calidad y confianza respecta; mayor equilibrio entre la oferta y la demanda, reducción de malos entendidos; reducción de costos de distribución, establecimiento gradual de una guía para la práctica industrial convenida nacionalmente, argumentos de venta entre mercados internacionales e incremento en la productividad nacional.

ANTEPROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA

"OXITETRACICLINA"

DGN-39-4-III-1

1. GENERALIDADES

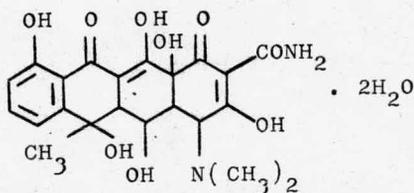
Antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclina-
nas

1.1 DEFINICIONES

Para los efectos de esta norma se entiende por oxite-
traciclina el producto constituido principalmente por
el compuesto químico $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$ con peso molecu-
lar de 496.48, con nombre químico de dihidrato de 4--
(Dimetilamino)-1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-octahidro-
3, 6, 10, 12, 12a-hexahidroxi-6-metil-1, 11-dioxo-2--
naftacenecarboxamida.

La oxitetraciclina es un compuesto hidratado o anhi-
dro con aspecto de polvo cristalino de color amarillo,
inodoro, obscurece por exposición a la luz solar in-
tensa y libre de materias extrañas visibles.

Fórmula desarrollada:



1.2 ALCANCE

La presente norma se aplica a la oxitetraciclina esté-
ril y no estéril.

1.3 USOS

En la fabricación de medicamentos

2. CLASIFICACION

El producto objeto de esta norma se clasifica en dos grados de calidad:

Grado A oxitetraciclina estéril

Grado B oxitetraciclina no estéril

3. ESPECIFICACIONES

3.1 DEL PRODUCTO

La oxitetraciclina en sus dos grados de calidad objeto de esta norma debe cumplir con las especificaciones indicadas en la tabla 1.

TABLA 1

Característica	Oxitetraciclina Especificaciones	
	Grado A estéril	Grado B no estéril
Identificación	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Potencia -en base anhidra-	No menos de 900 mcg de oxitetraciclina por mg	No menos de 900 mcg de oxitetraciclina por mg
Poder rotatorio específico en -base anhidra- (solución ácida al 1% por ciento a 20°C y 589 nm)	-188° a -200°	-188° a -200°
pH (suspensión al 1.0 por ciento - p/v)	4.5 a 7.0	4.5 a 7.0
Agua (Karl Fischer)	No más del 9.0 por ciento	No más del 9.0 por ciento
Cristalinidad	Presenta birrefringencia a la luz polarizada	Presenta birrefringencia a la luz polarizada
Absorbancia de luz en la región del ultravioleta a 353 nm -en base anhidra-	100 ± 4.0 por ciento comparada con una sustancia de referencia	100 ± 4.0 por ciento comparada con una sustancia de referencia
Inocuidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba

TABLA 1 (continúa)

Esterilidad	Pasa la prueba	- . -
Pirógenos	Pasa la prueba	- . -
Sustancias histaminosimiles	Pasa la prueba	- . -

3.2 MARCADO

3.2.1 En el envase y empaque

En el exterior del empaque y envase, debe aparecer -- una etiqueta en caracteres legibles y redactados en -- español los siguientes datos: Símbolo del fabricante-- nombre del producto, grado de calidad (estéril, no es-- téril), peso neto expresado en kilogramos o gramos, -- número de lote, fecha de fabricación y caducidad, la-- leyenda "Hecho en México", la leyenda "Conservese el-- envase bien cerrado en lugar fresco y seco", potencia o equivalente en actividad (en oxitetraciclina base)-- y otros datos tales como precauciones que deben tener-- se en el manejo y uso de los empaques y envases duran-- te su transporte y almacenamiento y el Sello Oficial-- de Garantía cuando la Secretaría de Industria y Comer-- cio lo juzgue conveniente.

3.3 ENVASADO Y EMPACADO

El producto no estéril objeto de esta norma se debe -- envasar en doble bolsa de polietileno negro o cual--- quier otro material cuyas características sean tales-- que no reaccione con el producto y lo proteja de la -- luz, cerradas por separado y a su vez estas en cuñe-- tes de capacidad y material adecuados para que resis-- tan su transporte y almacenamiento.

El producto estéril debe estar contenido en recipien-- tes estériles de aluminio o vidrio ámbar, hermética-- mente cerrados, los recipientes deben abrirse en área estéril y bajo condiciones asépticas.

4. MUESTREO

El muestreo se efectua de común acuerdo entre el fabricante y el comprador y a falta de este acuerdo se recomienda seguir el siguiente método:

4.1 METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO A GRANEL NO ESTERIL

4.1.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas

Muestreador de acero inoxidable, pulido de 1.27 cm de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia; completo de tubo interior de cierre.

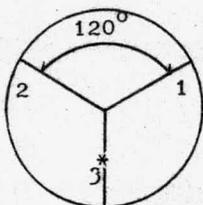
Bolsas de polietileno negro.

Frascos de vidrio color ámbar

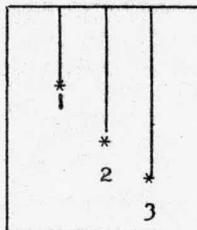
Frascos ámpula de color ámbar de 20 ml

4.1.2 Manera de operar

Por medio del muestreador sacar producto de cada cuñete en tres puntos diferentes; dispuestos a $\pm 120^\circ$ - uno de otro y a tres diferentes alturas según el esquema siguiente:



PLANTA



SECCION

De cada envase tomar aproximadamente 30 g de producto y ponerlos en bolsas de polietileno negro marcadas -- con el número del cuñete y el número del lote. Cerrar

los cuñetes con un oportuno cierre de garantía

De cada bolsa de polietileno pesar partes proporcionales al peso neto declarado en la etiqueta del cuñete correspondiente y transferirlas en otra bolsa de polietileno negro. Mezclar hasta completa homogeneidad.

Esta muestra oficial se dividirá en dos partes: una-- destinada al archivo (cantidad aproximada 100 g) y la otra destinada al análisis ambas envasadas en frascos de vidrio de color ámbar de 20 ml (20 frascos conteniendo cada uno 1 g de producto) debidamente rotulados y cerrados.

4.2 METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO A GRANEL GRADO ESTERIL

4.2.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Muestreador de acero inoxidable pulido, de 1.27 cm de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia; completo de tubo interior de cierre, esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h.

Frascos de vidrio de color ámbar, esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h.

Frascos ampula de color ámbar de 20 ml

Campana de flujo laminar o área estéril.

4.2.2 Manera de operar

~~En la campana de flujo laminar o en el área estéril -~~

realizar el procedimiento indicado en el punto 4.1.2, en forma aséptica.

4.3 CRITERIO DE ACEPTACION

El criterio de aceptación es 100 por ciento.

5. METODOS DE PRUEBA

Los reactivos que se mencionan en todas las determinaciones siguientes deben ser grado analítico (ver apéndice) a menos que se mencione otra cosa; cuando se -- indique agua debe entenderse agua destilada y la sustancia de referencia será la oficial (ver apéndice).

5.1 PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DE OXITETRACICLINA

5.1.1 Aparatos y equipo

Equipo común de laboratorio

5.1.2 Materiales y reactivos

Acido sulfúrico concentrado (95-98 por ciento p/p)

5.1.3 Procedimiento

Añadir 2 ml de ácido sulfúrico a 1 mg de muestra

5.1.4 Interpretación de resultados

Al agregar el ácido sulfúrico a la muestra se produce color rojo brillante.

5.2 DETERMINACION DE POTENCIA

5.2.1 METODO MICROBIOLÓGICO (CILINDRO-PLACA)

5.2.1.1 Aparatos y equipo

Horno para esterilizar

Autoclave

Incubadora

Fotocolorímetro con filtro para 580 nm

Botella de Roux

Cajas Petri de 20 X 100 mm

Tapas de porcelana vidriadas por fuera para las cajas Petri

Cilindros de acero inoxidable con diámetro exterior - de 8 mm (\pm 0.1 mm), diámetro interior de 6 mm (\pm 0.1 mm) y altura de 10 mm (\pm 0.1 mm).

Escala graduada con décimas de mm o similar

Equipo común de laboratorio

5.2.1.2 Materiales y reactivos

Sustancia de referencia de oxitetraciclina.

Solución reguladora de fosfatos de pH 4.5, estéril - (transferir 13.6 g de fosfato monopotásico a un matraz aforado de 1000 ml disolver y aforar con agua; esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min, - si es necesario, ajustar el pH a 4.45 - 4.55 con solución 18.0 N de ácido fosfórico o con solución 10.0 N de hidróxido de potasio).

Solución 0.01 N de ácido clorhídrico.

Medio antibiótico No. I (agar nutritivo para mantener al microorganismo de prueba); esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Peptona -----	6.0 g
Digerido pancreático de caseína-	4.0 g

Extracto de levadura -----	3.0 g
Extracto de carne -----	1.5 g
Dextrosa -----	1.0 g
Agar -----	15.0 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización pH 6.5 a 6.6

Medio antibiótico No. II (agar nutritivo para la capa de siembra y para la capa base); esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Extracto de carne -----	1.5 g
Peptona -----	6.0 g
Extracto de levadura -----	3.0 g
Agar -----	15.0 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización , pH de 5.8 a 6.0

Cepa de Bacillus cereus var. mycoides (ATCC 11778)

Solución salina estéril (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua; esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min).

5.2.1.3 Preparación de la solución de rereferencia
Transferir a un matraz aforado de 1000 ml una cantidad exactamente pesada de sustancia de referencia de oxitetraciclina equivalente a 100 mg de oxitetraciclina, disolver y aforar con solución 0.01 N de ácido clorhídrico (concentración estimada de 0.1 mg por ml) Mantener esta solución primaria bajo refrigeración en un matraz con tapón de vidrio esmerilado, desechar esta solución después de una semana.

El día de la prueba transferir 10.0 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 100 ml y aforar con solución 0.01 N de ácido clorhídrico (concentración-

estimada de 10 mcg por ml).

5.2.1.4 Preparación del microorganismo de prueba
El microorganismo de prueba es Bacillus cereus var. -
mycoides (ATCC 11778), mantener al microorganismo de
prueba sobre medio antibiótico No. I en tubos con 10-
ml de medio inclinado. Lavar el desarrollo de un tubo
con 3 ml de solución salina estéril. Pasar esta sus-
pensión de microorganismos a una botella de Roux que
contenga 300 ml de medio antibiótico No. I; extender
la suspensión en toda la superficie del medio con ayu-
da de perlas de vidrio estériles. Incubar por una se-
mana a 37 °C, lavar el crecimiento resultante con 50-
ml de solución salina estéril pasar la suspensión den-
tro de un matraz erlenmeyer con tapón de vidrio esme-
rilado. Calentar con agitación esta suspensión por 30
min a 70 °C, lavar tres veces con solución salina es-
téril y centrifugar entre cada lavado calentando en -
igual forma. Resuspender en 50 ml de solución salina
estéril, esta suspensión de esporas puede ser conser-
vada bajo refrigeración por 1 mes.

Hacer placas de prueba para determinar la cantidad de
suspensión que hay que agregar a 100 ml de medio anti-
biótico No. II (generalmente 0.1 ml) para obtener --
zonas de inhibición claras y definidas de tamaño apro-
piado que deberán aparecer después de la incubación --
con la solución de referencia de concentración de 1.0
mcg por ml.

5.2.1.5 Preparación de las placas

Preparar las placas el mismo día que se van a usar, -
añadir 21 ml de medio antibiótico No. II en cajas Pet-
tri de 20 X 100 mm, extender el medio uniformemente y
dejar solidificar, fundir la cantidad necesaria de me

dio antibiótico No. II, enfriar a 48 °C y añadir la cantidad necesaria apropiada de suspensión de Bacillus cereus var. mycoides, según las experiencias de la -- preparación del microorganismo de prueba, y mezclar -- para obtener una suspensión homogénea. Añadir a cada caja Petri 4 ml de este medio inoculado y distribuirlo uniformemente, cubrir las cajas Petri con tapas de porcelana y dejar solidificar, cuando el medio ha en -- durecido colocar 6 cilindros estériles en la superficie del agar inoculado a intervalos aproximadamente -- de 60° uno de otro sobre y radio de 2.8 cm.

5.2.1.6 Preparación de la curva de referencia

El día de la prueba preparar las siguientes diluciones a partir de la solución primaria de 10 mcg por ml, -- preparada como se indica en 5.2.1.3 usando solución -- reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5.

- 6.4 ml a 100 ml (0.64 mcg por ml)
- 8.0 ml a 100 ml (0.80 mcg por ml)
- 10.0 ml a 100 ml (1.00 mcg por ml)
- 12.5 ml a 100 ml (1.25 mcg por ml)
- 15.6 ml a 100 ml (1.56 mcg por ml)

usar 4 series de 3 cajas Petri cada una.

Serie 1 : llenar 3 cilindros alternados de cada caja -- con dilución de referencia de 0.64 mcg por ml.

Serie 2: llenar 3 cilindros alternados de cada caja -- con dilución de referencia de 0.80 mcg por ml.

Serie 3: llenar 3 cilindros alternados de cada caja -- con dilución de referencia de 1.25 mcg por ml.

Serie 4: llenar 3 cilindros alternados de cada caja -- con dilución de referencia de 1.56 mcg por ml.

Llenar los tres cilindros restantes de todas y cada --

una de las cajas con dilución de referencia de 1.0 -- mcg por ml.

Incubar las placas durante 16 - 18 h a 30 °C y medir los diámetros de inhibición de las placas, obtener el promedio de las 36 lecturas de la dilución de referencia de 1.0 mcg por ml y el promedio de las 9 lecturas de cada dilución de referencia. Corregir las lecturas de cada una de las series 1, 2, 3 y 4 aumentando o -- disminuyendo la misma diferencia que exista entre el promedio de las 36 lecturas de la dilución de 1.0 mcg por ml y el promedio de las 9 lecturas de la misma dilución en cada serie, por ejemplo:

Para corregir el punto de concentración 0.8 mcg por - ml; si el promedio de las 36 lecturas de la dilución de referencia de 1.0 mcg por ml fué de 20 mm y el promedio de las lecturas para el conjunto de estas tres placas de 1.0 mcg por ml fué de 19.8 mm, la corrección será de + 0.2 mm. Si el promedio de las lecturas de - 0.8 mcg por ml de las tres placas fué de 19 mm, el va lor corregido deberá ser de 19.2 mm.

Graficar los diámetros corregidos incluyendo el promedio de las 36 lecturas de 1.0 mcg por ml sobre papel semilogarítmico de 2 ciclos colocando la concentración del antibiótico en mcg por ml, en las ordenadas (escala logarítmica) y el diámetro de las zonas de inhibición en las abscisas (escala aritmética).

La curva de referencia se traza uniendo los valores - máximo y mínimo calculándolos por medio de las ecuaciones siguientes:

$$B = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$A = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

B = Diámetro de la zona de inhibición calculado para-

la concentración más baja de la curva

A = Diámetro de la zona de inhibición calculado para la concentración más alta de la curva.

c = Diámetro promedio de las 36 lecturas de 1.0 mcg por ml.

a, b, d y e = Valores promedio corregidos de las soluciones de referencia de concentración de 0.64, 0.80 - 1.25 y 1.56 mcg por ml respectivamente.

5.2.1.7 Procedimiento

Preparar la solución problema en la misma forma que la solución de referencia (5.2.1.3) haciendo al final otra dilución de 10.0 ml a 100 ml con la misma solución reguladora, para obtener una concentración estimada de 1.0 mcg por ml de oxitetraciclina base.

Usar tres placas como se indica en 5.2.1.5 llenar tres cilindros de cada caja con la dilución de referencia de concentración de 1.0 mcg por ml y tres cilindros con solución muestra alternando la solución muestra con la de referencia. Incubar las placas, incluyendo aquellas que contienen la curva de referencia a 30 °C al abrigo de la luz por 16 - 18 h y medir el diámetro de las zonas de inhibición. Sacar el promedio de las lecturas de la solución de referencia y el de las lecturas de la solución problema. Si el promedio del problema tiene un valor mayor que el promedio del de referencia, agregar la diferencia al promedio del diámetro de la solución de 1.0 mcg por ml en la curva de referencia. Si el problema da un valor menor que el promedio del de referencia, restar la diferencia al diámetro de la solución de 1.0 mcg por ml en la curva de referencia. Leer en la curva la concentración correspondiente a estos valores corregidos de

las zonas, multiplicar la concentración por el factor de dilución apropiado para obtener el contenido del - antibiótico en la muestra.

5.2.2 METODO MICROBIOLÓGICO (TURBIDIMETRICO)

5.2.2.1 Aparatos y equipo

Fotocolorímetro con filtro para 580 nm

Horno para esterilizar

Autoclave

Botellas de Roux

Aparato para baño de agua provisto de control termostático

Tubos de 16 X 125 mm (dimensiones exteriores)

Equipo común de laboratorio

5.2.2.2 Materiales y reactivos

Sustancia de referencia de oxitetraciclina

Cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P)

Medio antibiótico No. III (caldo nutritivo); esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Peptona -----	5.0 g
Extracto de levadura -----	1.5 g
Extracto de carne -----	1.5 g
Cloruro de sodio -----	3.5 g
Dextrosa -----	1.0 g
Fosfato dipotásico -----	3.68 g
Fosfato monopotásico -----	1.32 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización pH 7.0

Medio antibiótico I y II descritos en 5.2.1.2

Solución salina estéril (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y -

aforar con agua, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min).

Solución al 12.0 por ciento de formaldehído.

Solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 estéril (transferir 13.6 g de fosfato monopotásico a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua; esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min; ajustar el pH de 4.45 a 4.55 si es necesario, -- con solución 18.0 N de ácido fosfórico o con solución 10.0 N de hidróxido de potasio).

5.2.2.3 Preparación de la solución de referencia

Transferir a un matraz aforado de 1000 ml una cantidad exactamente pesada de sustancia de referencia de oxitetraciclina, disolver y aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico (concentración estimada de 0.1 - mg de oxitetraciclina por ml).

Mantener esta solución primaria bajo refrigeración en un matraz con tapón de vidrio esmerilado, desechar la solución después de una semana.

El día de la prueba transferir 10.0 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 1000 ml, aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico (concentración -- estimada de 1.0 mcg de oxitetraciclina por ml).

5.2.2.4 Preparación del microorganismo de prueba

Cultivar la cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P) en tubos con 10 ml de medio antibiótico No. I inclinado, incubándolos a 32 - 35 °C durante 24 h. Lavar el desarrollo de un tubo con 3 ml de solución salina estéril. Pasar esta suspensión de microorganismos a una botella de Roux que contenga 300 ml de medio antibiótico No. I. Extender la suspensión con ayuda de perlas de vidrio estériles, incubar por 24 horas de 32

a 35 °C lavar el crecimiento de la superficie del -- agar con 50 ml de solución salina estéril. Diluir esta suspensión con solución salina estéril de tal manera que de ella se obtenga una transmitancia del 25 -- por ciento en un fotocolorímetro a 580 nm. Generalmente 1:20 Guardar esta suspensión primaria bajo refrigeración por una semana.

Para la inoculación diaria usar aproximadamente 3 ml de suspensión primaria para cada 1000 ml de medio antibiótico No. III.

5.2.2.5 Preparación de la solución problema

Transferir a un matraz aforado de 1000 ml una cantidad exactamente pesada de muestra de oxitetraciclina equivalente a 240 mg, disolver con solución 0.1 N de ácido clorhídrico (concentración estimada de 0.24 mg - por ml). Transferir 1.0 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 1000 ml aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 (concentración estimada de 0.24 mcg por ml).

5.2.2.6 Preparación de los tubos

Preparar seis series de tres tubos cada una y marcarlos respectivamente como serie 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

5.2.2.7 Preparación de la curva de referencia

Preparar las siguientes diluciones a partir de la solución de referencia de concentración de 1.0 mcg por ml, usando solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5:

- 14.6 ml a 100 ml (0.146 mcg por ml)
- 18.7 ml a 100 ml (0.187 mcg por ml)
- 24.0 ml a 100 ml (0.240 mcg por ml)
- 30.8 ml a 100 ml (0.308 mcg por ml)

39.5 ml a 100 ml (0.395 mcg por ml)

Usar 5 series de tres tubos cada una y proceder como sigue:

Serie 1 ; Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.146 mcg por ml.

Serie 2 ; Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.187 mcg por ml.

Serie 3 ; Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.240 mcg por ml.

Serie 4 ; Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.308 mcg por ml.

Serie 5 ; Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.395 mcg por ml.

Una vez que se ha agregado la solución de referencia a los tubos, añadir 9.0 ml de medio antibiótico No.-III inoculado, inmediatamente después colocarlos en un baño de agua a 37 °C por un período de 3 a 4 horas

Al término de este período sacar los tubos del baño y agregar a cada uno de ellos 0.5 ml de solución al 12 por ciento de formaldehído.

Como paso siguiente leer las absorbancias de cada tubo en un fotocolorímetro, a una longitud de onda de 530 nm, usar como blanco, para ajustar el aparato, -- una solución formada por 9.0 ml de medio antibiótico-No. III no inoculado más 0.5 ml de solución al 12 por ciento de formaldehído y 1.0 ml de solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5.

Sacar el promedio de las absorbancias obtenidas de los tubos de cada serie y graficarlos en papel semilogarítmico de 2 ciclos, colocar la concentración del antibiótico en mcg en las ordenadas (escala logarítmica) y las absorbancias en las abscisas (escala aritmética).

La curva de referencia se traza uniendo los valores-máximo y mínimo, calculados por medio de las ecuaciones siguientes:

$$B = \frac{3a + 2b + c - e}{5} \quad A = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

B = Valor de la absorbancia calculada par la concentración más bajo de la curva.

A = Valor de la absorbancia calculada para la concentración más alta de la curva,

a, b, c, d y e = Valores promedio de las absorbancias de las soluciones de referencia de concentración de 0.146, 0.187, 0.240, 0.308 y 0.395 mcg por ml respectivamente.

5.2.2.8 Procedimiento

A la serie marcada como No. 6, añadir a cada tubo 1.0 ml de solución problema de concentración de 0.240 mcg por ml y 9.0 ml de medio antibiótico No. III inoculado y proceder con ellos de igual forma que con los tubos de las otras cinco series.

Después de la adición del formadehído a los tubos, leer las absorbancias en un fotocolorímetro a una longitud de onda de 530 nm usando como blanco, para ajustar el aparato, una solución formada por 9.0 ml de medio antibiótico No. III no inoculado más 0.5 ml de solución al 12 por ciento de formadehído y 1.0 ml de solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5

Sacar el promedio de las absorbancias obtenidas. Leer en la curva la concentración correspondiente al promedio de las absorbancias de los tubos problema. Multiplicar la concentración por el factor de dilución apropiado para obtener el contenido del antibiótico en la muestra.

5.2.3 METODO QUIMICO (ESPECTROFOTOMETRICO)

5.2.3.1 Aparatos y equipo

Espectrofotómetro

Potenciómetro

Equipo común de laboratorio

5.2.3.2 Materiales y reactivos

Solución 0.01 N de ácido clorhídrico

Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

Solución primaria de cloruro férrico (pesar cuidadosamente, porque es muy higroscópico, 5 g de cloruro férrico hexahidratado dentro de un vaso de 100 ml y añadir 10 ml de solución 1.0 N de ácido clorhídrico, agitar hasta disolver, transferir cuantitativamente a un matraz aforado ámbar de 50 ml, con tapón de vidrio y aforar con agua).

Reactivo de cloruro férrico (transferir 10.0 ml de la solución primaria de cloruro férrico a un matraz aforado de 2 l, añadir 20 ml de solución 1.0 N de ácido clorhídrico, aforar con agua, ajustar el pH entre 2.0 a 2.1).

Sustancia de referencia de oxitetraciclina.

5.2.3.3 Preparación de la solución de referencia

Transferir a un matraz aforado de 250 ml una cantidad exactamente pesada de sustancia de referencia de oxi-tetraciclina, disolver con 25 ml de solución 0.1 N de ácido clorhídrico y aforar con agua destilada. Guardar la solución en un frasco con tapón de vidrio esmerilado bajo refrigeración, desechar después de 1 semana.

5.2.3.4 Preparación de la solución problema

La solución problema se prepara de la misma forma que la solución de referencia.

5.2.3.4 Procedimiento

Colocar dentro de los tubos de prueba y por separado 10.0 ml de solución de referencia y 10.0 ml de solución problema, a cada tubo añadir 10.0 ml de reactivo de cloruro férrico, mezclar y dejar en reposo 15 min. Determinar la absorbancia de cada solución en un espectrofotómetro a 490 nm, ajustar el aparato usando un blanco preparado con 10.0 ml de solución 0.01 N de ácido clorhídrico y 10.0 ml de reactivo de cloruro férrico.

5.2.3.6 Cálculos

Determinar la cantidad de mcg de oxitetraciclina por mg de muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{mcg de oxitetraciclina por mg} = \frac{A_m \times P_p \times F \times 100}{A_p \times P_m \times (100-h)}$$

Donde:

A_m = Absorbancia de la muestra

P_p = Peso de la sustancia de referencia expresada en mg

F = Potencia de la sustancia de referencia expresada en mcg por mg

A_p = Absorbancia de la solución de referencia

P_m = Peso de la muestra expresada en mg

h = Porcentaje de agua en la muestra

5.3 DETERMINACION DEL PODER ROTATORIO ESPECIFICO

5.3.1 Aparatos y equipo

Polarímetro con precisión de $\pm 0.1^\circ$, luz de sodio y filtro para 589.3 nm.

Equipo común de laboratorio

5.3.2 Materiales y reactivos
Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

5.3.3 Procedimiento:

Pesar con exactitud alrededor de 500 mg de muestra, - anhidra o hidratada, equivalente a 500 mg de oxitetraciclina, transferirlos a un matraz aforado de 100 ml- disolver y aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico, realizar el aforo a 20°C .

Determinar el poder rotatorio específico de esta solución a 20°C , tomar cinco lecturas de la solución, -- calcular el promedio de estas lecturas (a). Tomar cinco lecturas del disolvente empleado para disolver la muestra y calcular el promedio de las lecturas (a_0).

5.3.4 Cálculos

Calcular el poder rotatorio específico de la muestra en base anhidra, por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{P.R.E.} = \frac{(a - a_0) \times A \times 100}{L \times P \times (100 - h)}$$

Donde:

P.R.E. = Poder rotatorio específico de la muestra en base anhidra

a = Promedio de las cinco lecturas observadas de la solución problema

a_0 = Promedio de las cinco lecturas observadas para el disolvente

A = Volumen al que se aforó la muestra pesada

L = Longitud del tubo polarimétrico, expresado en dm

h = Por ciento de agua en la muestra

5.4 DETERMINACION DE pH

5.4.1 Aparatos y equipo

Potenciómetro equipado con un electrodo de vidrio sensible a la actividad del ión hidrógeno, y uno de calomel que es el de referencia.

Equipo común de laboratorio.

5.4.2 Materiales y reactivos

Solución reguladora 0.2 M de biftalato neutralizado de pH 4.8: mezclar en un matraz aforado de 200 ml, 50.0 ml exactamente medidos, de solución 0.2 M de biftalato de potasio (40.846 g de biftalato de potasio para hacer 1000 ml de solución con agua) y 16.5 ml de solución 0.2 M de hidróxido de sodio valorada, y aforar con agua.

Solución reguladora 0.2 M de fosfato de pH 6.8: mezclar en un matraz aforado de 200 ml, 50.0 ml exactamente medidos, de solución 0.2 M de fosfato monobásico de potasio (27.218 g de fosfato monobásico de potasio para hacer 1000 ml de solución con agua) y 22.4 ml de solución 0.2 M de hidróxido de sodio valorada y aforar con agua.

5.4.3 Procedimiento

Transferir 50.0 mg de muestra, exactamente pesados, a un matraz aforado de 50 ml, mezclar y aforar con agua.

Realizar las determinaciones de pH de las soluciones a una temperatura de 25 ± 2.0 °C.

Calibrar el potenciómetro ajustándolo con las soluciones reguladoras de pH 4.8 y 6.8, como paso siguiente-

medir el pH de la suspensión problema dos o más veces hasta que no haya variación.

Entre cada determinación tener la precaución de lavar los electrodos con la solución a la que se le va a determinar el pH y desechar los lavados.

5.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AGUA - METODO DE KARL FISCHER

5.5.1 Aparatos y equipo

Aparato que permita la apropiada exclusión de la humedad atmosférica y la determinación del punto final. Comprende por lo general un sistema cerrado, constituido por buretas automáticas y un vaso de titulación con cubierta hermética, provisto de dos electrodos de platino y un agitador magnético.

Equipo común de laboratorio.

5.5.2 Materiales y reactivos

Reactivo de Karl Fischer (a una solución que contenga 670 ml de metanol y 170 ml de piridina agregar 125 g de yodo e infriar. En una probeta graduada de 250 ml transferir 100 ml de piridina y mantenerla en baño de hielo, burbujear dióxido de azufre seco hasta que el volumen llegue a 200 ml. Lentamente y agitando se agrega esta solución a la mezcla de yodo enfriada. -- Agitar bien para disolver el yodo, pasar la solución al frasco del aparato y dejar en reposo durante la noche anterior a la valoración.

Un ml de esta solución recientemente preparada equivale aproximadamente a 5 mg de agua, pero se descompone gradualmente; por tanto debe valorarse 1 h antes de usarla o diariamente si esta en uso continuo. Se protege de la luz mientras esta en uso. Guardar el resto del reactivo preparado en un recipiente color ámbar -

con tapón de vidrio, protegido de la luz y bajo refrigeración. También se puede emplear una solución estabilizada del reactivo disponible comercialmente-

Tartrato de sodio

Metanol

5.5.3 Normalización del reactivo de Karl Fischer
Colocar 36 ml de metanol en el vaso de titulación y añadir suficiente reactivo de Karl Fischer para obtener el punto final característico. Añadir rápidamente de 150 a 350 mg de tartrato de sodio pesados con exactitud y titular hasta el punto final.

Por la fórmula siguiente se obtiene el factor F de equivalencia del agua, expresado en mg de agua por ml de reactivo.

$$F = \frac{0.1566 \times P}{V}$$

Donde:

F = Factor de equivalencia del agua, expresado en mg de agua por ml de reactivo.

P = Peso del tartrato de sodio expresado en mg

V = Volumen empleado del reactivo de Karl Fischer

5.5.4 Procedimiento

Añadir 25 ml de metanol al vaso de titulación y titular con reactivo de Karl Fischer hasta llegar al punto final, sin tomar en cuenta el volumen consumido, ya que este no interviene en los cálculos.

Pesar exactamente alrededor de 300 mg de muestra, y transferir rápidamente al vaso de titulación.

Agitar vigorosamente y titular de nuevo con reactivo de Karl Fischer hasta obtener el punto final.

5.5.5 Cálculos

Determinar el por ciento de agua en la muestra por la siguiente ecuación:

$$P.C.A. = \frac{V \times F \times 100}{P}$$

Donde:

P.C.A. = Por ciento de agua en la muestra

V = Volumen del reactivo empleado

F = Factor de equivalencia del agua

P = Peso de la muestra expresado en mg

5.6 PRUEBA DE CRISTALINIDAD

5.6.1 Aparatos y equipo

microscopio con luz polarizada (con objeto de obtener luz polarizada se puede emplear un filtro polaroid entre la platina y el condensador)

Equipo común de laboratorio

5.6.2 Materiales y reactivos

Aceite mineral

5.6.3 Procedimiento

Mezclar en un porta-objetos una pequeña cantidad de la muestra (aproximadamente 2 mg) con una o dos gotas de aceite mineral. Cubrir el porta-objetos y observar al microscopio con luz polarizada.

5.6.4 Interpretación de resultados

Los cristales de oxitetraciclina, muestran partículas en las cuales se observa el fenómeno de birrefringencia y posiciones de extinción por movimiento circular del porta-objetos.

5.7 DETERMINACION DE ABSORCION DE LUZ EN LA REGION DEL ULTRAVIOLETA A 353 nm

5.7.1 Aparatos y equipo
Espectrofotómetro

Equipo común de laboratorio.

5.7.2 Materiales y reactivos
Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

Sustancia de referencia de oxítetraciclina

5.7.3 Procedimiento

Transferir 50 mg de muestra y de sustancia de referencia por separado a un matraz aforado de 250 ml disolver y aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico-transferir una alícuota de 10.0 ml a un matraz aforado de 100 ml y aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico. Determinar la absorbancia a 353 nm de las soluciones muestra y de referencia usando como blanco, para ajustar el aparato, solución 0.1 N de ácido clorhídrico.

5.7.4 Cálculos

Determinar el porcentaje relativo de absorbancia, en base anhidra, por medio de la siguiente ecuación:

$$P.C.A. = \frac{A_m \times P_p \times F \times 10}{A_p \times P_m \times (100-h)}$$

Donde:

P.C.A. Porcentaje relativo de absorbancia, en base anhidra, de la muestra

A_m = Absorbancia de la muestra

P_p = Peso de la sustancia de referencia expresada en mg

F = Potencia de la sustancia de referencia expresada en mcg por mg

Ap = Absorbancia de la sustancia de referencia

Pm = Peso de la muestra expresada en mg

h = Porcentaje de agua en la muestra

5.8 PRUEBA DE INOCUIDAD

5.8.1 Aparatos y equipo

Agujas y jeringas estériles (esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h)

Equipo común de laboratorio

5.8.2 Materiales y reactivos

Ratones blancos de 18 a 25 g no usados antes en otra prueba similar.

Agua destilada estéril (esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min)

Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

5.8.3 Procedimiento

Inyectar intravenosamente a 5 ratones 0.5 ml de solución muestra de concentración de 2 mg por ml (transferir 100 mg de muestra a un matraz aforado de 50 ml-disolver con 5 ml de solución 0.1 N de ácido clorhídrico y aforar con agua destilada estéril). La inyección deberá hacerse a una velocidad de 0.05 ml por segundo; observar a los ratones durante un período de 48 horas.

5.8.4 Interpretación de resultados

Si ningún animal muere en el período de observación de 48 horas la muestra pasa la prueba. Si uno o más -

animales muere dentro de las 48 horas repetir la prueba usando 10 ratones con peso de 20 g (± 0.5 g) cada uno. La muestra pasa la prueba si el número total de animales muertos dentro de las 48 horas no es mayor -- del 10 por ciento del número total de animales probados, incluyendo la prueba original.

5.9 PRUEBA DE ESTERILIDAD

5.9.1 Aparatos y equipo

Equipo de filtros membrana para la prueba de esterilidad de 3 ó 6 unidades

Membranas filtrantes de 0.45 ± 0.02 micras

Campana de flujo laminar

Autoclave

Potenciómetro

Tubos para cultivo con tapa

Cortadores y pinzas para membrana

Equipo común de laboratorio

5.9.2 Materiales y reactivos

Peptona (BBL 11919; Difco 0118-01-8)

Solución de peptona, esterizar en autoclave a 121°C por un mínimo de 20 min (disolver 1.0 g de peptona - en suficiente agua, añadir 1.0 ml de p-tert-octilfenoxi polietoxietanol y aforar con agua destilada a -- 1.0 l después de esterilizar ajustar el pH a 7.0 - 7.2, si es necesario con solución 2.0 N de hidróxido de sodio o solución 2.0 N de ácido clorhídrico).

Medio de soya y digerido de caseína (BBL 11768; Difco 037-01-1)

Agar micológico (BBL 11445; Difco 0405-01-0)

Agar soya tripticasa (BBL 1104; Difco 0369)

5.9.3 Procedimiento

Armar un equipo de filtración de 3 ó 6 unidades con sus filtros membrana y filtros hidrófobicos según --- instrucciones del fabricante y prepararlo para su es-
terilización.

Esterilizar en autoclave todo el equipo a 121 °C de-
20 a no más de 45 min. EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA SON
CRITICOS. Los filtros membrana pueden ser esteriliza-
dos aparte pero da mejor resultado y menor riesgo de-
contaminación si se esterilizan ya en la unidad.

Los cortadores y pinzas deben se esterilizados en ca-
lor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h.

Preparar y limpiar la campana de flujo laminar y en -
condiciones asépticas pasar todo el material que se -
va a utilizar para la prueba, conectar la campana 10-
a 15 min antes de empezar a trabajar.

Tomar una muestra sépticamente de 6 g del producto -
que debe contener de todos y cada uno de los recipien-
tes que forman el lote, vaciar a un matraz erlenmeyer
de 500 ml que contenga 200 ml de solución de peptona
esterilizada y a temperatura ambiente disolver la ---
muestra agitando hasta disolución total.

Empezar a filtrar asépticamente usando un filtro como
testigo. Si la filtración se dificulta o es muy lenta
se debe disolver la muestra en 400 ml de solución de-
peptona o usar 3 g de muestra.

Tomar la membrana con las pinzas y colocarla en el---
cortador, cortar la parte central en un círculo de---
17.5 mm de diámetro, transferir la parte central de -
la membrana cortada dentro de un tubo que contenga me

dio flúido de tioglicolato, colocar la parte exterior dentro de un tubo que contenga medio de soya y digerido de caseína. Repetir esto con el testigo.

Durante la prueba exponer una caja Petri con agar micológico y otra con agar soya tripticasa, incubar durante un período de 4 días y observar su crecimiento para tener la seguridad de que el área donde se efectuó la prueba fué una área estéril.

Incubar los tubos con medio fluido de tioglicolato -- por 7 días a 30 - 32 °C (medio para bacterias) y los tubos con medio de soya y digerido de caseína a 22 -- 25 °C por 7 días (medio para hongos)

5.9.4 Interpretación de resultados

Se dice que el lote o muestra pasa la prueba si después de 7 días de incubación en ningún tubo aparece crecimiento.

Si se observa crecimiento, deberá repetirse la prueba con el doble de muestra y si el crecimiento es en un solo medio, colocar la membrana en ese medio.

Si en los dos ensayos hay crecimiento la muestra no pasa la prueba.

5.10 PRUEBA DE PIROGENOS

5.10.1 Aparatos y equipo

Termómetro y agujas libres de pirógenos (esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h)

5.10.2 Materiales y reactivos

Conejos no albinos sanos y adultos, con peso no menor de 1500 g, cada uno de los cuales, por lo menos una semana antes de la prueba, debe ser mantenido en su peso con una dieta libre de antibióticos.

Area de alojamiento de temperatura de 23 ± 1.5 °C humedad relativa de 50 ± 10 por ciento y libre de perturbaciones que facilmente los puedan exitar.

Mantener a los conejos en esta área en forma individual.

Un animal que no se ha usado anteriormente en la prueba permanecerá dos semanas antes de la misma bajo las condiciones anteriores. Simular una prueba uno a tres días antes de la determinación bajo las condiciones especificadas en el procedimiento, omitiendo la inyección. Si el animal no pasa satisfactoriamente esta prueba, probarlo nuevamente dos veces con un lapso de dos días de descanso entre cada una. Si no pasa la tercera prueba desechar al animal.

Usar los animales cada 48 horas o cada dos semanas si la prueba anterior fué calificada como pirógena.

Agua destilada estéril (esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min).

5.10.3 Procedimiento

Realizar la prueba en una área donde los animales estén alojados en las condiciones ambientales mencionadas. El día de la prueba suspender todo el alimento a los animales que van a ser usados hasta después de terminada, excepto la administración de agua.

Determinar la temperatura control de cada animal, 40 min antes de iniciar la prueba, por la inserción del termómetro en el recto del animal a una profundidad de no menos de 7.5 cm manteniendolo el tiempo suficiente para alcanzar la máxima temperatura. Usar solo aquellos animales cuya temperatura control no se desvie más de 1.0 °C de cada una de las otras lecturas y no se use ningún animal con una temperatura que exceda de 39.8 °C.

La temperatura control registrada para cada conejo constituye la temperatura a partir de la cual se calcula cualquier elevación subsecuente a la inyección del material de prueba. Preparar una solución con una concentración de 5 mg por ml de oxitetraciclina (transferir 50 mg de muestra a un matraz aforado de 10 ml, disolver con 2.5 ml de solución 0.1 N de ácido clorhídrico, y aforar con agua destilada estéril), 30 min después de haber tomado la temperatura control, inyectar un ml de la solución anterior por kg de peso corporal, la inyección deberá hacerse en un lapso de un minuto, por la vena marginal de la oreja de cada uno de los tres conejos, habiendo calentado previamente la solución a inyectar a 37°C ; llevar un registro de las temperaturas a 1, 2 y 3 horas después de la inyección.

5.10.4 Interpretación de resultados

Si los conejos no muestran un incremento individual de temperatura de 0.6°C o más de su respectiva temperatura control y si la suma de los tres incrementos de temperatura no excede de 1.4°C la muestra pasa la prueba.

Si uno o dos conejos muestran una elevación de temperatura de 0.6°C o más; o si la suma de los incrementos de temperatura excede de 1.4°C repetir la prueba usando 5 conejos. Si no más de tres de los ocho conejos muestran incrementos individuales de temperatura de 0.6°C o más y si la suma de esas elevaciones de temperatura no excede de 3.7°C , la muestra pasa la prueba.

5.11

PRUEBA DE SUSTANCIAS HISTAMINOSIMILES

5.11.1 Aparatos y equipo

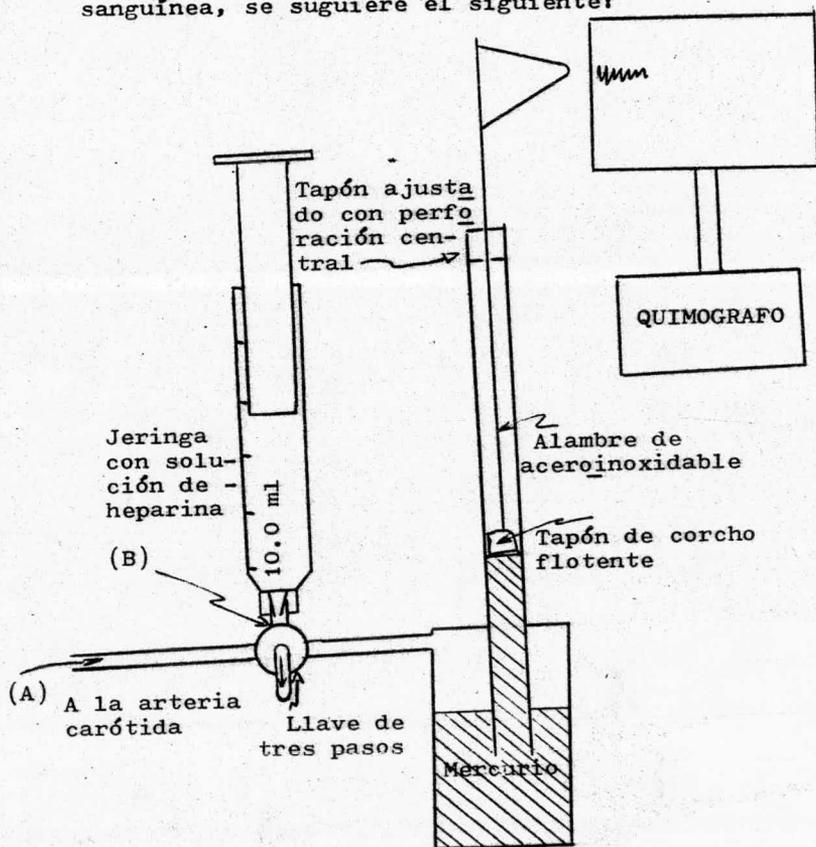
Quimógrafo

Jeringas y agujas para tuberculina, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de una h

Jeringa de 10 ml y aguja del No. 22, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h

Equipo de disección, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Manómetro de mercurio adecuado para medir la presión sanguínea, se sugiere el siguiente:



5.11.2 Materiales y reactivos

Un gato sano macho o hembra no preñada que no pese menos de 2.5 kg, y que se ha mantenido cuando menos -- una semana en una área de alojamiento de características iguales a las especificadas en el punto 5.10.2.

Agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Solución fisiológica, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua destilada)

Sustancia de referencia de diclorhidrato de histamina Anestésico de acción media o prolongada, que no afecte la estabilidad de la presión sanguínea (fenobarbital sódico, pentobarbital sódico o nembutal).

Solución de heparina (disolver 100 mg de heparina sódica en 1.0 l de solución fisiológica estéril; concentración estimada de 100 mcg de heparina por ml).

Solución de referencia de histamina: Pesar exactamente una cantidad aproximada a 165.6 mg de diclorhidrato de histamina de referencia (equivalente a 100 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril (concentración estimada de 1 mg de histamina base por ml). -- Transferir alícuotas de 0.5 ml de la solución anterior a ampolletas de vidrio, sellar las ampolletas y conservarlas bajo refrigeración hasta su uso. Para -- hacer una solución primaria diluir una alícuota de -- 0.5 ml en un matraz aforado de 50 ml, con agua destilada estéril (concentración estimada de 10 mcg de -- histamina base por ml); esta solución primaria puede ser conservada bajo refrigeración por un mes. El día de la prueba preparar a partir de la solución primaria, una solución que contenga 1.0 mcg de histamina -- base por ml haciendo una dilución de 1:10 con agua -- destilada estéril

Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

5.11.3 Preparación de la muestra

Transferir una cantidad de muestra problema equivalente a 50 mg de oxitetraciclina a un matraz aforado de 10 ml, disolver con 2.4 ml de solución 0.1 N de ácido clorhídrico aforar con agua destilada estéril y mezclar (concentración estimada de 5 mg de oxitetraciclina por ml).

5.11.4 Procedimiento

Determinar el peso del animal y aplicar anestesia general por medio de una inyección intraperitoneal del anestésico elegido. Descubrir quirúrgicamente la arteria carótida separándola completamente de todas las estructuras a su alrededor, seccionar el nervio vago.

Desplazar totalmente el aire del manómetro por solución de heparina, aplicada con una jeringa colocada en la entrada B (ver esquema, 5.11.1)

Insertar una cánula en la arteria carótida conectada al manómetro por la entrada A manteniendo la llave cerrada; para medir directamente y tener un registro constante de la presión sanguínea, abrir la llave; si la sangre tiende a coagularse, agregar la cantidad necesaria de heparina.

Descubrir quirúrgicamente la vena femoral para facilitar la inyección intravenosa.

Conectar el manómetro al quimógrafo e inspeccionar la amplitud de los trazos del movimiento de oscilación y estabilidad relativa de la presión sanguínea.

Determinar la sensibilidad del animal a la histamina por medio de inyecciones en la vena femoral de la solución de referencia de histamina de concentración -- de 1.0 mcg de histamina base por ml, aplicar las inyecciones a intervalos uniformes de tiempo de no menos de 5 min cada una, aplicar 0.05, 0.10 y 0.15 mcg de histamina base por kg de peso corporal, repetir -- las inyecciones haciendo caso omiso de las primeras series de lecturas hasta que las caídas de presión -- causadas por dosis de histamina sean equivalentes y relativamente uniformes, y la caída de presión sanguínea causada con 0.10 mcg de histamina base por kg de peso corporal no sea menor de 20 mm de mercurio. Reemplazar la histamina por la solución muestra preparada como se describe en 5.11.3 que contiene 5 mg de -- oxitetraciclina por ml e inyectar 3.0 mg por kg de peso corporal en un lapso de 5 min. Si hay baja significativa de la presión sanguínea, la dosis vuelve a repetirse después de alternar con una dosis de 0.10 -- mcg de histamina base por kg de peso corporal. Emplear diferentes agujas y jeringas de tuberculina para inyectar la solución de histamina de referencia y la solución del antibiótico. El animal puede ser utilizado hasta que sus respuestas sean razonablemente estable a la histamina.

5.11.5 Interpretación de resultados

El producto pasa la prueba se ausencia de sustancias histaminosímiles si la baja de presión sanguínea obtenida con 3 mg de oxitetraciclina por kg de peso corporal no es mayor que la obtenida con 0.1 mcg de histamina base por kg de peso corporal.

6.1 OBSERVACIONES

Los reactivos grado analítico empleados en los métodos de prueba cumplirán con las especificaciones marcadas por la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.

La sustancia de referencia oficial será la aseptada - por la Secretaría de Salubridad y Asistencia (S.S.A.)

6.2 BIBLIOGRAFIA

Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, - 4a Edición, 1974. Pág. 94-96, 170-72, 31-42

Higuchi, Takeru; Brochman-Hassen, Pharmaceutical Analysis, Ed. Interscience 1961 Pág 624-638

Federal Register, Vol. 29, No. 105 - mayo 30, 1974 -- 446. 65a.

National Formulary XII - 286

The Merck Index, 1968; Eighth Edition. Pág 776

The United States Dispensatory, 27th Edition, 1973. - Pág 824 y 1152-1178.

Organización Mundial de la Salud, Publicación Científica No. 158 febrero 1968, Animales de Laboratorio.

Farmacopea Helvética, 6a Edición, 1971 Tomo I Pág. 213

Goodman-Gilman Bases Farmacológicas de la terapéutica 4a Edición, 1970, Editorial Interamericana. Pág. 1206-1210.

Osol-Hoover Remington's Pharmaceutical Sciences, 14th-Edition, 1970. Pág 633.

6.3 PARTICIPANTES

Fermic S.A. de C.V.

Química Hoechst de México, S.A.

Laboratorios Sanfer S.A.

Abbott Laboratories de México, S.A.

Laboratorio Fedal, S.A.

Farmaceúticos Helenka, S.A.

Laboratorios Terrier, S.A.

Laboratorios Bristol de México, S.A.

Pfizer, S.A.

ANTEPROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA
"CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA"
DGN-39-4-III-2

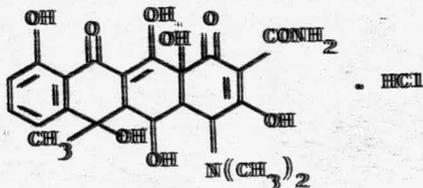
1. GENERALIDADES

Antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclinas

1.1 DEFINICIONES

Para los efectos de esta norma se entiende por clorhidrato de oxitetraciclina al producto constituido principalmente por el compuesto químico $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot HCl$ con peso molecular de 496.91 con nombre químico de monoclóhidrato de 4-(Dimetil amino)-1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-octahidro-3, 5, 6, 10, 12, 12a-hexahidroxi-6-metil-1, 11-dioxo-2-naftacenecarboxamida. El clorhidrato de oxitetraciclina es un compuesto con aspecto de polvo cristalino de color amarillo, inodoro, e higroscópico, de sabor amargo, oscurece por exposición a la luz solar intensa y libre de materias visibles, extrañas.

Fórmula desarrollada:



1.2 ALCANCE

La presente norma se aplica al clorhidrato de oxitetraciclina estéril y no estéril.

1.3 USOS

En la fabricación de medicamentos

2. CLASIFICACION

El producto objeto de esta norma se clasifica en dos grados de calidad

Grado A clorhidrato de oxitetraciclina estéril

Grado B clorhidrato de oxitetraciclina no estéril

3. ESPECIFICACIONES

3.1 DEL PRODUCTO

El clorhidrato de oxitetraciclina en sus dos grados - de calidad objeto de esta norma, debe cumplir con las especificaciones indicadas en la tabla 1.

TABLA 1

Característica	Clorhidrato de oxitetraciclina Especificaciones	
	Grado A estéril	Grado B no estéril
Identificación	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Potencia en base anhidra-	No menor de 835 mcg de oxitetraciclina por mg	No menor de 835 mcg de oxitetraciclina por mg
Poderrotatorio específico -en base anhidra (solución ácida al 1.0 por ciento a 20 °C y 589.3 nm)	-188° a -200°	-188° a -200°
pH (solución 1.0 por ciento p/v)	2.0 a 3.0	2.0 a 3.0
Perdida al secado (a 60°C y presión reducida)	No más de 2.0 por ciento	No más de 2,0 por ciento
Cristalinidad	Presenta birrefringencia a la luz polarizada	Presenta birrefringencia a la luz polarizada

TABLA 1 (continúa)

Absorbancia de luz en la región ultravioleta a 353 nm -en base anhidra-	92.5 \pm 4.3 por ciento comparada con una sustancia de referencia.	92.5 \pm 4.3 por ciento comparada con una sustancia de referencia.
Inocuidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Esterilidad	Pasa la prueba	- . -
Pirógenos	Pasa la prueba	- . -
Sustancias histaminosímiles	Pasa la prueba	- . -

3.2

MARCADO

3.2.1 En el envase y empaque

En el exterior del empaque y envase, debe aparecer una etiqueta en caracteres legibles y redactados en español los siguientes datos: Símbolo del fabricante, nombre del producto, grado de calidad (estéril, no estéril), peso neto expresado en kilogramos o gramos, número de lote, fecha de fabricación y caducidad, la leyenda "Hecho en México" la leyenda "Conservese el envase bien cerrado en lugar fresco y seco", potencia o equivalente en actividad (en oxitetraciclina base)- y otros datos tales como precauciones que deben tenerse en el manejo y uso de los empaques y envases durante su transporte y almacenamiento y el Sello Oficial de Garantía cuando la Secretaría de Industria y Comercio lo juzgue conveniente.

3.3

ENVASADO Y EMPACADO

El producto no estéril objeto de esta norma se debe envasar en doble bolsa de polietileno negro o cualquier otro material adecuado cuyas características -

sean tales que no reaccione con el producto y lo proteja de la luz, cerradas por separado y a su vez estas en cuñetes de capacidad y material adecuados para que resistan su transporte y almacenamiento.

El producto estéril debe estar contenido en recipientes estériles de aluminio o vidrio ámbar, herméticamente cerrados; los recipientes deben abrirse solamente en áreas estériles y bajo condiciones asépticas.

4. MUESTREO

El muestreo se efectúa de común acuerdo entre el fabricante y el comprador y a falta de este acuerdo se recomienda seguir el siguiente método:

4.1 METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO A GRANEL GRADO NO ESTERIL

4.1.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas.

Muestreador de acero inoxidable pulido, de 1.27 cm de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia; completo de tubo interior de cierre.

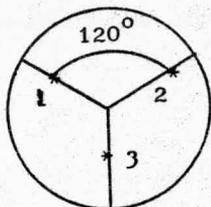
Bolsas de polietileno negro u otro material adecuado-

Frascos de vidrio de color ámbar.

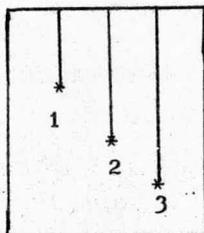
Frascos ampula de color ámbar de 20 ml.

4.1.2 Manera de operar

Por medio del muestreador sacar producto de cada cuñete en tres puntos diferentes dispuestos a $\pm 120^\circ$ uno de otro y a tres diferentes alturas según el esquema siguiente:



PLANTA



SECCION

De cada envase tomar aproximadamente 30 g de producto y ponerlos en bolsas de polietileno negro marcadas -- con el número del cuñete y el número del lote. Cerrar los cuñetes con un oportuno cierre de garantía:

De cada bolsa de polietileno negro pesar partes proporcionales al peso neto declarado en la etiqueta del cuñete correspondiente y transferirlas a otra bolsa - de polietileno negro. Mezclar hasta completa homogeneidad.

Esta muestra oficial se dividirá en dos partes: Una - destinada al archivo (cantidad aproximada 100 g) y -- otra destinada al análisis ambas envasadas en frascos de vidrio de color ámbar. En caso de que el lote se - ponga a prueba de estabilidad se repartirá una tercera porción del producto en frascos ampula de color -- ámbar de 20 ml. (20 frascos conteniendo cada 1 g de - producto) debidamente rotulados y cerrados.

4.2 METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO A GRANEL GRADO ESTERIL

4.2.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas, esterilizar en autoclave a 121°C por un mínimo de 20 min.

Muestreador de acero inoxidable pulido, de 1.27 cm - de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia; completo de tubo interior de cierre, esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h.

Frascos de de color ámbar de 20 ml

Campana de flujo laminar o área estéril

4.2.2 Manera de operar

En la campana de flujo laminar o en el área estéril - realizar el procedimiento indicado en el punto 4.1.2- en forma aséptica.

4.3 CRITERIO DE ACEPTACION

El criterio de aceptación es 100 por ciento

5. METODOS DE PRUEBA

Los reactivos que se mencionen en todas las determinaciones siguientes deben ser grado analítico (ver apéndice) a menos que se mencione otra cosa; cuando se -- indique agua debe entenderse agua destilada y la sustancia de referencia será la oficial (ver apéndice).

5.1 PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DE CLOR- HIDRATO DE OXITETRACICLINA

5.1.1 Aparatos y equipo
Equipo común de laboratorio

5.1.2 Materiales y reactivos
Acido sulfúrico concentrado (95 - 98 por ciento p/v)

5.1.3 Procedimiento
Añadir 2 ml de ácido sulfúrico a 1 mg de muestra.

5.1.4 Interpretación de resultados

Al agregar ácido sulfúrico a la muestra se produce color rojo brillante.

5.2 DETERMINACION DE POTENCIA

5.2.1 METODO MICROBIOLÓGICO (CILINDRO PLACA)

5.2.1.1 Aparatos y equipo

Horno para esterilizar

Autoclave

Incubadora

Botella de Roux

Cajas Petri de 20 X 100 mm

Tapas de porcelana vidriadas por fuera, para las cajas Petri.

Cilindros de acero inoxidable con diámetro exterior de 8 mm (± 0.1 mm), diámetro interno de 6 mm (± 0.1 mm) y altura de 10 mm (± 0.1 mm).

Fotocolorímetro con filtro para 580 m μ

Escala graduada con décimas de mm o similar

Equipo común de laboratorio

5.2.1.2 Materiales y reactivos

Sustancia de referencia de oxitetraciclina

Solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 estéril (transferir 13.6 g de fosfato monopotásico a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min, si es necesario, ajustar el pH a 4.45 - 4.55 con solución 18.0 N de ácido fosfórico o con solución 10.0 N de hidróxido de potasio.

Medio antibiótico No I (agar nutritivo para mantener al microorganismo de prueba); esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Peptona -----	6.0 g
Digerido pancreático de caseína-----	4.0 g
Extracto de levadura -----	3.0 g
Extracto de carne -----	1.5 g
Dextrosa -----	1.0 g
Agar -----	15.0 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización pH 6.5 - 6.6

Medio antibiótico No. II (agar nutritivo para la capa de siembra y para la capa base); esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Extracto de carne -----	1.5 g
Peptona -----	6.0 g
Extracto de levadura -----	3.0 g
Agar -----	15.0 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización pH 5.8 a 6.0

Cepa de Bacillus cereus var. mycoides (ATCC 11778)

Solución salina estéril (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua; esterilizar en autoclave a 121 °C -- por un mínimo de 20 min).

Solución 0.01 N de ácido clorhídrico

5.2.1.3 Preparación de la solución de referencia
Transferir a un matraz aforado de 1000 ml una cantidad exactamente pesada de sustancia de referencia de oxitetraciclina equivalente a 100 mg de oxitetraciclina, disolver y aforar con solución 0.01 N de ácido clorhídrico (concentración estimada de 0.1 mg por ml)

Mantener esta solución primaria bajo refrigeración en un matraz con tapón de vidrio esmerilado, desechar -- esta solución después de una semana.

El día de la prueba transferir 10.0 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 100 ml y aforar con solución 0.01 N de ácido clorhídrico (concentración - estimada de 10 mcg por ml).

5.2.1.4 Preparación del microorganismo de prueba

El microorganismo de prueba es Bacillus cereus var. - mycoides (ATCC 11778), mantener al microorganismo - de prueba sobre medio antibiótico No. I en tubos con 10 ml de medio inclinado. Lavar el desarrollo de un - tubo con 3 ml de solución salina estéril. Pasar esta - suspensión de microorganismos a una botella de Roux - que contenga 300 ml de medio antibiótico No. I; exten - der la suspensión en toda la superficie del medio con ayuda de perlas de vidrio estériles. Incubar por una - semana a 37 °C. lavar el crecimiento resultante con - 50 ml de solución salina estéril y pasar esta suspen - sión de esporas dentro de un matraz erlenmeyer con ta - pón de vidrio esmerilado. Calentar con agitación esta suspensión por 30 min a 70 °C, lavar tres veces con - solución salina estéril y centrifugar entre cada lava - do, calentando en igual forma, resuspender en 50 ml - de solución salina estéril. Esta suspensión de espo - ras puede ser conservada bajo refrigeración por un -- mes.

5.2.1.5 Preparación de las placas

Preparar las placas el mismo día que se van a usar, - añadir 21 ml de medio antibiótico No. II, en cajas Pe - de 20 X 100 mm extender el medio uniformemente y de-- jar solidificar. Fundir la cantidad necesaria de me--

dio antibiótico No. II, enfriar a 48 °C y añadir la cantidad necesaria de suspensión de Bacillus cereus - var. mycoides según las experiencias de la preparación del microorganismo de prueba, y mezclar para obtener una suspensión homogénea. Añadir a cada caja Petri 4 ml de este medio inoculado y distribuirlo uniformemente, cubrir las cajas Petri con tapas de porcelana y dejar solidificar, cuando el medio ha endurecido, colocar 6 cilindros en la superficie del agar inoculado a intervalos de aproximadamente 60° uno de otro sobre un radio de 2.8 cm.

5.2.1.6 Preparación de la curva de referencia

El día de la prueba preparar las siguientes diluciones a partir de la solución primaria de 10 mcg por ml, usando solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5

6.4 ml a 100 ml (0.64 mcg por ml)

8.0 ml a 100 ml (0.80 mcg por ml)

10.0 ml a 100 ml (1.00 mcg por ml)

12.5 ml a 100 ml (1.25 mcg por ml)

15.6 ml a 100 ml (1.56 mcg por ml)

Usar 4 series de 3 cajas Petri cada una.

Serie 1 : llenar 3 cilindros alternados de cada caja con dilución de referencia de 0.64 mcg por ml.

Serie 2 : llenar 3 cilindros alternado de cada caja con dilución de referencia de 0.80 mcg por ml.

Serie 3 : llenar 3 cilindros alternados de cada caja con dilución de referencia de 1.25 mcg por ml.

Serie 4 : llenar 3 cilindros alternados de cada caja con dilución de referencia de 1.56 mcg por ml.

Llenar los 3 cilindros restantes de todas y cada una de las cajas con dilución de referencia de 1.0 mcg -- por ml.

Incubar las placas durante 16 - 18 h a 30 °C y medir los diámetros de las zonas de inhibición de las placas. Obtener el promedio de las 36 lecturas de la dilución de referencia de 1.0 mcg por ml y el promedio de las 9 lecturas de cada dilución de referencia. Corregir las lecturas de cada una de las series 1, 2, 3, y 4 aumentando o disminuyendo la misma diferencia que exista entre el promedio de las 36 lecturas de la dilución 1.0 mcg por ml y el promedio de las 9 lecturas de la misma dilución de cada serie por ejemplo:

Para corregir el punto de concentración de 0.8 mcg -- por ml si el promedio de las 36 lecturas de la dilución de referencia de 1.0 mcg por ml fué de 20 mm y el promedio de las lecturas, para el conjunto de estas tres placas de 1.0 mcg por ml fué de 19,8 mm, la corrección será de +0.2 mm. Si el promedio de las lecturas de 0.8 mcg por ml de las tres placas fué de 19 mm, el valor corregido deberá ser de 19.2 mm.

Graficar los diámetros corregidos incluyendo el promedio de las 36 lecturas de 1.0 mcg por ml sobre papel semilogarítmico de 2 ciclos, colocando la concentración del antibiótico en mcg por ml en las ordenadas - (escala logarítmica), y el diámetro de las zonas de inhibición en las abscisas (escala aritmética).

La curva de referencia se traza uniendo los valores máximo y mínimo, calculándolos por medio de las ecuaciones siguientes:

$$B = \frac{3a + 2b + c - e}{5} \quad A = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

B = Diámetro de la zona calculado para la concentración más baja de la curva.

A = Diámetro de la zona calculado para la concentra--

ción más alta de la curva.

c = Diámetro de las 36 lecturas de 1.0 mcg por ml

a, b, d y e = Valores promedio de las soluciones de referencia de concentración de 0.64, 0.80, 1.25 y 1.56 mcg por ml respectivamente.

5.2.1.7 Procedimiento

Preparar la solución problema en la misma forma que la solución de referencia (5,2.1.3) haciendo al final otra dilución de 10.0 ml a 100 ml con la misma solución reguladora para obtener una concentración estimada de 1.0 mcg de oxitetraciclina base por ml.

Usar tres placas preparadas como se indica en 5.2.1.5 llenar tres cilindros alternados de cada caja con la dilución de referencia de concentración de 1.0 mcg -- por ml y tres cilindros con solución muestra, alterando la solución muestra con la de referencia.

Incubar las placas, incluyendo aquellas que contienen la curva de referencia a 30 °C al abrigo de la luz -- por 16 - 18 h y medir el diámetro de las zonas de inhibición. Sacar el promedio de las lecturas de la solución de referencia y el de las lecturas de la solución problema. Si el promedio del problema tiene un valor mayor que el promedio del de referencia agregar la diferencia al promedio del diámetro de la solución de 1.0 mcg por ml en la curva de referencia. Si el -- promedio del problema da un valor menor que el promedio del de referencia, restar la diferencia al diámetro de la solución de 1.0 mcg por ml en la curva de -- referencia. Leer en la curva la concentración correspondiente a estos valores corregidos de las zonas. -- Multiplicar la concentración por el factor de dilu--- ción apropiado para obtener el contenido del antibiótico en la muestra.

5.2.2 METODO MICROBIOLOGICO (TURBIDIMETRICO)

5.2.2.1 Aparatos y equipo

Fotocolorímetro con filtro para 580 y 530 nm

Horno para esterilizar

Autoclave

Aparato para baño de agua provisto de control termotático

Botella de Roux

Tubos de 16 X 125 mm (dimensiones exteriores)

Equipo común de laboratorio

5.2.2.2 Materiales y reactivos

Sustancia de referencia de oxitetraciclina

Cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)

Solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min (transferir 13.6 g de fosfato monopotásico a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua, ajustar el pH de 4.45 a 4.55 después de la esterilización si es necesario, con solución 18.0 N de ácido fosfórico o con solución 10.0 N de hidróxido de potasio).

Medio antibiótico No. III (caldo nutritivo); esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Peptona -----	5.0 g
Extracto de levadura -----	1.5 g
Extracto de carne -----	1.5 g
Cloruro de sodio -----	3.5 g
Dextrosa -----	1.0 g
Fosfato dipotásico -----	3.68 g
Fosfato monopotásico -----	1.32 g

Agua destilada c.b.p.----- 1000.0 ml
después de la esterilización pH 7.0

Solución al 12.0 por ciento de formaldehído

Solución salina estéril (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua; esterilizar en autoclave a 121 °C - por un mínimo de 20 min).

Medio antibiótico I y II descritos en 5.2.1.2

Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

5.2.2.3 Preparación de la solución de referencia

Transferir a un matraz aforado de 1000 ml una cantidad exactamente pesada de sustancia de referencia de oxitetraciclina, equivalente a 100 mg de oxitetraciclina, disolver y aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico (concentración estimada de 0.1 mg de oxitetraciclina por ml), mantener esta solución primaria bajo refrigeración en un matraz con tapón de vidrio esmerilado, desechar la solución después de una semana.

El día de la prueba transferir 10.0 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 1000 ml, aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico (concentración estimada de 1.0 mcg de oxitetraciclina por ml).

5.2.2.4 Preparación del microorganismo de prueba

Cultivar la cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P) en tubos con 10 ml de medio antibiótico No. I inclinado, incubándolos a 32 - 35 °C durante 24 h. Lavar el desarrollo de un tubo con 3 ml de solución salina estéril. Pasar esta suspensión de microorganismos a una Botella de Roux que contenga 300 ml de medio antibió-

tico No. I. Extender la suspensión en toda la superficie del medio con ayuda de perlas de vidrio estériles e incubar por 24 horas de 32 a 35 °C, lavar el crecimiento de la superficie del agar con 50 ml de solución salina estéril. Diluir esta suspensión con solución salina estéril de tal manera que de ella se obtenga una transmitancia del 25 por ciento en un fotocolorímetro a 580 nm. Generalmente 1:20, guardar esta suspensión primaria bajo refrigeración por una semana.

Para la inoculación diaria usar aproximadamente 3 ml de suspensión primaria para cada 1000 ml de medio antibiótico No. III.

5.2.2.5 Preparación de la solución problema

Transferir a un matraz aforado de 1000 ml una cantidad exactamente pesada de muestra equivalente a 240 mg de oxitetraciclina base, disolver y aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico (concentración estimada de 0.24 mg por ml). Transferir 1.0 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 1000 ml, aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 (concentración estimada de 0.24 mcg por ml).

5.2.2.6 Preparación de los tubos

Preparar seis series de tres tubos cada una y marcarlos respectivamente como serie 1, 2, 3, 4, 5 y 6

5.2.2.7 Preparación de la curva de referencia

Preparar las siguientes diluciones a partir de la solución de referencia de concentración de 1.0 mcg por ml, Usando solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5:

14.6 ml a 100 ml (0.146 mcg por ml)

- 18.7 ml a 100 ml (0.187 mcg por ml)
- 24.0 ml a 100 ml (0.240 mcg por ml)
- 30.8 ml a 100 ml (0.308 mcg por ml)
- 39.5 ml a 100 ml (0.395 mcg por ml)

Usar 5 series de tres tubos cada una y proceder como sigue:

Serie 1 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.146 mcg por ml.

Serie 2 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.187 mcg por ml.

Serie 3: Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.240 mcg por ml

Serie 4 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.308 mcg por ml

Serie 5 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.395 mcg por ml.

Una vez que se ha agregado la solución de referencia a los tubos, añadir 9.0 ml de medio antibiótico No. - III inoculado, inmediatamente después colocarlos en un baño de agua a 37 °C por un período de 3 a 4 h.

Al término de este período sacar los tubos del baño y agregar a cada uno de ellos 0.5 ml de una solución al 12 por ciento de formaldehído.

Como paso siguiente leer las absorbancias de cada tubo en un fotocolorímetro, a una longitud de onda de 530 nm, usar como blanco para ajustar el aparato, una solución formada por 9.0 ml de medio antibiótico No.- III no inoculado más 0.5 ml de solución al 12.0 por ciento de formaldehído y 1.0 ml de solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5.

Sacar el promedio de las absorbancias obtenidas de --

los tubos de cada serie y graficarlos en papel semi-logarítmico de 2 ciclos colocar la concentración en mcg por ml, en las ordenadas (escala logarítmica), y las absorbancias en las abscisas (escala aritmética)

La curva de referencia se traza uniendo los valores - máximo y mínimo, calculándolos por medio de las ecuaciones siguientes:

$$B = \frac{3a + 2b + c - e}{5} \quad A = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

B = Valor de la absorbancia calculada para la concentración más baja de la curva.

A = Valor de la absorbancia calculada para la concentración más alta de la curva.

a, b, c, d y e = Valores promedio de las absorbancias de las soluciones de referencia de 0.146, 0.187, 0.240, 0.308 y 0.395 mcg por ml respectivamente.

5.2.2.8 Procedimiento

A la serie marcada como No. 6, añadir a cada tubo 1.0 ml de solución problema de concentración de 0.24 mcg por ml y 9.0 ml de medio antibiótico No. III inoculado y proceder con ellos de igual forma que con los tu bos de las otras cinco series.

Después de la adición del formaldehído a los tubos, leer sus absorbancias en un fotocolorímetro a una longitud de onda de 530 nm usando como blanco para ajustar el aparato una solución formada por 9.0 ml de me dio antibiótico No. III no inoculado más 0.5 ml de so lución al 12.0 por ciento de formaldehído y 1.0 ml de solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5. Sacar el promedio de las absorbancias obtenidas. Leer en la curva la concentración correspondiente al prome

dio de las absorbancias de los tubos problema. Multiplicar la concentración por el factor de dilución -- apropiado para obtener el contenido del antibiótico - en la muestra.

5.2.3 METODO QUIMICO (ESPECTROFOTOMETRICO)

5.2.3.1 Aparatos y equipo

Espectrofotómetro

Potenciómetro

Equipo común de laboratorio

5.2.3.2 Materiales y reactivos

Solución 0.01 N de ácido clorhídrico

Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

Solución 1.0 N de ácido clorhídrico

Solución primaria de cloruro férrico (pesar cuidadosamente, porque es muy higroscópico, 5 g de cloruro férrico hexahidratado dentro de un vaso de 100 ml y añadir 10 ml de solución 1.0 N de ácido clorhídrico - agitar hasta disolver, transferir cuantitativamente a un matraz aforado ámbar de 50 ml con tapón de vidrio y aforar con agua).

Reactivo de cloruro férrico (transferir 10.0 ml de la solución primaria de cloruro férrico a un matraz aforado de 2 l añadir 20 ml de solución 1.0 N de ácido clorhídrico, aforar con agua. Ajustar el pH entre 2.0 y 2.1)

Sustancia de referencia de oxitetraciclina

5.2.3.3 Preparación de la solución de referencia

Transferir a un matraz aforado de 250 ml una cantidad

exactamente pesada de sustancia de referencia de oxitetraciclina, equivalente a 50 mg de oxitetraciclina-disolver con 25 ml de solución 0.1 N de ácido clorhídrico y aforar con agua. Guardar la solución en un frasco con tapón de vidrio esmerilado bajo refrigeración, desechar después de una semana.

5.2.3.4 Preparación de la solución problema

La solución problema se prepara de la misma forma que la solución de referencia.

5.2.3.5 Procedimiento

Colocar dentro de los tubos de prueba y por separado 10.0 ml de solución de referencia y 10.0 ml de la solución problema, a cada tubo añadir 10.0 ml del reactivo de cloruro férrico, mezclar y dejar en reposo 15 min. Determinar la absorbancia de cada dilución en un espectrofotómetro a 490 nm, ajustar el aparato usando un blanco preparado con 10.0 ml de solución 0.01 N de ácido clorhídrico y 10 ml de reactivo de cloruro férrico.

5.2.3.6 Cálculos

Determinar la cantidad de mcg de oxitetraciclina por mg de muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{mcg de oxitetraciclina por mg} = \frac{A_m \times P_p \times F \times 100}{A_p \times P_m \times (100-h)}$$

Donde:

A_m = Absorbancia de la muestra

P_p = Peso de la sustancia de referencia expresada en mg

F = Potencia de la sustancia de referencia expresada en mcg por mg

A_p = Absorbancia de la sustancia de referencia

P_m = Peso de la muestra expresada en mg

h = Porcentaje de agua en la muestra

5.3 DETERMINACION DEL PODER ROTATORIO ESPECIFICO

5.3.1 Aparatos y equipo

Polarímetro con precisión de $\pm 0.1^\circ$, luz de sodio y filtro para 589.3 nm

Equipo común de laboratorio

5.3.2 Materiales y reactivos

Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

5.3.3 Procedimiento

Pesar con exactitud alrededor de 500 mg de muestra, transferirlos a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico, realizar el aforo a 20°C .

Determinar el poder rotatorio específico de esta solución a 20°C , tomar cinco lecturas de la solución, -- calcular el promedio de estas lecturas (a). Tomar cinco lecturas del disolvente empleado para disolver la muestra y calcular los promedios de las lecturas (a_0).

5.3.4 Cálculos

Calcular el poder rotatorio específico de la muestra en base anhidra, por medio de la siguiente ecuación

$$\text{P.R.E} = \frac{(a - a_0) \times A \times 100}{L \times P \times (100 - h)}$$

Donde:

P.R.E. = Poder rotatorio específico de la muestra -
en base anhidra

a = Promedio de las cinco lecturas observadas de la -
solución problema

a_0 = Promedio de las cinco lecturas observadas para-
el disolvente

A = Volumen al que se aforó la muestra pesada

L = Longitud del tubo polarimétrico, expresado en dm

P = Peso de la muestra expresado en g

h = Por ciento de agua en la muestra

5.4 DETERMINACION DE pH

5.4.1 Aparatos y equipo

Potenciómetro equipado con un electrodo de vidrio sen-
sible a la actividad del ión hidrógeno y uno de calom-
mel que es el de referencia.

Equipo común de laboratorio

5.4.2 Materiales y reactivos

Solución reguladora 0.2 M de cloruros de pH 1.5: Mez-
clar en un matraz aforado de 200 ml, 50 ml exactamen-
te medidos de solución 0.2 M de cloruro de potasio --
(14.911 g de cloruro de potasio para hacer 1000 ml de
solución con agua destilada) y 41.4 ml de solución --
0.2 M de ácido clorhídrico (valorada) y aforar con --
agua.

Solución reguladora 0.2 M de ftalato ácido de pH 3.4:
Mezclar en un matraz aforado de 200 ml, 50 ml exacta-
mente medidos, de solución 0.2 M de biftalato de pota-
sio (40.846 g de biftalato de potasio para hacer 1000
ml de solución con agua) y 10.4 ml de solución 0.2 M -
de ácido clorhídrico (valorada) y aforar con agua.

5.4.3 Procedimiento

Transferir 500 mg de muestra, exactamente pesados, a un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con -- agua.

Realizar las determinaciones de pH de las soluciones a una temperatura de 25 ± 2.0 °C.

Calibrar el potenciómetro ajustándolo con las soluciones reguladoras de pH 1.5 y 3.4, como paso siguiente, medir el pH de la solución problema 2 o más veces hasta que no haya variación.

Entre cada determinación tener la precaución de lavar los electrodos con la solución a la que se le va a determinar el pH y desechar los lavados.

5.5 DETERMINACION DE PERDIDA AL SECADO

5.5.1 Aparatos y equipo

Estufa de vacío con termómetro

Equipo común de laboratorio

5.5.2 Materiales y reactivos

Agente deshidratante (ácido sulfúrico concentrado - 95 - 98 por ciento p/p, o sílica gel)

Desecador con pentóxido de fósforo o sílica gel.

5.5.3 Procedimiento

En una atmósfera cercana al 10 por ciento de humedad relativa, transferir 100 mg de muestra en forma de polvo finamente dividido a un pesafiltros tarado y a peso constante (previamente desecado durante 30 min a 60 °C a un vacío no mayor de 5 mm de mercurio, sobre pentóxido de fósforo), pesar el pesafiltros con muestra y destapado colocarlo en una estufa de va--

cfo con termómetro, a una presión de 5 mm de mercurio y temperatura de 60 °C por lo menos 3 h. Al final de este período de desecación, llenar el aire de la estufa con aire seco haciendo pasar aire por un agente -- deshidratante como ácido sulfúrico o sílica gel, tapar y transferir el pesafiltros a un desecador con -- pentóxido de fósforo o sílica gel, dejar enfriar a -- temperatura ambiente y volver a pesar.

5.5.4 Cálculos

Determinar el porcentaje de pérdida al secado por medio de la siguiente ecuación:

$$P.C.S. = \frac{P_m - P_d}{P_m - P_a} \times 100$$

Donde:

P.C.S. = Porcentaje de pérdida al secado

P_m = Peso del pesafiltros con muestra

P_d = Peso del pesafiltros después del secado

P_a = Peso del pesafiltros vacío

5.6 PRUEBA DE CRISTALINIDAD

5.6.1 Aparatos y equipo

Microscopio con luz polarizada (con objeto de obtener luz polarizada se puede emplear un filtro polaroid -- entre la platina y el condensador).

Equipo común de laboratorio

5.6.2 Materiales y reactivos

Aceite mineral

5.6.3 Procedimiento

Mezclar en un portaobjetos una pequeña cantidad de -- muestra (aproximadamente 2 mg) con una o dos gotas de

aceite mineral. Cubrir el porta-objetos y observar al microscopio de luz polarizada.

5.6.4 Interpretación de resultados

Los cristales de oxitetraciclina, muestran partículas en las cuales se observa el fenómeno de birrefringencia y posiciones de extinción por movimiento circular del porta-objetos.

5.7 DETERMINACION DE ABSORCION DE LUZ EN LA REGION ULTRAVIOLETA A 353 nm

5.7.1 Aparatos y equipo

Espectrofotómetro

Equipo común de laboratorio

5.7.2 Materiales y reactivos

Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

Sustancia de referencia de oxitetraciclina

5.7.3 Procedimiento

transferir 50 mg de muestra y de sustancia de referencia por separado a un matraz aforado de 250 ml, disolver y aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico. Transferir una alícuota de 10.0 ml a un matraz aforado de 100 ml y aforar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico. Determinar la absorbancia a 353 nm de las soluciones muestra y referencia, usar como blanco para ajustar el aparato solución 0.1 N de ácido clorhídrico.

5.7.4 Cálculos

Determinar el porcentaje de absorbancia en base anhidra por medio de la siguiente ecuación:

$$P.C.A. = \frac{A_m \times P_p \times F \times 10}{A_p \times P_m \times (100 - h)}$$

Donde:

P.C.A. = Porcentaje relativo de absorbancia, en base-anhidra, de la muestra

A_m = Absorbancia de la muestra

P_p = Peso de la sustancia de referencia expresado en mg

F = Potencia de la sustancia de referencia expresada en mcg por mg

A_p = Absorbancia de la sustancia de referencia

P_m = Peso de la muestra expresado en mg

h = Porcentaje de pérdida al secado en la muestra

5.8 PRUEBA DE INOCUIDAD

5.8.1 Aparatos y equipo

Agujas y jeringas estériles (esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h)

Equipo común de laboratorio

5.8.2 Materiales y reactivos

Ratones blancos de 18 a 25 g no usados antes en otra prueba similar.

Agua destilada estéril. (esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min).

5.8.3 Procedimiento

Inyectar intravenosamente a 5 ratones 0.5 ml de solución muestra de concentración de 2 mg por ml (transferir 100 mg de muestra a un matraz aforado de 50 ml

disolver y aforar con agua destilada estéril), la inyección deberá hacerse a una velocidad de 0.05 ml por segundo, observar a los ratones por un período de 48 h.

5.8.4 Interpretación de resultados

Si ningún animal muere en el período de observación de 48 horas muestra pasa la prueba. Si uno o más ratones muere dentro del período de observación de 48 horas repetir la prueba usando 10 ratones con peso de 20 g (± 0.5 g) cada uno; la muestra pasa la prueba si el número total de animales muertos dentro de las 48 horas no es mayor del 10 por ciento del número total de animales probados, incluyendo la prueba original.

5.9 PRUEBA DE ESTERILIDAD

5.9.1 Aparatos y equipo

Equipo de filtros membrana para la prueba de esterilidad de 3.6 6 unidades.

Membranas filtrantes de 0.45 ± 0.02 micras.

Campana de flujo laminar

Autoclave

Potenciómetro

Tubos para cultivo con tapa

Cortadores y pinzas para membrana

Equipo común de laboratorio

5.9.2 Materiales y reactivos

Peptona (BBL 11919 : Difco 0118-01-8)

Solución de peptona, esterilizar en autoclave a 121°C por un mínimo de 20 min (disolver 1.0 g de peptona en suficiente agua destilada, añadir 1.0 ml de p-

tert-octil-fenoxi polietoxietanol y aforar con agua a 1.0 litro, después de esterilizar ajustar el pH a 7.0 - 7.2, si es necesario, con solución 2.0 N de ácido clorhídrico o solución 2.0 N de hidróxido de sodio Medio de soya y digerido de caseína (BBL 11768; Difco 0370-01-1).

Agar micológico (BBL 11445; Difco 0405-01-0)

Agar soya tripticasa (BBL 1104; Difco 0369)

5.9.3 Procedimiento

Armar un equipo de filtración de 3 ó 6 unidades con sus filtros membrana y filtros hidrofóbicos según instrucciones del fabricante y prepararlo para su esterilización.

Esterilizar en autoclave todo el equipo a 121°C de 20 a no más de 45 min, EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA SON CRITICOS. Los filtros membrana pueden ser esterilizados a parte pero da mejor resultado y menos riesgo de contaminación si se esterilizan ya en la unidad.

Los cortadores y pinzas deben ser esterilizados en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 hora.

Preparar y limpiar la campana de flujo laminar y en condiciones asépticas todo el material que se va a utilizar para la prueba, conectar la campana 10 a 15 min antes de empezar a trabajar.

Tomar una muestra asépticamente de 6 g del producto que debe de contener de todos y cada uno de los recipientes que forman el lote, vaciar a un matraz erlenmeyer de 500 ml que contenga 200 ml de solución de peptona esterilizada y a temperatura ambiente disolver la muestra agitando hasta disolución total.

Empezar a filtrar asépticamente usando un filtro como

testigo. Si la filtración se dificulta o es muy tardada se debe disolver la muestra en 400 ml de solución de peptona o usar 3 g de muestra.

Lavar el filtro con 3 porciones de 100 ml cada una, de solución de peptona.

Tomar la membrana con una de las pinzas y colocarla en el cortador, cortar la parte central en un círculo de 17.5 mm de diámetro, transferir la parte central de la membrana cortada a un tubo que contenga medio flúido de tioglicolato, colocar la parte exterior dentro de un tubo que contenga medio de soya y digerido de caseína, repetir esto con el testigo.

Durante la prueba exponer una caja Petri con agar microbiológico y otra con agar soya tripticasa, incubar durante un período de 4 días y observar su crecimiento para tener la seguridad de que el área donde se efectuó la prueba fué un área estéril.

Incubar los tubos con medio flúido de tioglicolato por 7 días a 30 - 32 °C (medio para bacterias) y los tubos con medio de soya y digerido de caseína a 22 - 25 °C por 7 días (medio para hongos)

5.9.4 Interpretación de resultados

Se dice que el lote o muestra pasa la prueba si después de 7 días de incubación ningún tubo presenta crecimiento.

Si se observa crecimiento, deberá repetirse la prueba con el doble de muestra y si el crecimiento es en un solo medio, colocar la membrana en ese medio.

Si en los dos ensayos hay crecimiento la muestra no pasa la prueba.

5.10.1 Aparatos y equipo

Termómetro clínico

Jeringas y agujas libres de pirógenos (esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h).

5.10.2 Materiales y reactivos

Conejos no albinos sanos y adultos, con peso no menor de 1500 g; cada uno de los cuales por lo menos una semana antes de la prueba, debe ser mantenido en su peso con una dieta libre de antibióticos.

Area de alojamiento de temperatura de $23 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ -humedad relativa de 50 ± 10 por ciento y libre de perturbaciones que fácilmente los puedan excitar. Mantener a los conejos en esta área en forma individual.

Un animal que no se ha usado antes en la prueba, permanecerá dos semanas antes de la misma bajo las condiciones anteriores. Simular una prueba, 1 a 3 días antes de la determinación bajo las condiciones especificadas en el procedimiento omitiendo la inyección. Si el animal no pasa satisfactoriamente esta prueba probarlo nuevamente 2 veces con un lapso de 2 días de descanso entre cada una. Si no pasa la tercera prueba desechar al animal.

Usar los animales cada 48 horas o cada dos semanas si la prueba anterior fué calificada como pirogénica.

Agua destilada estéril (esterilizar en autoclave a 121°C por un mínimo de 20 min).

5.10.3 Procedimiento

Realizar la prueba en una área donde los animales estén alojados en las condiciones ambientales mencionadas. El día de la prueba suspender todo el alimento a

los animales que van a ser usados, hasta después de terminada, excepto la administración de agua.

Determinar la temperatura control de cada animal 40 min antes de iniciar la prueba, por la inserción del termómetro en el recto del animal a una profundidad de no menos de 7.3 cm manteniéndolo el tiempo suficiente para alcanzar la máxima temperatura. Usar solo aquellos animales cuya temperatura control no se desvie más de 1.0 °C de cada una de las otras lecturas y no se use ningún animal con una temperatura que exceda de 39.8 °C.

La temperatura control registrada para cada conejo constituye la temperatura a partir de la cual se calcula cualquier elevación subsecuente a la inyección del material de prueba.

Preparar una solución con agua destilada estéril libre de pirógenos, de concentración de 5 mg de oxite-traciclina por ml preparada por disolución de una cantidad de muestra equivalente a 50 mg de oxitetra-ciclina en agua destilada estéril libre de pirógenos-aforando a 10 ml; 30 min después de haber tomado la temperatura control, inyectar 1.0 ml de la solución anterior por kg de peso corporal, la inyección deberá hacerse en un lapso de 1 min, por la vena marginal de la oreja de cada uno de los tres conejos habiendo calentado previamente la solución a inyectar a 37 °C, llevar un registro de las temperaturas a 1, 2 y 3 h después de la inyección.

5.10.4 Interpretación de resultados.

Si los conejos no muestran un incremento individual de temperatura de su respectiva temperatura control, de 0.6 °C o más y si la suma de los tres incrementos de temperatura no excede de 1.4 °C la muestra pasa la

prueba.

Si uno o dos conejos muestran una elevación de temperatura de 0.6°C o más, o si la suma de los incrementos de temperatura excede de 1.4°C , repetir la prueba usando 5 conejos; si no más de tres de los 8 conejos muestra incrementos individuales de temperatura de 0.6°C o más, y si la suma de los incrementos no excede de 3.7°C , la muestra pasa la prueba.

5.11 PRUEBA DE SUSTANCIAS HISTAMINOSIMILES

5.11.1 Aparatos y equipo

Quimógrafo

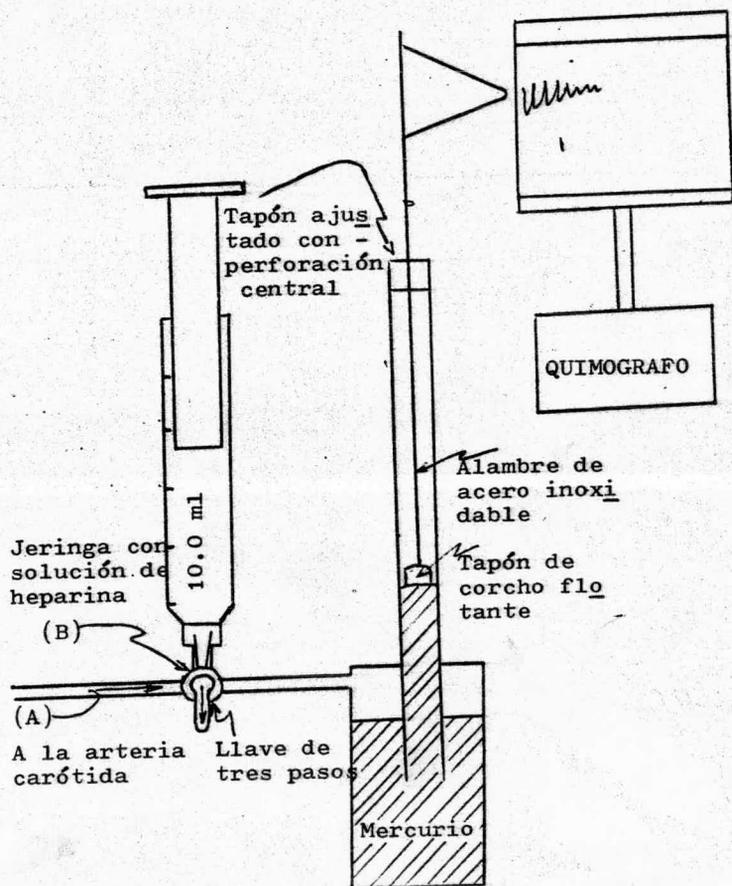
Jeringas y agujas para tuberculina estériles (esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h)

Jeringas de 10 ml y aguja del No. 22, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Equipo de disección estéril (esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h)

Manómetro de mercurio adecuado para medir la presión-sanguínea, se sugiere el siguiente:

Manómetro de mercurio:



5.11.2 Materiales y reactivos

Un gato sano, macho o hembra, no preñada, que no pese menos de 2.5 kg y que se ha mantenido cuando menos una semana en una área de características iguales a las que se especifican en el punto 5.10.2

Agua destilada estéril (esterilizar en autoclave a --
121 °C por un mínimo de 20 min)

Solución fisiológica estéril (transferir 9.0 g de -
cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, di-
solver y aforar con agua, esterilizar en autoclave a-
121 °C por un mínimo de 20 min).

Sustancia de referencia de diclorhidrato de histamina
Anestésico de acción media o prolongada, que no afec-
te la estabilidad de la presión sanguínea (fenobarbi-
tal sódico o nembutal).

Solución de heparina (disolver 100 mg de heparina só-
dica en 1.0 litro de solución fisiológica estéril, --
concentración estimada de 100 mcg de heparina sódica-
por ml).

Solución de referencia de histamina : pesar exactamen-
te una cantidad aproximada a 165.6 mg de diclorhidra-
to de histamina de referencia (equivalente a 100 mg-
de histamina base), transferir a un matraz aforado de
100 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril-
(concentración estimada de 1 mg de histamina base --
por ml) transferir alícuotas de 0.5 ml de la solu-
ción anterior a ampollitas de vidrio, llenar las ampo-
lletas y conservarlas bajo refrigeración hasta su --
uso. Para hacer una solución primaria diluir una alí-
cuota de 0.5 ml en un matraz aforado de 50 ml con --
agua destilada estéril (concentración estimada de 10-
mcg de histamina base por ml), esta solución primaria
puede ser conservada bajo refrigeración por un mes --
El día de la prueba preparar a partir de la solución-
primaria una solución que contenga 1.0 mcg de histami-
na base por ml, haciendo una dilución de 1:10 con --
agua destilada estéril.

5.11.3 Preparación de la muestra

Transferir una cantidad de muestra exactamente pesada equivalente a 50 mg de oxitetraclina a un matraz -- aforado de 10 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril (concentración estimada de 5 mg de oxite-
traciclina por ml)

5.11.4 Procedimiento

Determinar el peso del animal y aplicar anestésia ge-
neral por medio de una inyècción intraperitoneal del
anestésico elegido; descubrir quirúrgicamente la arte-
ria carótida separándola completamente de todas las
estructuras a su alrededor y seccionar el nervio vago.

Desplazar totalmente el aire del manómetro por solu-
ción de heparina aplicada con una jeringa colocada -
en la entrada B (ver esquema, 5.11.1)

Insertar una cánula en la arteria carótida conectada-
al manómetro por la entrada A, manteniendo la llave-
cerrada para medir directamente y tener un registro-
constante de la presión sanguínea abrir la llave, si
la sangre tiende a coagularse, agregar la cantidad ne-
cesaria de solución de heparina.

Descubrir quirúrgicamente la vena femoral para facili-
tar la inyección intravenosa.

Conectar el manómetro al quimógrafo e inspeccionar la
amplitud de los trazos del movimiento de oscilación-
y estabilidad relativa de la presión sanguínea.

Determinar la sensibilidad del animal a la histamina-
por medio de inyecciones, en la vena femoral de la so-
lución de referencia de histamina de concentración
de 1.0 mcg de histamina base por ml, aplicar inyec-
ciones a intervalos uniformes de tiempo de no menos-
de 5 min cada una, aplicar 0.05 , 0.10 y 0.15 mcg de

histamina base por kg de peso corporal, repetir las inyecciones haciendo caso omiso de las primeras series de lecturas hasta que las caídas de presión sanguínea causadas por dosis de histamina sean equivalentes y relativamente uniformes, y la caída de presión sanguínea causada con 0.10 mcg de histamina base por kg de peso corporal no sea menor de 20 mm de mercurio. Reemplazar la histamina por la solución muestra de concentración de 5 mg de oxitetraciclina por ml e inyectar 3 mg por kg de peso corporal en un lapso de 5 min. Si hay baja significativa de la presión sanguínea, la dosis vuelve a repetirse después de alternar con una dosis de solución de histamina base de concentración de 0.10 mcg por kg de peso corporal. Emplear jeringas y agujas diferentes para inyectar la solución de histamina de referencia ----- y la solución del antibiótico. ----- El animal puede ser utilizado hasta que sus respuestas sean razonablemente estables a la histamina.

5.11.5 Interpretación de resultados

El producto pasa la prueba de ausencia de sustancias histaminosímiles si la baja de presión sanguínea obtenida para 3.0 mg de oxitetraciclina por kg de peso corporal no es mayor que la obtenida con 0.10 mcg de histamina base por kg de peso corporal.

6. APENDICE

6.1 OBSERVACIONES

Los reactivos grado analítico empleados en los métodos de prueba cumplirán con las especificaciones marcadas por la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.

La sustancia de referencia será la aceptada por la -
Secretaría de Salubridad y Asistencia. (S.S.A.)

6.2 BIBLIOGRAFIA

Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos -
4a Edición, 1974. Págs 94-96, 170-172, 31-42 y 1019.

The United States Dispensatory, 27th Edition, 1973. -
Págs. 1151-1178 y 824

Organización Mundial de la Salud, Publicación Cientí-
fica No. 158 febrero 1968 Animales de Laboratorio

Farmacopea Helvética, 6a Edición, 1971. Tomo I Pág --
213

Goodman - Gilman, Bases Farmacológicas de la terapeú-
tica 4a Edición, 1970. Editorial Interamericana. Págs
1206-1210.

Osol - Hoover, Remington's Pharmaceutical Sciences, -
14a Edition, 1970 Pág 633.

Specification for the Quality Control of Pharmaceuti-
cal Preparations, Second Edition of the International
Pharmacopeia 1967. Págs. 419-420

Higuchi-Takeru, Brochmann-Hassen, Pharmaceutical Ana-
lysis, Editorial Interscience 1961. Pág 624 - 638

Federal Register, Vol 39 No. 101 - mayo 30, 1974 ---
440.67a

National Formulary XII. Pág. 286

United States Pharmacopeia XVIII. Pág 467

The Merck Index, 1968; Eighth Edition. Pág. 776

6.3 PARTICIPANTES

Fermic, S.A. de C.V.

Química Hoechst de México, S.A.

Laboratorios Sanfer, S.A.

Abbott Laboratories de México, S.A.

Industria Farmacéutica Andromaco

Laboratorios Berzelius de México, S.A.

Laboratorios Terrier, S.A.

Farmacéuticos Helenka, S.A.

Pfizer, S.A. de C.V.

ANTEPROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA
"N-PIRROLIDIN METIL TETRACICLINA ó ROLITETRACICLINA"
DGN-39-4-III-3

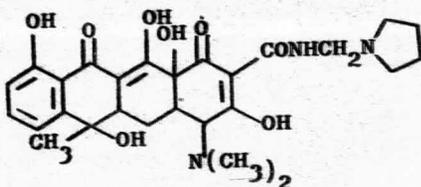
1. GENERALIDADES

Antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclinas

1.1 DEFINICIONES

Para los efectos de esta norma se entiende por rolite traciclina al producto constituido principalmente por el compuesto químico $C_{27}H_{33}N_3O_8$ con peso molecular de 527.58, con nombre químico de 4-(Dimetilamino)-1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-octahidro-3, 6, 10, 12, 12a-pentahidroxi-6-metil-1, 11-dioxo-N-(1-pirrolidinilmetil)-2-naftacencarboxamida; inestable a aire y oscurece a la luz, con aspecto de polvo amarillo, claro, ligero olor a aminas y libre de materias visibles extrañas.

Fórmula desarrollada:



1.2 ALCANCE

La presente norma se aplica a la rolitetraciclina estéril y no estéril.

1.3 USOS

En la fabricación de medicamentos

2. CLASIFICACION

El producto objeto de esta norma se clasifica en dos grados de calidad:

Grado A rolitetraciclina estéril

Grado B rolitetraciclina no estéril

3. ESPECIFICACIONES

3.1 DEL PRODUCTO

La rolitetraciclina en sus dos grados de calidad, objeto de esta norma, debe cumplir con las especificaciones indicadas en la tabla 1.

TABLA 1

Característica	Rolitetraciclina Especificaciones	
	Grado A estéril	Grado B no estéril
Identificación Prueba A : Prueba B : Prueba C :	Pasa la prueba Pasa la prueba Pasa la prueba	Pasa la prueba Pasa la prueba Pasa la prueba
Potencia -en base anhidra-	No menos de 900 mcg de rolitetraciclina por mg	No menos de 900 mcg de rolitetraciclina por mg
pH (solución al 1.0 por ciento p/v)	7.0 a 9.0	7.0 a 9.0
Cristalinidad	Presenta birrefringencia a la luz polarizada	Presenta birrefringencia a la luz polarizada
Agua (Karl Fischer)	No más del 2.0 por ciento	No más del 2.0 por ciento
Perdida por secado (a 60°C y presión reducida)	No más del 2.0 por ciento	No más del 2.0 por ciento
Absorbancia de luz en la región ultravioleta a 380 nm -en base anhidra	100 + 4.4 por ciento comparada con una sustancia de referencia	100 + 4.4 por ciento comparada con una sustancia de referencia

TABLA 1 (continúa)

Coeficiente de- absorbancia en- la región del - ultravioleta - 270 nm/355 nm	1.11 a 1.21	1.11 a 1.21
Metales pesados	No más de 28 - p.p.m.	No más de 28 - p.p.m.
Cloruros	No más de 0.5 - por ciento	No más de 0.5 - por ciento
Cenizas sulfata- das	0.01 a 0.05 - por ciento	0.01 a 0.05 por ciento
Inocuidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Esterilidad	Pasa la prueba	- . -
Pirógenos	Pasa la prueba	- . -
Sustancias his- taminosímiles	Pasa la prueba	- . -

3.2 MARCADO

3.2.1 En el envase y empaque

En el exterior del empaque y envase debe aparecer una etiqueta en caracteres legibles y redactados en español los siguientes datos: Símbolo del fabricante, nombre del producto, grado de calidad (estéril, no estéril), peso neto en kilogramos o gramos, número de lote, fecha de fabricación y caducidad, la leyenda "Hecho en México", la leyenda "Conservese el envase bien cerrado en lugar fresco y seco", potencia o equivalente en actividad (en rolitetraciclina base) y otros datos tales como precauciones que deben tenerse en el manejo y uso de los empaques y envases durante su transporte y almacenamiento y el Sello Oficial de Garantía cuando la Secretaría de Industria y Comercio lo juzgue conveniente.

3.3 ENVASADO Y EMPACADO

El producto no estéril, objeto de esta norma, debe -

estar contenido en envases de vidrio ámbar o cualquier otro material adecuado, protegido de la luz, - envasado y sellado en atmósfera de nitrógeno seco y a su vez estos en cuñetes de capacidad y material -- adecuados para que resistan su transporte y almacenamiento.

El producto estéril debe estar contenido en recipientes estériles de vidrio ámbar u otro material adecuado, protegido de la luz, herméticamente cerrados envasado y sellado en atmósfera de nitrógeno seco; - los recipientes deben abrirse solamente en áreas estériles y bajo condiciones asépticas. Los envases - deben estar contenidos en cuñetes de capacidad y material adecuados para que resistan su transporte y almacenamiento.

4. MUESTREO

El muestreo se efectúa de común acuerdo entre fabricante y comprador y a falta de este acuerdo se recomienda seguir el siguiente método.

4.1 METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO A GRANEL GRADO NO ESTERIL

4.1.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas

Muestreador de acero inoxidable pulido, de 1.27 cm - de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia completo de tubo interior de cierre.

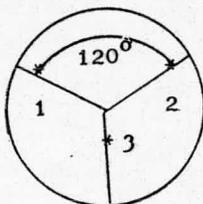
Bolsas de polietileno de color negro.

Frascos de vidrio de color ámbar

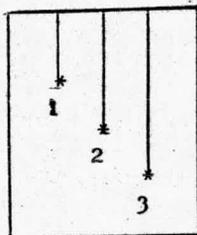
Frascos ampula de color ámbar de 20 ml

4.1.2 Manera de operar

Por medio del muestreador sacar producto de cada cuñete en tres puntos diferentes, dispuestos a $\pm 120^\circ$ uno de otro y a tres diferentes alturas según el esquema siguiente:



PLANTA



SECCION

Abrir los cuñetes en una área de humedad relativa ambiental menor del 20 por ciento y luz controlada. De cada envase tomar aproximadamente 30 g de producto y ponerlo en bolsas de polietileno negro marcadas con el número del cuñete y el número del lote. Sellar los envases desplazando el aire con nitrógeno seco y con un oportuno cierre de garantía.

De cada bolsa de polietileno pesar partes proporcionales al peso neto declarado en la etiqueta del cuñete correspondiente y transferirlas a otra bolsa de polietileno negro, Mezclar hasta completa homogeneidad.

Esta muestra oficial se dividirá en dos partes: una destinada al archivo (cantidad aproximada 100 g), la del archivo en frascos de vidrio de color ámbar y sellada en atmósfera de nitrógeno seco, y otra destinada al análisis en caso de que el lote se ponga a prueba de estabilidad se repartirá una tercera porción del producto en frascos ampula de color ámbar de 20 -

ml (20 frascos conteniendo cada uno 1 g de producto) debidamente rotulados y sellados en atmósfera de nitrógeno seco.

4.2 METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO A GRANEL GRADO ESTERIL

4.2.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas, esterilizar en autoclave a 121°C por un mínimo de 20-min.

Muestreador de acero inoxidable pulido, de 1.27 cm - de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia; completo de tubo interior de cierre, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Fascos de vidrio de color ámbar, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Fascos ampula de color ámbar de 20 ml.

Campana de flujo laminar o área estéril

4.2.2 Manera de operar

En la campana de flujo laminar o en el área estéril - realizar el procedimiento indicado en el punto 4,1,2, en forma aséptica.

4.3 CRITERIO DE ACEPTACION

El criterio de aceptación es 100 por ciento

5. METODOS DE PRUEBA

Los reactivos que se mencionen en todas las determinaciones siguientes deben ser grado analítico, (ver --- apéndice) a menos que se mencione otra cosa; cuando -

se indique agua debe entenderse agua destilada y la sustancia de referencia será la oficial (ver apéndice)

5.1 PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DE ROLITETRACICLINA

5.1.1 Prueba A (identificación de rolitetraciclina)

5.1.1.1 Aparatos y equipo
Equipo común de laboratorio

5.1.1.2 Materiales y reactivos
Solución 1.0 N de hidróxido de sodio

5.1.1.3 Procedimiento

Transferir 100 mg de muestra a un tubo de ensayo y añadir 5 ml de solución 1.0 N de hidróxido de sodio, calentar lentamente hasta ebullición durante 15 segundos y enfriar a temperatura ambiente.

5.1.1.4 Interpretación de resultados

Al calentar se percibe un marcado olor a pirrolidina y cuando la solución se ha enfriado es cristalina de color rojo vino.

5.1.2 Prueba B (identificación del componente tetraciclínico)

5.1.2.1 Aparatos y equipo
Equipo común de laboratorio

5.1.2.2 Materiales y reactivos
Acido sulfúrico concentrado (95 - 98 por ciento p/p)

5.1.2.3 Procedimiento

Transferir 30 g de muestra a un tubo de ensayo y añadir 5 ml de ácido sulfúrico.

5.1.2.4 Interpretación de resultados

Al agregar el ácido sulfúrico a la muestra se produce coloración violeta

5.1.3 Prueba C (identificación del componente pirrolidínico)

5.1.3.1 Aparatos y equipo

Equipo común de laboratorio

5.1.3.2 Materiales y reactivos

Solución metanólica al 1.0 por ciento de benzoquinona

5.1.3.3 Procedimiento

Calentar en baño de vapor durante 1 a 2 min, una solución de 30 mg de muestra en 1 ml de agua y 0.25 ml de solución metanólica al 1.0 por ciento de benzoquinona

5.1.3.4 Interpretación de resultados

Al calentar la solución se produce coloración roja intensa.

5.2 DETERMINACION DE POTENCIA

5.2.1 Método microbiológico (turbidimétrico)

5.2.1.1 Aparatos y equipo,

Fotocolorímetro con filtro para 530 y 580 nm

Horno para esterilizar

Autoclave

Botellas de Roux

Aparato para baño de agua provisto de control termos-
tático

Tubos de 16 X 150 mm (dimensiones exteriores)

Equipo común de laboratorio

5.2.1.2 Materiales y reactivos

Sustancia de referencia de rolitetetraciclina (en el mo-
mento de usar secar 3 horas a 60 °C a una presión no
mayor de 5 mm de mercurio).

Cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)

Solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5, este-
rilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min
(transferir 13.6 g de fosfato monopotásico a un ma-
traz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua,-
ajustar el pH de 4.45 a 4.55 después de la esteriliza-
ción, si es necesario, con solución 18.0 N de ácido -
fosfórico o con solución 10.0 N de hidróxido de pota-
sio).

Solución al 12.0 por ciento de formaldehído

Medio antibiótico No.1 (agar nutritivo para mantener-
al microorganismo de prueba); esterilizar en autocla-
ve a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Peptona -----	6.0 g
Extracto digerido de caseína ---	4.0 g
Extracto de levadura -----	3.0 g
Extracto de carne -----	1.5 g
Dextrosa -----	1.0 g
Agar -----	15.0 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización, pH 6.5 - 6.6

Medio antibiótico No. II (caldo nutritivo); esterili-

zar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Peptona -----	5.0 g
Extracto de levadura -----	1.5 g
Extracto de carne -----	1.5 g
Cloruro de sodio -----	3.5 g
Dextrosa -----	1.0 g
Fosfato dipotásico -----	3.68 g
Fosfato monopotásico -----	1.32 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización, pH 6.95 - 7.05

Solución salina, esterilizar en autoclave a 121 °C -- por un mínimo de 20 min (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y - aforar con agua).

5.2.1.3 Preparación de la solución de referencia
Transferir 100 mg de sustancia de referencia de rolitetraciclina (la cual ha sido secada previamente, durante 3 horas, a 60 °C y 5 mm de mercurio) a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con metanol (concentración estimada de 1 mg de rolitetraciclina - por ml). Guardar esta solución primaria bajo refrigeración en un matraz de vidrio, con tapón esmerilado - y desechar la solución después de un día de preparación.

5.2.1.4 Preparación de la solución problema
Transferir 100 mg de muestra, exactamente pesados, a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con alcohol metílico (concentración estimada de 1 mg de rolitetraciclina por ml). Transferir una alícuota de -- 1.0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml mezclar y aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 (concentración estimada de 10 mcg de rolitetraciclina por ml). Transferir una alícuota de

25.0 ml a un matraz aforado de 1000 ml, mezclar y aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 (concentración estimada de 0.25 mcg de rolitetra-ciclina por ml)

5.2.1.5 Preparación del microorganismo de prueba
Cultivar la cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P) en tubos con 10 ml de medio antibiótico No. 1 inclinado incubándolos a 32 - 35 °C durante 24 horas. Lavar el desarrollo de un tubo con 3 ml de solución salina-estéril. Pasar esta suspensión de microorganismos a una botella de Roux, que contenga 250 ml de medio antibiótico No. 1. Extender la suspensión en toda la superficie del medio con ayuda de perlas de vidrio estériles e incubar por 24 horas a 32 - 35 °C, lavar el crecimiento de la superficie del agar con 50 ml de solución salina estéril de tal manera que de ella se obtenga una transmitancia del 25 por ciento en un fotocolorímetro a 580 nm. Generalmente 1 : 20. Guardada esta suspensión bajo refrigeración, en un matraz de vidrio puede ser empleada antes de una semana.

Una vez ajustada la suspensión de microorganismos --- agregar de 10 a 20 ml de la misma a 1.0 l de medio antibiótico No. II

5.2.1.6 Preparación de los tubos
Preparar seis series de tres tubos cada una y marcar los respectivamente como serie 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

5.2.1.7 Preparación de la curva de referencia
Transferir 1.0 ml de la solución primaria de referencia, preparada como se indica en 5.2.1.3, a un matraz aforado de 1000 ml, aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfato de pH 4.5 (concentración estimada -

de 1.0 mcg de rolitetraciclina por ml), apartir de esta solución preparar las siguientes diluciones usando solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5:

16.0 ml a 100 ml (0.160 mcg por ml)

20.0 ml a 100 ml (0.200 mcg por ml)

25.0 ml a 100 ml (0.250 mcg por ml)

31.2 ml a 100 ml (0.312 mcg por ml)

39.0 ml a 100 ml (0.390 mcg por ml)

Usar 5 series de tres tubos cada una y proceder como sigue:

Serie 1 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.160 mcg por ml.

Serie 2 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.200 mcg por ml.

Serie 3: Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.250 mcg por ml

Serie 4 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.312 mcg por ml.

Serie 5 Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.390 mcg por ml.

Una vez que se ha agregado la solución de referencia a los tubos añadir 9.0 ml de medio antibiótico No. II inoculado, inmediatamente después colocarlos en un baño de agua a 37 °C por un período de 3 a 4 horas.

Al término de este período sacar los tubos del baño y agregar a cada uno de ellos 0.5 ml de solución al 12.0 por ciento de formaldehído.

Como paso siguiente leer las absorbancias de cada tubo en un fotocolorímetro a una longitud de onda de 530 nm, emplear como blanco, para ajustar el aparato, una solución formada por 9.0 ml de medio antibiótico-

No. II no inoculado más 0.5 ml de solución al 12.0 - por ciento de formaldehído y 1.0 ml de solución regu- ladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5

Sacar el promedio de las absorbancias obtenidas de -- los tubos de cada serie y graficarlas en papel semilo- garítmico de 2 ciclos, colocar la concentración del - antibiótico en mcg por ml en las ordenadas (escala lo- garítmica), y las absorbancias en las abscisas (esca- la aritmética).

La curva de referencia se traza uniendo los valores - máximo y mínimo calculándolos por medio de las ecua- ciones siguientes:

$$B = \frac{2a + 2b + c - e}{3} \quad A = \frac{2e + 2d + c - a}{3}$$

Donde

B = Valor de la absorbancia calculada para la concen- tración más baja de la curva

A = Valor de la absorbancia calculada para la concen- tración más alta de la curva.

a, b, c, d, y e = Valores promedio de las absorban- cias de las soluciones de referencia de concentra- ción de 0.160, 0.200, 0.312 y 0.390. mcg por ml res- pectivamente.

5.2.1.8 Procedimiento

A la serie marcada con número 6 añadir a cada tubo -- 1.0 ml de la solución problema de concentración de -- 0.250 mcg por ml y 9.0 ml de medio antibiótico No II+ inoculado y proceder con ellos de igual forma que con los tubos de las otras cinco series.

Después de la adición de formaldehído a los tubos, - leer las absorbancias en un fotocolorímetro a una lon-

gitud de onda de 530 nm usando como blanco, para ajustar el aparato, una solución formada por 9.0 ml de medio antibiótico No. II no inoculado más 0.5 ml de solución al 12.0 por ciento de formaldehído y 1.0 ml de solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5.

Sacar el promedio de las absorbancias obtenidas. Leer en la curva la concentración equivalente a las absorbancias de los tubos problema. Multiplicar la concentración por el factor de dilución apropiado para obtener el contenido de antibiótico en la muestra.

5.3 DETERMINACION DE pH

5.3.1 Aparatos y equipo

Potenciómetro equipado con un electrodo de vidrio, sensible a la actividad del ión hidrógeno, y uno de calomel que es el de referencia.

Equipo común de laboratorio

5.3.2 Materiales y reactivos

Solución reguladora de fosfatos de pH 7.0: Mezclar en un matraz aforado de 200 ml, 50.0 ml exactamente medidos de solución 0.2 M de fosfato monobásico de potasio (27.218 g de fosfato monobásico de potasio para hacer 1000 ml de solución con agua) y 29.1 ml de solución 0.2 M de hidróxido de sodio valorada, y aforar con agua.

Solución reguladora 0.2 M de ácido bórico y cloruro de potasio de pH 9.0: Mezclar en un matraz aforado de 200 ml, 50.0 ml exactamente medidos de solución 0.2 M de ácido bórico y cloruro de potasio (12.366 g de ácido bórico y 14.911 g cloruro de potasio para hacer -- 1000 ml de solución con agua), y 20.8 ml de solución-

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Q.F.B. RAMON ULACIA ESTEVE
Vocal	Q.F.B. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES
Secretario	Q.F.B. BICE V. NOVI AVILA
1er. Suplente	Q.F.B. ANDRES ZUÑIGA PADILLA
2do. Suplente	Q.F.B. MARIO MIRANDA CASTRO

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorios Sanfer, S.A.

Sustentante:

ARTURO LOPEZ ANAYA

Asesor del tema:

Q.F.B. BICE V. NOVI AVILA

CON TODO CARIÑO

A MIS PADRES:

JUAN Y MARIA

A MIS HERMANOS:

LUCIA

RODOLFO

CLARA

A MI AMOR:

MARIA

A MIS MAESTROS

A MIS COMPAÑEROS

A MIS AMIGOS

0.2 M de hidróxido de sodio valorada y aforar con --
agua.

5.3.3 Procedimiento

Transferir 500 mg de muestra, exactamente pesados, a un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con --
agua.

Realizar las determinaciones de pH de las soluciones a una temperatura de 25 ± 2.0 °C.

Calibrar el potenciómetro, ajustándolo con las soluciones reguladoras de pH 7.0 y 9.0, como paso siguiente medir el pH de la solución problema dos o más veces hasta que no haya variación en las lecturas.

Entre cada determinación tener la precaución de lavar los electrodos con la solución a la que se le va a determinar el pH y desechar los lavados.

5.4 PRUEBA DE CRISTALINIDAD

5.4.1 Aparatos y equipo

Microscopio con luz polarizada (con objeto de obtener luz polarizada se puede emplear un filtro polaroid entre la platina y el condensador).

Equipo común de laboratorio

5.4.2 Materiales y reactivos

Aceite mineral

5.4.3 Procedimiento

Mezclar en un porta-objetos una pequeña cantidad de muestra (aproximadamente 2 mg) con una o dos gotas de aceite mineral. Cubrir el porta-objetos y observar al microscopio con luz polarizada.

5.4.4 Interpretación de resultados

Los cristales de rolitetetraciclina, muestran partículas en las cuales se observa el fenómeno de birrefringencia y posiciones de extinción de la luz por movimiento circular del porta-objetos.

5.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AGUA - METODO DE KARL FISCHER

5.5.1 Aparatos y equipo

Aparato que permita la apropiada exclusión de la humedad atmosférica y determinación del punto final. Comprende por lo general un sistema cerrado, constituido por buretas automáticas y un vaso de titulación con cubierta hermética, provisto de dos electrodos de platino y de un agitador magnético.

Equipo común de laboratorio

5.5.2 Materiales y reactivos

Reactivo de Karl Fischer (a una solución que contenga 670 ml de metanol y 170 ml de piridina, agregar -- 125 g de yodo e infriar en una probeta graduada de -- 250 ml transferir 100 ml de piridina y mantenerla en baño de hielo burbujear dióxido de azufre seco hasta que el volumen llegue a 200 ml. Lentamente y agitando se agrega esta solución a la mezcla de yodo enfriada. Agitar bien para disolver el yodo, pasar la solución al frasco del aparato y dejar en reposo durante la noche anterior a la valoración. Un ml de esta solución recientemente preparada equivale aproximadamente a 5 mg de agua, pero se descompone gradualmente, por tanto debe valorarse una hora antes de usarla o diariamente si está en uso continuo. Se protege de la luz mientras esta en uso guardar el resto del reactivo --

preparado en un recipiente color ámbar con tapón de vidrio protegido de la luz y bajo refrigeración. También se puede emplear una solución estabilizada del reactivo disponible comercialmente).

Tartrato de sodio.

Metanol

5.5.3 Normalización del reactivo Karl Fischer
Colocar 36 ml de metanol en un vaso de titulación y añadir suficiente reactivo de Karl Fischer para obtener el punto final característico. Añadir rápidamente de 150 a 350 mg de tartrato de sodio, pesados con exactitud, y titular hasta el punto final. Por la fórmula siguiente se obtiene el factor F de equivalencia del agua, expresado en mg de agua por ml de reactivo:

$$F = \frac{0.1566 \times P}{V}$$

Donde:

F = Factor de equivalencia del agua, expresado en mg de agua por ml de reactivo.

P = Peso del tartrato de sodio expresado en mg

V = Volumen empleado del reactivo de Karl Fischer.

5.5.4 Procedimiento

Añadir 25 ml de metanol al vaso de titulación y titular con reactivo de Karl Fischer hasta llegar al punto final, sin tomar en cuenta el volumen consumido, ya que este no interviene en los cálculos.

Pesar cuidadosamente alrededor de 300 mg de muestra y transferir rápidamente al vaso de titulación.

Agitar vigorosamente y titular de nuevo con reactivo de Karl Fischer hasta obtener el punto final.

5.5.5 Cálculos

Determinar el por ciento de agua en la muestra por la siguiente ecuación:

$$\text{P.C.A.} = \frac{V \times F \times 100}{P}$$

Donde:

P.C.A. = Por ciento de agua en la muestra

V = Volumen del reactivo empleado

F = Factor de equivalencia del agua.

P = Peso de la muestra expresado en mg.

5.6 DETERMINACION DE PERDIDA AL SECADO

5.6.1 Aparatos y equipo

Estufa de vacío

Desecador con pentóxido de fósforo o sílica gel

Equipo común de laboratorio

5.6.2 Materiales y reactivos

Agente deshidratante (ácido sulfúrico concentrado 95-98 por ciento p/p o sílica gel)

5.6.3 Procedimiento

En una atmósfera cercana al 10 por ciento de humedad relativa transferir 100 mg de muestra, en forma de polvo finamente dividido, a un pesafiltros tarado y a peso constante previamente desecado durante 30 min a 60 °C, a un vacío no mayor de 5 mm de mercurio (sobre pentóxido de fósforo), pesar el pesafiltros con muestra y destapado colócarlo en una estufa de vacío con termómetro a una presión de 5 mm de mercurio y temperatura de 60 °C por lo menos 3 h. Al final de este pe

río de desecación, llenar la estufa con aire seco - (haciendo pasar el aire por un agente deshidratante - como ácido sulfúrico o sílica gel), tapar y transferir el pesafiltros a un desecador con pentóxido de fósforo o sílica gel, dejar enfriar a temperatura ambiente y volver a pesar.

5.6.4 Cálculos

Determinar la pérdida al secado, expresada en por ciento por medio de la siguiente ecuación:

$$P.S. = \frac{P_m - P_d}{P_m - P_a} \times 100$$

Donde:

P.S. = Pérdida al secado de la muestra, expresada en por ciento

P_m = Peso del pesafiltros con muestra

P_d = Peso del pesafiltros después del secado

P_a = Peso del pesafiltros vacío

5.7 DETERMINACIÓN DE ABSORCIÓN DE LUZ EN LA REGIÓN ULTRAVIOLETA A 380 nm

5.7.1 Aparatos y equipo

Espectrofotómetro

Equipo común de laboratorio

5.7.2 Materiales y reactivos

Solución 5.0 N de hidróxido de sodio

Solución 0.25 N de hidróxido de sodio

Sustancia de referencia de rolitetraciclina

5.7.3 Procedimiento

Transferir 40 mg de muestra exactamente pesados a un matraz aforado de 250 ml, disolver y aforar con agua transferir una alícuota de 10.0 ml a un matraz aforado de 100 ml, agregar 75 ml de agua y 5.0 ml solución 5.0 N de hidróxido de sodio, aforar con agua y mezclar, leer la absorbancia de la solución exactamente 6 min después de haber agregado el hidróxido de sodio, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 380 nm empleando como blanco, para ajustar el aparato, solución 0.25 N de hidróxido de sodio.

Proceder al mismo tiempo y en la misma forma con la sustancia de referencia de rolitetraciclina.

5.7.4 Cálculos

Determinar el porcentaje de absorbancia de la muestra comparada con una sustancia de referencia por medio de la siguiente ecuación:

$$P.A. = \frac{A_m \times P_s \times F \times 10}{A_s \times P_m \times (100 - h)}$$

Donde:

P. A. = Porcentaje de absorbancia de la muestra, comparada con una sustancia de referencia

P_s = Peso de la sustancia de referencia expresada en mg

F = Potencia de la sustancia de referencia expresada en mcg por mg

A_s = Absorbancia de la sustancia de referencia

P_m = Peso de la muestra expresada en mg

h = Porcentaje de agua en la muestra

5.8

DETERMINACION DEL COCIENTE DE ABSORBANCIA
EN LA REGION DEL ULTRAVIOLETA 270/355 nm

5.8.1 Aparatos y equipo

Espectrofotómetro

Equipo común de laboratorio

5.8.2 Materiales y reactivos

Solución 0.1 N de ácido clorhídrico

5.8.3 Procedimiento

Transferir 50 mg de muestra, exactamente pesados, a un matraz aforado de 250 ml, disolver y aforar con agua, tomar una alícuota de 5.0 ml y transferirla a un matraz aforado de 50 ml, aforar y mezclar con solución 0.1 N de ácido clorhídrico. Leer las absorbancias de la solución en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 270 y 355 nm empleando como blanco, para ajustar a cero el aparato, agua.

5.8.4 Cálculos

Determinar el cociente de absorbancia de la muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$C.A. = \frac{A_{270 \text{ nm}}}{A_{355 \text{ nm}}}$$

Donde:

C.A. = Cociente de absorbancia de la muestra

A_{270} = Absorbancia de la solución a una longitud de onda de 270 nm

A_{355} = Absorbancia de la solución a una longitud de onda de 355 nm

5.9 PRUEBA PARA DETERMINAR METALES PESADOS

5.9.1 Aparatos y equipo

Mufla

Tubos de Nessler

Equipo común de laboratorio

5.9.2 Materiales y reactivos

Acido sulfúrico concentrado (95 -98 por ciento p/p)

Acido nítrico concentrado (69 - 71 por ciento p/p)

Acido clorhídrico concentrado (35 - 38 por ciento p/p)

Solución al 10.0 por ciento de hidróxido de amonio

Solución al 6.0 por ciento de ácido acético

Solución al 12.0 por ciento de ácido acético

Solución al 10.0 por ciento de sulfuro de sodio

Solución de referencia de plomo: 0.183 g de acetato de plomo y 5 ml de solución al 12.0 por ciento de ácido-acético a un matraz aforado de 1000 ml mezclar y aforar con agua, concentración estimada de 100 mcg de -- plomo por ml. El día de la prueba diluir 10.0 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 100 ml de la solución anterior en un matraz aforado de 100 ml - con agua destilada, concentración estimada de 10 mcg de plomo por ml.

5.9.3 Procedimiento

Transferir 350 mg de muestra exactamente pesados a un crisol de porcelana; calcinar en la mufla de 500 a -- 600 °C y dejar enfriar . Añadir al residuo 2 ml de -- ácido nítrico y cinco gotas de ácido sulfúrico, calentar la mezcla con mechero hasta que desaparezcan - los humos blancos. Finalmente calcinar la mezcla en - la mufla hasta desaparición de los restos de carbón,- Enfriar y agregar 2 ml de ácido clorhídrico calentar en baño de vapor hasta sequedad. Agregar al residuo - dos o cuatro gotas de ácido clorhídrico y 10 ml de --

agua caliente. Sobre baño de vapor calentar la mezcla agregar solución al 10.0 por ciento de hidróxido de sodio hasta reacción alcalina, después solución al 6.0 por ciento de ácido acético hasta reacción ligeramente ácida y filtrar la solución, si es necesario, transferirla a un tubo Nessler y lavar el crisol y el filtro con 10 ml de agua. Enseguida diluir la mezcla a 25 ml, alcalinizar con solución al 10.0 por ciento de hidróxido de amonio y agregar cinco gotas de solución al 10.0 por ciento de sulfuro de sodio y completar el volumen a 50 ml con agua.

Transferir 1.0 ml de la solución de referencia de plomo de concentración de 10 mcg de plomo por ml, a un tubo Nessler añadir 25 ml de agua y solución al 10.0 por ciento de hidróxido de amonio hasta reacción alcalina agregar 5 gotas de solución al 10.0 por ciento de sulfuro de sodio y completar el volumen a 50 ml con agua,

Comparar la turbidez de las dos soluciones.

5.9.4 Interpretación de resultados

La solución problema debe ser menos turbia que la solución de referencia.

5.10 PRUEBA PARA DETERMINAR CLORUROS

5.10.1 Aparatos y equipo

Matraz de combustión de Schoeninger de 1 litro

Tubos Nessler

Equipo común de laboratorio

5.10.2 Materiales y reactivos

Solución de referencia de cloro: transferir a un ma--

traz aforado de 1000 ml 5.85 g de cloruro de sodio -
previamente desecados, disolver y aforar con agua, con
centración estimada de 3.55 mg de cloro por ml.

El día de la prueba preparar las soluciones siguientes:

Solución de referencia diluída de cloro: transferir -
28.2 ml de la solución de referencia de cloro a un ma-
traz aforado de 100 ml aforar con agua y mezclar.

Solución comparadora de cloro: transferir 4.0 ml de -
la solución anterior a un matraz aforado de 100 ml, -
aforar con agua y mezclar.

Solución al 12.5 por ciento de ácido nítrico

Solución al 25.0 por ciento de ácido nítrico

Solución 1.0 N de hidróxido de sodio

Solución 0.1 N de nitrato de plata

5.10.3 Procedimiento

Colocar 50 mg de muestra, exactamente pesados, en pa-
pel filtro recortado en forma especial, doblar el pa-
pel de manera que no caiga el polvo. Transferir al ma-
traz de Schoeninger de 1 litro el papel con muestra -
colocarlo entre la espiral de platino de manera que -
la punta de papel quede en el bucle, agregar 5 ml de
solución 1.0 N de hidróxido de sodio y conducir en el
mismo una corriente abundante de oxígeno durante 20 -
segundos. Tapar de inmediato el aparato e iniciar la
combustión. Una vez terminada la combustión esperar a
que se enfríe el matraz, agitar para que los gases de
combustión sean absorbidos por la solución de hidróxi-
do de sodio. Abrir con cuidado y agregar 10 ml de so-
lución al 12.5 por ciento de ácido nítrico y mezclar-
transferir con agitación la solución a un matraz afo-
rado de 50 ml, enjuagar el matraz de combustión suce-

sivamente con tres porciones de 3 ml de agua cada una, agregándolos al matraz aforado, completar el volumen con agua.

Simultáneamente correr un blanco, quemar un papel sin muestra, y tratarlo de igual forma que como se describió en el párrafo anterior sólo que antes de aforar, agregar 0.2 ml de solución de referencia diluida de cloro.

Transferir por separado, a tres tubos Nessler las siguientes soluciones:

Tubo No. 1 : 10.0 ml de solución problema, más 3.0 ml de solución al 25.0 por ciento de ácido nítrico y 1.0 ml de solución 0.1 N de nitrato de plata.

Tubo No. 2 : 10.0 ml de solución resultante de la combustión sin muestra, más 3.0 ml de solución al 25.0 por ciento de ácido nítrico y 1.0 ml de solución 0.1 N de nitrato de plata.

Tubo No. 3 : 10.0 ml de solución comparadora más 11.0 ml de agua, más 1.0 ml de solución al 25.0 por ciento de ácido nítrico y 1.0 ml de solución 0.1 N de nitrato de plata.

Comparar la turbidez producida en cada tubo sobre una superficie negra.

5.10.4 Interpretación de resultados

La turbidez presente en el tubo No. 1 no debe ser mayor que la de los tubos 2 y 3 en caso de que fuera mayor, hacer otra solución para el tubo No. 1 para compararla con los tubos 2 y 3 consistente en : 8.0 ml de solución problema, 2.0 ml de agua, 3.0 ml de solución al 12.5 por ciento de ácido nítrico y 1.0 ml de solución 0.1 N de nitrato de plata.

La turbidez de esta solución deberá ser menor que la de los tubos 2 y 3.

5.11 DETERMINACION DE CENIZAS SULFATADAS

5.11.1 Aparatos y equipo

Mufla

Equipo común de laboratorio

5.11.2 Materiales y reactivos

Acido sulfúrico concentrado (95 - 98 por ciento p/p)

5.11.3 Procedimiento

Transferir 500 mg de muestra, exactamente pesados, a un crisol de porcelana previamente tarado, incinerar con flama de mechero hasta que la sustancia se carbonice del todo, enfriar y agregar tres gotas de ácido sulfúrico, calentar nuevamente de igual forma la mezcla hasta que no haya desprendimiento de vapores blancos e incinerar en la mufla a 800 ± 25 °C hasta peso constante.

5.11.4 Cálculos

Determinar el por ciento de cenizas sulfatadas, en la muestra, por medio de la siguiente ecuación:

$$P.C. = \frac{Pd - Pc}{Pm - Pc} \times 100$$

Donde:

P.C. = Por ciento de cenizas sulfatadas en la muestra

Pd = Peso del crisol después de la calcinación

Pc = Peso del crisol vacío y a peso constante

Pm = Peso del crisol con muestra antes de la calcinación

5.12 PRUEBA DE INOCUIDAD

5.12.1 Aparatos y equipo

Agujas y jeringas de tuberculina, esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h.

Equipo común de laboratorio

5.12.2 Materiales y reactivos

Ratones blancos de 18 a 25 g no usados antes en otra prueba similar.

Agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min

5.12.3 Procedimiento

Inyectar intravenosamente a 5 ratones 0.5 ml de solución muestra de concentración de 2 mg por ml (transferir 100 mg de muestra a un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril), la inyección deberá hacerse a una velocidad de 0.05 ml por segundo, observar a los ratones por un período de 48 horas.

5.12.4 Interpretación de resultados

Si ningún animal muere en el período de observación de 48 horas la muestra pasa la prueba. Si uno o más ratones muere dentro de las 48 horas, repetir la prueba usando 10 ratones con peso de 20 g (\pm 0.5 g) cada uno; la muestra pasa la prueba si el número total de animales muertos dentro de las 48 horas no es mayor del 10 por ciento del número total de animales probados, incluyendo la prueba original.

5.13

PRUEBA DE ESTERILIDAD

5.13.1 Aparatos y equipo

Equipo de filtros membrana para la prueba de esterilidad de 3 o 6 unidades

Membranas filtrantes de 0.45 ± 0.02 micras

Campana de flujo laminar

Autoclave

Potenciómetro

Tubos para cultivo con tapa

Cortadores y pinzas para membranas

Equipo común de laboratorio

5.13.2 Materiales y reactivos

Peptona (BBL 11919; Difco 0118-01-8)

Solución de peptona estéril, (disolver 1.0 g de peptona en suficiente agua destilada, añadir 1.0 ml de p-tert-ostilfenoxi polietoxietanol y aforar con agua a 1.0 l, esterilizar en autoclave a 121°C por un mínimo de 20 min, después de la esterilización ajustar el pH de 7.0 a 7.2, si es necesario, con solución 2.0 N de ácido clorhídrico o solución 2.0 N de hidróxido de sodio)

Medio de soya y digerido de caseína (BBL 11768; Difco 0370-01-1)

Agar micológico (BBL 11445, Difco 0405-01-0)

Agar soya tripticasa (BBL 1104; Difco 0369)

5.13.3 Procedimiento

Armar un equipo de filtración de 3 ó 6 unidades con sus filtros de membrana y filtros hidrofóbicos según instrucciones del fabricante y prepararlo para su esterilización.

Esterilizar en autoclave todo el equipo a 121°C de - 20 a no más de 45 min. EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA SON

CRITICOS. Los filtros membrana pueden ser esterilizados aparte pero da mejor resultado y menos riesgo de contaminación si se esterilizan ya en la unidad.

Los cortadores y pinzas pueden ser esterilizados en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h.

Preparar y limpiar la campana de flujo laminar y en condiciones asépticas pasar todo el material que se va a utilizar para la prueba, conectar la campana 10 a 15 min antes de empezar a trabajar.

Tomar una muestra asépticamente de 6 g de producto, -- que debe de contener de todos y cada uno de los recipientes que forman el lote, vaciar a un matraz erlenmeyer de 500 ml que contenga 200 ml de solución de -- peptona esterilizada y a temperatura ambiente disolver la muestra agitando hasta disolución total.

Empazar a filtrar asépticamente usando un filtro como testigo. Si la filtración se dificulta o es muy tardada se debe disolver la muestra en 400 ml de solución de peptona o usar 3 g de muestra.

Lavar el filtro con tres porciones de 100 ml, cada una de solución de peptona estéril.

Tomar la membrana con una de las pinzas y colocarla en el cortador, cortar la parte central, en un círculo de 17.5 mm de diámetro, transferir la parte central de la membrana cortada dentro de un tubo que contenga medio flúido de tioglicolato, colocar la parte exterior dentro de un tubo que contenga medio de soya y digerido de caseína. Repetir esto con el testigo.

Durante la prueba exponer una caja Petri con agar micológico y otra con agar soya tripticasa, incubar durante un período de 4 días y observar su crecimiento para tener la seguridad de que el área donde se efec-

tuó la prueba fué una área estéril.

Incubar los tubos con medio flúido de tioglicolato -- por 7 días a $30 - 32^{\circ}\text{C}$ (medio para bacterias) y los tubos con medio de soya y digerido de caseína a $22 - 25^{\circ}\text{C}$ por 7 días (medio para hongos)

5.13.4 Interpretación de resultados

Se dice que el lote o muestra pasa la prueba si después de 7 días de incubación en ningún tubo aparece crecimiento.

Si se observa crecimiento, deberá repetirse la prueba con el doble de muestra y si el crecimiento es en un solo medio, colocar la membrana en ese medio.

Si en los dos ensayos hay crecimiento la muestra no pasa la prueba.

5.14 PRUEBA DE PIROGENOS

5.14.1 Aparatos y equipo

Termómetro clínico

Jeringas y agujas libres de pirógenos (esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h)

5.14.2 Materiales y reactivos

Conejos sanos y adultos, con peso no menor de 1800 g cada uno de los cuales, por lo menos una semana antes de la prueba debe ser mantenido en su peso con una dieta libre de antibióticos.

Area de alojamiento de temperatura de $23 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$, - humedad relativa de 50 ± 10 por ciento y libre de perturbaciones que facilmente los puedan excitar. Mantener a los conejos, en esta área en forma individual-

Un animal que no se ha usado anteriormente en la prueba, permanecerá dos semanas antes de la misma, bajo las condiciones especificadas anteriormente. Simular una prueba, 1 a 3 días antes de la determinación bajo las condiciones especificadas en el procedimiento omitiendo la inyección. Si el animal no pasa satisfactoriamente esta prueba, probarlo nuevamente dos veces con un lapso de dos días de descanso entre cada una. Si no pasa la tercera prueba desechar al animal.

Usar los animales cada 48 horas o cada dos semanas si la prueba anterior fué calificada como pirógena.

Agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a 121°C por un mínimo de 20 min.

5.14.3 Procedimiento

Realizar la prueba en una área donde los animales estén alojados en las condiciones ambientales mencionadas. El día de la prueba suspender todo el alimento a los animales que van a ser usados hasta después de terminada, excepto la administración de agua.

Determinar la temperatura control para animal, 40 minutos antes de iniciar la prueba, por la inserción del termómetro en el recto del animal de prueba a una profundidad de no menos de 7.5 cm manteniéndolo el tiempo suficiente para alcanzar la temperatura. Usar solo aquellos animales cuya temperatura control no se desvía más de 1.0°C de cada una de las otras lecturas y no se use ningún animal con una temperatura que exceda de 39.8°C .

La temperatura control registrada para cada conejo constituye la temperatura a partir de la cual se calcula cualquier elevación subsecuente a la inyección -

del material de prueba.

Preparar una solución con agua destilada estéril libre de pirógenos de concentración de 5 mg de rolitetraciclina por ml (transferir 50 mg de rolitetraciclina, exactamente pesados, a un matraz aforado de 10 ml disolver y aforar con agua destilada estéril libre de pirógenos), 30 min después de haber tomado la temperatura control inyectar 1.0 ml de la solución anterior por kg de peso corporal, la inyección deberá hacerse en un lapso de 1 min, por la vena marginal de la oreja de cada uno de los tres conejos habiendo calentado previamente la solución a inyectar a 37 °C, llevar un registro de las temperaturas a 1, 2 y 3 h después de la inyección.

5.14.4 Interpretación de resultados

Si los conejos no muestran un incremento individual de temperatura, de su respectiva temperatura control, de 0.6 °C o más y si la suma de los tres incrementos de temperatura no excede de 1.4 °C la muestra pasa la prueba.

Si uno o dos conejos muestran una elevación de temperatura de 0.6 °C o más, o si la suma de los incrementos de temperatura excede de 1.4 °C, repetir la prueba usando 5 conejos, si no más de tres de los ocho conejos muestran incrementos individuales de temperatura de 0.6 °C o más y si la suma de los incrementos no excede de 3.7 °C, la muestra pasa la prueba.

5.15 PRUEBA DE SUSTANCIAS HISTAMINOSIMILES

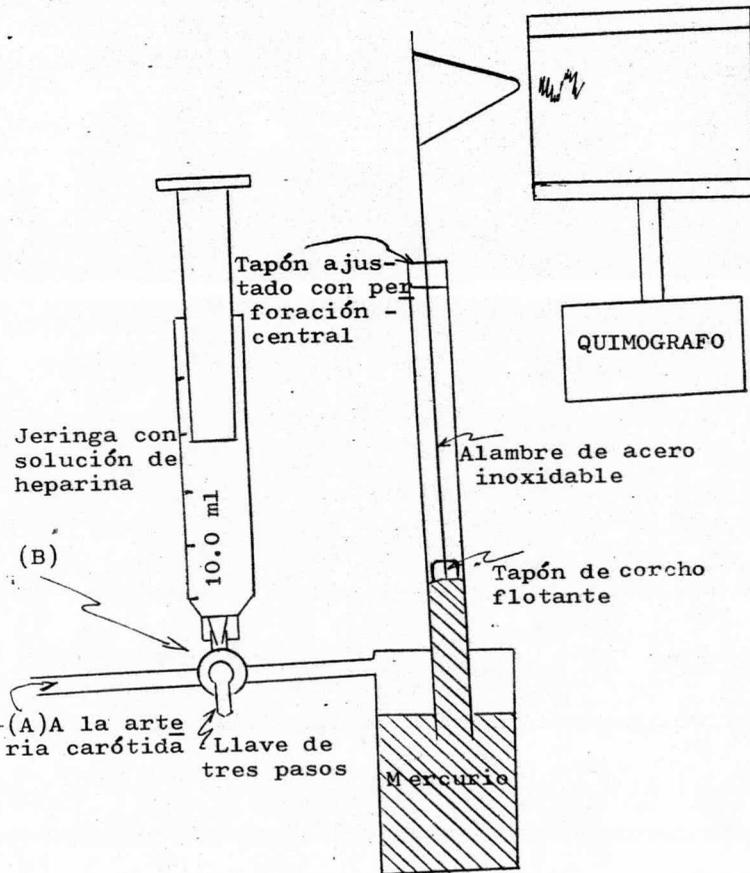
5.15.1 Aparatos y equipo Quimógrafo

Jeringas y agujas para tuberculina estériles, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Jeringa de 10 ml y aguja del No. 22, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Equipo de disección estéril, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Manómetro de mercurio adecuado para medir la presión sanguínea, se sugiere el siguiente:



5.15.2 Materiales y reactivos

Un gato sano, macho o hembra no preñada, que no pese menos de 2.5 kg y que se ha mantenido una semana antes en una área de alojamiento de características iguales a las que se especifican en el punto 5.14.2.

Agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Solución fisiológica estéril (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min).

Sustancia de referencia de diclorhidrato de histamina Anestésico de acción media o prolongada, que no afecte la estabilidad de la presión sanguínea (fenobarbital sódico, pentobarbital sódico o nembutal).

Solución de heparina (disolver 100 mg de heparina sódica en 1 litro de solución fisiológica estéril, concentración estimada de 100 mcg de heparina sódica por ml).

Solución de referencia de histamina: pesar exactamente una cantidad aproximada a 165.6 mg de diclorhidrato de histamina de referencia (equivalente a 100 mg de histamina base), transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril (concentración estimada de 1 mg de histamina base por ml), transferir alícuotas de 0.5 ml de la solución anterior a ampolletas de vidrio, sellar las ampolletas y conservarlas bajo refrigeración hasta su uso. Para hacer una solución primaria diluir una alícuota de 0.5 ml en un matraz aforado de 50 ml con agua destilada estéril (concentración estimada de 10 mcg de histamina base por ml), esta solución primaria puede ser -

conservada bajo refrigeración por un mes. El día de la prueba preparar a partir de la solución primaria una solución primaria que contenga 1.0 mcg de histamina base por ml, haciendo una dilución de 1:10 con agua destilada estéril.

5.15.5 Preparación de la muestra

Transferir una cantidad de muestra equivalente a 50 mg de rolitetraciclina a un matraz aforado de 10 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril (concentración estimada de 5 mg de rolitetraciclina por ml).

5.15.5 Procedimiento

Determinar el peso del animal y aplicar anestesia general por medio de una inyección intraperitoneal del anestésico elegido; descubrir quirúrgicamente la arteria carótida separándola completamente de todas las estructuras a su alrededor. Seccionar el nervio vago. Desplazar totalmente el aire del manómetro por solución de heparina, aplicada con una jeringa colocada en la entrada B (ver esquema 5.15.5).

Insertar una cánula en la arteria carótida conectada al manómetro por la entrada A, manteniendo la llave cerrada, para medir directamente y tener un registro constante de la presión sanguínea abrir la llave; si la sangre tiende a coagularse agregar la cantidad necesaria de solución de heparina.

Descubrir quirúrgicamente la vena femoral para facilitar la inyección intravenosa.

Conectar el manómetro al quimógrafo e inspeccionar la amplitud de los trazas del movimiento de oscilación y estabilidad de la presión sanguínea.

Determinar la sensibilidad del animal a la histamina-

por medio de inyecciones en la vena femoral de la solución de referencia de histamina de concentración de 1.0 mcg de histamina base por ml, aplicar las inyecciones a intervalos de tiempo de no menos de 5 min -- cada una, aplicar 0.05, 0.10 y 0.15 mcg de histamina-base por kg de peso corporal, repetir las inyecciones haciendo caso omiso de las primeras series de lecturas hasta que las caídas de presión causadas con dosis de histamina sean equivalentes y relativamente -- uniformes, y la caída de presión sanguínea causada -- con 0.1 mcg de histamina base por kg de peso corporal no sea menor de 20 mm de mercurio. Reemplazar la histamina por la solución muestra de concentración de 5-mg de rolitetraciclina por ml e inyectar 3 mg por kg-de peso corporal en un lapso de 5 min, Si hay baja -- significativa de presión sanguínea, la dosis vuelve -- a repetirse después de alternar con una dosis de --- 0.10 mcg de histamina base por kg de peso corporal. -- Emplear diferentes agujas y jeringas de tuberculina -- para inyectar la solución de histamina y la solución-del antibiótico.

El animal puede ser utilizado hasta que sus respuestas sean razonablemente estables a la histamina.

5.15.5 Interpretación de resultados

El producto pasa la prueba de ausencia de sustancias histaminosímiles si la baja de presión sanguínea obtenida para 3.0 mg de rolitetraciclina por kg de peso corporal no es mayor que la obtenida con 0.10 mcg de histamina por kg de peso corporal .

6. APENDICE

6.1 OBSERVACIONES

Los reactivos grado analítico empleados en los métodos de prueba cumplirán con las especificaciones marcadas por la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.

La **sustancia** de referencia oficial será la aceptada por la Secretaría de Salubridad y Asistencia (S.S.A.)

6.2 BIBLIOGRAFIA

Federal Register, Vol. 39 No. 105, mayo 30, 1974. 446 75a

National Formulary XII, 1970. Pág. 274

The United States Dispensatory, 27th Edition, 1973. - Págs. 1030 y 1151 - 1178

Organización Mundial de la Salud, Publicación Científica No. 158 - febrero, 1968. Animales de Laboratorio Farmacopea Helvética, 6a Edición, 1971, tomo I. Pág - 213

Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, - 4a Edición, 1974. Págs 94 - 96 y 170 - 172

Goodman - Gilman, Bases Farmacológicas de la Terapéutica 4a Edición, 1970, Ed. Interamericana, Págs. 1206 -1210.

6.3 PARTICIPANTES

Fermic, S.A. de C.V.

Química Hoechst de México, S.A.

Laboratorios Fedal, S.A.

Abbott Laboratories México, S.A.

Laboratorios Sanfer, S.A.

ANTEPROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA
 "NITRATO DE N-PIRROLIDIN METIL TETRACICLINA"
 6 NITRATO DE ROLITETRACICLINA"
 DGN-39-4-III-4

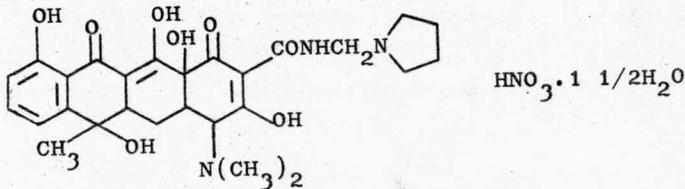
1. GENERALIDADES

Antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclina-
 nas

1.1 DEFINICIONES

Para los efectos de esta norma se entiende por nitra-
 to de rolitetraciclina al producto constituido princi-
 palmente por el compuesto químico $C_{27}H_{33}N_3O_8 \cdot HNO_3 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$
 con peso molecular de 617.64, con nombre químico de-
 nitrato de 4-(Dimetilamino)-1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a
 octahidro-3, 6, 10, 12, 12a-pentahidroxi-6-metil-1, 11-
 dioxo-N-(1-pirrolidinilmetil)-2-naftacenocarboxamida, -
 hidratado o anhidro, inestable al aire y obscurece a la-
 luz, con aspecto de polvo cristalino y libre de mate-
 rias extrañas visibles.

Fórmula desarrollada:



1.2 ALCANCE

La presente norma se aplica al nitrato de rolitetraci-
 clina estéril y no estéril.

1.3 USOS

En la fabricación de medicamentos

2. CLASIFICACION

El producto objeto de esta norma se clasifica en dos-
grados de calidad:

Grado A nitrato de rolitetetraciclina estéril

Grado B nitrato de rolitetetraciclina no estéril

3. ESPECIFICACIONES

3.1 DEL PRODUCTO

El nitrato de rolitetetraciclina en sus dos grados de -
calidad objeto de esta norma debe cumplir con las es-
pecificaciones indicadas en la tabla 1.

TABLA 1

Característica	Nitrato de rolitetetraciclina	
	Especificaciones	
	Grado A estéril	Grado B no estéril
Identificación		
Prueba A	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Prueba B	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Potencia -como- está-	No menos de 805 mcg de rolite-- traciclina por- mg	No menos de 805 mcg de rolite - traciclina por- mg
pH (solución al 1.0 por ciento- p/v)	3.5 a 5.5.	3.5 a 5.5
Cristalinidad	Presenta birre- fringencia a la luz polarizada	Presenta birre- fringencia a la luz polarizada
Agua (Karl --- Fischer)	No más de 5.0 por ciento	No más de 5.0 por ciento
Pérdida por se- cado (a 60 °C y presión reduci- da)	No más de 5.0 por ciento, a - lo más 1.0 por- ciento arriba - de agua por - Karl Fischer.	No mas de 5.0 - por ciento, a - lo más 1.0 por- ciento arriba - de agua por --- Karl Fischer.

TABLA 1 (continúa)

Absorbancia de luz en la región ultravioleta a 380 nm -en base anhidra--	89.2 ± 4.0 por ciento comparada con una sustancia de referencia	89.2 ± 4.0 por ciento comparada con una sustancia de referencia
Cenizas sulfatadas	0.01 a 0.05 por ciento	0.01 a 0.05 por ciento
Metales pesados	No más de 28 - p.p.m.	No más de 28 - p.p.m.
Contenido de nitrato (como está)	9.1 a 11.1 por ciento	9.1 a 11.1 por ciento
Inocuidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Esterilidad	Pasa la prueba	- . -
Pirógenos	Pasa la prueba	- . -
Sustancias histaminosímiles	Pasa la prueba	- . -

3.2 MARCADO

3.2.1 En el envase y empaque

En el exterior del empaque y envase debe aparecer una etiqueta en caracteres legibles y redactados en español los siguientes datos: Símbolo del fabricante, nombre del producto, grado de calidad (estéril, no estéril), peso neto expresado en kilogramos o gramos, número de lote, fecha de fabricación y caducidad, la leyenda "Hecho en México", la leyenda "Conservese el envase bien cerrado en lugar fresco y seco", potencia o equivalente en actividad (en rolitetraciclina base) y otros datos tales como precauciones que deben tenerse en el manejo y uso de los empaques y envases durante su transporte y almacenamiento y el Sello Oficial de Garantía cuando la Secretaría de Industria y Comercio lo juzgue conveniente.

3.3 ENVASADO Y EMPACADO

El producto no estéril, objeto de esta norma, debe estar contenido en envase de vidrio ámbar o cualquier otro material adecuado, protegidos de la luz, envasado y sellado en atmósfera de nitrógeno seco y a su vez estos en cuñetes de capacidad y material adecuados para que resistan su transporte y almacenamiento.

El producto estéril debe estar contenido en recipientes estériles de vidrio ámbar u otro material adecuado, protegidos de la luz, herméticamente cerrados, envasado y sellado en atmósfera de nitrógeno seco; los recipientes deben abrirse en área estéril y bajo condiciones asépticas. Los envases deben estar contenidos en cuñetes de capacidad y material adecuados para que resistan su transporte y almacenamiento.

4. MUESTREO

El muestreo se efectúa de común acuerdo entre fabricante y comprador y a falta de este acuerdo se recomienda seguir el siguiente método.

4.1 METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO A GRANEL GRADO NO ESTERIL

4.1.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas

Muestreador de acero inoxidable pulido, de 1.27 cm de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia; completo de tubo interior de cierre.

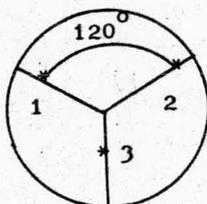
Bolsas de polietileno de color negro

Frascos de vidrio de color ámbar

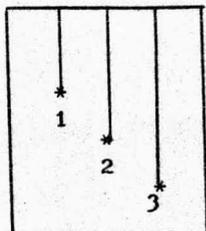
Frascos ampula de color ámbar de 20 ml

4.1.2 Manera de operar

Por medio del muestreador sacar producto de cada cuñete en tres puntos diferentes, dispuestos a $\pm 120^\circ$ -- uno de otro y a tres diferentes alturas según el esquema siguiente:



PLANTA



SECCION

Abrir los cuñetes en una área de humedad relativa ambiental del 20 por ciento y luz controlada. De cada envase tomar aproximadamente 30 g de producto y ponerlos en bolsas de polietileno negro marcadas con el número del cuñete y el número del lote. Sellar los envases desplazando el aire con nitrógeno seco y con un oportuno cierre de garantía.

De cada bolsa de polietileno pesar partes proporcionales al peso neto declarado en la etiqueta del cuñete correspondiente y transferirlas a otra bolsa de polietileno negro, mezclar hasta completa homogeneidad.

Esta muestra oficial se dividirá en dos partes: Una destinada al archivo (cantidad aproximada 100 g) la del archivo en frascos de vidrio de color ámbar y sellada en atmósfera de nitrógeno seco, y otra destinada al análisis.

En caso de que el lote se ponga a prueba de estabilidad se repartirá una tercera porción del producto en frascos ampula de color ámbar de 20 ml (20 frascos -

conteniendo cada uno 1 g de producto). Debidamente rotulados y sellados en atmósfera de nitrógeno seco.

4.2 METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO A GRANEL GRADO ESTERIL

4.2.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Muestreador de acero inoxidable pulido, de 1.27 cm de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia, completo de tubo interior de cierre, esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h

Frascos de vidrio de color ámbar estériles, esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h.

Frascos ampula de color ámbar de 20 ml

Campana de flujo laminar o área estéril

4.2.2 Manera de operar

En la campana de flujo laminar o en el área estéril - realizar el procedimiento indicado en el punto 4.1.2- en forma aséptica.

4.3 CRITERIO DE ACEPTACION

El criterio de aceptación es 100 por ciento

5. METODOS DE PRUEBA

Los reactivos que se mencionen en todas las determinaciones siguientes deben ser grado analítico (ver-- apéndice) a menos que se mencione otra cosa; cuando se indique agua debe entenderse agua destilada y la -

sustancia de referencia será la oficial (ver apéndice)

5.1 PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DE NITRATO DE ROLITETRACICLINA

5.1.1 Prueba A (Identificación de rolitetraciclina)

5.1.1.1 Aparatos y equipo

Equipo común de laboratorio

5.1.1.2 Materiales y reactivos

Solución 1.0 N de hidróxido de sodio

5.1.1.3 Procedimiento

Transferir 100 mg de muestra a un tubo de ensayo y - añadir 5 ml de solución 1.0 N de hidróxido de sodio - calentar lentamente hasta ebullición durante 15 segundos y enfriar a temperatura ambiente.

5.1.1.4 Interpretación de resultados

Al calentar se percibe un marcado olor a pirrolidina y cuando la solución se ha enfriado es cristalina de color rojo vino.

5.1.2 Prueba B (identificación de nitrato)

5.1.2.1 Aparatos y equipo

Equipo común de laboratorio

5.1.2.2 Materiales y reactivos

Acido acético concentrado (36-37 por ciento, p/p)

Solución al 10.0 por ciento p/v de nitrón en solución 1.0 N de ácido acético (nitrón, $C_{20}H_{16}N_4$; 1, 4-difenil-3, 5-endo-anilino-4, 5-dihidro-1,2, 4-triazol).

5.1.2.3 Procedimiento

Transferir 1 g de muestra a un vaso de precipitados - de 250 ml y añadir 100 ml de agua, acidificar con 11 - ml de ácido acético.

Calentar hasta ebullición con agitación constante y añadir 10 ml de la solución de nitrón. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente.

5.1.2.4 Interpretación de resultados

Al dejar enfriar la solución de prueba se forma precipitado denso.

5.2 DETERMINACION DE POTENCIA

5.2.1 Método microbiológico (turbidimétrico)

5.2.1.1 Aparatos y equipo

Fotocolorímetro con filtro para 530 y 580 nm

Horno para esterilizar

Autoclave

Botellas de Roux

Aparato para baño de agua provisto de control termostático.

Tubos de 16 mm X 150 mm (dimensiones exteriores)

Equipo común de laboratorio

5.2.1.2 Materiales y reactivos

Sustancia de referencia de rolitetraciclina (en el momento de usar secar 3 h a 60 °C a una presión no mayor de 5 mm de mercurio)

Cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)

Solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5, estéril, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo-

de 20 min la siguiente solución: (transferir 13.6 g de fosfato monopotásico a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar, ajustar el pH de 4.45 a 4.55- después de la esterilización, si es necesario, con solución 18.0 N de ácido fosfórico o con solución 10.0-N de hidróxido de potasio)

Solución 12.0 por ciento de formaldehído

Medio antibiótico No. I (agar nutritivo para mantener al microorganismo de prueba); esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Peptona -----	6.0 g
Extracto digerido de caseína ----	4.0 g
Extracto de levadura -----	3.0 g
Extracto de carne -----	1.5 g
Dextrosa -----	1.0 g
Agar -----	15.0 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización, pH 6.5 - 6.6

Medio antibiótico No. II (caldo nutritivo); esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Peptona-----	5.0 g
Extracto de levadura -----	1.5 g
Extracto de carne -----	1.5 g
Cloruro de sodio -----	3.5 g
Dextrosa -----	1.0 g
Fosfato dipotásico -----	3.68 g.
Fosfato monopotásico -----	1.32 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización, pH 6.95 - 7.05

Solución salina estéril, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min (transferir 9.0 de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, di-

solver y aforar con agua).

5.2.1.3 Preparación de la solución de referencia
Transferir 100 mg de sustancia de referencia de rolitetraciclina (la cual ha sido secada previamente, durante 3 h a 60 °C y 5 mm de mercurio) a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con metanol (concentración estimada de 1 mg de rolitetraciclina por ml). Guardar esta solución primaria bajo refrigeración en un matraz de vidrio, con tapón esmerilado y desechar la solución después de un día de preparada.

5.2.1.4 Preparación de la solución problema
Transferir a un matraz aforado de 100 ml una cantidad-exactamente pesada de muestra, equivalente a 100 mg de rolitetraciclina, disolver y aforar con alcohol metílico (concentración estimada de 1 mg de rolitetraciclina por ml). Transferir una alícuota de 1.0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml; mezclar y aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 (concentración estimada de 10 mcg de rolitetraciclina por ml). Transferir una alícuota de 25.0 ml a un matraz aforado de 1000 ml, mezclar y aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 (concentración estimada de 0.25 mcg de rolitetraciclina por ml).

5.2.1.5 Preparación del microorganismo de prueba
Cultivar la cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P) en tubos con 10 ml de medio antibiótico No. I inclinado, incubados a 32 - 35 °C durante 24 h. Lavar el desarrollo de un tubo con 3 ml de solución salina estéril. Pasar esta suspensión de microorganismos a una botella de Roux, que contenga 250 ml de medio antibiótico No. I. Extender la suspensión en toda la superfi-

cie del medio con ayuda de perlas de vidrio estériles e incubar por 24 h a 30 - 35 °C, lavar el crecimiento de la superficie del agar con 50 ml de solución salina estéril. Diluir esta suspensión con solución salina estéril de tal manera que de ella se obtenga una transmitancia del 25 por ciento en un fotocolorímetro a 580 nm. Generalmente 1 : 20

Guardada esta suspensión bajo refrigeración, en un matraz de vidrio puede ser empleada antes de una semana. Una vez ajustada la suspensión de microorganismos, -- agregar de 10 a 20 ml de la misma a 1.0 l de medio antibiótico No. II.

5.2.1.6 Preparación de los tubos

Preparar seis series de tres tubos cada una y marcarlos respectivamente como serie 1, 2, 3, 4, 5 y 6

5.2.1.7 Preparación de la curva de referencia

Transferir 1.0 ml de la solución primaria de referencia, preparada como se indica en 5.2.1.3 a un matraz aforado de 1000 ml, aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 (concentración estimada de 1-mcg de rolitetetraciclina por ml), a partir de esta solución preparar las siguientes diluciones usando solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5:

- 16.0 ml a 100 ml (0.160 mcg por ml)
- 20.0 ml a 100 ml (0.200 mcg por ml)
- 25.0 ml a 100 ml (0.250 mcg por ml)
- 31.2 ml a 100 ml (0.312 mcg por ml)
- 39.0 ml a 100 ml (0.390 mcg por ml)

Usar cinco series de tres tubos cada una y proceder como sigue:

Serie 1 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución -

de referencia de 0.160 mcg por ml.

Serie 2 : agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.200 mcg por ml.

Serie 3 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.250 mcg por ml.

Serie 4: Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.312 mcg por ml.

Serie 5 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.390 mcg por ml.

Una vez que se ha agregado la solución de referencia a los tubos añadir 9.0 ml de medio antibiótico No. II inoculado, inmediatamente después colocarlos en un baño de agua a 37 °C por un período de 3 a 4 horas.

Al término de este período sacar los tubos del baño - y agregar a cada uno de ellos 0.5 ml de solución al 12.0 por ciento de formaldehído.

Como paso siguiente, leer las absorbancias de cada uno de los tubos en un fotocolorímetro, a una longitud de onda de 530 nm, emplear como blanco para ajustar el aparato una solución formada por 9.0 ml de medio antibiótico No. II no inoculado más 0.5 ml de solución al 12.0 por ciento de formaldehído y 1.0 ml de solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5.

Sacar el promedio de las absorbancias obtenidas de los tubos de cada serie y graficarlos en papel semilogarítmico de dos ciclos, colocar la concentración del antibiótico en mcg por ml. en las ordenadas (escala logarítmica) y las absorbancias en las abscisas (escala aritmética).

La curva de referencia se traza uniendo los valores máximo y mínimo, calculándolos por medio de las ecua-

ciones siguientes:

$$B = \frac{3a + 2b + c - e}{5} \quad A = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

B = Valor de la absorbancia calculada para la concentración más baja de la curva.

A = Valor de la absorbancia calculada para la concentración más alta de la curva.

a, b, c, d y e = Valores promedio de las absorbancias de las soluciones de referencia de concentración 0.160, 0.200, 0.250, 0.312 y 0.390 mcg por ml respectivamente

5.2.1.8 Procedimiento

A la serie marcada como No. 6 añadir a cada uno de los tubos: 1.0 ml de la solución problema de concentración de 0.250 mcg por ml y 9.0 ml de medio antibiótico No. II inoculado y proceder con ellos de igual forma que con los tubos de las otras cinco series.

Después de la adición del formaldehído a los tubos, leer las absorbancias en un fotocolorímetro a una longitud de onda de 530 nm usando como blanco para ajustar a cero el aparato una solución formada por 9.0 ml de medio antibiótico No. II no inoculado más 0.5 ml de solución al 12.0 por ciento de formaldehído y 1.0 ml de solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5. Sacar el promedio de las absorbancias, leer en la curva la concentración correspondiente al promedio de las absorbancias de los tubos problema. Multiplicar la concentración por el factor de dilución apropiado para obtener el contenido del antibiótico en la muestra.

5.3.1 Aparatos y equipo

Potenciómetro equipado con un electrodo de vidrio sensible a la actividad del ión hidrógeno, y uno de calomel que es el de referencia.

Equipo común de laboratorio

5.3.2 Materiales y reactivos

Solución reguladora 0.2 M de ftalato ácido de pH 3.6: mezclar en un matraz aforado de 200 ml, 50.0 ml exactamente medidos de solución 0.2 M de biftalato de potasio (40.846 g de biftalato de potasio para hacer 1000 ml de solución con agua) y 3.6 ml de solución 0.2 M de ácido clorhídrico valorada, y aforar con agua.

Solución reguladora 0.2 M de ftalato neutralizado de pH 5.6: mezclar en un matraz aforado de 200 ml, 50.0 ml exactamente medidos de solución 0.2 M de biftalato de potasio (40.846 g de biftalato de potasio para hacer 1000 ml de solución con agua destilada) y 38.8 ml de solución 0.2 M de hidróxido de sodio valorada, y aforar con agua.

5.3.3 Procedimiento

Transferir 500 mg de muestra, exactamente pesados, a un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con agua.

Realizar las determinaciones de pH de las soluciones a una temperatura de 25 ± 2.0 °C.

Calibrar el potenciómetro, ajustándolo con las soluciones reguladoras de pH de 3.6 y 5.6, como paso siguiente medir el pH de la solución problema dos o más veces hasta que no haya variación.

Entre cada determinación tener la precaución de lavar los electrodos con la solución a la que se le va a de terminar el pH y desechar los lavados.

5.4 PRUEBA DE CRISTALINIDAD

5.4.1 Aparatos y equipo

Microscopio con luz polarizada (con objeto de obtener luz polarizada se puede emplear un filtro polaroid entre la platina y el condensador)

5.4.2 Materiales y reactivos

Aceite mineral

5.4.3 Procedimiento

Mezclar en un porta-objetos una pequeña cantidad de muestra (aproximadamente 2 mg) con una o dos gotas de aceite mineral. Cubrir el porta-objetos y observar al microscopio con luz polarizada

5.4.4 Interpretación de los resultados

Los cristales de nitrato de rolitetraciclina, muestran partículas en las cuales se observa el fenómeno de birrefringencia y posiciones de extinción por movimiento circular del porta-objetos.

5.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AGUA-METODO DE KARL FISCHER

5.5.1 Aparatos y equipo

Aparato que permita la apropiada exclusión de la humedad atmosférica y la determinación del punto final. - Comprende por lo general un sistema cerrado, constudo por buretas automáticas y un vaso de titulación con -

Cubierta hermética , provisto de dos electrodos de plata y de un agitador magnético.

5.5.2 Materiales y reactivos

Reactivo de Karl Fischer (a una solución que contenga 670 ml de metanol y 170 ml de piridina, agregar 125 g de yodo y enfriar. En una probeta graduada de 250 ml-transferir 100 ml de piridina y mantenerla en baño de hielo, burbujear dióxido de azufre seco hasta que el volumen llegue a 200 ml. Lentamente y agitando se --- agrega esta solución a la mezcla de yodo enfriada. -- Agitar bien para disolver el yodo, pasar la solución al frasco del aparato y dejar en reposo durante la noche anterior a la valoración. 1 ml de esta solución-recientemente preparada equivale aproximadamente a 5-mg de agua, pero se descompone gradualmente; por tanto debe valorarse 1 h antes de usarla o diariamente - si está en uso continuo; se protege de la luz. Guardar el resto del reactivo preparado en un reci- -- piente color ámbar con tapón de vidrio protegido de - la luz y bajo refrigeración. También se puede emplear una solución estabilizada del reactivo disponible co--mercialmente).

Tartrato de sodio

Metanol

5.5.3 Normalización del reactivo de Karl Fischer

Colocar 36 ml de metanol en el vaso de titulación y - añadir suficiente reactivo de Karl Fischer para obtener el punto final característico. Añadir rápidamente de 150 a 350 mg de tartrato de sodio, pesados con -- exactitud y titular hasta el punto final. Por la fórmula siguiente se obtiene el factor de equivalencia - del agua, expresado en mg de agua por ml de reactivo.

$$F = \frac{0.1566 \times P}{V}$$

Donde:

F = Factor de equivalencia del agua expresado en mg - de agua por ml de reactivo.

P = Peso del tartrato de sodio expresado en mg

V = Volumen del reactivo de Karl Fischer

5.5.4 Procedimiento

Añadir 25 ml de metanol al vaso de titulación y titular con reactivo de Karl Fischer hasta llegar al punto final sin tomar en cuenta el volumen consumido, ya que este no interviene en los cálculos.

Pesar exactamente alrededor de 300 mg de muestra y -- transferir rápidamente al vaso de titulación.

Agitar bien y titular de nuevo con reactivo de Karl - Fischer hasta obtener el punto final.

5.5.5 Cálculos

Determinar el por ciento de agua en la muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$P.C.A. = \frac{V \times F \times 100}{P}$$

Donde:

P.C.A. = Por ciento de agua en la muestra

V = Volumen del reactivo empleado

F = Factor de equivalencia del agua

P = Peso de la muestra expresado en mg

5.6 DETERMINACION DE PERDIDA AL SECADO

5.6.1 Aparatos y equipo

Estufa de vacío

Desecador con pentóxido de fósforo o sílica gel

Equipo común de laboratorio

5.6.2 Materiales y reactivos

Agente deshidratante (ácido sulfúrico concentrado 95-98 por ciento p/p; o sílica gel)

5.6.3 Procedimiento

En una atmósfera cercana al 10 por ciento de humedad relativa, transferir 100 mg de muestra de polvo finamente dividido a un pesafiltros tarado y a peso constante (previamente desecado durante 30 min a 60 °C a un vacío no mayor de 5 mm de mercurio, sobre pentóxido de fósforo), pesar el pesafiltros con muestra y colocarlo destapado en una estufa de vacío con termómetro a una presión de 5 mm de mercurio y temperatura de 60 °C por lo menos 3 horas. Al final de este período de desecación, llenar con aire seco la estufa (haciendo pasar el aire por un agente deshidratante como ácido sulfúrico concentrado 95 -98 por ciento -- p/p o sílica gel), tapar y transferir el pesafiltros a un desecador con pentóxido de fósforo o sílica gel - dejar enfriar a temperatura ambiente y volver a pesar

5.6.4 Cálculos

Determinar la pérdida al secado, expresada en por ciento, de la muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$P.S. = \frac{(P_m - P_d) \times 100}{P_m \times P_a}$$

Donde:

P.S. = pérdida al secado de la muestra expresada en por ciento

P_m = Peso del pesafiltros con muestra

Pd = Peso del pesafiltros después del secado

Pa = Peso del pesafiltros vacío

5.7 DETERMINACION DE ABSORCION DE LUZ EN LA
REGION ULTRAVIOLETA A 380 nm

5.7.1 Aparatos y equipo

Espectrofotómetro

Equipo común de laboratorio

5.7.2 Materiales y reactivos

Solución 5.0 N de hidróxido de sodio

Solución 0.25 N de hidróxido de sodio

Sustancia de referencia de rolitetraciclina

5.7.3 Procedimiento

Transferir 40 mg de muestra exactamente pesados a un matraz aforado de 250 ml, disolver y aforar con agua, transferir una alícuota de 10.0 ml a un matraz aforado de 100 ml, agregar 75 ml de agua y 5.0 ml de solución 5.0 N de hidróxido de sodio, aforar con agua y mezclar, leer la absorbancia de la solución exactamente ----- : 6 min después de haber agregado el hidróxido de sodio, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 380 nm empleando como blanco para -- ajustar el aparato, solución 0.25 N de hidróxido de -- sodio.

Proceder al mismo tiempo y en la misma forma con una sustancia de referencia.

5.7.4 Cálculos

Determinar el porcentaje de absorbancia de la muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$P.A. = \frac{A_m \times P_s \times F \times 10}{A_s \times P_m \times (100 - h)}$$

Donde:

P.A. = Porcentaje de absorbancia de la muestra, comparada con una sustancia de referencia

A_m = Absorbancia de la muestra

P_s = Peso de la sustancia de referencia expresada en mg

F = Potencia de la sustancia de referencia expresada en mcg por mg

A_s = Absorbancia de la sustancia de referencia

P_m = Peso de la muestra expresada en mg

h = Porcentaje de agua en la muestra

5.8 DETERMINACION DE CENIZAS SULFATADAS

5.8.1 Aparatos y equipo

Mufla

Equipo común de laboratorio

5.8.2 Materiales y reactivos

Acido sulfúrico concentrado (95 - 98 por ciento p/p)

5.8.3 Procedimiento

Transferir 500 mg de muestra, exactamente pesados, a un crisol de porcelana, previamente tarado y a peso constante, incinerar con flama de mechero paulatinamente hasta que la sustancia se carbonice totalmente enfriar y agregar tres gotas de ácido sulfúrico, calentar nuevamente de igual forma hasta que no haya despredimiento de vapores blancos e incinerar en la mufla a temperatura de 800 ± 25 °C hasta peso constante y pesar. Guardar el residuo para la determinación de-

metales pesados.

5.8.4 Cálculos

Determinar el porcentaje de cenizas sulfatadas en la muestra por medio de la siguiente ecuación:

$$P.C. = \frac{(Pd - Pc) \times 100}{Pm - Pc}$$

Donde:

P.C. = Por ciento de cenizas sulfatadas en la muestra

Pd = Peso del crisol después de la calcinación

Pc = Peso del crisol vacío (a peso constante)

Pm = Peso del crisol con muestra antes de la calcinación

5.9 PRUEBA DEL CONTENIDO DE METALES PESADOS

5.9.1 Aparatos y equipo

Equipo común de laboratorio

5.9.2 Materiales y reactivos

Solución reguladora de acetatos de pH 3.5 (transferir 25.0 g de acetato de amonio a un matraz aforado de 100 ml, disolver con 45 ml de solución 6.0 N de ácido clorhídrico, mezclar y aforar con agua)

Solución de referencia de plomo (transferir 160 mg de nitrato de plomo, exactamente pesados a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con agua destilada recientemente hervida y enfriada. Concentración es timada de 1 mg de plomo por ml).

Solución diluida de referencia de plomo (transferir 1.0 ml de la solución de referencia de plomo a un matraz aforado de 100 ml, aforar con agua destilada re--

recientemente hervida y enfriada. Concentración estimada de 10 mcg de plomo por ml), preparar esta solución el día de la prueba.

Solución al 4.0 por ciento de tioacetamida

Mezcla de hidróxido de sodio - glicerina (mezclar - 15.0 ml de solución 0.1 N de hidróxido de sodio con - 5.0 ml de agua destilada y 20.0 ml de glicerina), -- Preparar la mezcla en el momento de hacer la prueba.

Reactivo de tioacetamida (mezclar 0.6 ml de solución al 4.0 por ciento de tioacetamida con 3.0 ml de mezcla de hidróxido de sodio-glicerina, calentar en baño de vapor por 20 segundos), preparar el reactivo - en el momento de hacer la prueba.

Acido nítrico concentrado (69 -71 por ciento p/p)

Solución 6.0 N de ácido acético.

5.9.3 Procedimiento

Agregar al residuo de la prueba de cenizas sulfatadas 0.3 ml de ácido nítrico y llevar a sequedad con flama de mechero, disolver el residuo con 0.25 ml de solución 6.0 N de ácido acético y 4.0 ml de agua, completar el volumen de la solución a exactamente 15.0 ml, con agua .

Preparar dos tubos - uno con la solución muestra y - otro con solución comparadora - de la siguiente manera:

Tubo No. I: Transferir 12.0 ml de la solución problema,

Tubo No. II: Transferir 2.0 ml de la solución problema, 9.0 ml de agua y 1.0 ml de solución diluida de referencia de plomo.

A ambos tubos agregar 2.0 ml de la solución reguladora de acetatos y 1.2 ml de la solución reactivo de --tioacetamida, agitar inmediatamente. Después de 2 min observar las soluciones.

5.9.4 Interpretación de resultados

La muestra pasa la prueba de metales pesados si el tubo que contiene la solución problema no es más obscura que la solución comparadora.

5.10 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE NITRATO

5.10.1 Aparatos y equipo

Columna cromatográfica (altura : 35 cm, diámetro : 1.2 - 1.5 cm).

Equipo común de laboratorio

5.10.2 Materiales y reactivos

Solución 0.1 N de hidróxido de sodio valorada

Resina intercambiadora de cationes I (fuertemente ácida) de Merck.

Solución alcohólica al 0.1 por ciento de rojo de metilo

Solución alcohólica al 0.05 por ciento de azul de metileno.

Mezcla alcohólica de rojo de metilo y azul de metileno (mezclar cantidades iguales de las soluciones alcohólicas de rojo de metilo y azul de metileno).

Solución 2.0 N de ácido clorhídrico.

5.10.3 Procedimiento

Preparar la columna cromatográfica de la siguiente manera: agregar suficiente agua a la resina y empaquetarla en la columna cromatográfica, evitando la forma

ción de huecos de aire y ejuagar varias veces antes de usarla.

Disolver 500 mg, exactamente pesados, de muestra en 20 ml de agua. Pasar esta solución a través de la columna cromatográfica, si la solución que escurre de la columna estuviera aún amarilla, se vuelve a pasar por la columna.

Finalmente lavar la columna cromatográfica con 25 ml de agua los que se colectan junto con la solución --- muestra. Provar las últimas gotas de lavado las cuales deben dar reacción neutra, en caso contrario seguir lavando.

Titular el eluato con solución 0.1 N de hidróxido de sodio y como indicador la mezcla de solución de rojo de metilo y azul de metileno. El punto final de la titulación estará dado por el cambio de color de la solución de violeta a verde.

Para la activación, así como para la regeneración de la resina, pasar 50 ml de solución 2.0 N de ácido --- clorhídrico y lavar con agua destilada hasta reacción neutra. La columna debe estar siempre cubierta de solución

5.10.4 Cálculos

Determinar el por ciento de nitrato en la muestra por medio de la ecuación siguiente:

$$P.C.N. = \frac{V \times F \times 6.3016 \times 100}{P_m}$$

Donde:

P.C.N. = Por ciento de nitrato en la muestra

V = Volumen empleado de solución 0.1 N de hidróxido de sodio

$F =$ Cociente de normalidad real entre la normalidad teórica (0.1 N)

6.3016 = mg de ácido nítrico equivalente a 1.0 ml - de solución 0.1 N de hidróxido de sodio

$P_m =$ Peso de la muestra expresado en mg

5.11 PRUEBA DE INOCUIDAD

5.11.1 Aparatos y equipo

Agujas y geringas de tuberculina, esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h

Equipo común de laboratorio

5.11.2 Materiales y reactivos

Ratones blancos de 18 a 25 g no usados antes en otra prueba similar.

Agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a -- 121 °C por un mínimo de 20 min.

5.11.3 Procedimiento

Inyectar intravenosamente a 5 ratones 0.5 ml de solución muestra de concentración de 2 mg por ml (transferir 100 mg de muestra a un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril), la inyección deberá hacerse a una velocidad de 0.05 ml por segundo, observar a los ratones por un período de 48 horas.

5.11.4 Interpretación de resultados

Si ningún animal muere en el período de observación de 48 h la muestra pasa la prueba. Si uno o más ratones muere dentro de las 48 horas, repetir la prueba-

usando 10 ratones con peso de 20 g (± 0.5 g) cada uno; la muestra pasa la prueba si el total de animales muertos dentro de las 48 h no es mayor del 10 por ciento, del número total de animales probados, incluyendo la prueba original.

5.12 PRUEBA DE ESTERILIDAD

5.12.1 Aparatos y equipo

Equipo de filtros membrana para la prueba de esterilidad de 3 ó 6 unidades.

Campana de flujo laminar

Membranas filtrantes de 0.45 ± 0.02 micras

Autoclave

Potenciómetro

Tubos para cultivo con tapa

Cortadores y pinzas para membrana

Equipo común de laboratorio

5.12.2 Materiales y reactivos

Peptona (BBL 11919; Difco 0118-01-8)

Solución de peptona estéril, (disolver y aforar 1.0 g de peptona en suficiente agua destilada, añadir 1.0 ml de p-tert-octilfenoxipolietoxietanol y aforar con agua destilada a 1.0 l, esterilizar en autoclave a 121°C por un mínimo de 20 min, después de esterilizar ajustar el pH de 7.0 a 7.2, si es necesario, con solución 2.0 N de ácido clorhídrico o solución 2.0 N de hidróxido de sodio)

Medio de soya y digerido de caseína (BBL - 11768; Difco 0370-01-1)

Agar micológico (BBL 11445; Difco 0405-01-0)

Agar soya tripticasa (BBL 1104; Difco 0369)

5.12.3 Procedimiento

Armar un equipo de filtración de 3 ó 6 unidades con sus filtros de membrana y filtros hidrofóbicos según instrucciones del fabricante y prepararlo para su esterilización.

Esterilizar en autoclave todo el equipo a 121 °C de 20 a no más de 45 min. EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA SON CRITICOS. Los filtros membrana pueden ser esterilizados aparte pero da mejor resultado y menos riesgo de contaminación si se esterilizan ya en la unidad.

Los cortadores y pinzas deben ser esterilizados en calor seco a 250 °C por un mínimo de una hora.

Preparar y limpiar la campana de flujo laminar y en condiciones asépticas pasar todo el material que se va a utilizar para la prueba, conectar la campana 10 a 15 min antes de empezar a trabajar.

Tomar una muestra asépticamente de 6 g que debe contener de todos y cada uno de los recipientes que forman el lote, vaciar a un matraz erlenmeyer de 500 ml que contenga 200 ml de solución de peptona esterilizada y a temperatura ambiente disolver la muestra agitando hasta disolución total.

Empezar a filtrar asépticamente usando un filtro como testigo. Si la filtración se dificulta o es muy tardada se debe disolver la muestra en 400 ml de solución de peptona o usar 3 g de muestra.

Lavar el filtro con tres porciones de 100 ml cada una de solución de peptona estéril.

Tomar la membrana con una de las pinzas y colocarla en el cortador, cortar la parte central, en un círculo de 17.5 mm de diámetro, transferir la parte central de la membrana cortada dentro de un tubo que contenga medio líquido de tioglicolato, colocar la parte exterior dentro de un tubo que contenga medio de soya y digerido de caseína. Repetir esto con el testigo.

Durante la prueba exponer una caja Petri con agar micológico y otra con agar soya tripticasa, incubar durante un período de cuatro días y observar su crecimiento, para tener la seguridad de que el área donde se efectuó la prueba fué una área estéril

Incubar los tubos con medio líquido de tioglicolato -- por 7 días a 30 - 32 °C (medio para bacterias) y los tubos con medio de soya y digerido de caseína a 22 -- 25 °C por 7 días (medio para hongos).

5.12.4 Interpretación de resultados

Se dice que el lote o muestra pasa la prueba si después de 7 días de incubación en ningún tubo aparece crecimiento.

Si se observa crecimiento, deberá repetirse la prueba con el doble de muestra, si el crecimiento es en un solo medio, colocar la membrana en ese medio.

Si en los dos ensayos hay crecimiento la muestra no pasa la prueba.

5.13 PRUEBA DE PIROGENOS

5.13.1 Aparatos y equipo

Termómetro clínico

Jeringas y agujas libres de pirógenos (esterilizar en

calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h)

5.13.2 Materiales y reactivos

Conejos no albinos sanos y adultos, con peso no menor de 1800 g; cada uno de los cuales, por lo menos una semana antes de la prueba, debe ser mantenido en su peso con una dieta libre de antibióticos.

Area de alojamiento de temperatura de 23 ± 1.5 °C, - humedad realtiva de 50 ± 10 por ciento y libre de perturbaciones que facilmente los puedan excitar.

Mantener los conejos en esta área en forma individual.

Un animal que no se ha usado anteriormente en la prueba permanecerá dos semanas antes de la misma bajo las condiciones anteriores. Simular una prueba uno a tres días antes de la determinación bajo las condiciones especificadas en el procedimiento omitiendo la inyección. Si el animal no pasa satisfactoriamente esta -- prueba, probarlo nuevamente dos veces con un lapso de dos días de descanso entre cada una. Si no pasa la -- tercera prueba desechar al animal.

Usar solo los animales cada 48 horas o cada dos semanas si la prueba anterior fué calificada como prirogénica.

Agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min.

5.13.3 Procedimiento

Realizar la prueba en una área donde los animales - estén alojados en las condiciones ambientales mencionadas. El día de la prueba suspender todo el alimento a los animales que van a ser usados, hasta después de terminada, excepto la administración de agua.

Determinar la temperatura control de cada animal, 40-min antes de iniciar la prueba, por la inserción del termómetro en el recto del animal de prueba a una profundidad de no menos de 7.5 cm manteniéndolo el tiempo suficiente para alcanzar la máxima temperatura. -- Usar solo aquellos animales, cuya temperatura control no se desvíe más de 1.0 °C de cada una de las otras lecturas y no se use ningún animal con una temperatura que exceda de 39.8 °C.

La temperatura control registrada para cada conejo -- constituye la temperatura a partir de la cual se calcula cualquier elevación subsecuente a la inyección del material de prueba. Preparar una solución con agua destilada estéril libre de pirógenos de concentración de 5 mg de rolitetraciclina por ml, (transferir a un matraz aforado de 10 ml una cantidad de muestra -- exactamente pesada, equivalente a 50 mg de rolitetraciclina disolver y aforar con agua destilada estéril libre de pirógenos) 30 min después de haber tomado la temperatura control, inyectar 1.0 ml de la solución anterior por kg de peso corporal, la inyección -- deberá hacerse en un lapso de 1 min por la vena marginal de la oreja de cada uno de los tres conejos habiendo calentado previamente la solución a inyectar a 37 °C, llevar un registro de las temperaturas a 1, 2- y 3 h después de la inyección.

5.13.4 Interpretación de resultados

Si los conejos no muestran un incremento individual de temperatura, de su respectiva temperatura control, de 0.6 °C o más y si la suma de los tres incrementos de temperatura no excede de 1.4 °C la muestra pasa la prueba.

Si uno o dos conejos muestran una elevación de tempe-

ratura de 0.6°C o más, o si la suma de los incrementos de temperatura excede de 1.4°C repetir la prueba usando 5 conejos, si no más de tres de los ocho conejos muestran incrementos individuales de temperatura de 0.6°C o más, y si la suma de los incrementos no excede de 3.7°C , la muestra pasa la prueba.

5.14 PRUEBA DE SUSTANCIAS HISTAMINOSIMILES

5.14.1 Aparatos y equipo

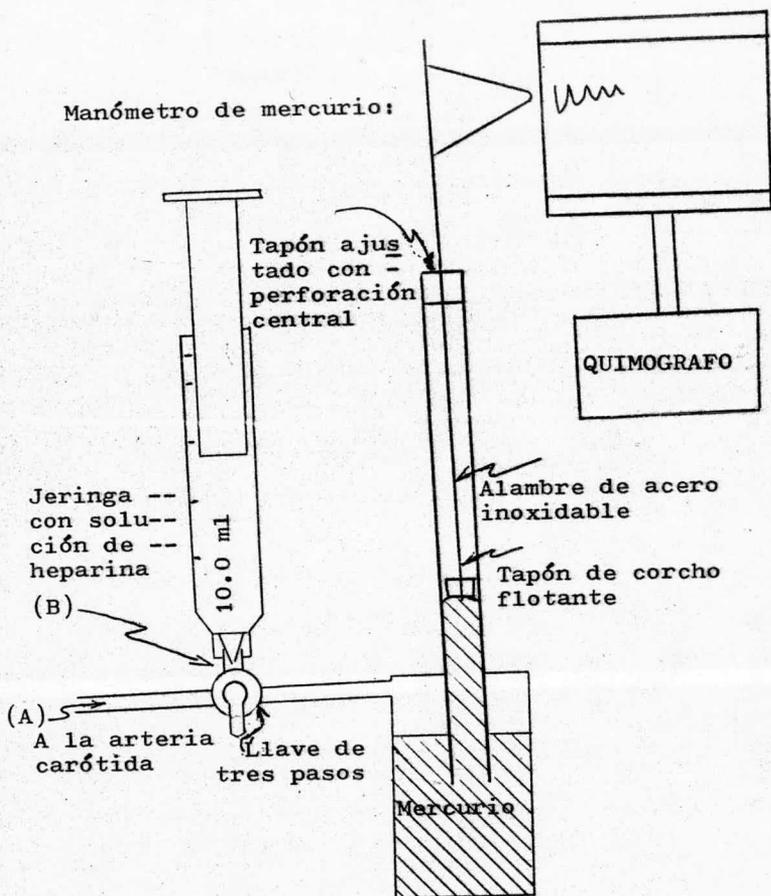
Quimógrafo

Jeringas y agujas para tuberculina, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Jeringa de 10 ml y aguja del No. 22, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Equipo de disección, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Manómetro de mercurio adecuado para medir la presión sanguínea, se sugiere el siguiente:



5.14.2 Materiales y reactivos

Un gato sano, macho o hembra no preñada, que no pese menos de 2.5 kg, y que se ha mantenido cuando menos una semana en un área de alojamiento de características iguales a las que se especifican en el punto ----

5.13.2.

Agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a -- 121 °C por un mínimo de 20 min.

Solución fisiológica estéril, (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua, esterilizar en autoclave -- a 121 °C por un mínimo de 20 min).

Sustancia de referencia de diclorhidrato de histamina Anestésico de acción media o prolongada, que no afecte la estabilidad de la presión sanguínea (fenobarbital sódico, pentobarbital sódico o nembutal)

Solución de heparina (disolver 100 mg de heparina sódica en 1.0 l de solución fisiológica estéril; concentración estimada de 100 mcg de heparina sódica por ml).

Solución de referencia de histamina. Pesar exactamente una cantidad aproximada a 165.6 mg de diclorhidrato de histamina de referencia (equivalente a 100 mg de histamina base), transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril (concentración estimada de 1 mg de histamina base por ml), transferir alícuotas de 0.5 ml de la solución anterior a ampolletas de vidrio, sellar las ampolletas y conservarlas bajo refrigeración hasta su uso. Para hacer una solución primaria diluir una alícuota de 0.5 ml, en un matraz aforado de 50 ml, aforar con agua destilada estéril, (concentración estimada de 10 mcg de histamina base por ml); esta solución primaria puede ser conservada bajo refrigeración por un mes. El día de la prueba preparar a partir de la solución primaria una solución que contenga 1.0 mcg de histamina base por ml, haciendo una dilución de 1 : 10 con agua destilada estéril.

5.14.3 Preparación de la muestra

Transferir a un matraz aforado de 100 ml, una canti--

dad de muestra exactamente pesada, equivalente a 500-mg de rolitetraciclina, disolver y aforar con solución salina estéril (concentración estimada de 5 mg - de rolitetraciclina por ml).

5.14.4 Procedimiento

Determinar el peso del animal y aplicar anestesia general por medio de una inyección intraperitoneal del anestésico elegido. Descubrir quirúrgicamente la arteria carótida separándola completamente de todas las estructuras a su alrededor, seccionar el nervio vago.

Desplazar totalmente el aire del manómetro por solución de heparina, aplicada con una jeringa colocada en la entrada B (ver esquema, 5.14.1).

Insertar una cánula en la arteria carótida conectada al manómetro por la entrada A manteniendo la llave cerrada; para medir directamente y tener un registro constante de la presión sanguínea, abrir la llave; - si la sangre tiende a coagularse, agregar la cantidad necesaria de solución de heparina.

Descubrir quirúrgicamente la vena femoral para facilitar la inyección intravenosa.

Conectar el manómetro al quimógrafo e inspeccionar -- la amplitud de los trazos del movimiento de oscilación y estabilidad relativa de la presión sanguínea.

Determinar la sensibilidad del animal a la histamina por medio de inyecciones en la vena femoral de la solución de referencia de histamina de concentración de 1.0 mcg de histamina base por ml, aplicar las inyecciones a intervalos uniformes de tiempo de no menos de 5 min cada una, aplicar 0.05, 0.10 y 0.15 mcg de histamina base por kg de peso corporal, repetir las -

inyecciones haciendo caso omiso de las primeras series de lecturas hasta que las caídas de presión --- causadas por dosis de histamina sean equivalentes y relativamente uniformes, y la caída de presión sanguínea causada con 0.10 mcg de histamina base por kg de peso corporal no sea menor de 20 mm de mercurio. - Reemplazar la histamina por la solución muestra de - concentración de 5 mg de rolitetraciclina por ml, e- inyectar 3.0 mg por kg de peso corporal en un lapso de 5 min. Si hay baja significativa de la presión san- guínea, la dosis vuelve a repetirse después de alter- nar con una dosis de 0.10 mcg de histamina base por - kg de peso corporal. Emplear diferentes agujas y je- ringas de tuberculina para inyectar la solución de - histamina de referencia y la solución del antibiótico El animal puede ser utilizado hasta que sus respues - tas sean razonablemente estables a la histamina.

5.14.5 Interpretación de resultados

El producto pasa la prueba de ausencia de sustancias histaminosímiles si la baja de presión sanguínea obte- nida para 3.0 mg de rolitetraciclina por kg de peso - corporal no es mayor que la obtenida con 0.10 mcg de histamina base por kg de peso corporal.

6. APENDICE

6.1 OBSERVACIONES

Los reactivos grado analítico empleados en los méto- dos de prueba cumplirán con las especificaciones mar- cadas por la Farmacopea Nacional de los Estados Uni- dos Mexicanos.

La sustancia de referencia oficial será la aceptada-- por la Secretaría de Salubridad y Asistencia (S.S.A.)

6.2 BIBLIOGRAFIA

Federal Register, Vol. 39, 105 - Mayo 30, 1974 -----
446.76a

The Merck Index, 1968; Eighth Edition pág. 922

Deutsches Arznei Buch, 7 Ausgabe 1968 - 51 a

Farmacopea Helvética, 6a. Edición, 1971 Tomo I, pág. -
213

The United States Dispensatory, 27 th Edition, 1973. -
págs. 1151 - 1178

Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, -
4a. Edición, 1974 págs. 94 - 96 y 170 - 172

Goodman - Gilman, Bases Farmacológicas de la terapéuti
ca 4a. Edición, 1970, Ed. Interamericana. págs 1206 -
1210

6.3 PARTICIPANTES

Fermic, S.A. de C.V.

Química Hoechst de México, S.A.

Laboratorios Fedal, S.A.

Abbott Laboratories de México, S.A.

Laboratorios Sanfer, S.A.

ANTEPROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA
 "CITRATO DE N-PIRROLIDIN METIL TETRACICLINA
 6 CITRATO DE ROLITETRACICLINA
 DGN-39-4-III-5

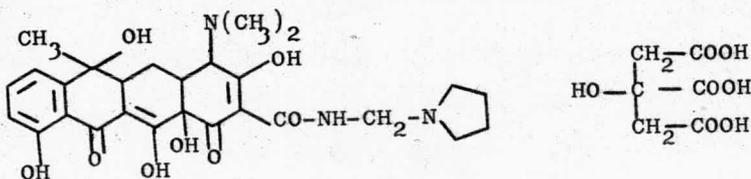
1. GENERALIDADES

Antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclina.

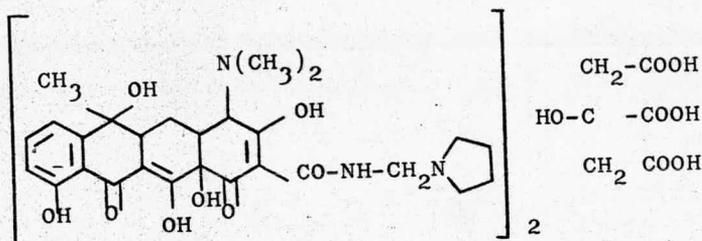
1.1 DEFINICIONES

Para los efectos de esta norma se entiende por citrato de pirrolidín metil tetraciclina el producto constituido principalmente por tres diferentes tipos de compuestos químicos:

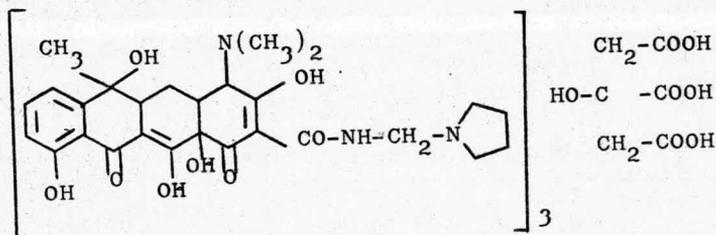
Citrato de monopirrolidin metil tetraciclina, con nombre químico de citrato de mono 4-(Dimetilamino)-1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-octahidro-3, 6, 10, 12, 12a-pentahidroxi-6-metil-1, 11-dioxo-N-(1-pirrolidinilmetil)-2-naftacenecarboxamida, con fórmula condensada de $C_{27}H_{33}N_3O_8 \cdot C_6H_8O_7$ con peso molecular de 719.68, cuya fórmula desarrollada es:



Citrato de dipirrolidin metil tetraciclina, con nombre químico de citrato de di 4-(Dimetilamino)-1, 4, -4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-octahidro-3, 6, 10, 12, 12a-pentahidróxi-6-metil-1; 11-dioxo-N-(1-pirrolidinilmetil)-2-naftacenecarboxamida, con fórmula condensada de $(C_{27}H_{33}N_3O_8)_2 \cdot C_6H_8O_7$ con peso molecular de 1247.24 cu ya fórmula desarrollada es:



Citrato de tripirrolidín metil tetraciclina con nombre químico de citrato de tri 4-(Dimetilamino)-1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-octahidro-3, 6, 10, 12, 12a---pentahidroxi-6-metil-1, 11-dioxo-N-(1-pirrolidinilme til)-2-naftacencarboxamida, con fórmula condensada de $(\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_8)_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ con peso molecular de 1774.80 cuya fórmula desarrollada es:



El producto comercial es la mezcla de estos tres compuestos siendo la relación de salificación igual en los tres casos.

Es un polvo cristalino amarillo claro, inodoro, que es inestable al aire y oscurece a la luz y libre de materias visibles extrañas.

1.1.1 CALCULO TEORICO DEL CONTENIDO DE N-PIRROLIDIN METIL TETRACICLINA EN LA MEZCLA DE CITRATOS

Peso molecular de pirrolidin metil tetraciclina --
---- 527.56

Peso molecular de ácido cítrico anhidro
192.12

Peso molecular del citrato de monopirrolidin metil -
tetraciclina
719.68

Peso molecular de la parte activa (como rolitetra-
ciclina base anhidra)
527.26

Por ciento de rolitetraciclina base anhidra en la mo-
lecule de citrato de monopirrolidin metil tetracicli-
na:

$$719.68 : 527.56 = 100 : X$$

X = 73.3 por ciento

73.3 por ciento es el contenido teórico de rolitetraciclina base anhidra en el citrato de mono_pirrolidin metil tetraciclina. Un valor inferior a este indicaría la presencia de ácido cítrico libre (no salificado) y un valor superior la presencia de base libre.

Peso molecular de citrato de dipirrolidín metil tetra-
ciclina 1247.24

Peso molecular de la parte activa (como rolitetra-
ciclina base anhidra)
1055.12

Por ciento de rolitetraciclina base anhidra en la --
molécula de citrato de dipirrolidín metil tetracicli-
na:

$$1774 : 1582 = 100 : X$$

X = 84.5 por ciento

84.5 por ciento es el contenido teórico de rolitetraciclina base anhidra en el citrato de dipirrolidín - metil tetraciclina. Un valor inferior indicaría la -- presencia de ácido cítrico libre, y un valor superior

indicaría la presencia de base libre.

Peso molecular de tripirrolidin metil tetraciclina-
1774.80

Peso molecular de la parte activa (como rolitetra-
ciclina base anhidra)
1582.68

Por ciento de rolitetraciclina base anhidra en la -
molécula de citrato de tripirrolidin metil tetra-
ciclina:

$$1774,80 : 1582 = 100 : X$$

X = 89.1 por ciento

89.1 por ciento de el contenido teórico de rolitetr-
ciclina base anhidra en el citrato de tripirrolidin -
metil tetraciclina. Un valor inferior indicaría la --
presencia de ácido cítrico libre, y un valor supe ---
rior la presencia de base libre.

Por tanto el límite inferior y superior de contenido-
de rolitetraciclina base anhidra en la mezcla de ci--
tratos son respectivamente 73.3 y 89.1 por ciento

1.2 ALCANCE

La presente norma se aplica al citrato de rolitetra-
ciclina estéril y no estéril.

1.3. USOS

En la fabricación de medicamentos

2. CLASIFICACION

El producto objeto de esta norma se clasifica en dos-
grados de calidad:

Grado A citrato de rolitetraciclina estéril

Grado B citrato de rolitetraciclina no estéril

3. ESPECIFICACIONES

3.1 DEL PRODUCTO

El citrato de rolitetraciclina en sus dos grados de calidad, objeto de esta norma, debe cumplir con las especificaciones indicadas en la tabla 1.

TABLA 1

Característica	Citrato de Rolitetraciclina Especificaciones	
	Grado A estéril	Grado B no estéril
Identificación		
Prueba A	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Prueba B	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Prueba C	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Prueba D	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Color (solución al 0.5 por ciento p/v a 470 nm)	máximo 0.150	máximo 0.180
Potencia -en base anhidra	733 a 891 mcg- de rolitetraci- clina por mg	733 a 891 mcg- de rolitetraci- clina por mg
pH (solución al 1.0 por ciento y 10.0 por ciento p/v)	4.5 a 6.8	4.5 a 6.8
Solubilidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Agua (Karl Fischer)	No más del 4.0 por ciento	No más del 4.0 por ciento
Cristalinidad	Presenta birrefringencia a la luz polarizada	Presenta birrefringencia a la luz polarizada
Absorbancia de luz en la región del ultravioleta a 380 nm -en base anhidra-	de 73.3 a 89.1 por ciento com- parada con una sustancia de re- ferencia	de 73.3 a 89.1 por ciento com- parada con una sustancia de re- ferencia
Inocuidad	Pasa la prueba	Pasa la prueba
Esterilidad	Pasa la prueba	- . -

TABLA 1 (continúa)

Pirógenos	Pasa la prueba	- . -
Sustancias hasta minosímiles	Pasa la prueba	- . -

3.2 MARCADO

3.2.1 En el envase y empaque

En el exterior del empaque y envase, debe aparecer - una etiqueta en caracteres legibles y redactados en español los siguientes datos: Símbolo del fabricante, nombre del producto, grado de calidad (estéril, no estéril), peso neto expresado en kilogramos o gramos, - número de lote, fecha de fabricación y caducidad, la leyenda "Hecho en México", la leyenda "Conservese el envase bien cerrado en lugar fresco y seco", potencia o equivalente en actividad (en rolitetraciclina base) y otros datos tales como precauciones que deben tenerse en el manejo y uso de los empaques y envases -- durante su transporte y almacenamiento y el Sello Oficial de Garantía cuando la Secretaría de Industria y Comercio lo juzgue conveniente.

3.3 ENVASADO Y EMPACADO

El producto no estéril, objeto de esta norma, debe estar contenido en envases de vidrio ámbar o cualquier otro material adecuado, protegido de la luz, envasado y sellado en atmósfera de nitrógeno seco y a su vez - estos en cuñetes de capacidad y material adecuados para que resistan su transporte y almacenamiento.

El producto estéril debe estar contenido en recipientes estériles de vidrio ámbar u otro material adecuado, protegidos de la luz, herméticamente cerrados, envasado y sellado en atmósfera de nitrógeno seco; los recipientes deben abrirse solamente en áreas estéri--

les y bajo condiciones asépticas. Los envases deben estar contenidos en cuñetes de capacidad y material adecuado para que resistan su transporte y almacenamiento.

4. MUESTREO

El muestreo se efectúa de común acuerdo entre fabricante y comprador y a falta de este acuerdo se recomienda seguir el siguiente método.

4.1 METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO A GRANEL GRADO NO ESTERIL

4.1.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas.

Muestreador de acero inoxidable pulido, de 1.27 cm de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia; completo de tubo interior de cierre.

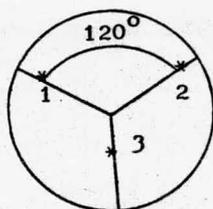
Bolsas de polietileno de color negro

Frascos de vidrio de color ámbar

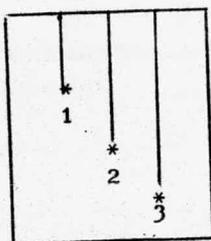
Frascos ampula de color ámbar de 20 ml

4.1.2 Manera de operar

Por medio del muestreador sacar producto de cada cuñete en tres puntos diferentes, dispuestos a $\pm 120^\circ$ uno de otro y a tres diferentes alturas según el esquema siguiente:



PLANTA



SECCION

Abrir los cuñetes en una área de humedad relativa - ambiental menor del 20 por ciento y luz controlada.

De cada envase tomar aproximadamente 30 g de producto y ponerlos en bolsas de polietileno negro, marcadas - con el número del cuñete y el número del lote. Sellar los envases desplazando el aire con nitrógeno seco y con un oportuno cierre de garantía.

De cada bolsa de polietileno pesar partes proporcio- nales al peso neto declarado en la etiqueta del cuñe- te correspondiente y transferirlas a otra bolsa de po- lietileno negro. Mezclar hasta completa homogeneidad.

Esta muestra oficial se dividirá en dos partes : Una- destinada al archivo (cantidad aproximada 100 g), la - del archivo en frascos de vidrio de color ámbar y se- llada en atmósfera de nitrógeno seco y otra destinada al análisis. En caso de que el lote se ponga a prue- ba de estabilidad se repartirá una tercera porción -- del producto en frascos ampula de color ámbar de 20 - ml (20 frascos conteniendo cada uno 1 g de producto)- debidamente rotulados y sellados en atmósfera de ni- trógeno seco.

4.2

METODO DE MUESTREO PARA PRODUCTO TERMINADO
A GRANEL GRADO ESTERIL

4.2.1 Aparatos y equipo

Guantes de hule con superficies exteriores lisas, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 - min.

Muestreador de acero inoxidable pulido, de 1.27 cm de diámetro con ventanas por lo menos de una tercera parte de la circunferencia; completo de tubo interior de cierre, esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h.

Frascos de vidrio de color ámbar, esterilizar en ca-
lor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h.

Frascos ampula de color ámbar de 20 ml.

Campana de flujo laminar o área estéril

4.2.2 Manera de operar

En la campana de flujo laminar o en el área estéril-
realizar el procedimiento indicado en el punto 4.1.2
en forma aséptica.

4.3 CRITERIO DE ACEPTACION

El criterio de aceptación es 100 por ciento.

4.3.1 METODOS DE PRUEBA

Los reactivos que se mencionen en todas las determi-
naciones siguientes deben ser grado analítico, (ver-
apéndice) a menos que se mencione otra cosa, cuando -
se indique agua debe entenderse agua destilada y la -
sustancia de referencia será la oficial (ver apéndice)

5.1 PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DE CITRA TO DE ROLITETRACILINA

5.1.1 Prueba A

5.1.1.1 Aparatos y equipo

Equipo común de laboratorio

5.1.1.2 Materiales y reactivos

Acido sulfúrico concentrado (95 - 98 por ciento, p/p)

Solución 1.0 N de cloruro férrico

5.1.1.3 Procedimiento

Transferir 50 mg de muestra a un tubo de ensayo y --
agregar cinco gotas de ácido sulfúrico, diluir con 3
ml de agua y finalmente agregar 1 ml de solución 1.0-
N de cloruro férrico.

5.1.1.4 Interpretación de resultados

Al agregar el ácido sulfúrico a la muestra aparece co-
lor violeta que al diluirlo con agua cambia a color -
amarillo y finalmente a color café-rojizo con la adi-
ción de la solución de cloruro férrico.

5.1.2 Prueba B

5.1.2.1 Aparatos y equipo

Equipo común de laboratorio

5.1.2.2 Materiales y reactivos

Solución 1.0 N de hidróxido de sodio

5.1.2.3 Procedimiento

Transferir de 20 a 30 mg de muestra a un tubo de en-
sayo, disolver con 3 ml de agua y agregar 0.5 ml de -
solución 1.0 N de hidróxido de sodio, observar la so-
lución y dividir el contenido del tubo en dos partes-

a una agregar 5 ml de agua y a la otra 5 ml de solución 1.0 N de hidróxido de sodio.

5.1.2.4 Interpretación de resultados

Al agregar los 0.5 ml de solución 1.0 N de hidróxido de sodio aparece precipitado de color amarillo, el cual se solubiliza con la adición del agua y de los 5 ml de solución 1.0 N de hidróxido de sodio.

5.1.3 Prueba C

5.1.3.1 Aparatos y equipo
Equipo común de laboratorio

5.1.3.2 Materiales y reactivos

Acido clorhídrico concentrado (35 - 38 por ciento, -- p/p)

5.1.3.3 Procedimiento

Transferir de 20 a 30 mg de muestra a un tubo de ensayo disolver con 3 ml de agua y agregar dos gotas - de ácido clorhídrico concentrado.

5.1.3.4 Interpretación de resultados

Con la adición del ácido clorhídrico a la muestra se produce color amarillo.

5.1.4 Prueba D

5.1.4.1 Aparatos y equipo
Equipo común de laboratorio

5.1.4.2 Materiales y reactivos

Agua oxigenada (110 vol = 30 por ciento, p/p)

5.1.4.3 Procedimiento

Transferir 50 mg de muestra a un tubo de ensayo, ---
agregar agua oxigenada y calentar lentamente sin lle
gar a la ebullición.

5.1.4.4 Interpretación de resultados

Al calentar la solución se produce color rojo-naran-
ja.

5.2 DETERMINACION DE COLOR DE LA SOLUCION

5.2.1 Aparatos y equipo

Espectrofotómetro

Equipo común de laboratorio

5.2.2 Procedimiento

Transferir 500 mg de muestra, exactamente pesados, a
un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con --
agua. Leer la absorbancia de la solución a 470 nm em-
pleando como blanco para ajustar el aparato agua.

5.2.3 Interpretación de resultados

La muestra estéril, no debe dar un valor mayor a ---
0.150. La muestra no estéril, no debe dar un valor -
mayor a 0.180.

5.3 DETERMINACION DE POTENCIA

5.3.1 Método microbiológico (turbidimétrico)

5.3.1.1 Aparatos y equipo

Horno para esterilizar

Autoclave

Aparato para baño de agua provisto de control termos-
tático.

Botella de Roux

Tubos de 16 X 125 mm (dimensiones exteriores)

Fotocolorímetro con filtros para 530 y 580 nm

Equipo común de laboratorio

5.3.2.1 Materiales y reactivos

Sustancia de referencia de rolitetraciclina (en el -
momento de usar secar 3 horas a 60 °C a una presión-
no mayor de 5 mm de mercurio)

Cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)

Solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5, este-
rilar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min
(transferir 13.6 g de fosfato monopotásico a un ma-
traz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua, -
ajustar el pH de 4.45 a 4.55 después de la esteriliza-
ción, si es necesario, con solución 18.0 N de ácido--
fosfórico o con solución 10.0 N de hidróxido de pota-
sio)

Solución al 12.0 por ciento de formaldehído.

Medio antibiótico No. I (agar nutritivo para mantener
al microorganismo de prueba): esterilizar en autocla-
ve a 121 °C por un mínimo de 20 min.

Peptona -----	6.0 g
Extracto digerido de caseína ---	4.0 g
Extracto de levadura -----	3.0 g
Extracto de carne -----	1.5 g
Dextrosa -----	1.0 g
Agar -----	15.0 g
Agua destilada c.b.p. -----	1000.0 ml

después de la esterilización, pH 6.5 - 6.6

Medio antibiótico No. II (caldo nutritivo); esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min

Peptona	-----	5.0 g
Extracto de levadura	-----	1.5 g
Extracto de carne	-----	1.5 g
Cloruro de sodio	-----	3.5 g
Dextrosa	-----	1.0 g
Fosfato dipotásico	-----	3.68 g
Fosfato monopotásico	-----	1.32 g
Agua destilada c.b.p.	-----	1000.0 ml

después de la esterilización, pH 6.95 - 7.05

Solución salina, esterilizar en autoclave a 121 °C -- por un mínimo de 20 min (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua).

5.3.1.3 Preparación de la solución de referencia

Transferir 100 mg de sustancia de referencia de rolitetraciclina (la cual ha sido secada previamente, durante 3 h a 60 °C y 5 mm de mercurio) a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con metanol (concentración estimada de 1 mg de rolitetraciclina por ml). Guardar esta solución primaria bajo refrigeración en un matraz de vidrio, con tapón esmerilado y desechar la solución después de un día de preparado.

5.3.1.4 Preparación de la solución problema

Transferir a un matraz aforado de 100 ml una cantidad exactamente pesada de muestra equivalente a 100 mg de rolitetraciclina, disolver y aforar con alcohol metílico (concentración estimada de 1 mg de rolitetraciclina por ml). Transferir una alícuota de 1.0 ml de -

esta solución a un matraz aforado de 100 ml, mezclar y aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 (concentración estimada de 10 mcg por ml).

Transferir una alícuota de 1000 ml, mezclar y aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 - (concentración estimada de 0.25 mcg de rolitetraciclina por ml).

5.3.1.5 Preparación del microorganismo de prueba
Cultivar la Cepa de Staphylococcus aureus (ATCC 6538P) en tubos con 10 ml de medio antibiótico No. I inclinado incubandolos a 32 - 35 °C durante 24 horas. Lavar el desarrollo de un tubo con 3 ml de solución salina estéril. Pasar esta suspensión de microorganismos a una botella de Roux, que contenga 250 ml de medio antibiótico No. I. Extender la suspensión en toda la superficie del medio con ayuda de perlas de vidrio estériles e incubar por 24 horas a 32 - 35 °C, lavar el crecimiento de la superficie del agar con 50 ml de solución salina estéril. Diluir esta suspensión con solución salina estéril de tal manera que de ella se obtenga una transmitancia del 25 por ciento en un fotocolorímetro a 580 nm. Generalmente 1: 20, guardada esta suspensión bajo refrigeración, en un matraz de vidrio puede ser empleada antes de una semana.

Una vez ajustada la suspensión de microorganismos --- agregar de 10 a 20 ml de la misma a 1.0 litro de medio antibiótico No. II.

5.3.1.6 Preparación de los tubos

Preparar seis series de tres tubos cada una y marcarlos respectivamente como serie 1, 2, 3, 4, 5, y 6

5.3.1.7 Preparación de la curva de referencia

Transferir 1.0 ml de la solución primaria de referencia preparada como se indica en 5.3.1.3 a un matraz aforado de 1000 ml, aforar con solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5 (concentración estimada de 1 mcg de rolitetraciclina por ml), a partir de esta solución, preparar las siguientes diluciones usando solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5.

16.0 ml a 100 ml (0.160 mcg por ml)

20.0 ml a 100 ml (0.200 mcg por ml)

25.0 ml a 100 ml (0.250 mcg por ml)

31.2 ml a 100 ml (0.312 mcg por ml)

39.0 ml a 100 ml (0.390 mcg por ml)

Usar cinco series de tres tubos cada una y proceder como sigue:

Serie 1 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.160 mcg por ml

Serie 2 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.200 mcg por ml

Serie 3 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.250 mcg por ml

Serie 4 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.312 mcg por ml

Serie 5 : Agregar a cada tubo 1.0 ml de la dilución de referencia de 0.390 mcg por ml.

Una vez que se ha agregado la solución de referencia a los tubos añadir 9.0 ml de medio antibiótico No. II inoculado, inmediatamente después colocarlos en un baño de agua a 37 °C por un mínimo de 3 a 4 horas.

Al termino de este período sacar los tubos del baño y agregar a cada uno de ellos 0.5 ml de solución al 12.0 por ciento de formaldehído.

Como paso siguiente leer las absorbancias de cada uno de los tubos en un fotocolorímetro , a una longitud de onda de 530 nm emplear como blanco para ajustar el aparato una solución formada por 9.0 ml de medio anti biótico No.II no inoculado más 0.5 ml de solución al-12.0 por ciento de formaldehído y 1.0 ml de solución- reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5.

Sacar el promedio de las absorbancias obtenidas de los tubos de cada serie y graficarlos en papel semiloga- rítmico de 2 ciclos colocar la concentración del anti biótico en mcg por ml en las ordenadas (escala loga- rítmica) y las absorbancias en las abscisas (escala - aritmética).

La curva de referencia se traza uniendo los valores - máximo y mínimo, calculándolos por medio de las ecua- ciones siguientes:

$$B = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$A = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

B = Valor de la absorbancia calculada para la concen- tración más baja de la curva.

A = Valor de la absorbancia calculada para la concen- tración más alta de la curva

a, b, c, d y e = Valores promedio de las absorbancias de las soluciones de referencia de concentración 0.160 0.200, 0.250, 0.312 y 0.390 mcg por ml respectivamente

5.3.1.8 Procedimiento

A la serie marcada como No. 6 añadir a cada tubo 1.0 ml de la solución problema de concentración de 0.250 mcg por ml y 9.0 ml de medio antibiótico No. II ino- culado y proceder con ellos de igual forma que con --

los tubos de las otras cinco series.

Después de la adición de formaldehído a los tubos, leer las absorbancias en un fotocolorímetro a una longitud de onda de 530 nm usando como blanco para ajustar a cero una solución formada por 9.0 ml de medio antibiótico No. II no inoculado más 0.5 ml de solución al 12.0 por ciento de formaldehído y 1.0 ml de solución reguladora 0.1 M de fosfatos de pH 4.5.

Sacar el promedio de las absorbancias obtenidas. Leer en la curva la concentración correspondiente al promedio de las absorbancias de los tubos problema. Multiplicar la concentración por el factor de dilución apropiado para obtener el contenido del antibiótico en la muestra.

5.4 DETERMINACION DE pH

5.4.1 Aparatos y equipo

Potenciómetro equipado con un electrodo de vidrio, sensible a la actividad del ión hidrógeno, y uno de calomel que es el de referencia.

Equipo común de laboratorio

5.4.2 Materiales y reactivos

Solución reguladora 0.2 de ftalato neutralizado de pH 4.6; mezclar en un matraz aforado de 200 ml, 50.0 ml exactamente medidos de solución 0.2 M de biftalato de potasio (40.846 g de biftalato de potasio para hacer 1000 ml de solución con agua destilada) y 11.1 ml de solución 0.2 M de hidróxido de sodio valorada, y aforar con agua.

Solución reguladora 0.2 M de fosfato de pH 6.6 ; mezclar en un matraz aforado de 200 ml, 50.0 ml exacta--

mente medidos, de solución 0.2 M de fosfato monobásico de potasio (27.218 g de fosfato monobásico de potasio para hacer 1000 ml de solución con agua destilada) y 16.4 ml de solución 0.2 M de hidróxido de sodio valorada, y aforar con agua destilada.

5.4.3 Procedimiento

Transferir 500 mg de muestra, exactamente pesados, a un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con agua.

Transferir 5.0 g muestra, exactamente pesados, a un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con agua.

Realizar las determinaciones de pH de las soluciones a una temperatura de 25 ± 2.0 °C.

Calibrar el potenciómetro ajustándolo con las soluciones reguladoras de pH de 4.6 a 6.6, como paso siguiente medir el pH de las dos soluciones problema (al 1.0 y 10.0 por ciento) dos o más veces hasta que no haya variación.

Entre cada determinación tener la precaución de lavar los electrodos con la solución a la que se va a determinar el pH y desechar los lavados.

5.5 PRUEBA DE SOLUBILIDAD

5.5.1 Aparatos y equipo

Equipo común de laboratorio

5.5.2 Reactivos

Acido ascórbico

5.5.3 Procedimiento

A 700 mg de muestra agregar 500 mg de ácido ascórbico

y 10.0 ml de agua destilada, observar la solución por un período de 6 h a temperatura ambiente.

5.5.4 Interpretación de resultados

Debe producirse una solución completamente límpida y permanecer en esta forma durante el período de observación de 6 h.

5.6 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AGUA-METODO DE KARL FISCHER

5.6.1 Aparatos y equipo

Puede emplearse cualquier aparato que permita la apropiada exclusión de la humedad atmosférica y la determinación del punto final. Comprende por lo general un sistema cerrado, constituido por buretas automáticas y un vaso de titulación con cubierta hermética, provisto de dos electrodos de platino y de un agitador magnético.

Equipo común de laboratorio

5.6.2 Materiales y reactivos

Reactivo de Karl Fischer : (a una solución que contenga 670 ml de metanol y 170 ml de piridina, agregar 125 g de yodo y enfriar. En una probeta graduada de 250 ml transferir 100 ml de piridina y mantenerla en baño de hielo, burbujear dióxido de azufre seco hasta que el volumen llegue a 200 ml. Lentamente y agitando se agrega esta solución a la mezcla de yodo enfriada. Agitar bien para disolver el yodo, pasar la solución al frasco del aparato y dejar en reposo durante la noche anterior a la valoración. Un ml de esta solución recientemente preparada equivale aproximadamente a 5 mg de agua, pero se descompone gradualmente; por-

tanto debe valorarse 1 h antes de usarla o diariamente si esta en uso. Guardar el resto del reactivo preparado en un recipiente color ámbar con tapón de vidrio, protegido de la luz y bajo refrigeración. También se puede emplear una solución disponible comercialmente).

Tartrato de sodio

Metanol.

5.6.3 Normalización del reactivo de Karl Fischer
Colocar aproximadamente 36 ml de metanol en el vaso de titulación y añadir suficiente reactivo de Karl Fischer para obtener el punto final característico. - Añadir rápidamente de 150 a 350 mg de tartrato de sodio pesados con exactitud y titular hasta el punto final. Por la fórmula siguiente se obtiene el factor F de equivalencia del agua, expresado en mg de agua por ml de reactivo.

$$F = \frac{0.1566 \times P}{V}$$

Donde:

F = Factor de equivalencia del agua, expresado en mg de agua por ml de reactivo.

P = Peso del tartrato de sodio expresado en mg

V = Volumen del reactivo de Karl Fischer

5.6.4 Procedimiento

Añadir 25 ml de metanol al vaso de titulación y titular con reactivo de Karl Fischer hasta llegar al punto final, sin tomar en cuenta el volumen consumido - ya que este no interviene en los cálculos.

Pesar exactamente alrededor de 300 mg de muestra y transferir rápidamente al vaso de titulación.

Agitar vigorosamente y titular de nuevo con reactivo de Karl Fischer hasta obtener el punto final.

5.6.5 Cálculos

Determinar el por ciento de agua en la muestra por la siguiente ecuación:

$$P.C.A. = \frac{V \times F \times 100}{P}$$

Donde:

P.C.A. = Por ciento de agua en la muestra

V = Volumen del reactivo empleado

F = Factor de equivalencia del agua

P = Peso de la muestra expresado en mg

5.7 PRUEBA DE CRISTALINIDAD

5.7.1 Aparatos y equipo

Microscopio con luz polarizada (con objeto de obtener luz polarizada se puede emplear un filtro polaroid entre la platina y el condensador)

Equipo común de laboratorio

5.7.2 Materiales y reactivos

Aceite mineral

5.7.3 Procedimiento

Mezclar en un porta objetos una pequeña cantidad de muestra (aproximadamente 2 mg) con una o dos gotas de aceite mineral. Cubrir el porta-objetos y observar al microscopio con luz polarizada.

5.7.4 Interpretación de resultados

Los cristales de citrato de rolitetraciclina muestran partículas en las cuales se observa el fenómeno de --

birrefringencia y posiciones de extinción por movimiento circular del porta-objetos.

5.8 DETERMINACION DE ABSORCION DE LUZ EN LA REGION ULTRAVIOLETA A 380 nm

5.8.1 Aparatos y equipo
Espectrofotómetro

Equipo común de laboratorio

5.8.2 Materiales y reactivos

Solución 5.0 N de hidróxido de sodio

Solución 0.25 N de hidróxido de sodio

Sustancia de referencia de rolitetraciclina

5.8.3 Procedimiento

Transferir 40 mg de muestra exactamente pesados a un matraz aforado de 250 ml, disolver y aforar con agua, transferir una alícuota de 10.0 ml a un matraz aforado de 100 ml, agregar 75 ml de agua y 5.0 ml de solución 5.0 N de hidróxido de sodio, aforar con agua y mezclar, leer la absorbancia de la solución exactamente 6 min después de haber agregado el hidróxido de sodio en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 380 nm, empleando como blanco, para ajustar el aparato, solución 0.25 N de hidróxido de sodio.

Proceder al mismo tiempo y en la misma forma con una sustancia de referencia.

5.8.4 Cálculos

Determinar el porcentaje de absorbancia de la muestra comparada con una sustancia de referencia por medio de la siguiente ecuación:

$$P.A. = \frac{A_m \times P_s \times F \times 10}{A_s \times P_m \times (100 - h)}$$

Donde:

P.A. = Porcentaje de absorbancia de la muestra, comparada con una sustancia de referencia

A_m = Absorbancia de la muestra

P_s = Peso de la sustancia de referencia expresada en mg

F = Potencia de la sustancia de referencia expresada en mcg por mg

A_s = Absorbancia de la sustancia de referencia

P_m = Peso de la muestra expresada en mg

h = Porcentaje de agua de la muestra

5.9 PRUEBA DE INOCUIDAD

5.9.1 Aparatos y equipo

Agujas y jeringas, esterilizar en calor seco a 250 °C por un mínimo de 1 h

Equipo común de laboratorio

5.9.2 Materiales y reactivos

Ratones blancos de 18 a 25 g no usados antes en otra prueba similar

Agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min

5.9.3 Procedimiento

Inyectar intravenosamente a 5 ratones 0.5 ml de solución muestra de concentración de 2 mg por ml (transferir 100 mg de muestra a un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril), la inyección deberá hacerse a una velocidad de 0.05 ml por

segundo, observar a los ratones por un período de --
48 horas.

5.9.4 Interpretación de resultados

Si ningún animal muere en un período de observación de 48 horas la muestra pasa la prueba. Si uno o más ratones mueren dentro de las 48 horas, repetir la prueba usando 10 ratones con peso de 20 g (± 0.5 g) cada uno; la muestra pasa la prueba si el número total de animales muertos dentro de las 48 horas no es mayor del 10 por ciento, del número total de animales probados, incluyendo la prueba original.

5.10 PRUEBA DE ESTERILIDAD

5.10.1 Aparatos y equipo

Equipo de filtros membrana para la prueba de esterilidad de 3 ó 6 unidades

Membranas filtrantes de 0.45 ± 0.02 micras

Campana de flujo laminar

Autoclave

Potenciómetro

Tubos para cultivo con tapa

Cortadores y pinzas para membrana

Equipo común de laboratorio

5.10.2 Materiales y reactivos

Peptona (BBL 11919; Difco 0118-01-8)

Solución de peptona esterilizar en autoclave a 121°C por un mínimo de 20 min (disolver 1.0 g de peptona en suficiente agua, añadir 1.0 ml de p-tert-octilfenoxi-

polietoxietanol y aforar con agua destilada a 1.0 -- litro, después de esterilizar ajustar el pH de 7.0-7.2, si es necesario, con solución 2.0 N de ácido --- clorhídrico o solución 2.0 N de hidróxido de sodio).

Medio de soya y digerido de caseína (BBL 11768; Difco 0370-01-1)

Agar micológico (BBL 1145; Difco 0405-01-0)

Agar soya tripticasa (BBL 1104; Difco 0369)

5.10.3 Procedimiento

Armar un equipo de filtración de 3 ó 6 unidades con sus filtros hidrofópicos según instrucciones del fabricante y prepararlo para su esterilización.

Esterilizar en autoclave todo el equipo a 121 °C de 20 a no más de 45 min, EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA SON CRITICOS. Los filtros membrana pueden ser esterilizados a parte pero da mejor resultado y menos riesgo de contaminación si se esterilizan ya en la unidad.

Los cortadores y pinzas deben ser esterilizados en calor seco a 250 °C por un mínimo 1 h

Preparar y limpiar la campana de flujo laminar y en condiciones asépticas pasar todo el material que se va a utilizar para la prueba, conectar la campana 10 a 15 min antes de empezar a trabajar.

Tomar una muestra asépticamente de 6 g del producto que debe contener de todos y cada uno de los recipientes que forman el lote, vaciar a un matraz erlenmeyer de 500 ml que contenga 200 ml de solución de peptona esterilizada y a temperatura ambiente disolver la muestra agitando hasta disolución total.

Empezar a filtrar asépticamente usando un filtro como

testigo. Si la filtración se dificulta o es muy tardada se debe disolver la muestra en 400 ml de solución de peptona o usar 3 g de muestra

Lavar el filtro con 3 porciones de 100 ml cada una, de solución de peptona.

Tomar la membrana con una de las pinzas y colocarla en el cortador, cortar la parte central, en un círculo de 17.5 mm de diámetro, transferir la parte central de la membrana cortada dentro de un tubo que contenga medio fluido de tioglicolato, colocar la parte exterior dentro de un tubo que contenga medio de soya y digerido de caseína. Repetir esto con el estigo.

Durante la prueba exponer una caja Petri con agar micológico y otra con agar soya tripticasa, incubar durante un período de 4 días y observar su crecimiento para tener la seguridad de que el área donde se efectuó la prueba fué una área estéril.

Incubar los tubos con medio fluido de tioglicolato -- por 7 días a 30 - 32 °C (medio para bacterias) y los tubos con medio de soya y digerido de caseína a 22 - 25 °C por 7 días (medio para hongos)

5.10.4 Interpretación de resultados

Se dice que el lote o muestra pasa la prueba si después de 7 días de incubación en ningún tubo aparece crecimiento.

Si se observa crecimiento deberá repetirse la prueba con el doble de muestra y si el crecimiento es en un solo medio, colocar la membrana en ese medio.

Si en los dos ensayos hay crecimiento la muestra no pasa la prueba.

5.11 PRUEBA DE PIROGENOS

5.11.1 Aparatos y equipo

Termómetro clínico

Jeringas y agujas libres de pirógenos (esterilizar - en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h)

5.11.2 Materiales y reactivos

Conejos no albinos y adultos, con peso no menor de -- 1800 g; cada uno de los cuales por lo menos una semana antes de la prueba, debe ser mantenido en su peso con una dieta libre de antibióticos.

Area de alojamiento con temperatura uniforme de $23 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 50 ± 10 por ciento y libre de perturbaciones que facilmente los puedan exitar. Mantener a los conejos, en esta área en forma -- individual.

Un animal que no se ha usado anteriormente en la prueba permanecera dos semanas antes de la misma bajo -- las condiciones anteriores. Simular una prueba, 1 a 3 días antes de la determinación bajo las condiciones especificadas en el procedimiento omitiendo la inyección. Si el animal no pasa satisfactoriamente esta -- prueba probarlo nuevamente 2 veces con un lapso de 2- días de descanso entre cada una. Si no pasa la tercera prueba desechar al animal.

Usar los animales cada 48 horas o cada dos semanas si la prueba anterior fué calificada de pirogénica.

Agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a -- 121°C por un mínimo de 20 min.

5.11.3 Procedimiento

Realizar la prueba en una área donde los animales estén alojados en las condiciones ambientales mencionadas. El día de la prueba suspender todo el alimento a los animales que van a ser usados, hasta después de terminada, excepto la administración de agua,

Determinar la temperatura control de cada animal, 40 min antes de iniciar la prueba, por la inserción del termómetro en el recto del animal de prueba a una profundidad no menor de 7.5 cm manteniendolo el tiempo suficiente para alcanzar la máxima temperatura. Usar solo aquellos animales cuyas temperaturas control no se desvíen más de 1.0 °C de cada una de las otras lecturas y no se use ningún animal con una temperatura que exceda de 39.8 °C

La temperatura control registrada para cada conejo constituye la temperatura a partir de la cual se calcula cualquier elevación subsecuente a la inyección del material de prueba.

Preparar una solución con agua destilada estéril libre de pirógenos, de concentración de 5 mg de rolitetraciclina por ml, (transferir una cantidad de muestra equivalente a 50 mg de rolitetraciclina, exactamente pesados, a un matraz aforado de 10 ml, disolver y aforar con agua destilada libre de pirógenos), 30 min después de haber tomado la temperatura control, inyectar 1.0 ml de la solución anterior por kg de peso corporal, la inyección deberá hacerse en un lapso de 1 min, por la vena marginal de la oreja de cada uno de los tres conejos habiendo calentado previamente la solución a inyectar a 37 °C, llevar un registro de las temperaturas a 1, 2 y 3 h después de la inyección

5.11.4 Interpretación de resultados

Si los conejos no muestran un incremento individual de su respectiva temperatura control, de 0.6°C o más y si la suma de los tres incrementos de temperatura no excede de 1.4°C la muestra pasa la prueba

Si uno o dos conejos muestra una elevación de temperatura de 0.6°C o más, o si la suma de los incrementos de temperatura excede de 1.4°C , repetir la prueba usando 5 conejos; si no más de tres de los 8 conejos muestran incrementos individuales de temperatura de 0.6°C o más, o si la suma de los incrementos no excede de 3.7°C , la muestra pasa la prueba.

5.12 PRUEBA DE SUSTANCIAS HISTAMINOSIMILES

5.12.1 Aparatos y equipo

Quimógrafo

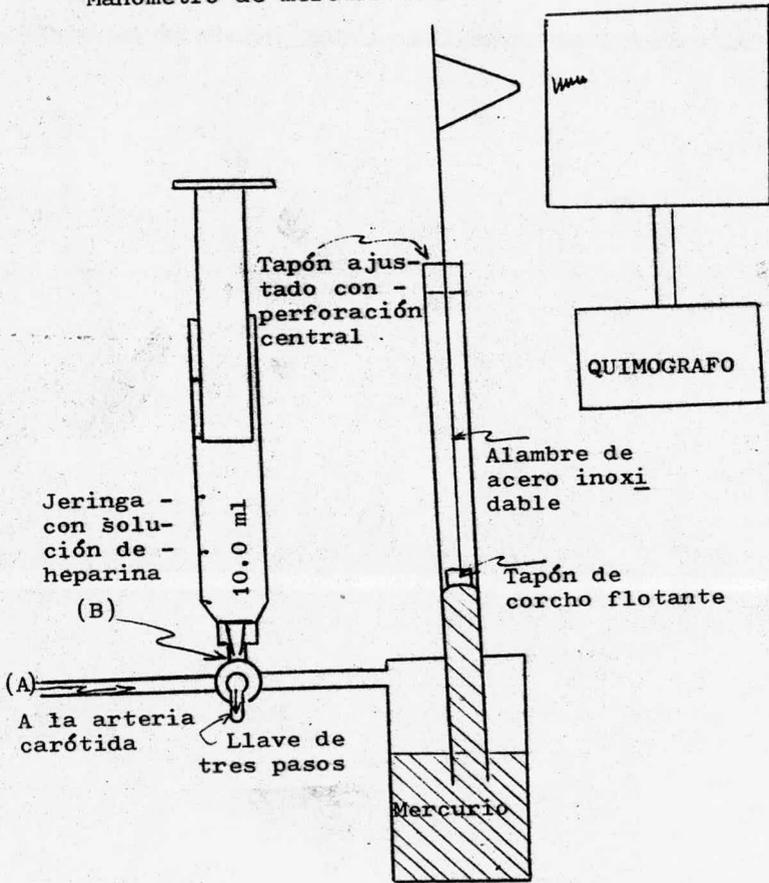
Jeringas y agujas de tuberculina, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Jeringa de 10 ml y aguja del No. 22, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Equipo de disección, esterilizar en calor seco a 250°C por un mínimo de 1 h.

Manómetro de mercurio adecuado para medir la presión sanguínea, se sugiere el siguiente:

Manómetro de mercurio:



5.12.2 Materiales y reactivos

Un gato sano, macho o hembra no preñada que no pese menos de 2.5 kg y que se ha mantenido cuando menos -- una semana, en una área de alojamiento de características iguales a las que se especifican en el punto -- 5.11.2.

Agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a -- 121 °C por un mínimo de 20 min.

Solución fisiológica estéril (transferir 9.0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 1000 ml, disolver y aforar con agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C por un mínimo de 20 min).

Sustancia de referencia de diclorhidrato de histamina Anestésico de acción media o prolongada, que no afecte la estabilidad de la presión sanguínea (fenobarbital sódico; pentobarbital sódico o nembutal)

Solución de heparina (disolver 100 mg de heparina sódica en 1 litro de solución fisiológica salina estéril concentración estimada de 100 mcg de heparina sódica por ml).

Solución de referencia de histamina : pesar exactamente una cantidad aproximada a 165.6 mg de diclorhidrato de histamina de referencia (equivalente a 100 mg de histamina base), transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver y aforar con agua destilada estéril (concentración estimada de 1 mg de histamina base por ml), transferir alícuotas de 0.5 ml de la solución anterior a ampollitas y conservarlas bajo refrigeración hasta su uso. Para hacer una solución primaria diluir una alícuota de 0.5 ml en un matraz aforado de 50 ml con agua destilada estéril (concentración estimada de 10 mcg de histamina base por ml) esta solución primaria puede ser conservada bajo refrigeración por un -

mes. El día de la prueba preparar a partir de la solu
ción primaria una solución que contenga 1.0 mcg de --
histamina base por ml, haciendo una dilución de 1:10-
con agua destilada estéril.

5.12.3 Preparación de la muestra

Transferir una cantidad equivalente a 50 mg de roli-
tetraciclina a un matraz aforado de 10 ml., disol---
ver y ~~reforzar~~ con agua destilada estéril (concentra-
ción estimada de 5 mg de rolitetraciclina por ml).

5.12.4 Procedimiento

Determinar el peso del animal y aplicar anestesia ge-
neral por medio de una inyección intraperitoneal del
anestésico elegido; descubrir quirúrgicamente la arte-
ria carótida separándola completamente de todas las -
estructuras a su alrededor, seccionar le nervio vago.
Desplazar completamente el aire del manómetro por so-
lución de heparina aplicada con una jeringa colocada-
en la entrada B (ver esquema).

Insertar una cánula en la arteria carótida conectada-
al manómetro por la entrada A, manteniendo la llave -
cerrada, para medir directamente y tener un registro-
constante de la presión sanguínea abrir la llave, si-
la sangre tiende a coagularse, agregar la cantidad ne-
cesaria de solución de heparina.

Descubrir quirúrgicamente la vena femoral para facili-
tar la inyección intravenosa.

Conectar el manómetro al quimógrafo e inspeccionar la
amplitud de los trazos del movimiento de oscilación
y estabilidad relativa de la presión sanguínea.

Determinar la sensibilidad del animal a la histamina por medio de inyecciones, en la vena femoral de la solución de referencia de histamina de concentración de 1.0 mcg de histamina base por ml, aplicar las inyecciones a intervalos uniformes de tiempo de no menos de 5 min cada una, aplicar 0.05, 0.10 y 0.15 mcg de histamina base por kg de peso corporal, repetir las inyecciones haciendo caso omiso de las primeras series de lecturas hasta que las caídas de presión causadas por dosis de histamina sean equivalentes y relativamente uniformes, y la caída de presión sanguínea causada con 0.1 mcg de histamina base por kg de peso corporal no sea menor de 20 mm de mercurio. Reemplazar la histamina por la solución muestra de concentración de 5 mg de rolitetraciclina por ml e inyectar 3 mg por kg de peso corporal en un lapso de cinco min. Si hay baja significativa de la presión sanguínea la dosis vuelve a repetirse después de alternar con una dosis de 0.10 mcg de histamina base por kilogramo de peso corporal. Emplear diferentes agujas y jeringas de tuberculina para inyectar la solución de histamina de referencia y la solución del antibiótico. El animal puede ser utilizado hasta que sus respuestas sean razonablemente estables a la histamina.

5.12.5 Interpretación de resultados

El producto pasa la prueba de ausencia de sustancias histaminosímiles si la baja de presión sanguínea obtenida para 3.0 mg de rolitetraciclina por kg de peso corporal no es mayor que la obtenida con 0.10 mcg de histamina base por kg de peso corporal.

6.1 OBSERVACIONES

Los reactivos grado analítico empleados en los métodos de prueba cumplirán con las especificaciones marcadas por la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.

La sustancia de referencia oficial será la aceptada por la Secretaría de Salubridad y Asistencia (S.S.A.)

6.2 BIBLIOGRAFIA

Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 4a Edición, 1974, Págs. 94- 96 y 170 - 172

The United States Dispensatory, 27th Edition, 1973. - Págs. 1151 -1178

Organización Mundial de la Salud, Publicación Científica No. 158, febrero 1968. Animales de laboratorio.

Farmacopea Helvética, 6a. Edición, 1971. Tomo I pág. 213

Goodman - Gilman

Bases Farmacológicas de la Terapéutica

4a. Edición, 1970

Ed. Interamericana

Págs. 1206 - 1210

Osol - Hoover

Reminton's Pharmaceutical Sciences

14th Edition, 1970

pág 633

6.3 PARTICIPANTES

Fermic, S.A. de C.V.

Química Hoechst de México S.A.

Laboratorios Sanfer S.A.

Abbott Laboratories de México, S.A.

Laboratorios Fedal, S.A.