European Drug Master File
Parte abierta
de
Agrimonia

Agrimonia eupatoria L.

Elaborado por

Camino de Purchil 66
18004 Granada
ESPAÑA
Mayo 2009

Índice

3.2.S.1.- Información general.....04

3.2.S.1.1.- Nomenclatura 04

3.2.S.1.1.1.-Especie vegetal.....04

3.2.S.1.1.2.-Extracto de Agrimonia eupatoria L.....04

3.2.S.1.2.- Estructura.....05

3.2.S.1.3.- Propiedades generales.....06

3.2.S.1.3.1.- Especie vegetal.....06

3.2.S.1.3.2.- Extracto.....06

3.2.S.1.3.3.- Catequinas totales como Epigalocatequina galato.....07

3.2.S.1.3.4.- Propiedades farmacológicas del E.S. *Agrimonia eupatoria L.*....07

3.2.S.2.- Fabricación.....09

3.2.S.2.1. – Fabricante.....09

3.2.S.2.2. - Descripción del proceso de fabricación y de los controles realizados durante el proceso.....12

3.2.S.2.2.1 – Identificación de lotes.....13

3.2.S.2.2.2– Llenado, almacenamiento y transporte.....13

3.2.S.2.3. – Control de los materiales **(PARTE CERRADA)**.....

Certificados analíticos.....

3.2.S.2.4. –Control de los puntos críticos del proceso **(PARTE CERRADA)**.....

3.2.S.2.4.1.- Control de los productos intermedios.....

3.2.S.2.5. – Validación del proceso de Fabricación **(PARTE CERRADA)**.....

3.2.S.2.6. - Desarrollo del proceso de Fabricación **(PARTE CERRADA)**.....

3.2.S.3.- Caracterización.....15

3.2.S.3.1. – Elucidación de la estructura y otras características.....15

3.2.S.3.2.- Impurezas.....17

Certificados de análisis de Metales Pesados, Aflatoxinas y Disolventes residuales

P.N.T. de Metales pesados

P.N.T. de Disolventes Residuales

P.N.T. de Aflatoxinas

P.N.T. de Pesticidas

Monografía R.F.E: D. Residuales y Pesticidas

3.2.S.4.- Control del producto....19
3.2.S.4.1.Especificaciones....19
3.2.S.4.1.1 Especificaciones de la planta....19
3.2.S.4.1.2. Especificaciones del Extracto....20
Monografía R.F.E: Extractos
3.2.S.4.2. – Procesos analíticos....21
3.2.S.4.2.1.- Especie vegetal....21
3.2.S.4.2.2.- Extracto....26
Monografías R.F.E: Métodos Físico-Químicos
3.2.S.4.3. – Validación de los procesos analíticos si procede....35
3.2.S.4.4. – Análisis de lotes....38
3.2.S.4.5. – Justificación de las especificaciones....39

3.2.S.5. – Referencias de los estándares o materiales....40
3.2.S.5.1.- Control de reactivos y disolventes....40

3.2.S.6. – Sistema de almacenamiento....42
3.2.S.6.1.- Envasado....42
3.2.S.6.2. Etiquetado....43

3.2.S.7. – Estabilidad....45
3.2.S.7.1.- Resumen de estabilidad y conclusiones....45
3.2.S.7.2.- Datos de estabilidad....52

3.2.S.1.- INFORMACIÓN GENERAL

3.2.S.1.1.- Nomenclatura

3.2.S.1.1.1.-Especie Vegetal:

Nombre latín: *Agrimonia eupatoria L.*
Familia: Rosaceae
Nombre común: Agrimonia
Parte utilizada Agrimonia: Hojas
La Agrimonia se ha utilizado para la fabricación del extracto seco en agua 100% (4/1) de *Agrimonia eupatoria L* que se documenta en este EDMF, proviene de Europa tal y como recoge el certificado analítico de la especie vegetal (planta) incluido en el punto 3.2.S.4.4. Análisis de lotes.

3.2.S.1.1.2.- Extracto

Nombre: Extracto de Agrimonia (E.S. Agrimonia) al 98%
1) Marcador de Calidad: 0,2-0,6% Catequinas totales como Epigalocatequina galato (EPGCG)
2) Extracción: Agua 100%
3) Relación planta/extracto 4/1 (p/p)
4) Excipientes utilizados: Dióxido de Silicio 2%

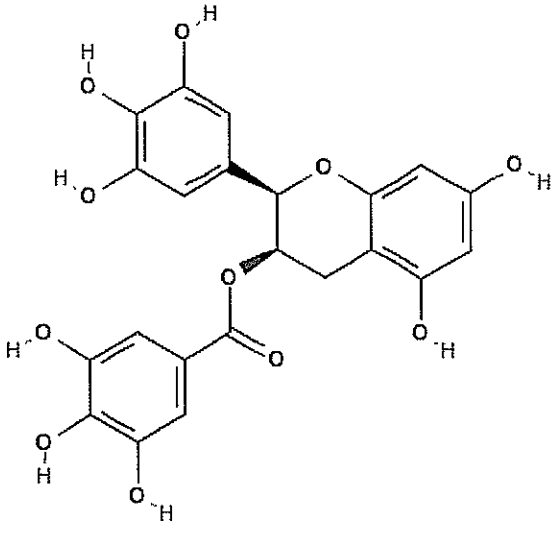
3.2.S.1.2- Estructura

Epigalocatequina Galato

Fórmula empírica: $C_{22}H_{18}O_{11}$ (epigalocatequina galato)

Peso molecular: 458.37 [g/mol] (EPGCG)

Fórmula desarrollada: Epigalocatequingalato (EPGCG)



3.2.S.1.3.- Propiedades generales

3.2.S.1.3.1.- Descripción especie vegetal: *Agrimonia eupatoria L*

Agrimonia eupatoria L., también conocida en España como "Hierba de San Guillermo".

Esta hierba es muy común en toda nuestra Península y en el resto de Europa. En general es fácil encontrarla a orillas de los cultivos y en las lindes de los bosques de encinas y robles; prefiere los lugares frescos y sombreados.

Es una planta herbácea perenne de la familia de las Rosáceas, tiene un pequeño rizoma, el tallo es verde aunque también puede ser de color rojizo, es cilíndrico y muy pocas veces ramificado, además está rematado por una inflorescencia de alegres flores amarillas que se disponen en un racimo suelto.

Las hojas son muy profundamente dentadas y serradas, de color verde oscuro en la parte superior y grisácea en la parte inferior.

Las flores son pequeñas y de forma puntiaguda. Son pentámeros y nacen en las axilas de las ramas. Los pétalos son libres, amarillos y perennes. Los cálices están rodeados de cerca por numerosos capiteles enganchados en la zona terminal de la planta, constituyendo los bordes del velludo receptáculo.

3.2.S.1.3.2.- Descripción Extracto Seco de Agrimonia

Extracto seco obtenido por atomización del extracto fluido concentrado de *Agrimonia eupatoria L.* El extracto seco se denomina a las preparaciones sólidas, obtenidas por evaporación del disolvente utilizado para su elaboración. En general, los extractos secos tienen una humedad no inferior al 94% en masa. Pueden añadirse sustancias inertes adecuadas.

El análisis bibliográfico señala que las sustancias marcadoras de este extracto y que provienen de las hojas de Agrimonia son las catequinas totales como EPGCG.

3.2. S.1.3.3.- Descripción Catequinas Totales (EPGCG).

Las Catequinas totales son el marcador de calidad que en base a nuestra experiencia y al análisis bibliográfico nos puede aportar más información sobre la calidad de la planta. Las Epigalocatequinas forman cristales blancos en contacto con el agua, llegando a alcanzar la temperatura de fusión a 218º C. En etanol su absorbancia máxima es a 275nm.

Generalmente las catequinas:
-En su ***forma -dl (racémica)*** forman agujas en contacto con agua y acido acético siendo su temperatura de fusión de 212-216º. Son ligeramente solubles en agua fría y éter, solubles en agua caliente, alcohol, acido acético glacial y acetona, y prácticamente insolubles en benzenos y cloroformo.

-En su ***forma -l (levogira)*** forman agujas en contacto con agua y acido acético siendo su temperatura de fusión de 175-177º

Su estructura se adjunta en el punto 3.2.S.1.2 del presente DMF.

3.2.S.1.3.4. Propiedades farmacológicas Agrimonia.

Por su abundancia en taninos tiene efecto antidiarreico, antiinflamatorio local y cicatrizante. Además presenta una ligera acción diurética.

Clasificación terapéutica: PA07. Plantas medicinales antidiarreicas.

Clasificación terapéutica: PD02. Plantas medicinales cicatrizantes.

- ***Antidiarreico***. Debido al efecto astringente de los taninos, la agrimonia ejerce un efecto antidiarreico.

- ***Hipoglucemiante***. En ensayos *in vivo* sobre ratón, se ha comprobado que la agrimonia ejerce un efecto antidiabético, al administrarla junto con la dieta en dosis de 6.25 (g/kg). Al administrar 200 mg de estreptozotocina/Kg por vía intraperitoneal, se observó al duodécimo día que la agrimonia disminuía la hiperglucemia y la

polidipsia. Parece ser que el efecto se debe a un aumento de la secreción de insulina y a un aumento del metabolismo de la glucosa.

En ensayos *in vitro* sobre fibra muscular de ratón, el extracto acuoso de agrimonia a concentración de 1 mg/ml aumentaba el transporte de glucosa, su oxidación y la glucogenosíntesis. Además, un extracto de agrimonia a concentración de 0.25-1.0 mg/ml producía una secreción de insulina 1.9-3.8 veces superior a la del placebo.

- ***Cicatrizante***.

La ***Comisión E*** recoge las siguientes indicaciones:

- **Uso interno**: Diarreas agudas inespecíficas leves.
  Inflamaciones de las mucosas bucofaríngeas.
- **Uso externo**: inflamaciones ligeras de la piel.

3.2.S.2.- FABRICACIÓN

3.2.S.2.1.- Fabricante

Nombre

Nº registro: 3468-E

PULEVA BIOTECH/ EXXENTIA

Personas responsables:

Sr. Juan Carlos de Gregorio	Director General
Jose Carlos Quintela	Director I & D

Dirección administrativa

Camino de Purchil 66
18004 Granada – España

Tel.: +34 958 240 381
Fax: +34 958 240 160

Dirección de fabricación

Polígono industrial Alcantarilla s/n
10310 Talayuela - Cáceres

Teléfono: 927 667005

Declaración de compromiso

Nosotros, PULEVA BIOTECH/ EXXENTIA, certificamos que los métodos utilizados en la fabricación, envasado y manipulación así como las instalaciones y los controles utilizados durante la fabricación de los productos fabricados por nosotros en nuestras instalaciones, Fábrica: Polígono industrial Alcantarilla s/n, 0310 Talayuela - Cáceres, son conformes a las Buenas Prácticas de Fabricación.

Declaramos por lo tanto, que los productos se fabricarán según los métodos descritos en este EDMF. Además, declaramos que existirá una consistencia entre los diferentes lotes según las especificaciones vigentes y descritas en el presente EDMF.

Si se realizan cambios significativos de este EDMF, se someterán los correspondientes anexos o modificaciones a los solicitantes y a las autoridades competentes.

Análisis del impacto medio ambiental

Nuestra compañía cumple la legislación local, nacional e internacional referente a la protección y conservación del medio ambiente. El cumplimiento de esta legislación conlleva mantener un estricto control de la emisión de líquidos, gases o sólidos resultantes de nuestro proceso de fabricación. El tratamiento de los residuos es constantemente controlado de acuerdo a la legislación vigente por la Unión Europea.

Nuestros productos son extractos de plantas utilizados en la preparación de compuestos destinados a uso humano y no consideramos que existan riesgos de contaminación del medio ambiente como resultado de su utilización, fabricación y almacenamiento.

No creemos que el producto penetre en el medio ambiente como resultado de su utilización y fabricación o de su eliminación y de la eliminación de productos residuales durante su fabricación, que son extractos de plantas que pueden ser utilizados en la preparación de compuestos destinados a uso humano.

3.2.S.2.2.- Descripción de los procesos de fabricación y de los controles realizados durante el proceso

	Etapas del Proceso	Controles durante Proceso
Partes aéreas Agrimonia →	Pesada de los componentes	
Líquido-extractivo (agua) →	↓	← Líquidos de extracción
	Percolación en contracorriente	Calefacción del líquido extractivo Tª max.60º
	↓	← Repetir el proceso extractivo con agua.
	Vaciar y Microfiltrar el extracto fluido	← Determinación residuo seco y microbiología.
	↓ Concentración a Tª controlada y en vacío	
	↓	← Determinación de residuo seco.
	Esterilización térmica a Tª Controlada (Opcional)	
	↓	← Determinación de residuo seco y microbiología.
→		
Adición de excipientes	Secado en aire caliente y vacío, Nebulización	
	↓	
Excipientes →		← Determinación de Catequinas y análisis general
	Producto Terminado	

Producto final

3.2.S.2.2.1. Identificación de lotes.

Los lotes de E.S. Agrimonia se numeran para seguir la historia completa de cada lote y garantizar la trazabilidad correcta del lote.

El sistema de numeración es una letra que corresponde al año en el cual el lote se ha fabricado y una serie de seis números de los cuales los dos primeros corresponden al número de orden de la fabricación del año, los dos siguientes corresponden con el día y los dos últimos con el mes correspondiente a la fecha de fabricación, tal y como se ha descrito en el PNT de "*Asignación del número de lote y fecha de caducidad a los productos recepcionados y fabricados*" con Nº PGF0001. Por último se añaden un grupo de tres letras identificativas de cada producto, en el caso del E.S. de Agrimonia estas letras son: AGI.

En el desarrollo de este EDMF hemos considerado como número de lotes: A011006-AGI; A021106-AGI; A031206-AGI.

El tamaño de los lotes empleados en la elaboración de este EDMF son de 25 Kg ± 5 Kg.

3.2.S.2.2.2.- Llenado, almacenamiento y transporte.

El extracto seco se recoge en bidones de 25 kg y se le identifica con el número de lote, asignado al principio del proceso de acuerdo con la guía de fabricación (tal y como hemos explicado anteriormente), posteriormente se cierra, pasando a la zona de pesadas donde se comprueba que el contenido de la misma es de aproximadamente 25 kg.

Esta se etiqueta con una etiqueta de cuarentena (color amarillo) hasta que sea analizado por control de Calidad, ya que de acuerdo con nuestro procedimiento de ensayo general cada lote se muestrea y se ensaya antes de su liberación.

Control de calidad preestablece el número de muestras para analizar, siendo al menos una por cada sublote. Se toman dos muestras de 25 g de cada bolsa de 25 kg, una en la parte inferior y otra en la parte superior. Se mezclan las muestras inferior y superior de cada bolsa y de todas las bolsas se toman dos muestras finales que se analizan.

Todo este proceso de análisis tiene una duración aproximada de una semana. Pasado este tiempo, si todos los resultados son favorables, se libera el lote y se le pone una etiqueta de color verde, último paso antes de su almacenamiento definitivo. (Las condiciones de almacenamiento son las correspondientes a la zona climática II de Madrid: 25º ± 2ºC, 60 ± 5% HR)

P.N.T.s de referencia:

P.N.T. de Recepción y almacenamiento en cuarentena de producto PAR 0004.
P.N.T.s de Gestión de Almacenes: PAR 0005 y PAR 0006
P.N.T. de Asignación de Lote PGF0001
P.N.T. de Muestreo PAR0003

3.2.S.3.- CARACTERIZACIÓN

3.2.S.3.1. Elucidación de la estructura y otras características

Los principales componentes de las hojas de Agrimonia son:

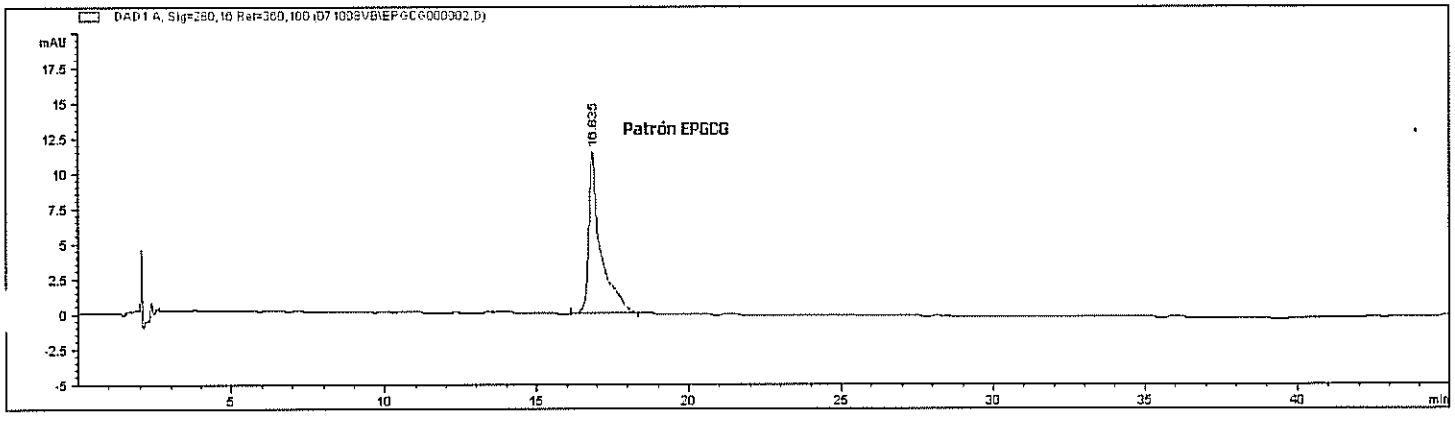
- **Taninos catéquicos.**
- **Taninos elágicos. Agrimonólido.**
- **Flavonoides. Glucósidos de apigenina, luteolina, quercetina.**
- **Triterpenos. Alfa-amirina, ácido ursólico.**
- **Cumarinas.**
- **Aceite. Triglicéridos de ácidos palmítico, esteárico.**

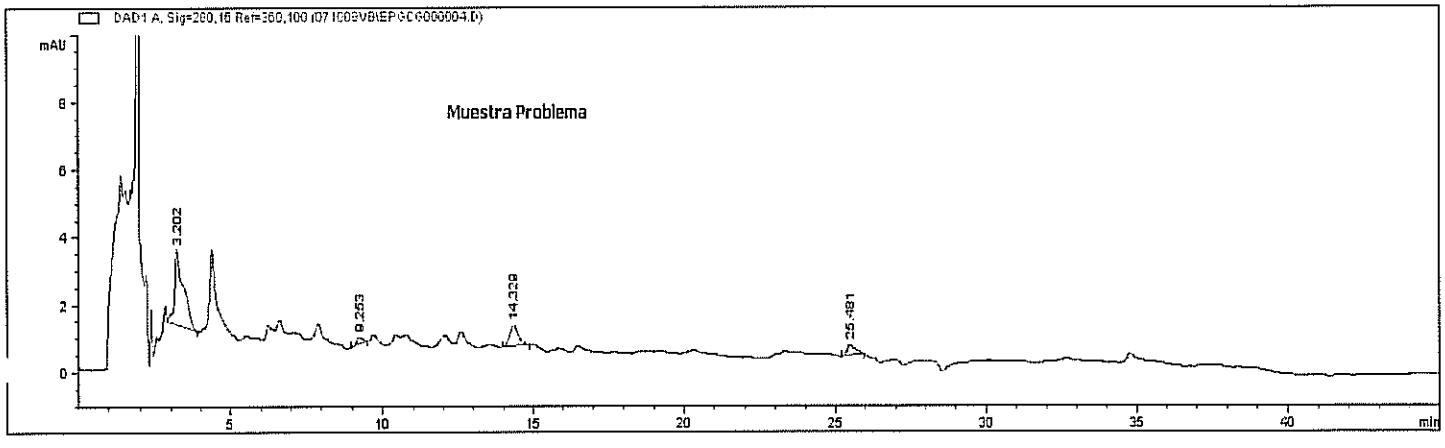
Debido a la gran cantidad de componentes presentes en las hojas de *Agrimonia eupatoria L.* Puleva Biotech/ Exxentia ha buscado varios de los componentes más característicos y destacados en las principales bibliografías que garantizan la calidad del producto, utilizando finalmente para la caracterización del mismo las catequinas totales como EPGCG (Epigalocatequina galato).

Para una clara caracterización del E.S. de Agrimonia se ha utilizado un método interno desarrollado y validado por Puleva Biotech/ Exxentia para la identificación y valoración por HPLC, se adjunta a continuación un perfil cromatográfico del E.S. de Agrimonia obtenido por cromatografía líquida de Alta resolución (HPLC).

Este método permite una clara identificación del marcador del Extracto seco de Agrimonia, las catequinas totales como EPGCG (Epigalocatequina galato).

Muestras de los Cromatogramas obtenidos: Patrón de EPGCG y Extracto seco de Agrimonia





3.2.S.3.2. Impurezas

1. Disolventes residuales.

Para la obtención del E.S. de Agrimonia consistente en una nebulización a una temperatura de entrada de 180-200ºC y de salida de 80-100 ºC, se obtiene un polvo fino y seco sin restos de disolventes.

Se determina el contenido de disolventes residuales en el extracto seco por cromatografía de gases GC. El etanol según la monografía de Farmacopea Europea debe de estar a una concentración menor de 5000 ppm.

En varios lotes determinados, tal y como se muestra a continuación, la concentración fue menor a este valor (5000 ppm), por lo que el Extracto seco de Agrimonia cumple con lo establecido en la Farmacopea Europea. Se adjunta Protocolo Normalizado de Trabajo de dicha técnica.

Especificaciones

En los Certificados analíticos referentes a disolventes residuales, se determina de manera sistemática Etanol, a pesar de que en nuestro proceso de fabricación se utiliza agua.

El Etanol es el disolvente con el que Puleva Biotech/Exxentia tiene mayor experiencia y por tanto más cantidad de analíticas que nos garantizan que los productos fabricados con Etanol/agua siempre se encuentran en proporciones inferiores a 5000 ppm.

El Etanol es un disolvente de la Clase 3, de acuerdo a la clasificación de la Farmacopea Española – Farmacopea Europea v.v., por lo que se considera como un producto sin peligro para la salud humana a los niveles normalmente aceptados en los productos farmacéuticos. Además para estos disolventes la Farmacopea Española-Farmacopea Europea no exige su determinación, ni establecimiento de un límite de detección, siempre y cuando la cantidades presentes en el producto final no excedan de 50 mg/ día.

2. Pesticidas

Se determina el contenido de pesticidas en el extracto seco siguiendo la técnica y metodología descrita en la Farmacopea Europea v.v. y en la Real Farmacopea Española v.v.

Especificaciones

En el certificado analítico que se adjunta a continuación, se observa que el contenido en los diferentes pesticidas cumple con los límites requeridos por Eur. Ph. v.v. y la Real Farmacopea Española v.v.

3. Aflatoxinas

Se determina el contenido de aflatoxinas en el extracto seco siguiendo la técnica de inmunoensayo "ELISA". Se adjunta Protocolo Normalizado de Trabajo de dicha técnica.

4. Metales pesados

Se determina el contenido en metales pesados en el extracto seco siguiendo la técnica de Espectroscopía de Absorción atómica/ Vapor frío (Generador de Hidruros). Se adjunta Protocolo Normalizado de Trabajo de dicha técnica.

Se adjuntan los P.N.T. y los certificados de validación correspondientes:

- **Metales Pesados: Cadmio, Plomo, Mercurio y Arsénico.**
- **Aflatoxinas.**
- **Disolventes residuales.**
- **Pesticidas.**

Igualmente se adjuntan las monografías correspondientes de la Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea para disolventes residuales y pesticidas, así como los certificados de análisis llevados a cabo en Quantum experimental.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name:*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer nº:*	A011006-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample nº:*	QEN-D-40-08

DETERMINACIONES REALIZADAS
TESTS RESULTS

Análisis *Tests*	**Resultado** *Results*	**Método utilizado** *Method*
Determinación de arsénico	<0,07 ppm	A.A./C.G./Zeeman
Determinación de cadmio	<0,11 ppm	A.A./C.G./Zeeman
Determinación de plomo	<0,05 ppm	A.A./C.G./Zeeman
Determinación de mercurio	<0,09 ppm	A.A./VAPOR FRIO

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente
Departamento Técnico
Technical Department

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name:*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer nº:*	A021106-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample nº:*	QEN-D-41-08

DETERMINACIONES REALIZADAS
TESTS RESULTS

Análisis *Tests*	**Resultado** *Results*	**Método utilizado** *Method*
Determinación de arsénico	<0,09 ppm	A.A./C.G./Zeeman
Determinación de cadmio	<0,13 ppm	A.A./C.G./Zeeman
Determinación de plomo	<0,03 ppm	A.A./C.G./Zeeman
Determinación de mercurio	<0,12 ppm	A.A./VAPOR FRIO

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente
Departamento Técnico
Technical Department

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name:*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer nº:*	A031206-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample nº:*	QEN-D-43-08

DETERMINACIONES REALIZADAS
TESTS RESULTS

Análisis *Tests*	**Resultado** *Results*	**Método utilizado** *Method*
Determinación de arsénico	<0,15 ppm	A.A./C.G./Zeeman
Determinación de cadmio	<0,10 ppm	A.A./C.G./Zeeman
Determinación de plomo	<0,10 ppm	A.A./C.G./Zeeman
Determinación de mercurio	<0,18 ppm	A.A./VAPOR FRIO

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente
Departamento Técnico
Technical Department

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name :*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer no.*	A011006-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample no:*	QEN-D-43-08

DETERMINACIONES REALIZADAS

TESTS RESULTS

Análisis *Tests*	**Resultado** *Results*	**Método utilizado** *Method*
Determinación de Disolventes residuales	<0,01%	GC/MS/MS

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente
Departamento Técnico
Technical Department

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name :*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer no.*	A021106-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample no:*	QEN-D-44-08

DETERMINACIONES REALIZADAS

TESTS RESULTS

Análisis *Tests*	**Resultado** *Results*	**Método utilizado** *Method*
Determinación de Disolventes residuales	<0,01%	GC/MS/MS

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente
Departamento Técnico
Technical Department

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name :*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer no.*	A031206-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample no:*	QEN-D-45-08

DETERMINACIONES REALIZADAS

TESTS RESULTS

Análisis *Tests*	**Resultado** *Results*	**Método utilizado** *Method*
Determinación de Disolventes residuales	<0,01%	GC/MS/MS

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente

Departamento Técnico

Technical Department

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name :*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer nº:*	Y011011-AGR
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample nº:*	QEN-D-37-08

DETERMINACIONES REALIZADAS
TESTS RESULTS

Análisis *Tests*	**Resultado** *Results*	**Método utilizado** *Method*
Aflatoxina B1, B2, G1, G2	0,11 ppb	ELISA

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente
Departamento Técnico
Technical Department

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name :*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer nº:*	A021106-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample nº:*	QEN-D-38-08

DETERMINACIONES REALIZADAS
TESTS RESULTS

Análisis *Tests*	**Resultado** *Results*	**Método utilizado** *Method*
Aflatoxina B1, B2, G1, G2	0,31 ppb	ELISA

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente
Departamento Técnico
Technical Department

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name :*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer nº:*	A031206-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample nº:*	QEN-D-39-08

DETERMINACIONES REALIZADAS
TESTS RESULTS

Análisis *Tests*	**Resultado** *Results*	**Método utilizado** *Method*
Aflatoxina B1, B2, G1, G2	0,45 ppb	ELISA

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente
Departamento Técnico
Technical Department

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name :*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer no.*	A011006-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample no:*	QEN-D-46-08

PESTICIDAS ORGANOCLORADOS, ORGANOFOSFORADOS Y OTROS COMPUESTOS

DICTAMEN: La muestra **CUMPLE** según la Real Farmacopea Española.
(Procesamiento según técnica y metodología descrita en la Pharmacopea Europea III)
La muestra analizada cumple con los requisitos de la Farmacopea Europea III y de la Real Farmacopea Español.

DETERMINACIONES REALIZADAS

	Nombre	Resultado (mg/Kg)	L.C (mg/Kg)		Nombre	Resultado (mg/Kg)	L.C (mg/Kg)
1	Acefato	< 0,001	0.01	41	Lambda cyhalotrin	< 0,001	0.05
2	Acrinatrina	< 0,001	0.02	42	MAlation	0,016	0.01
3	Bitertanol	< 0,001	0.05	43	MCPA	< 0,001	0.05
4	Bromopropilato	< 0,001	0.01	44	Metalaxil	< 0,001	0.01
5	Bupirimato	< 0,001	0.01	45	Metamidofos	< 0,001	0.01
6	Captan	< 0,001	0.02	46	Metiocarb	< 0,001	0.05
7	Cipermetrina	< 0,001	0.05	47	Miclobutanil	< 0,001	0.01
8	Ciproconazol	< 0,001	0.01	48	Napropamida	< 0,001	0.01
9	Permetrina	< 0,001	0.01	49	Norflurazona	< 0,001	0.05
10	Clorpirifos	< 0,001	0.01	50	Nuarimol	< 0,001	0.01
11	Clorpirifos metil	< 0,001	0.01	51	Orizalina	< 0,001	0.01
12	Clortalonil	0,005	0.01	52	Oxadiazon	< 0,001	0.01
13	Clozolinato	< 0,001	0.01	53	Oxifluorfen	< 0,001	0.01
14	Deltametrina	< 0,001	0.05	54	Paration metil	< 0,001	0.01
15	Diazinon	< 0,001	0.01	55	Penconazol	< 0,001	0.05
16	Diflufenican	< 0,001	0.01	56	Pendimetalina	< 0,001	0.01
17	Dimetoato	< 0,001	0.01	57	Pirazofos	< 0,001	0.01
18	Diniconazol	< 0,001	0.01	58	Piridaben	< 0,001	0.05
19	Dinobuton	< 0,001	0.01	59	Pirifenox	0,022	0.05

Este informe sólo afecta a la muestra sometida a ensayo.
Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

20	Dinocap	< 0,001	0.01	60	Pirimicarb	< 0,001	0.05
21	Endosulfan Alfa	< 0,001	0.01	61	Pirimifos metil	< 0,001	0.01
22	Endosulfan Beta	< 0,001	0.01	62	Piriproxifen	< 0,001	0.01
23	Endosulfan sulfato	< 0,001	0.01	63	Propargita	< 0,001	0.01
24	EPTC	< 0,001	0.05	64	Quinalfos	< 0,001	0.01
25	Etiofencarb	0,033	0.05	65	Fluvalinato Tau	< 0,001	0.01
26	Etion	< 0,001	0.01	66	Tebufenpirad	< 0,001	0.01
27	Fernarimol	< 0,001	0.01	67	Terbacillo	< 0,001	0.01
28	Fenazaquin	< 0,001	0.01	68	Tetraconazol	< 0,001	0.01
29	Fenitrion	< 0,001	0.01	69	Triadimenol	< 0,001	0.01
30	Fenoxicarb	< 0,001	0.01	70	Triclorfon	< 0,001	0.05
31	Fention	< 0,001	0.01	71			
32	Fluacifop-butil	< 0,001	0.01	72			
33	Flusilazol	< 0,001	0.01	73			
34	Folpet	< 0,001	0.02	74			
35	Formotion	< 0,001	0.01	75			
36	Fosalone	< 0,001	0.01	76			
37	Fosmet	< 0,001	0.05	77			
38	Hexaconazol	< 0,001	0.01	78			
39	Iprodiona	< 0,001	0.02	79			
40	Isoxaben	< 0,001	0.01				

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente

Departamento Técnico

Technical Department

Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name :*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer no.*	A021106-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample no:*	QEN-D-47-08

PESTICIDAS ORGANOCLORADOS, ORGANOFOSFORADOS Y OTROS COMPUESTOS

DICTAMEN: La muestra **CUMPLE** según la Real Farmacopea Española.
(Procesamiento según técnica y metodología descrita en la Pharmacopea Europea III)
La muestra analizada cumple con los requisitos de la Farmacopea Europea III y de la Real Farmacopea Español.

DETERMINACIONES REALIZADAS

	Nombre	Resultado (mg/Kg)	L.C (mg/Kg)		Nombre	Resultado (mg/Kg)	L.C (mg/Kg)
1	Acefato	< 0.001	0.01	41	Lambda cyhalotrin	< 0,001	0.05
2	Acrinatrina	< 0.001	0.02	42	MAlation	<0,001	0.01
3	Bitertanol	< 0.001	0.05	43	MCPA	< 0,001	0.05
4	Bromopropilato	< 0.001	0.01	44	Metalaxil	< 0,001	0.01
5	Bupirimato	< 0.001	0.01	45	Metamidofos	< 0,001	0.01
6	Captan	< 0.001	0.02	46	Metiocarb	< 0,001	0.05
7	Cipermetrina	< 0.001	0.05	47	Miclobutanil	< 0,001	0.01
8	Ciproconazol	< 0.001	0.01	48	Napropamida	< 0,001	0.01
9	Permetrina	< 0.001	0.01	49	Norflurazona	< 0,001	0.05
10	Clorpirifos	< 0.001	0.01	50	Nuarimol	< 0,001	0.01
11	Clorpirifos metil	< 0.001	0.01	51	Orizalina	< 0,001	0.01
12	Clortalonil	<0.001	0.01	52	Oxadiazon	< 0,001	0.01
13	Clozolinato	< 0.001	0.01	53	Oxifluorfen	< 0,001	0.01
14	Deltametrina	< 0.001	0.05	54	Paration metil	< 0,001	0.01
15	Diazinon	< 0.001	0.01	55	Penconazol	< 0,001	0.05
16	Diflufenican	< 0.001	0.01	56	Pendimetalina	< 0,001	0.01
17	Dimetoato	< 0.001	0.01	57	Pirazofos	< 0,001	0.01
18	Diniconazol	< 0.001	0.01	58	Piridaben	< 0,001	0.05
19	Dinobuton	< 0.001	0.01	59	Pirifenox	<0,001	0.05

Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

20	Dinocap	< 0,001	0.01	60	Pirimicarb	< 0,001	0.05
21	Endosulfan Alfa	< 0,001	0.01	61	Pirimifos metil	< 0,001	0.01
22	Endosulfan Beta	< 0,001	0.01	62	Piriproxifen	< 0,001	0.01
23	Endosulfan sulfato	< 0,001	0.01	63	Propargita	< 0,001	0.01
24	EPTC	< 0,001	0.05	64	Quinalfos	< 0,001	0.01
25	Etiofencarb	0.017	0.05	65	Fluvalinato Tau	< 0,001	0.01
26	Etion	< 0,001	0.01	66	Tebufenpirad	< 0,001	0.01
27	Fernarimol	< 0,001	0.01	67	Terbacilo	< 0,001	0.01
28	Fenazaquin	< 0,001	0.01	68	Tetraconazol	< 0,001	0.01
29	Fenitrion	< 0,001	0.01	69	Triadimenol	< 0,001	0.01
30	Fenoxicarb	< 0,001	0.01	70	Triclorfon	< 0,001	0.05
31	Fention	< 0,001	0.01	71			
32	Fluacifop-butil	< 0,001	0.01	72			
33	Flusilazol	< 0,001	0.01	73			
34	Folpet	< 0,001	0.02	74			
35	Formotion	< 0,001	0.01	75			
36	Fosalone	< 0,001	0.01	76			
37	Fosmet	< 0,001	0.05	77			
38	Hexaconazol	< 0,001	0.01	78			
39	Iprodiona	< 0,001	0.02	79			
40	Isoxaben	< 0,001	0.01				

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente

Departamento Técnico

Technical Department

Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

quantum experimental

Avda. M-40, Portal 17, Oficinas 68- 69
Tfno. 00 34 91 485 53 47 Fax. 00 34 91 485 54 09
28925 Alcorcón (Madrid)

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cliente/Prov.: *Customer/ Supplier :*	Puleva Biotech/Exxentia
Descripción de muestra: *Product name :*	AGRIMONIA
Nº Lote de muestra cliente: *Batch customer no.*	A031206-AGI
Nº Muestra asignada por QUANTUM: *QUANTUM sample no:*	QEN-D-48-08

PESTICIDAS ORGANOCLORADOS, ORGANOFOSFORADOS Y OTROS COMPUESTOS

DICTAMEN: La muestra **CUMPLE** según la Real Farmacopea Española.
(Procesamiento según técnica y metodología descrita en la Pharmacopea Europea III)
La muestra analizada cumple con los requisitos de la Farmacopea Europea III y de la Real Farmacopea Español.

DETERMINACIONES REALIZADAS

	Nombre	Resultado (mg/Kg)	L.C (mg/Kg)		Nombre	Resultado (mg/Kg)	L.C (mg/Kg)
1	Acefato	< 0,001	0.01	41	Lambda cyhalotrin	< 0,001	0.05
2	Acrinatrina	< 0,001	0.02	42	MAlation	<0,001	0.01
3	Bitertanol	< 0,001	0.05	43	MCPA	< 0,001	0.05
4	Bromopropilato	< 0,001	0.01	44	Metalaxil	< 0,001	0.01
5	Bupirimato	< 0,001	0.01	45	Metamidofos	< 0,001	0.01
6	Captan	0,011	0.02	46	Metiocarb	< 0,001	0.05
7	Cipermetrina	< 0,001	0.05	47	Miclobutanil	< 0,001	0.01
8	Ciproconazol	< 0,001	0.01	48	Napropamida	< 0,001	0.01
9	Permetrina	< 0,001	0.01	49	Norflurazona	< 0,001	0.05
10	Clorpirifos	< 0,001	0.01	50	Nuarimol	< 0,001	0.01
11	Clorpirifos metil	< 0,001	0.01	51	Orizalina	< 0,001	0.01
12	Clortalonil	< 0,001	0.01	52	Oxadiazon	< 0,001	0.01
13	Clozolinato	< 0,001	0.01	53	Oxifluorfen	< 0,001	0.01
14	Deltametrina	< 0,001	0.05	54	Paration metil	< 0,001	0.01
15	Diazinon	< 0,001	0.01	55	Penconazol	< 0,001	0.05
16	Diflufenican	< 0,001	0.01	56	Pendimetalina	< 0,001	0.01
17	Dimetoato	< 0,001	0.01	57	Pirazofos	< 0,001	0.01
18	Diniconazol	< 0,001	0.01	58	Piridaben	< 0,001	0.05
19	Dinobuton	< 0,001	0.01	59	Pirifenox	<0,001	0.05

Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

20	Dinocap	< 0.001	0.01	60	Pirimicarb	0,028	0.05
21	Endosulfan Alfa	< 0.001	0.01	61	Pirimifos metil	< 0,001	0.01
22	Endosulfan Beta	< 0.001	0.01	62	Piriproxifen	< 0,001	0.01
23	Endosulfan sulfato	< 0.001	0.01	63	Propargita	< 0,001	0.01
24	EPTC	< 0.001	0.05	64	Quinalfos	< 0,001	0.01
25	Etiofencarb	0.030	0.05	65	Fluvalinato Tau	< 0,001	0.01
26	Etion	< 0.001	0.01	66	Tebufenpirad	< 0,001	0.01
27	Fernarimol	< 0.001	0.01	67	Terbacillo	< 0,001	0.01
28	Fenazaquin	< 0.001	0.01	68	Tetraconazol	< 0,001	0.01
29	Fenitrion	< 0.001	0.01	69	Triadimenol	< 0,001	0.01
30	Fenoxicarb	< 0.001	0.01	70	Triclorfon	< 0,001	0.05
31	Fention	< 0.001	0.01	71			
32	Fluacifop-butil	< 0.001	0.01	72			
33	Flusilazol	< 0.001	0.01	73			
34	Folpet	< 0.001	0.02	74			
35	Formotion	< 0.001	0.01	75			
36	Fosalone	< 0.001	0.01	76			
37	Fosmet	< 0.001	0.05	77			
38	Hexaconazol	< 0.001	0.01	78			
39	Iprodiona	< 0.001	0.02	79			
40	Isoxaben	< 0.001	0.01				

Certificado emitido por Dpto. Técnico:

D. Pedro de la Fuente

Departamento Técnico

Technical Department

Total or partial reproduction is forbidden without written permission of QUANTUM.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARSENICO MÉTODO A. ATÓMICA HAZ DOBLE EFECTO ZEEMAN

1. OBJETO Y ALCANCE
2. REFERENCIAS
3. GENERALIDADES
4. REALIZACIÓN
5. EQUIPO: ESPECTROFOTÓMETRO DE A.A. VARIAN SPECTRA A-280Z
   - 5.1. Sistema de Corrección de fondo
   - 5.2. Cámara de Grafito Varian modelo GTA-120
   - 5.3. Inyector automático Varian modelo PSD-120
   - 5.4. Cámara de vídeo para Cámara de grafito
   - 5.5. Detector por dispositivo multifocal Tipo R-955
   - 5.6. Generador de vapor Varian modelo VGA-77
   - 5.7. Adaptador VGA/Zeeman SP-220Z/G
   - 5.8. Recirculador de agua VDH modelo MINORE II-VD
6. Argón 5.0

PROCEDIMIENTO:

Pesar 5 g de muestra en un crisol de porcelana y calcinar a 450º C durante 5 horas.
Si las cenizas no estuviesen blancas o grises, se humedece la muestra con agua, se seca a 103º C y se vuelve a calcinar a 450º C 2 horas más.
Repetir esta operación hasta conseguir una ceniza libre de carbón.

Posteriormente se añaden 10 mL de HNO_3 0,1 N al crisol de las cenizas, se calienta ligeramente hasta disolver el residuo.

Se pasa a un matraz aforado de 25 mL.

Se lava el crisol con pequeñas alícuotas de HNO_3 0,1 N hasta enrasar el matraz aforado de 25 mL

DETERMINACIÓN:

Se determina el Arsénico de la disolución por Espectroscopia de Absorción Atómica a una longitud de onda de:

Concentración	Unidades	Longitud de onda	Intensidad lámpara
50	ppb	193,7 nm	50
100	ppb	197,2 nm	100
25	ppb	189,0 nm	54

con atomización electrotérmica y corrector de fondo; cuantificando con patrones externos mediante integración de la señal

Nota.- Para la determinación del Arsénico deben de utilizarse modificadores de Paladio y ácido ascórbico y solución de Niquel.

Método: Arsénico (Zeeman)
Instrument Mode: Absorbance
Sampling Mode: Automix
Calibration Mode: Concentration
Measurement Mode: PROMT Height
Replicates Standard: 3
Replicates Sample: 3
Total Volume: 30 uL
Sample Volume: 20 uL
Vol. Reduction Factor: 5
Bulk Conc.: 25.00 ug/L

Parámetros del Horno

Step	Temp (C)	Time (s)	Flow (L/min)	Gas Type	Read	Signal storage
1	85	5.0	0,3	Normal	No	No
2	95	40.0	0,3	Normal	No	No
3	120	10.0	0,3	Normal	No	No
4	1500	5.0	0,3	Normal	No	No
5	1500	1.0	0,3	Normal	No	No
6	1500	2.0	0,0	Normal	No	Yes
7	2600	0.6	0.0	Normal	Yes	Yes
8	2600	2.0	0,0	Normal	Yes	Yes
9	2600	2.0	0.3	Normal	No	Yes

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CADMIO MÉTODO A. ATÓMICA HAZ DOBLE EFECTO ZEEMAN

1. OBJETO Y ALCANCE
2. REFERENCIAS
3. GENERALIDADES
4. REALIZACIÓN
5. EQUIPO: ESPECTROFOTÓMETRO DE A.A. VARIAN SPECTRA A-280Z
   - 5.1. Sistema de Corrección de fondo
   - 5.2. Cámara de Grafito Varian modelo GTA-120
   - 5.3. Inyector automático Varian modelo PSD-120
   - 5.4. Cámara de vídeo para Cámara de grafito
   - 5.5. Detector por dispositivo multifocal Tipo R-955
   - 5.6. Generador de vapor Varian modelo VGA-77
   - 5.7. Adaptador VGA/Zeeman SP-220Z/G
   - 5.8. Recirculador de agua VDH modelo MINORE II-VD
6. Argón 5.0

PROCEDIMIENTO:

Pesar 5 g de muestra en un crisol de porcelana y calcinar a 450° C durante 5 horas.
Si las cenizas no estuviesen blancas o grises, se humedece la muestra con agua, se seca a 103° C y se vuelve a calcinar a 450° C 2 horas más.
Repetir esta operación hasta conseguir una ceniza libre de carbón.

Posteriormente se añaden 10 mL de HNO_3 0,1 N al crisol de las cenizas, se calienta ligeramente hasta disolver el residuo.

Se pasa a un matraz aforado de 25 mL.

Se lava el crisol con pequeñas alícuotas de HNO_3 0,1 N hasta enrasar el matraz aforado de 25 mL

DETERMINACIÓN:

Se determina el Cadmio de la disolución por Espectroscopia de Absorción Atómica a una longitud de onda de:

Concentración	Unidades	Longitud de onda	Intensidad lámpara
1	ppb	228,8 nm	40
400	ppb	326,1 nm	100

con atomización electrotérmica y corrector de fondo; cuantificando con patrones externos mediante integración de la señal

Nota.- Para la determinación del Arsénico deben de utilizarse modificadores de Fosfato de Amnio monobásico, ácido ortofosfórico, solución dePaladio y ácido ascórbico.

Method: Cadmio (Zeeman)
Instrument Mode: Absorbance
Sampling Mode: Autonormal
Calibration Mode: Concentration
Measurement Mode: PROMT Height
Replicates Standard: 3
Replicates Sample: 3
Total Volume: 15 uL
Sample Volume: 5 uL

Parámetros del Horno

Step	Temp (C)	Time (s)	Flow (L/min)	Gas Type	Read	Signal storage
1	85	5.0	0,3	Normal	No	No
2	95	40.0	0,3	Normal	No	No
3	120	10.0	0,3	Normal	No	No
4	300	5.0	0,3	Normal	No	No
5	300	1.0	0,3	Normal	No	No
6	300	2.0	0,0	Normal	No	Yes
7	1800	0.8	0.0	Normal	Yes	Yes
8	1800	2.0	0,0	Normal	Yes	Yes
9	1800	2.0	0.3	Normal	No	Yes

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO MÉTODO A. ATÓMICA GENERADOR DE HIDRUROS

1. OBJETO Y ALCANCE
2. REFERENCIAS
3. GENERALIDADES
4. REALIZACIÓN
5. EQUIPO: ESPECTROFOTÓMETRO DE A.A. VARIAN SPECTRA A-280Z
   - 5.1. Sistema de Corrección de fondo
   - 5.2. Cámara de Grafito Varian modelo GTA-120
   - 5.3. Inyector automático Varian modelo PSD-120
   - 5.4. Cámara de vídeo para Cámara de grafito
   - 5.5. Detector por dispositivo multifocal Tipo R-955
   - 5.6. Generador de vapor Varian modelo VGA-77
   - 5.7. Adaptador VGA/Zeeman SP-220Z/G
   - 5.8. Recirculador de agua VDH modelo MINORE II-VD
6. Argón 5.0

PROCEDIMIENTO:

Preparación de la muestra

Se pesa 1 g de muestra ± 0,1 en un tubo de digestión..

Se añaden 2,5 mL de ácido nítrico y se agita suavemente, dejando reposar después durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añaden 8 mL de agua destilada, se agita suavemente para homogeneizar la mezcla y se deja reposar durante 5 minutos más para eliminar cualquier tipo de vapor o niebla formada en el tubo, que pueda interferir en el análisis.

Las muestras así preparadas están listas para ser transferidas al recipiente de medida del sistema de producción y arrastre de mercurio.

DETERMINACIÓN:

Se trasvasa el contenido de cada uno de los tubos de digestión correspondientes a blancos, patrones y muestras al recipiente de medida del sistema de producción y arrastre de mercurio e inmediatamente antes de efectuar la determinación se añade 1 mL de cloruro de estaño.

Se hace pasar una corriente de aire de aproximadamente 1 L/ min de caudal por el sistema de producción y arrastre de mercurio. El mercurio elemental, formado por la acción reductora del cloruro de estaño sobre las especies iónicas presentes en la muestra, es liberado de la disolución por el borboteo que produce la corriente de aire en el seno de la muestra y es arrastrado por dicha corriente hasta la celda de medida.

Se determina el Mercurio de la disolución por Espectroscopia de Absorción Atómica/Vapor frío (Generador de Hidruros) a una longitud de onda:

Concentración	Unidades	Longitud de onda	Intensidad lámpara
		253,7 nm	100

Se mide la absorbancia o la altura del pico correspondientes al vapor de mercurio elemental presente en la muestra.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PLOMO MÉTODO A. ATÓMICA HAZ DOBLE EFECTO ZEEMAN

1. OBJETO Y ALCANCE
2. REFERENCIAS
3. GENERALIDADES
4. REALIZACIÓN
5. EQUIPO: ESPECTROFOTÓMETRO DE A.A. VARIAN SPECTRA A-280Z
   - 5.1. Sistema de Corrección de fondo
   - 5.2. Cámara de Grafito Varian modelo GTA-120
   - 5.3. Inyector automático Varian modelo PSD-120
   - 5.4. Cámara de vídeo para Cámara de grafito
   - 5.5. Detector por dispositivo multifocal Tipo R-955
   - 5.6. Generador de vapor Varian modelo VGA-77
   - 5.7. Adaptador VGA/Zeeman SP-220Z/G
   - 5.8. Recirculador de agua VDH modelo MINORE II-VD
6. Argón 5.0

PROCEDIMIENTO:

Pesar 5 g de muestra en un crisol de porcelana y calcinar a 450º C durante 5 horas.
Si las cenizas no estuviesen blancas o grises, se humedece la muestra con agua, se seca a 103º C y se vuelve a calcinar a 450º C 2 horas más.
Repetir esta operación hasta conseguir una ceniza libre de carbón.

Posteriormente se añaden 10 mL de HNO_3 0,1 N al crisol de las cenizas, se calienta ligeramente hasta disolver el residuo.

Se pasa a un matraz aforado de 25 mL.

Se lava en crisol con pequeñas alícuotas de HNO_3 0,1 N hasta enrasar el matraz aforado de 25 mL

DETERMINACIÓN:

Se determina el Plomo de la disolución por Espectroscopia de Absorción Atómica a una longitud de onda de:

Concentración	Unidades	Longitud de onda	Intensidad lámpara
27	ppb	283,3 nm	100
14	ppb	217,0 nm	20
1120	ppb	261,4 nm	30

con atomización electrotérmica y corrector de fondo; cuantificando con patrones externos mediante integración de la señal

Nota.- Para la determinación de Plomo deben de utilizarse modificadores de Paladio, nitrato de magnesio, fosfato amónico, ácido ascórbico.

Método: Plomo (Zeeman)
Instrument Mode: Absorbance
Sampling Mode: Automix
Calibration Mode: Concentration
Measurement Mode: PROMT Height
Replicates Standard: 3
Replicates Sample: 3
Total Volume: 30 uL
Sample Volume: 20 uL
Vol. Reduction Factor: 5
Bulk Conc.: 25.00 ug/L
Modifier 1 Mode: Co Inject
Modifier 1 Vol.: 5 uL
Modifier 2 Mode: Co Inject
Modifier 2 Vol.: 5 uL

Parámetros del Horno

Step	Temp (C)	Time (s)	Flow (L/min)	Gas Type	Read	Signal storage
1	85	5.0	0,3	Normal	No	No
2	95	50.0	0,3	Normal	No	No
3	120	10.0	0,3	Normal	No	No
4	600	5.0	0,3	Normal	No	No
5	600	2.1	0,3	Normal	No	No
6	600	2.1	0,0	Normal	No	Yes
7	2100	0.9	0.0	Normal	Yes	Yes
8	2100	2.0	0,0	Normal	Yes	Yes
9	2100	2.0	0.3	Normal	No	Yes

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ALCOHOLES POR CROMATOGRAFIA DE GASES / MS / MS (Impacto electrónico)

1. OBJETO Y ALCANCE
2. REFERENCIAS
3. GENERALIDADES
4. REALIZACIÓN

1. OBJETO Y ALCANCE

Método para determinar mediante cromatografía de gases, la presencia de alcoholes: metanol, etanol, n-hexano, acetona, isopropanol, etanol, 2-metíl-2- propanol, 2-butanol, 2 metil-2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-pentanol, 1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-pentanol; Según la normativa ISO 3696/1987.

2. REFERENCIAS

Método validado según norma ISO 3696 y Resultados estadísticos interlaboratorios ISO 17025.

3. GENERALIDADES

La presencia de alcoholes se determina mediante la adición a la muestra pura o previamente diluida un patrón interno (pentan-3-ol) y se detectan mediante detector de masas / masas impacto electrónico

Nota: Conservar el patrón a una temperatura inferior a 5º C

4. REALIZACIÓN

a) Pesar 2 g de muestra ± 0,1 mg.
b) Echar a un vial 10 mL 2 g de muestra ± 0,1 mg, y 5 mL de cloruro sódico al 3% y adicionar 100 µL de 100 ppm del patrón interno (pentan-3-ol).
c) Homogenizar bien la muestra y posteriormente ultrasonicar durante 10 minutos.

d) Mantener la solución a 65° C ± 1° C durante 30 min y posteriormente inyectar 5 µL de la fase gaseosa mediante espacio en cabeza.

5. EQUIPO - CROMATÓGRAFO DE GASES VARIAN CP-3800

- Detectores:
  MS/MS (Ionización Química e Impacto Electrónico)
- Columna: Carbowax (30 x 0,25 x 0,25 i.d.)
- Inyector Automático COMBIPAL
  a) Inyección Espacio en cabeza con termostización

Bombona He 5.0 para cromatografía
Bombona de N_2 5.0 para cromatografía
Bombona de H_2 5.0 para cromatografía
Bombona de Aire sintético para cromatografía
Material de uso general en el laboratorio físico-químico.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE AFLATOXINAS POR INMUNOENSAYO

1. OBJETO Y ALCANCE

Las aflatoxinas están producidas principalmente por algunas cepas de ***Aspergillus flavus*** y por la mayoría, si no todas las cepas de ***Aspergillus parasiticus***. Hay cuatro aflatoxinas principales, B_1, B_2, G_1, y G_2, más dos adicionales con también importancia: M_1 y M_2, Los principales productos contaminados con , B_1, B_2, G_1, y G_2 son Cacahuetes, maíz, trigo, arroz, semillas de algodón, copra, frutos secos, pimentón. Las toninas M tienen mayor importancia en la industria láctea y afectan a la leche, huevos y quesos.

El contenido máximo de aflatoxinas en los productos alimenticios se fija en el reglamento (CE) nº 1258/98 de la Comisión de 16 de julio de 1.998 (Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 17.07.98).

2. REFERENCIAS

El test ELISA es un método basado en una cantidad conocida de anticuerpo que reacciona sólo contra la aflatoxina y permite la determinación rápida de la presencia de aflatoxinas hasta 0,5 ppb.

3. GENERALIDADES

Método que permite la detección de aflatoxinas en muestras de alimentos, piensos, cereales, plantas, etc.

4. EQUIPOS Y MATERIAL

- Molinillo triturador muestra
- Micropipeta y puntas de pipeta (100 µl)
- Tubos ensayo (12x75 mm)
- Probetas de 100 mL
- Metanol puro
- Agua desionizada
- Reloj cronómetro.
- Filtros
- Embudo
- Vaso precipitados

5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Pesar 25 g de muestra ± 0,1 g
- Extracción de la muestra con 100 mL de $MeOH/H_2O$ (80:20).
- Agitar con minipimer durante 3 minutos.
- Filtrar.
- Diluir la muestra 1:3 (1 mL del extracto + 2 mL de solución tampón.
- Posteriormente adicionar el enzima (tiempo1 minuto), transcurrido el minuto, añadir 20 mL de la solución sustrato (tiempo1 minuto).

6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Azul claro	0	ppb
- Azul tenue	1	ppb
- Indicios color	1,5	ppb
- Blanco	> 2	ppb.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS, ORGANOFOSFORADOS Y OTROS COMPUESTOS MÉTODO CROMATOGRAFÍA DE GASES MASAS/ MASAS POR IONIZACIÓN QUÍMICA E IMPACTO ELECTRÓNICO (identificación compuesto por la masa y el ión correspondiente)

1. DEFINICIÓN
2. LÍMITES
3. MÉTODO ANÁLISIS

    1. Extracción
    2. Purificación
    2. Condiciones cromatograficas

4. EQUIPOS Y MATERIALES

COPIA:
- ❒ Controlada Nº
- ❒ No Controlada Nº

ASIGNADA A:

FECHA:

1. DEFINICIÓN

Para los fines de la Farmacopea, se considera un pesticida toda sustancia o asociación de sustancias que se destine a rechazar, destruir o combatir las plagas y las especies no deseadas de plantas y de animales, que causan daños o resultan perjudiciales para la producción, la transformación, el almacenaje, el transporte o la comercialización de las sustancias medicinales de origen vegetal. El término incluye las sustancias destinadas a la regulación del crecimiento de las plantas, los agentes agentes defoliantes, los agentes desecantes y los productos aplicados a los cultivos, sea antes o después de la cosecha, para proteger los productos frente al deterioro durante el almacenaje y el transporte.

2. LÍMITES

Salvo indicación contraria en la monografía, la droga a examinar satisface como mínimo los límites **Legislación española (mayo 2003). Revisión mayo (2003) Lista jerárquica de productos.**

Código	Producto
01	Frutas frescas,desecadas o sin cocer;congeladas...
0101	Citricos
010101	Pomelos
010102	Limones
010103	Limas
010104	Mandarinas (incl. clementinas e hibridos)
010105	Naranjas
010106	Toronjas
010107	Otros citricos
0102	Frutos con o sin cascara
010201	Almendras
010202	Nueces del brasil
010203	Castañas
010204	Cocos
010205	Avellanas
010206	Macadamia
010207	Pacanas
010208	Piñones
010209	Pistachos
010210	Nueces comunes
010211	Otros frutos con o sin cascara
0103	Frutos de pepita
010301	Manzanas

010302	Peras
010303	Membrillos
010304	Nisperos
010305	Otros frutos de pepita
0104	Frutos de hueso
010401	Albaricoques
010402	Cerezas
010403	Melocotones(incl. las nectarinas e hibridos)
010404	Ciruelas
010405	Otros frutos de hueso
0105	Bayas y frutas pequeñas
010501	Uvas de mesa y vinificacion
01050101	Uvas de mesa
01050102	Uvas de vinificacion
010502	Fresas (distintas de silvestres)
010503	Frutas de caña(distintas de las silvestres)
01050301	Zarzamoras
01050302	Moras articas
01050303	Moras-frambuesas
01050304	Frambuesas
01050305	Otras frutas de caña
010504	Otras bayas y frutas pequeñas(distintas de silves)
01050401	Mirtilos
01050402	Arandanos
01050403	Grosellas
01050404	Grosellas espinosas
01050405	Otras bayas y frutas pequeñas.otros
010505	Bayas y frutas silvestres
0106	Otras frutas
010601	Aguacates
010602	Platanos
010603	Datiles
010604	Higos
010605	Kiwis
010606	Kumquats
010607	Lichis
010608	Mangos
010609	Aceitunas
010610	Frutos de la pasion
010611	Piñas
010612	Granadas
010613	Chirimoyas
010614	Otras frutas.otros
010615	Aceituna para producción de aceite
010616	Papaya
02	Hortalizas frescas o sin cocer cong. o desecadas
0201	Raices y tuberculos
020101	Raices

02010101	Remolacha
02010102	Zanahorias
02010103	Apionabos
02010104	Rabanos rusticanos
02010105	Chirivias
02010106	Perejil
02010107	Rabanos
02010108	Salsifies
02010109	Colinabos
02010110	Nabos
02010111	Otras raices
020102	Tubérculos
02010201	Patacas
02010202	Boniatos
02010203	Ñames
02010204	Otros tuberculos
0202	Bulbos
020201	Ajos
020202	Cebollas
020203	Chalotes
020204	Cebolletas
020205	Otros bulbos
0203	Frutos y peponides
020301	Solanaceas
02030101	Tomates
02030102	Pimientos
02030103	Berenjenas
02030104	Otras solanaceas
02030105	Pimientos picantes
020302	Cucurbitaceas de piel comestible
02030201	Pepinos
02030202	Pepinillos
02030203	Calabacines
02030204	Otras cucurbitaceas piel comestible
020303	Cucurbitaceas de piel no comestible
02030301	Melones
02030302	Calabazas
02030303	Sandias
02030304	Otras cucurbitaceas piel no comestible
020304	Maiz dulce
0204	Hortalizas del genero brassica
020401	Inflorescencias
02040101	Brecoles
02040102	Coliflores
02040103	Otras inflorescencias
020402	Cogollos
02040201	Coles de bruselas
02040202	Repollos

02040203	Otros cogollos
020403	Hojas - coles
02040301	Coles de china
02040302	Berzas
02040303	Otras coles de hoja
020404	Colirrabanos
0205	Hortalizas de hoja y hierbas aromaticas
020501	Lechugas y similares
02050101	Berros
02050102	Canonigos
02050103	Lechugas
02050104	Escarolas
02050105	Otras lechugas y similares
020502	Espinacas y similares
02050201	Acelgas
02050202	Espinacas
020503	Berros de agua
020504	Endibias
020505	Hierbas aromaticas
02050501	Perifollos
02050502	Cebollinos
02050503	Perejil raiz
02050504	Hojas de apio
02050505	Otras hierbas aromaticas
0206	Leguminosas verdes (frescas)
020601	Judias (con vaina)
020602	Judias (sin vaina) incluye habas
020603	Guisantes (sin vaina)
020604	Guisante con vaina
020605	Otras leguminosas verdes
0207	Tallos jovenes
020701	Esparragos
020702	Cardos comestibles
020703	Apios
020704	Hinojos
020705	Alcachofas
020706	Puerros
020707	Ruibarbo
020708	Otros tallos jovenes
020709	Borraja
0208	Hongos y setas
020801	Setas cultivadas
020802	Setas silvestres
03	Legumbres secas
0301	Judias
0302	Lentejas
0303	Guisantes
0304	Garbanzos

0305	Otras legumbres
04	Semillas oleaginosas y otras
0401	Semillas oleaginosas
040101	Semillas de lino
040102	Cacahuetes
040103	Semillas de adormidera
040104	Semillas de sésamo
040105	Semillas de girasol
040106	Semillas de colza
040107	Habas de soja
040108	Mostaza
040109	Semillas de algodon
040110	Otras semillas oleaginosas
040111	Semillas de girasol con cascara
0402	Otras semillas de consumo
040201	Cacao en grano
040202	Café en grano
040203	Nuez de cola
05	Patatas
0501	Patatas tempranas
0502	Patatas para almacenar
06	Te y otras infusiones
0601	Te(hojas y tallos desecados de camelia sinensis)
0602	Otras infusiones
07	Lupulos (desecados)incl.los granulados y polvo
08	Especias
09	Cereales
0901	Trigo
0902	Centeno
0903	Cebada
0904	Avena
0905	Triticale
0906	Arroz
0907	Maiz
0908	Sorgo-grano
0909	Otros cereales
0910	Arroz cáscara
0911	Arroz descascarillado
0912	Alforfón
0913	Mijo
0914	Arroz pulido
10	Otros productos de consumo
1001	Tabaco
1002	Remolacha azucarera
1003	Caña de azucar
1004	Otros productos de consumo. otros
11	Forrajes y pajas
1101	Alfalfa y otras leguminosas

1102	Maiz y sorgo forrajeros
1103	Forraje de gramineas
1104	Hojas y coronas de remolacha
1105	Paja de cereales
1106	Paja de legumbres
1107	Otros forrajes y pajas
12	Varios
1201	Productos desecados
120101	Pasas de uva
120102	Ciruelas pasas
120103	Higos secos
120104	Orejones de melocoton
120105	Orejones de albaricoque
120106	Datiles secos
120107	Pimientos desecados
120108	Tomates desecados

3. MÉTODO ANÁLISIS RESIDUOS PESTICIDAS

1. Extracción

Poner en maceración 10 g de la droga a examinar, en 100 mL de *acetona R* durante 20 minutos. Adicionar 1 mL de una disolución de 1,8 µg de *Carbofenotión R en tolueno R*. Homogenizar con ayuda de un mezclador rápido durante 3 minutos. Filtar y lavar el filtro y su contenido con 2 porciones de 25 mL de *acetona R*. Reunir el filtrado y los disolventes de lavado y evaporar hasta casi sequedad utilizando un evaporador rotatorio, a una temperatura no superior a 40º C. Adicionar algunos mL de *tolueno R* y evaporar de nuevo, hasta eliminar por completo la acetona. Disolver el residuo en 8 mL de *tolueno R*. Filtrar por un filtro de 45 µm, enjuagar el matraz y el filtro con *tolueno R* y completar hasta 10 mL con el mismo *acetona R*.

2. Purificación de la muestra

Acondicionamiento del cartucho C18

a) Lavar el cartucho C18 con 6 mL de agua destilada PAI, en fracciones de 2 mL cada una de ellas evitando que quede a sequedad.
b) Posteriormente lavar el C18 con 18 mL de metanol PAI, en fracciones de 6 mL cada una de ellas evitando que quede a sequedad.

Nota.- La elución del agua y posteriormente el metanol deberá de efectuarse lentamente 1 mL por minuto.

c) Posteriormente adicionar los 10 mL del extracto y eluir lentamente. Una vez eluída toda la muestra y evitando que el cartucho C18 quede a sequedad, lavar el mismo con 6 mL de agua destilada PAI en fracciones de 2 mL cada una de ellas evitando que quede a sequedad, despreciando el agua.
d) Posteriormente eluír el analíto retenido en el cartucho C18 con 18 mL de n-Hexano PAI, en fracciones de 6 mL cada una de ellas evitando que quede a sequedad.
e) Recoger los 18 mL de n-Hexano en un matraz de pera.
f) Rotavaporar los 18 mL de n-Hexano a sequedad y rehacer con 1,8 mL de n_hexano.

3. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

PESTICIDAS ORGANOCLORADOS, ORGANOFOSFORADOS Y OTROS COMPUESTOS

- Temperatura Inyector	250º C
- Detector Rango de masas	40-650
- Identificación pesticidas:	Ión y Masa compuesto
- Temperatura Horno	70ºC tº x 8 minutos.
- Rampa	25º C / min hasta 180º C-300ºC x 4 min.
- Modo trabajo	IE / IC
- Volumen inyectado	10 µL
- Flujo columna	1 mL/minuto
- Gas relleno	26 cm/minuto
- Gas Helio 5.0	60 cm/minuto

4. EQUIPOS Y MATERIAL

Pipetas de 1 mL estériles código
Pipetas de 2 mL estériles código
Pipetas de 5 mL estériles código
Estufa de cultivo regulada a 103º C ± 1º C.
Placa calefactora
Campana de gases CRUMAIR
pHMETRO
Congelador LIEBHERR - 25º C.
Jeringuillas de 100 µL

Puntas de pipetas de 1 mL estériles
Cartuchos C8 y C18
AGIMATIC N
Centrifuga MIXTASEL
Granatorio

CROMATÓGRAFO DE GASES VARIAN CP-3800

- Detectores:
  MS/MS (Ionización Química e Impacto Electrónico)
  FID
  TSD
- Columna: DB-5 (60 x 0,25 x 0,25 i.d.)
- Inyector Automático COMBIPAL
  a) Inyección muestras líquidas
  b) Inyección Espacio en cabeza con termostización
  c) Inyección grandes volúmenes
  d) Microextracción en fase sólida

Bombona He 5.0 para cromatografía
Bombona de N_2 5.0 para cromatografía
Bombona de H_2 5.0 para cromatografía
Bombona de Aire sintético para cromatografía
Material de uso general en el laboratorio físico-químico.

5. LÍMITES DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Límite de Detección	≤ 0,001 ppm
Límite de Cuantificación	≤ 0,002 ppm

PESTICIDAS ORGANOCLORADOS, ORGANOFOSFORADOS Y OTROS COMPUESTOS

		Ión Quant	ppm	Límite ppm			Ión Quant	Resulta ppm	Límite ppm
1	Alaclor	132.0	< 0,001	0,02	43	Azinfos metílo	132.0	< 0,001	1,00
2	Aldrin	191.0:193.0	< 0,001	0,05	44	Carbofenotión	199.0	< 0,001	0,02
3	Bromopropilato	181.0:187:0	< 0,001	3,00	45	Clorpirifos	258.0	< 0,001	0,20
4	Clordane técnico	264.0:303.0	< 0,001	0,05	46	Clorpirifos-metilo	207.9	< 0,001	0,10
[illegible]	Clordane-cis-alfa	299.0:303.0	< 0,001	0,05	47	Diazinon	179.0	< 0,001	0,50
[illegible]	Clordane-trans-gamma	264.0:266.0	< 0,001	0,05	48	**Diclorvos**	144.9	< 0,001	1,00
7	Clorfenvinfos	159.0	< 0,001	0,50	49	Etión	174.8	< 0,001	2,00
8	**Cipermetrina técnica**	152.0	< 0,001	1,00	50	Fonofos	136.8	< 0,001	0,05
9	DDT técnico	165.0	< 0,001	1,00	51	Fosalona	181.9	< 0,001	0,10
10	Deltametrina	172.0:174.0	< 0,001	0,50	52	**Malatión**	98.9	< 0,001	1,00
11	Dieldrin	204.0:206.0	< 0,001	0,05	53	Metidatión	85.0	< 0,001	0,20
12	Endosulfan (alfa + beta)	263.0:269.0	< 0,001	3,00	54	Paratión-etil	234.9	< 0,001	0,50
13	Endrin	243.0:245.0	< 0,001	0,05	55	Paratión-metilo	136.0	< 0,001	0,20
14	Fenitotrión	125.0	< 0,001	0,50	56	Piperonilo butoxido	117.0	< 0,001	3,00
15	Fenotrin	168.0	< 0,001	0,05	57	Pirimifos-metíl	150.9	< 0,001	0,05
16	Fenvalerato	119.0	< 0,001	1,50	58	Pirinfos-etil	182.0	< 0,001	4,00
17	Heptaclor	235.0:237.0	< 0,001	0,05	59	Pirinfos-metilo	150.9	< 0,001	4,00
18	Heptaclor-endo-epoxido-trans	253.0	< 0,001	0,05	60	Triadimonol	168.0	< 0,001	0,05
19	Heptaclor-exo-epoxido	263.0	< 0,001	0,05	61	Carbaryl	144.0	< 0,001	0,10
20	Hexaclorobenceno	142.0:144.0	< 0,001	0,10	62	Carbofuran	164.0	< 0,001	0,10
21	alfa-beta-delta-gamma HCH	181.0:183.0	< 0,001	0,30	63	Dimethoate	125.0	< 0,001	0,02
22	HCH-(BHC) técnico	181.0:183.0	< 0,001	0,60	64	Methiocarb	168.0	< 0,001	0,05
23	**Permetrina**	165.0	< 0,001	1,00	65	Mexacarbate	150:165.0	< 0,001	0,05
24	**Piretrinas**	152.0	< 0,001	3,00	66	Proposur	110.0	< 0,001	0,05
25	Tetrametrina	77.0+91	< 0,001	1,00	67	Aminocarb	152.0	< 0,001	0,05
26	Quintoceno	265.0	< 0,001	1,00	68	Carbaryl	144.0	< 0,001	0,10
[illegible]	Azinphos-ethyl	132.0	< 0,001	0,05	69	Aldicarb	λ 205.2	< 0,001	0,05
[illegible]	Bifenthrin	181.0	< 0,001	0,05	70	Asulam	λ 202.0	< 0,001	0,05
29	Bromophos-ethyl	359.0	< 0,001	0,05	71	Dimetilan	λ 205.2	< 0,001	0,05
30	Bromophos-methyl	331.0	< 0,001	0,05	72	Methomyl	λ 205.0	< 0,001	0,05
31	Buprofezin	175.0	< 0,001	0,05	73	Oxamyl	λ 205.2	< 0,001	0,05
32	Captan	79.0	< 0,001	0,05					
33	Chlorfenvinphos	267.0:269.0	< 0,001	0,05					
34	Etrimfos	181.0	< 0,001	0,05					
35	Mecarbam	227.0	< 0,001	0,10					
36	Mevinphos	127.0	< 0,001	0,30					
37	Profenofos	339.0	< 0,001	0,05					
38	Quinalphos	146.0	< 0,001	1,00					
39	Thiazophos	257.0	< 0,001	3,00					
40	Dicofol o'p'	139.0	< 0,001	1,00					
41	Dicofol p.p'	139.0	< 0,001	1,00					
42	Tetradifom	354.0:358.0	< 0,001	0,05					

B) **DICTAMEN:** La muestra **CUMPLE** según la Real Farmacopea Española.
(Procesamiento según técnica y metodología descrita en la Pharmacopea Europea III)
La muestra analizada cumple con los requisitos de la Farmacopea Europea III y de la Real Farmacopea Española

5.4. DISOLVENTES RESIDUALES

5.4. Disolventes residuales 565

01/2005, 50400

5.4. DISOLVENTES RESIDUALES

ESTABLECIMIENTO DE LÍMITES PARA LOS NIVELES DE DISOLVENTES EN SUSTANCIAS ACTIVAS, EXCIPIENTES Y PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

La Conferencia Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Medicamentos para Uso Humano (ICH) ha adoptado unas directrices sobre Impurezas aplicadas a Disolventes Residuales que prescriben límites al contenido de disolventes que pueden permanecer en sustancias activas, excipientes y productos farmacéuticos después de su procesado. Estas directrices, cuyo texto se reproduce a continuación, excluyen los productos ya comercializados. Sin embargo, la Farmacopea Europea está aplicando los mismos principios a sustancias activas, excipientes y productos farmacéuticos ya existentes, sean o no objeto de una monografía en la Farmacopea. Todas las sustancias y productos deben ensayarse para determinar el contenido de los disolventes que tengan mayor probabilidad de estar presentes en la sustancia o producto.

Cuando los límites que se aplican satisfacen los dados a continuación, en general los ensayos de disolventes residuales no se mencionan en las monografías específicas debido a que los disolventes empleados pueden variar de un fabricante a otro y los requisitos de este capítulo general se aplican por medio de la monografía general *Sustancias para uso farmacéutico* (*2034*). Por tanto, la autoridad competente deberá ser informada sobre los disolventes empleados durante el proceso de producción. Esta información se dará también en la documentación presentada para los certificados de idoneidad de las monografías de la Farmacopea Europea, y se menciona en el certificado.

Cuando en el proceso de producción se emplean solamente disolventes de la Clase 3, puede aplicarse un ensayo de pérdida por desecación o puede efectuarse una identificación específica del disolvente. Si un disolvente de Clase 3 tiene un límite superior al 0,5 por ciento, que haya sido justificado y autorizado, es necesaria una determinación específica de ese disolvente.

Cuando se emplean disolventes residuales de Clase 1 o Clase 2 (o Clase 3, cuando exceden el 0,5 por ciento), debe aplicarse, siempre que sea posible, la metodología que se describe en el método general (*2.4.24*). Si no es así, se empleará un método apropiado y validado.

Cuando se efectúa una determinación cuantitativa de un disolvente residual, el resultado se tiene en cuenta para el cálculo de contenido de la sustancia excepto cuando se realiza un ensayo de desecación.

IMPUREZAS: DIRECTRICES SOBRE DISOLVENTES RESIDUALES

(CPMP/ICH/283/95)

1. INTRODUCCIÓN

2. ÁMBITO DE ESTAS DIRECTRICES

3. PRINCIPIOS GENERALES

3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS DISOLVENTES RESIDUALES EN FUNCIÓN DE LA VALORACIÓN DE SU RIESGO

3.2. MÉTODOS PARA ESTABLECER LÍMITES DE EXPOSICIÓN

3.3. POSIBILIDADES PARA DESCRIBIR LÍMITES PARA LOS DISOLVENTES DE CLASE 2

3.4. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

3.5. INFORMACIÓN DE LOS LÍMITES DE LOS DISOLVENTES RESIDUALES

4. LÍMITES DE DISOLVENTES RESIDUALES

4.1. DISOLVENTES QUE DEBEN EVITARSE

4.2. DISOLVENTES CUYO USO DEBE LIMITARSE

4.3. DISOLVENTES CON POCOS EFECTOS TÓXICOS

4.4. DISOLVENTES PARA LOS QUE NO SE HAN ENCONTRADO DATOS TOXICOLÓGICOS ADECUADOS

GLOSARIO

APÉNDICE 1. LISTA DE DISOLVENTES INCLUIDOS EN ESTAS DIRECTRICES

APÉNDICE 2. INFORMACIÓN BÁSICA ADICIONAL

A2.1.: LEGISLACIÓN MEDIOAMBIENTAL SOBRE DISOLVENTES ORGÁNICOS VOLÁTILES

A2.2.: DISOLVENTES RESIDUALES EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

APÉNDICE 3. MÉTODOS PARA ESTABLECER LÍMITES DE EXPOSICIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de estas directrices es recomendar cantidades de disolventes residuales en productos farmacéuticos que sean aceptables para la seguridad del paciente. Dichas directrices recomiendan el uso de los disolventes menos tóxicos y describen niveles que se consideran aceptables desde el punto de vista toxicológico para algunos disolventes residuales.

Los disolventes residuales en productos farmacéuticos se definen aquí como productos químicos orgánicos volátiles que se utilizan o son producidos durante la fabricación de principios activos o excipientes o en la preparación de productos farmacéuticos. Los disolventes no son eliminados completamente por las técnicas prácticas de fabricación. Una selección apropiada del disolvente durante la síntesis del principio activo puede incrementar el rendimiento, o determinar características tales como la forma de los cristales, la pureza o la solubilidad. Por tanto, el disolvente puede ser algunas veces un parámetro crítico en el proceso de síntesis. Estas directrices no se refieren a disolventes que se utilicen deliberadamente como excipientes, ni tampoco a los solvatos. Sin embargo, el contenido de disolventes de estos productos debe ser evaluado y justificado.

Puesto que los disolventes residuales no producen ningún beneficio terapéutico, deben ser eliminados en lo posible para satisfacer las exigencias del producto, las prácticas de buena fabricación u otros requisitos relacionados con la calidad. Los productos farmacéuticos no deben contener niveles de disolventes residuales superiores a lo recomendado por los datos de inocuidad. Algunos disolventes de los que se saben que causan toxicidades inaceptables (Clase 1, Tabla 1) deben ser evitados en la producción de principios activos, excipientes o productos farmacéuticos a menos que su uso pueda ser adecuadamente justificado en función de la relación beneficio-toxicidad. Algunos disolventes con toxicidad menos grave (Clase 2, Tabla 2) deben limitarse para proteger a los pacientes de efectos adversos potenciales. Idealmente, deben utilizarse disolventes menos tóxicos (Clase 3, Tabla 3), siempre que sea posible en la práctica. La lista completa de los disolventes incluidos en estas directrices se encuentra en el Apéndice 1.

Estas listas no son exhaustivas, y existen otros disolventes que pueden ser utilizados y que se añadirán en su momento a las listas. Los límites recomendados de los disolventes de Clase 1 y Clase 2, o la clasificación de los disolventes, pueden variar a medida que se disponga de nuevos datos de inocuidad. Los datos de inocuidad que puedan utilizarse en una solicitud de registro para un nuevo producto farmacéutico que contenga un nuevo disolvente pueden basarse en conceptos incluidos en estas directrices o en el concepto de calificación de impurezas, tal y como se expresan en las directrices para principios activos (*Q3A*, Impurezas en Nuevos Principios Activos), productos farmacéuticos (*Q3B*, Impurezas en Nuevos Productos Farmacéuticos) o en las tres directrices.

2. ÁMBITO DE ESTAS DIRECTRICES

Estas directrices se ocupan de los disolventes residuales en principios activos, excipientes y en productos farmacéuticos. Por tanto, deben realizarse ensayos de disolventes residuales cuando se sepa que los procesos de producción y purificación tienen como consecuencia la presencia de dichos disolventes. Únicamente es necesario ensayar los disolventes que se utilizan o son producidos durante la fabricación o purificación de principios activos, excipientes o productos farmacéuticos. Aunque los fabricantes pueden decidir realizar los ensayos en el producto farmacéutico, puede emplearse un método acumulativo que permita calcular los niveles de disolventes residuales en el producto farmacéutico a partir de los niveles presentes en los principios activos utilizados para producir el producto farmacéutico. Si este cálculo da unos niveles iguales o inferiores a los recomendados en estas directrices, no es necesario realizar ensayos de disolventes residuales en el producto farmacéutico. Si el nivel calculado es superior al recomendado, deben realizarse ensayos en el producto farmacéutico para comprobar si el proceso de formulación ha reducido los niveles de disolventes a un nivel aceptable. También deben realizarse ensayos en el producto farmacéutico si se utiliza un disolvente en su fabricación.

Estas directrices no son de aplicación a nuevos principios activos, excipientes o productos farmacéuticos utilizados durante las etapas clínicas de desarrollo, ni tampoco a productos farmacéuticos ya comercializados.

Estas directrices se aplican a todas las formas farmacéuticas y vías de administración. Pueden ser aceptables niveles más altos de disolventes residuales en tratamientos breves (30 días o menos) o en el caso de la aplicación por vía tópica. Estos niveles deberán justificarse caso por caso.

Véase el Apéndice 2 para encontrar más información de tipo básico relacionada con los disolventes residuales.

3. PRINCIPIOS GENERALES

3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS DISOLVENTES RESIDUALES EN FUNCIÓN DE LA VALORACIÓN DE SU RIESGO

La expresión «ingesta diaria tolerable» (TDI) es utilizada por el Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS) para describir los límites de exposición a productos químicos tóxicos y la Organización Mundial de la Salud (OMS) y otros institutos de salud nacionales e internacionales utilizan para este mismo concepto la expresión «ingesta diaria aceptable» (ADI). La nueva expresión «exposición diaria permitida» (PDE) se define en las presentes directrices como una ingesta farmacéuticamente aceptable de disolventes residuales para evitar la confusión con los diferentes valores de ADI para una misma sustancia.

En el Apéndice 1 se da una lista de los disolventes residuales incluidos en estas directrices por sus nombres comunes y sus estructuras. Se ha evaluado su posible riesgo para la salud humana y se han incluido en una de las tres categorías que siguen:

Disolventes de Clase 1: Disolventes que deben evitarse

> Carcinógenos humanos conocidos, sustancias de las que existen fuertes sospechas de ser carcinógenos humanos y sustancias que producen problemas medioambientales.

Disolventes de Clase 2: Disolventes cuyo uso debe limitarse

> Sustancias carcinógenas para animales que no sean genotóxicas o sustancias que tengan posibilidades

de causar otros daños irreversibles, como neurotoxicidad o teratogenia.

Disolventes de los que se tiene la sospecha de otras toxicidades importantes pero reversibles.

Disolventes de Clase 3: Disolventes con pocos efectos tóxicos

Disolventes con pocos efectos tóxicos para el hombre, para los que no se necesita establecer un límite de exposición por motivos de salud. Los disolventes de Clase 3 tienen valores de PDE de 50 mg al día, o más.

3.2. MÉTODOS PARA ESTABLECER LÍMITES DE EXPOSICIÓN

El método empleado para establecer los límites diarios de exposición a disolventes residuales se explica en el Apéndice 3. Se han publicado resúmenes de los datos de toxicidad que se utilizaron para establecer los límites en *Pharmeuropa*, vol. 9, n.º 1, suplemento, abril de 1997.

3.3. POSIBILIDADES PARA DESCRIBIR LÍMITES PARA LOS DISOLVENTES DE CLASE 2

Existen dos opciones a la hora de establecer límites para los disolventes de Clase 2.

Opción 1: Pueden emplearse los límites de concentraciones, en ppm, que se indican en la Tabla 2. Se han calculado utilizando la ecuación (1) que se da a continuación, suponiendo que la administración diaria es de 10 g de producto.

$$\text{Concentración (ppm)} = \frac{1000 \times \text{PDE}}{\text{dosis}} \qquad (1)$$

PDE se expresa en mg/día y la dosis se da en g/día.

Estos límites se consideran aceptables para todas las sustancias, excipientes y productos. Por tanto, puede emplearse esta opción si la dosis diaria es desconocida o es fija. Si todos los excipientes y principios activos de una formulación satisfacen los límites de la Opción 1, dichos componentes pueden emplearse en cualquier proporción. No son necesarios más cálculos, suponiendo que la dosis diaria no exceda los 10 g. Para los productos que se administran a dosis superiores a 10 g por día, debe emplearse la Opción 2.

Opción 2: No se considera necesario que cada uno de los componentes de un producto farmacéutico satisfaga los límites de la Opción 1. Puede utilizarse la PDE en mg/día, tal y como se indica en la Tabla 2, junto con la dosis máxima diaria, que es conocida, y la ecuación (1) indicada anteriormente para determinar la concentración de disolvente residual permitida en un producto farmacéutico. Los límites así obtenidos se consideran aceptables si se demuestra que se ha alcanzado el mínimo nivel de disolvente residual que es posible en la práctica. Los límites deben ser realistas en lo que se refiere a la precisión de los métodos analíticos, la capacidad de fabricación y la posibilidad de introducir variaciones razonables en el proceso de fabricación. Los límites deben reflejar el estado actual de las técnicas de fabricación.

Puede aplicarse la Opción 2 añadiendo las cantidades de disolvente residual presentes en cada uno de los componentes de un producto farmacéutico. La suma de las cantidades diarias de disolvente debe ser inferior al valor indicado por la PDE.

Consideremos un ejemplo de aplicación de las Opciones 1 y 2 al establecimiento de límites para el acetonitrilo en un producto farmacéutico. La exposición diaria permitida al acetonitrilo es de 4,1 mg por día; por tanto, el límite en la Opción 1 es 410 ppm. La dosis máxima diaria de un determinado producto farmacéutico, que contiene dos excipientes, es 5,0 g. La composición de dicho producto y el contenido máximo calculado de acetonitrilo residual se indican en la siguiente tabla:

Componente	Cantidad en la formulación	Contenido de acetronitrilo	Exposición diaria
Principio activo	0,3 g	800 ppm	0,24 mg
Excipiente 1	0,9 g	400 ppm	0,36 mg
Excipiente 2	3,8 g	800 ppm	3,04 mg
Productos farmacéuticos	5,0 g	728 ppm	3,64 mg

El excipiente 1 satisface el límite de la Opción 1, pero el principio activo, el excipiente 2 y el producto farmacéutico no cumplen el límite de la Opción 1. No obstante, el producto cumple el límite de la Opción 2 (4,1 mg por día), por lo cual satisface las recomendaciones de las presentes directrices.

Consideremos un segundo ejemplo utilizando el acetonitrilo como disolvente residual. La dosis máxima diaria de un producto farmacéutico es 5,0 g, y el producto contiene dos excipientes. La composición de dicho producto y el contenido máximo calculado de acetonitrilo residual se indican en la siguiente tabla:

Componente	Cantidad en la formulación	Contenido de acetronitrilo	Exposición diaria
Principio activo	0,3 g	800 ppm	0,24 mg
Excipiente 1	0,9 g	2000 ppm	1,80 mg
Excipiente 2	3,8 g	800 ppm	3,04 mg
Productos farmacéuticos	5,0 g	1016 ppm	5,08 mg

En este ejemplo el producto no satisface los límites de la Opción 1 ni de la Opción 2. El fabricante podría estudiar el producto farmacéutico para determinar si el proceso de formulación redujo el nivel de acetonitrilo. Si no fue así, el fabricante debe tomar otras medidas para reducir el nivel de acetonitrilo en el producto farmacéutico. Si fallan todas esas medidas, el fabricante, en casos excepcionales, puede presentar un resumen de todos los intentos realizados para reducir el nivel de disolvente, así como un estudio de la relación riesgo-beneficio para justificar el empleo del producto con un nivel superior de disolventes residuales.

3.4. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Los disolventes residuales se determinan normalmente por técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases.

Si es posible, debe emplearse cualquier procedimiento armonizado para la determinación de disolventes residuales, como los descritos en las Farmacopeas. Si esto no es posible, los fabricantes tienen libertad para elegir el método analítico validado que consideren más apropiado para una aplicación determinada. Si sólo están presentes disolventes de Clase 3, puede emplearse un ensayo inespecífico, como la pérdida de masa por desecación.

La validación de métodos para la determinación de disolventes residuales debe adaptarse a las directrices de ICH, tituladas «Texto sobre la Validación de Procedimientos Analíticos» y «Ampliación del Texto de ICH sobre la Validación de Procedimientos Analíticos».

3.5. INFORMACIÓN DE LOS LÍMITES DE LOS DISOLVENTES RESIDUALES

Para poder cumplir los criterios que se dan en estas directrices, los fabricantes de productos farmacéuticos necesitan cierta información sobre el contenido de disolventes residuales en los excipientes o en los principios activos. Se dan a continuación algunos ejemplos de formas aceptables de información que podría proporcionar un proveedor de excipientes o principios activos a un fabricante de productos farmacéuticos. Dicho proveedor podría escoger una de estas formas de expresión, según proceda:

— Es probable que sólo estén presentes disolventes de la Clase 3. La pérdida por desecación es inferior al 0,5 por ciento.

— Es probable que sólo estén presentes los disolventes X, Y, ..., de la Clase 2. Todos ellos están por debajo del límite que marca la Opción 1 (aquí, el proveedor nombraría los disolventes de la Clase 2 representados por X, Y, ...).

— Es probable que sólo estén presentes los disolventes X, Y, ..., de la Clase 2 y disolventes de la Clase 3. Los disolventes residuales de la Clase 2 están por debajo del límite que marca la Opción 1 y los disolventes residuales de Clase 3 están por debajo del 0,5 por ciento.

Si es probable que estén presentes disolventes de la Clase 1, deben identificarse y cuantificarse. La expresión «es probable que estén presentes» se refiere al disolvente utilizado en la última etapa del proceso de fabricación y a disolventes utilizados en las etapas previas y que no sean eliminados a través de un proceso validado.

Si están presentes disolventes de las Clases 2 y 3 en niveles superiores a los límites de la Opción 1 o al 0,5 por ciento, respectivamente, deben identificarse y cuantificarse.

4. LÍMITES DE DISOLVENTES RESIDUALES

4.1. DISOLVENTES QUE DEBEN EVITARSE

Los disolventes de la Clase 1 no deben emplearse en la fabricación de principios activos, excipientes o productos farmacéuticos debido a que presentan una toxicidad inaceptable o a que sus efectos medioambientales son nocivos. Sin embargo, si su uso es inevitable en la producción de un producto farmacéutico que supone un avance terapéutico significativo, sus niveles deben restringirse, según se indica en la Tabla 1, salvo excepción justificada. Se ha incluido el 1,1,1-tricloroetano en la Tabla 1 debido a sus efectos medioambientales. El límite de 1500 ppm que se indica se basa en una revisión de datos de inocuidad.

Tabla 1.—*Disolventes de Clase 1 en productos farmacéuticos (disolventes que deben evitarse)*

Disolvente	Concentración límite (ppm)	Efecto
Benceno	2	Carcinógeno
Tetracloruro de carbono	4	Tóxico y perjudicial para el medio ambiente
1,2-Dicloroetano	5	Tóxico
1,1-Dicloroeteno	8	Tóxico
1,1,1,-Tricloroetano	1500	Perjudicial para el medio ambiente

4.2. DISOLVENTES CUYO USO DEBE LIMITARSE

Los disolventes que se indican en la Tabla 2 deben estar limitados en los productos farmacéuticos a causa de su toxicidad. Los valores de PDE se dan con una aproximación de 0,1 mg/día, y las concentraciones con una aproximación de 10 ppm. Los valores que se indican no reflejan la precisión del método analítico, la cual debe determinarse como parte del proceso de validación del método.

Tabla 2.—*Disolventes de Clase 2 en productos farmacéuticos*

Disolvente	PDE (mg/día)	Concentración límite (ppm)
Acetronitrilo	4,1	410
Clorobenceno	3,6	360
Cloroformo	0,6	60
Ciclohexano	38,8	3880
1,2-Dicloroeteno	18,7	1870
Diclorometano	6,0	600
1,2-Dimetoxietano	1,0	100
N,N-Dimetilacetamida	10,9	1090
N,N- Dimetilformamida	8,8	880
1,4-Dioxano	3,8	380
2-Etoxietanol	1,6	160
Etilenglicol	6,2	620
Formamida	2,2	220
Hexano	2,9	290
Metanol	30,0	3000
2-Metoxietanol	0,5	50
Metilbutilcetona	0,5	50
Metilciclohexano	11,8	1180
N-Metilpirrolidona	5,3	530
Nitrometano	0,5	50
Piridina	2,0	200
Sulfolano	1,6	160
Tetrahidrofurano	7,2	720
Tetralina	1,0	100
Tolueno	8,9	890
1,1,2-Tricloroeteno	0,8	80
Xileno*	21,7	2170

* normalmente 60 por ciento de *m*-xileno, 14 por ciento de *p*-xileno, 9 por ciento de *o*-xileno con 17 por ciento de etilbenceno

4.3. DISOLVENTES CON POCOS EFECTOS TÓXICOS

Los disolventes de la Clase 3 (indicados en la Tabla 3) pueden considerarse como menos tóxicos y de menor riesgo para la salud humana. La Clase 3 no incluye ningún disolvente del que se sepa que es un peligro para la salud humana a los niveles normalmente aceptados en los productos farmacéuticos. Sin embargo, no existen estudios de toxicidad a largo plazo ni de carcinogénesis para muchos de los disolventes de la Clase 3. Los datos disponibles indican que son menos tóxicos en estudios de toxicidad aguda o a corto plazo, y que no presentan genotoxicidad. Para estos disolventes, se considera que niveles de 50 mg por día o menores (que corresponderían a 5000 ppm o 0,5 por ciento, en las condiciones de la Opción 1) son aceptables sin necesidad de justificación. Pueden ser aceptables niveles superiores si son realistas en relación con la capacidad de fabricación y las buenas prácticas de fabricación (GMP).

Tabla 3.—*Disolventes de Clase 3 que se deben limitar por las GMP o por otros requisitos relacionados con la calidad*

Acetato de butilo	Etanol
Acetato de etilo	Éter etílico
Acetato de isobutilo	Éter *terc*-butilmetílico
Acetato de isopropilo	Formiato de etilo
Acetato de metilo	Heptano
Acetato de propilo	2-Metil-1-propanol
Acetona	3-Metil-1-butanol
Ácido acético	Metiletilcetona
Ácido fórmico	Metilisobutilcetona
Anisol	Pentano
1-Butanol	1-Pentanol
2-Butanol	1-Propanol
Cumeno	2-Propanol
Dimetilsulfóxido	

4.4. DISOLVENTES PARA LOS QUE NO SE HAN ENCONTRADO DATOS TOXICOLÓGICOS ADECUADOS

Los siguientes disolventes (Tabla 4) pueden ser de interés para los fabricantes de excipientes, principios activos o productos farmacéuticos. Sin embargo, no fue posible encontrar datos toxicológicos adecuados en los que basar una PDE. Los fabricantes deben justificar los niveles residuales de estos disolventes en productos farmacéuticos.

Tabla 4.—*Disolventes para los que no se han encontrado datos toxicológicos adecuados*

Ácido tricloroacético	Éter de petróleo
Ácido trifluoracético	Éter isopropílico
1,1-Dietoxipropano	Isooctano
1,1-Dimetoximetano	Isopropilmetilcetona
2,2-Dimetoxipropano	Metiltetrahidrofurano

GLOSARIO

Cancerígenos genotóxicos: Agentes cancerígenos que producen cáncer afectando a los genes o cromosomas.

Exposición diaria permitida: Ingesta máxima diaria aceptable de disolvente residual en productos farmacéuticos.

Factor de modificación: Factor determinado por el juicio profesional de un toxicólogo y aplicado a datos biológicos relacionados con la inocuidad para seres humanos.

LOEL: Abreviatura del *nivel mínimo que produce el efecto observado* (Lowest-Observed-Effect Level).

Neurotoxicidad: La capacidad de una sustancia de causar efectos adversos en el sistema nervioso.

Nivel mínimo que produce el efecto observado: La dosis más baja de una sustancia que, en un estudio o grupo de estudios, produce incrementos biológicamente significativos en la frecuencia o gravedad de cualquiera de los efectos en seres humanos o animales.

Nivel para el que no se observa efecto: La dosis más alta de una sustancia para la que no se producen incrementos biológicamente significativos en la frecuencia o gravedad de cualquiera de los efectos en seres humanos o animales.

NOEL: Abreviatura de *nivel para el que no se observan efectos* (No-Observed-Effect Level).

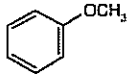
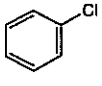
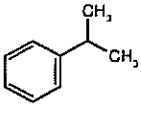
PDE: Abreviatura de *exposición diaria permitida* (Permitted Daily Exposure).

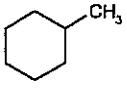
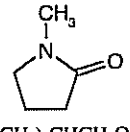
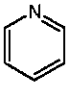
Sustancia de la que hay fuertes sospechas de ser un cancerígeno humano: Sustancia para la que no existe evidencia epidemiológica de carcinogénesis, pero existen datos concluyentes de genotoxicidad y una clara evidencia de carcinogénesis en roedores.

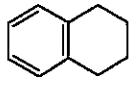
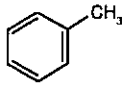
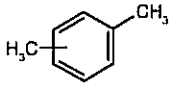
Teratogenia: Aparición de malformaciones estructurales en un feto en desarrollo cuando se administra una sustancia durante el embarazo.

Toxicidad reversible: Aparición de efectos dañinos causados por una sustancia y que desaparecen al terminar la exposición a la sustancia.

APÉNDICE 1. LISTA DE DISOLVENTES INCLUIDOS EN ESTAS DIRECTRICES

Disolvente	Otros nombres	Estructura	Clase
Acetato de butilo	Éster butílico del ácido acético	$CH_3COO(CH_2)_3CH_3$	Clase 3
Acetato de etilo	Éster etílico del ácido acético	$CH_3COOCH_2CH_3$	Clase 3
Acetato de isobutilo	Éster isobutílico del ácido acético	$CH_3COOCH_2CH_3CH_3)_2$	Clase 3
Acetato de isopropilo	Éster isopropílico del ácido acético	$CH_3COOCH(CH_3)_2$	Clase 3
Acetato de metilo	Éster metílico del ácido acético	CH_3COOCH_3	Clase 3
Acetato de propilo	Éster propílico del ácido acético	$CH_3COOCH_2CH_2CH_3$	Clase 3
Acetona	Propan-2-ona 2-Propanona	CH_3COCH_3	Clase 3
Acetonitrilo		CH_3CN	Clase 2
Ácido acético	Ácido etanoico	CH_3COOH	Clase 3
Ácido fórmico		HCOOH	Clase 3
Anisol	Metoxibenceno		Clase 3
Benceno	Benzol		Clase 1
1-Butanol	Alcohol *n*-butílico Butan-1-ol	$CH_3(CH_2)_3OH$	Clase 3
2-Butanol	Alcohol *sec*-butílico Butan-2-ol	$CH_3CH_2CH(OH)CH_3$	Clase 3
terc-Butilmetileter	2-Metoxi-2-metilpropano	$(CH_3)_3COCH_3$	Clase 3
Ciclohexano	Hexametileno		Clase 2
Clorobenceno			Clase 2
Cloroformo	Triclorometano	$CHCl_3$	Clase 2
Cumeno	Isopropilbenceno (1-Metiletil)benceno		Clase 3
1,2-Dicloroetano	*sim*-Dicloroetano Cloruro de etileno Dicloruro de etileno	CH_2ClCH_2Cl	Clase 1
1,1-Dicloroeteno	1,1-Dicloroetileno Cloruro de vinilideno	$H_2C = CCl_2$	Clase 1
1,2-Dicloroeteno	1,2-Dicloroetileno Dicloruro de acetileno	$ClCH = CHCl$	Clase 2
Diclorometano	Cloruro de metileno	CH_2Cl_2	Clase 2
1,2-Dimetoxietano	Dimetilcelosolve Dimetiléter del etilenglicol Monoglima	$H_3COCH_2CH_2OCH_3$	Clase 2
N,N-Dimetilacetamida	DMA	$CH_3CON(CH_3)_2$	Clase 2
N,N-Dimetilformamida	DMF	$HCON(CH_3)_2$	Clase 2

Disolvente	Otros nombres	Estructura	Clase
Dimetilsulfóxido	Metilsulfinilmetano Metilsulfóxido DMSO	$(CH_3)_2SO$	Clase 3
1,4-Dioxano	*p*-Dioxano [1,4]Dioxano		Clase 2
Etanol	Alcohol etílico	CH_3CH_2OH	Clase 3
Éter etílico	Dietil éter Etoxietano 1,1'-Oxibisetano	$CH_3CH_2OCH_2CH_3$	Clase 3
Etilenglicol	1,2-Dihidroxietano 1,2-Etanodiol	$HOCH_2CH_2OH$	Clase 2
2-Etoxietanol	Celosolve	$CH_3CH_2OCH_2CH_2OH$	Clase 2
Formamida	Metanamida	$HCONH_2$	Clase 2
Formiato de etilo	Éster etílico del ácido fórmico	$HCOOCH_2CH_3$	Clase 3
Heptano	*n*-Heptano	$CH_3(CH_2)_5CH_3$	Clase 3
Hexano	*n*-Hexano	$CH_3(CH_2)_4CH_3$	Clase 2
Isobutilmetilcetona	4-Metilpentan-2-ona 4-Metil-2-pentanona MIBK	$(CH_3)COCH_2CH(CH_3)_2$	Clase 3
Metanol	Alcohol metílico	CH_3OH	Clase 2
3-Metil-1-butanol	Alcohol isoamílico Alcohol isopentílico 3-Metilbutan-1-ol	$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$	Clase 3
Metilbutilcetona	2-Hexanona Hexan-2-ona	$CH_3(CH_2)_3COCH_3$	Clase 2
Metilciclohexano	Ciclohexilmetano		Clase 2
Metiletilcetona	2-Butanona MEK Butan-2-ona	$CH_3CH_2COCH_3$	Clase 3
N-Metilpirrolidona	1-Metilpirrolidin-2-ona 1-Metil-2-pirrolidinona		Clase 2
2-Metil-1-propanol	Alcohol isobutílico 2-Metilpropan-1-ol	$(CH_3)_2CHCH_2OH$	Clase 3
2-Metoxietanol	Metilcelosolve	$CH_3OCH_2CH_2OH$	Clase 2
Nitrometano		CH_3NO_2	Clase 2
Pentano	*n*-Pentano	$CH_3(CH_2)_3CH_3$	Clase 3
1-Pentanol	Alcohol amílico Alcohol pentílico Pentan-1-ol	$CH_3(CH_2)_3CH_2OH$	Clase 3
Piridina			Clase 2
1-Propanol	Alcohol propílico Propan-1-ol	$CH_3CH_2CH_2OH$	Clase 3
2-Propanol	Alcohol isopropílico Propan-2-ol	$(CH_3)_2CHOH$	Clase 3
Sulfonano	1,1-Dióxido de tetrahidrotiofeno		Clase 2
Tetracloruro de carbono	Tetraclorometano	CCl_4	Clase 1

Disolvente	Otros nombres	Estructura	Clase
Tetrahidrofurano	Oxaciclopentano Óxido de tetrametileno		Clase 2
Tetralina	1,2,3,4-Tetrahidronaftaleno		Clase 2
Tolueno	Metilbenceno		Clase 2
1,1,1-Tricloroetano	Metilcloroformo	CH_3CCl_3	Clase 1
1,1,2-Tricloroeteno	Tricloroeteno	$HClC{=}CCl_2$	Clase 2
Xileno*	Dimetilbenceno Xilol		Clase 2

* normalmente 60 por ciento de *m*-xileno, 14 por ciento de *p*-xileno, 9 por ciento de *o*-xileno con 17 por ciento de etilbenceno.

APÉNDICE 2. INFORMACIÓN BÁSICA ADICIONAL

A2.1. LEGISLACIÓN MEDIOAMBIENTAL SOBRE DISOLVENTES ORGÁNICOS VOLÁTILES

Varios de los disolventes residuales empleados con frecuencia en la fabricación de productos farmacéuticos figuran como productos químicos tóxicos en las monografías sobre Criterios de Salud Medioambiental (Environmental Health Criteria, EHC) y en el Sistema de Información Integrado sobre Riesgo (Integrated Risk Information System, IRIS). Grupos tales como el Programa Internacional sobre Seguridad Química (International Programme on Chemical Safety, IPCS), la Agencia para la Protección Medioambiental de Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, USEPA) y la Administración para Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (United States Food and Drug Administration, USFDA) tienen entre sus objetivos la determinación de niveles aceptables de exposición. El objetivo que se persigue es la protección de la salud humana, así como el mantenimiento de la integridad del medio ambiente frente a los posibles efectos nocivos de productos químicos que están presentes durante largos períodos. Los métodos empleados en la estimación de los límites máximos de exposición se basan normalmente en estudios a largo plazo. Cuando no existen estudios a largo plazo, pueden emplearse datos a corto plazo siempre que se introduzcan modificaciones apropiadas como el uso de mayores factores de inocuidad. El método que se describe aquí se basa principalmente en la exposición a largo plazo o durante la vida de la población en general a su medio ambiente, es decir, aire, alimentos, agua potable y otros medios.

A2.2. DISOLVENTES RESIDUALES EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

Los límites de exposición que se indican en estas directrices se basan en los datos de toxicidad y en las metodologías descritas en las monografías de EHC y de IRIS. No obstante, deben tenerse en cuenta a la hora de establecer los límites de exposición algunas presunciones en relación con los disolventes residuales que se emplean en la síntesis y formulación de los productos farmacéuticos. Son las siguientes:

1) Los pacientes (pero no la población, en general) utilizan productos farmacéuticos para tratar sus enfermedades o para profilaxis, intentando prevenir las infecciones o las enfermedades.

2) En la mayor parte de los casos no es necesario suponer que los pacientes estarán sometidos a exposición a productos farmacéuticos durante toda su vida, aunque puede utilizarse esta suposición como hipótesis de partida para reducir los riesgos para la salud humana.

3) Los disolventes residuales son una parte inevitable de la producción farmacéutica, por lo que con frecuencia serán parte también de los productos farmacéuticos.

4) Los disolventes residuales no pueden superar los niveles recomendados, salvo en circunstancias excepcionales.

5) Los datos toxicológicos que se utilizan para determinar los niveles aceptables de los disolventes residuales deben obtenerse utilizando protocolos aceptables, como los descritos, por ejemplo, por la OCDE o en el Libro Rojo de la FDA.

APÉNDICE 3. MÉTODOS PARA ESTABLECER LÍMITES DE EXPOSICIÓN

El método de Gaylor-Kodell para la valoración de riesgos (Gaylor, D. W., y Kodell, R. L., «Linear Interpolation algorithm for low dose assessment of toxic substance», *J. Environ. Pathology*, 4, 305, 1980) es apropiado para los disolventes cancerígenos de Clase 1. La extrapolación a través del empleo de modelos matemáticos para establecer límites de exposición sólo es justificable si se dispone de datos fiables de carcinogénesis. Los límites de exposición para los disolventes de Clase 1 deben incluir un elevado factor de inocuidad (por ejemplo, 10.000 a 100.000) respecto al nivel para el que no se observan efectos (No-Observed-Effect Level, NOEL). La detección y cuantificación de estos disolventes se realizará con métodos analíticos actualizados.

En estas directrices, los niveles aceptables de disolventes de Clase 2 se establecieron por cálculo de los valores de PDE, empleando los procedimientos para establecer límites de exposición en productos farmacéuticos (*Pharmacopeial Forum*, Nov.-Dic. 1989) y el método adoptado por IPCS para el estudio del Riesgo para la Salud Humana por Productos Químicos (*Environmental Health Criteria 170*, OMS, 1994). Estos métodos son similares a los usados por la USEPA (IRIS), por la USFDA (*Libro Rojo*) y por otros organismos. Para que se entienda mejor el origen de los valores de PDE, se da a continuación un resumen del método. No es necesario realizar estos cálculos para utilizar los valores de PDE que se tabulan en el apartado 4 de este documento.

La PDE se obtiene a partir del nivel para el que no se observan efectos (No-Observed-Effect Level, NOEL), o bien del nivel para el que se observa el efecto más pequeño (Lowest-Observed Effect Level, LOEL) en el estudio en animales que se considere más relevante como sigue:

$$\text{PDE} = \frac{\text{NOEL} \times \text{ajuste del peso}}{\text{F1} \times \text{F2} \times \text{F3} \times \text{F4} \times \text{F5}}$$

La PDE se obtiene preferentemente del NOEL. Si éste no existe, puede emplearse un LOEL. Los factores de modificación que se proponen aquí, con relación a los datos humanos son similares a los «factores de incertidumbre» empleados en los Criterios de Salud Medioambiental (*Environmental Health Criteria 170*, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1994) y a los «factores de modificación» o los «factores de inocuidad» del *Pharmacopeial Forum*. En todos los cálculos se supone una exposición sistémica del 100 por ciento, independientemente de la vía de administración.

Los factores de modificación son los siguientes:

F1 = Factor para la extrapolación de datos entre diferentes especies.

- F1 = 2 para extrapolación de perros a seres humanos.
- F1 = 2,5 para extrapolación de conejos a seres humanos.
- F1 = 3 para extrapolación de monos a seres humanos.
- F1 = 5 para extrapolación de ratas a seres humanos.
- F1 = 10 para extrapolación de otros animales a seres humanos.
- F1 = 12 para extrapolación de ratones a seres humanos.

F1 tiene en cuenta las relaciones comparativas entre las superficies específicas y las masas corporales de las especies consideradas y del hombre. La superficie específica (S) se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$S = km^{0,67}$$

donde m es la masa corporal y se toma el valor 10 para la constante k. En la Tabla A3.1 se dan los valores de masa corporal utilizados.

F2 = Factor de 10 para tener en cuenta la variabilidad entre individuos. El valor de 10 que se utiliza en estas directrices es el normalmente aceptado para todos los disolventes orgánicos.

F3 = Factor variable para tener en cuenta los estudios de toxicidad a corto plazo.

- F3 = 1 para estudios que duran al menos la mitad de la vida de la especie (1 año para roedores o conejos, 7 años para gatos, perros y monos).
- F3 = 1 para estudios de reproducción en los que se cubre todo el período de la organogénesis.
- F3 = 2 para un estudio de 6 meses en roedores o un estudio de 3,5 años en otros animales.
- F3 = 5 para un estudio de 3 meses en roedores o un estudio de 2 años en otros animales.
- F3 = 10 para estudios más cortos.

En todos los casos se emplea el factor más alto para estudios cuya duración es intermedia entre las indicadas (por ejemplo, un factor de 2 para un estudio de 9 meses en roedores).

F4 = Factor que debe aplicarse en casos de toxicidad grave, como carcinogénesis no genotóxica, neurotoxicidad o teratogenia. En estudios de toxicidad reproductora se emplean los siguientes factores:

- F4 = 1 para la toxicidad para el feto asociada a toxicidad para la madre.
- F4 = 5 para toxicidad para el feto sin toxicidad para la madre.
- F4 = 5 para un efecto teratogénico con toxicidad para la madre.
- F4 = 10 para un efecto teratogénico sin toxicidad para la madre.

F5 = Factor variable que puede aplicarse si no se ha establecido un nivel para el que no se observan efectos.

Si sólo se dispone de un LOEL, puede emplearse un factor de hasta 10, dependiendo de la gravedad de la toxicidad.

El ajuste del peso supone arbitrariamente un peso de 50 kg para un adulto humano, independientemente de su sexo. Este valor, relativamente bajo, supone un factor adicional de seguridad frente a los valores estándar de 60 kg o 70 kg que se emplean normalmente en este tipo de cálculos. Algunos pacientes adultos pesan menos de 50 kg, pero se considera que este hecho está compensado por otros factores de inocuidad empleados para determinar la PDE. Si el disolvente estuviera presente en una formulación destinada a uso pediátrico, sería adecuado un ajuste para un peso inferior.

Como ejemplo de aplicación de esta ecuación consideremos un estudio de toxicidad del acetonitrilo en ratones, que está resumido en *Pharmeuropa*, vol. 9, n.º 1, suplemento, abril de 1997, página S24. El NOEL calculado es de 50,7 $mg \cdot kg^{-1} \cdot día^{-1}$. La PDE del acetonitrilo en este estudio se calcula como sigue:

$$PDE = \frac{50{,}7\ mg \times kg^{-1} \times día^{-1} \times 50\ kg}{12 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1} = 4{,}22\ mg\ día^{-1}$$

En este ejemplo,

F1 = 12 para tener en cuenta la extrapolación de ratones a seres humanos,

F2 = 10 para tener en cuenta las diferencias entre individuos humanos,

F3 = 5 porque la duración del estudio fue sólo de 13 semanas,

F4 = 1 porque no se encontró toxicidad grave,

F5 = 1 porque se determinó el nivel para el que no se observan efectos.

Tabla A3.1.—*Valores utilizados en los cálculos de este documento*

Peso corporal de la rata	425 g
Peso corporal de la rata preñada	330 g
Peso corporal del ratón	28 g
Peso corporal de la ratona preñada	30 g
Peso corporal del cobaya	500 g
Peso corporal del mono Rhesus	2,5 kg
Peso corporal de la coneja (preñada o no)	4 kg
Peso corporal del perro sabueso	11,5 kg
Volumen respiratorio de la rata	290 l/día
Volumen respiratorio del ratón	43 l/día
Volumen respiratorio del conejo	1440 l/día
Volumen respiratorio del cobaya	430 l/día
Volumen respiratorio humano	28.800 l/día
Volumen respiratorio del perro	9000 l/día
Volumen respiratorio del mono	1150 l/día
Consumo de agua del ratón	5 ml/día
Consumo de agua de la rata	30 ml/día
Consumo de alimento de la rata	30 g/día

Se utilizó la ecuación de los gases perfectos ($PV = nRT$) para convertir las concentraciones de los gases empleados en estudios de inhalación de ppm en mg/l o mg/m^3. Como ejemplo, consideremos un estudio de toxicidad respecto a la reproducción en ratas por inhalación de tetracloruro de carbono (peso molecular, 153,84), que se resume en *Pharmeuropa*, vol. 9, n.º 1, suplemento, abril de 1997, página S9.

$$\frac{n}{V} = \frac{P}{RT} = \frac{300 \times 10^{-6}\ atm \times 153.840\ mg\ mol^{-1}}{0{,}0821\ atm\ K^{-1}\ mol^{-1} \times 298 K} =$$

$$= \frac{46{,}15\ mg}{24{,}451} = 1{,}89\ mg/l$$

Para convertir este resultado en mg/m^3, se utiliza la relación 1000 litros = 1 m^3.

dir, por miligramo de residuo, 0,02 ml de una mezcla recién preparada de 1 volumen de *clorotrimetilsilano R*, 3 volúmenes de *hexametildisilazano R* y 9 volúmenes de *piridina anhidra R*. Agitar cuidadosamente hasta que los esteroles se disuelvan por completo. Dejar reposar en un desecador sobre *pentóxido de difósforo R* durante 30 min. Centrifugar si es necesario y utilizar el líquido sobrenadante.

La cromatografía se puede llevar a cabo utilizando:

— una columna de sílice fundida de 20 m a 30 m de longitud y 0,25 mm a 0,32 mm de diámetro interno, recubierta con *poli[metil(95)fenil(5)]siloxano R* o de *poli[metil(94)fenil(5)vinil(1)]siloxano R* (película de un espesor de 0,25 µm),

— como gas portador, *hidrógeno para cromatografía R* con un flujo lineal de 30 cm a 50 cm por segundo o *helio para cromatografía R* con un flujo lineal de 20 cm a 35 cm por segundo. Para medir el flujo lineal proceder del siguiente modo: en las condiciones de trabajo indicadas para la determinación de esteroles, inyectar de 1 µl a 3 µl de metano o propano. Medir el tiempo requerido, en segundos, para que pase el gas a través de la columna desde el momento de la inyección hasta la aparición del primer pico (t_g). El flujo lineal se expresa como L/t_g, donde L es la longitud de la columna en centímetros,

— un detector de ionización por llama,

— un inyector por división (1/50 a 1/100).

Mantener la temperatura de la columna a 260 °C, la del inyector a 280 °C y la del detector a 290 °C.

Inyectar 1 µl de cada disolución.

El cromatograma obtenido con la disolución de referencia (a) muestra cuatro picos principales correspondientes al colesterol, brasicasterol, campesterol y ß-sitosterol y el cromatograma obtenido con la disolución de referencia (b) otros cuatro picos principales correspondientes al campesterol, estigmasterol, ß-sitosterol y Δ7-estigmastenol. Los tiempos de retención de los esteroles, en relación con el correspondiente al ß-sitosterol, se encuentran en la Tabla 2.4.23.-1.

El pico del patrón interno (betulina) estará claramente separado de los picos de los esteroles.

Tabla 2.4.23.-1.—*Tiempos de retención de los esteroles en relación con el β-sitosterol, para dos columnas diferentes*

	Poli[metil(95)-fenil(5)]-siloxano	Poli[metil(94)-fenil(5)vinil(1)]-siloxano
Colesterol	0,63	0,67
Brasicasterol	0,71	0,73
24-Metilencolesterol	0,80	0,82
Campesterol	0,81	0,83
Campestanol	0,82	0,85
Estigmasterol	0,87	0,88
Δ-7-Campesterol	0,92	0,93
Δ5,23-Estigmastadienol	0,95	0,95
Clerosterol	0,96	0,96
ß-Sitosterol	1	1
Sitostanol	1,02	1,02
Δ5-Avenasterol	1,03	1,03
Δ5,24-Estigmastadienol	1,08	1,08
Δ7-Estigmastenol [1]	1,12	1,12
Δ7-Avenasterol	1,16	1,16
Betulina	1,4	1,6

[1] Este esterol se denomina igualmente en la bibliografía Δ7-Estigmasterol.

En el cromatograma obtenido con las disoluciones problema, identificar los picos y determinar el contenido porcentual de cada esterol en la fracción esterol de la sustancia a examinar utilizando la siguiente expresión:

$$\frac{A}{S} \times 100$$

A = área del pico correspondiente al compuesto a ser determinado,

S = suma de las áreas de los picos, correspondientes a los componentes indicados en la Tabla 2.4.23.-1.

Si la monografía lo requiere, calcular el contenido de cada esterol en miligramos por 100 gramos de la sustancia a examinar, usando la siguiente expresión:

$$\frac{A \times m_S \times 100}{A_S \times m}$$

A = área del pico correspondiente al compuesto a ser determinado,

A_S = área del pico correspondiente a la betulina,

m = peso de la muestra de la sustancia a examinar en gramos,

m_S = peso de la betulina añadida en miligramos.

01/2005, 20424 corregido

2.4.24. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE DISOLVENTES RESIDUALES

Los ensayos descritos en este método general pueden utilizarse:

i. para la identificación de la mayor parte de los disolventes residuales de Clase 1 y Clase 2 en una sustancia activa, excipiente o producto farmacéutico cuando los disolventes residuales son desconocidos;

ii. como ensayo límite para los disolventes de Clase 1 y Clase 2 cuando están presentes en una sustancia activa, excipiente o producto farmacéutico;

iii. para la cuantificación de los disolventes de Clase 2 cuando los límites son mayores de 1000 ppm (0,1 por ciento) o para la cuantificación de disolventes de Clase 3, cuando sea necesaria.

Los disolventes residuales de Clase 1, Clase 2 y Clase 3 están enumerados en el capítulo general *5.4. Disolventes residuales.*

Se describen tres diluyentes para la preparación de las muestras, y las condiciones que se deben aplicar para la inyección del espacio de cabeza de la muestra gaseosa en el sistema cromatográfico. Se prescriben dos sistemas cromatográficos, de los cuales se prefiere el Sistema A, mientras que el Sistema B se emplea normalmente para la confirmación de identidad. La elección de método de preparación de la muestra depende de la solubilidad de la sustancia a examinar y, en ciertos casos, de los disolventes residuales a controlar.

Los siguientes disolventes residuales no son detectados fácilmente en las condiciones de inyección en el espacio de cabeza descritas: formamida, 2-etoxietanol, 2-metoxietanol, etilenglicol, *N*-metilpirrolidona y sulfolano. Deben emplearse otros procedimientos apropiados para el control de disolventes residuales.

Cuando el método de ensayo se aplica cuantitativamente para el control de disolventes residuales en una sustancia, debe validarse.

PROCEDIMIENTO

Examinar por cromatografía de gases con inyección estática en el espacio de cabeza (*2.2.28*).

Procedimiento 1 para la preparación de la muestra. Está destinado al control de disolventes residuales en sustancias hidrosolubles.

Disolución problema (1). Disolver 0,200 g de la sustancia a examinar en *agua R* y diluir hasta 20,0 ml con el mismo disolvente.

Procedimiento 2 para la preparación de la muestra. Está destinado al control de disolventes residuales en sustancias no hidrosolubles.

Disolución problema (2). Disolver 0,200 g de la sustancia a examinar en *N,N-dimetilformamida R* (DMF) y diluir hasta 20,0 ml con el mismo disolvente.

Procedimiento 3 para la preparación de la muestra. Está destinado al control de la *N,N-dimetilacetamida* o la *N,N-dimetilformamida,* o ambas, cuando se sabe o sospecha que una de estas sustancias o ambas están presentes en la sustancia a examinar.

Disolución problema (3). Disolver 0,200 g de la sustancia a examinar en *1,3-dimetil-2-imidazolidinona R* (DMI) y diluir hasta 20,0 ml con el mismo disolvente.

En algunos casos, no son apropiados los métodos anteriormente indicados para la preparación de la muestra, en cuyo caso debe demostrarse que son adecuados el diluyente utilizado para la preparación de la disolución de la muestra y las condiciones del espacio de cabeza estático.

Disolución de disolventes (a). A 1,0 ml de la *disolución de disolventes residuales de Clase 1 SQR* añadir 9 ml de *dimetilsulfóxido R* y diluir hasta 100,0 ml con *agua R.* Diluir 1,0 ml de esta disolución hasta 100 ml con *agua R.* Diluir 1,0 ml de esta disolución hasta 10,0 ml con *agua R.*

Las disoluciones de referencia corresponden a los siguientes límites:

— benceno: 2 ppm,

— tetracloruro de carbono: 4 ppm,

— 1,2-dicloroetano: 5 ppm,

— 1,1-dicloroetano: 8 ppm,

— 1,1,1-tricloroetano: 10 ppm.

Disolución de disolventes (b). Disolver cantidades apropiadas de los disolventes residuales de Clase 2 en *dimetilsulfóxido R* y diluir hasta 100,0 ml con *agua R.* Diluir hasta obtener una concentración de 1/20 de los límites indicados en la Tabla 2 (véase *5.4. Disolventes residuales*).

Disolución de disolventes (c). Disolver 1,00 g del disolvente o disolventes presentes en la sustancia a examinar en *dimetilsulfóxido R* o *agua R,* si es adecuado, y diluir hasta 100,0 ml con *agua R.* Diluir hasta obtener una concentración de 1/20 del límite o los límites indicados en las Tablas 1 ó 2 (véase *5.4. Disolventes residuales*).

Disolución de un blanco. Preparar la disolución como se describe para la disolución de disolventes (c), pero sin adición del disolvente o los disolventes (utilizada para comprobar la ausencia de picos de interferencia).

Disolución problema. Introducir en un vial de inyección 5,0 ml de la disolución problema y 1,0 ml de la disolución del blanco.

Disolución de referencia (a) (Clase 1). Introducir en un vial de inyección 1,0 ml de la disolución de disolventes (a) y 5,0 ml del diluyente apropiado.

Disolución de referencia (a_1) (Clase 1). Introducir en un vial de inyección 5,0 ml de la disolución problema y 1,0 ml de la disolución de disolventes (a).

Disolución de referencia (b) (Clase 2) Introducir en un vial de inyección 1,0 ml de la disolución de disolventes (b) y 5,0 ml del diluyente apropiado.

Disolución de referencia (c). Introducir en un vial de inyección 5,0 ml de la disolución problema y 1,0 ml de la disolución de disolventes (c).

Disolución de referencia (d). Introducir en un vial de inyección 1,0 ml la disolución del blanco y 5,0 ml del diluyente apropiado.

Cerrar los viales con un tapón de membrana de goma ajustado, recubierto de politetrafluoroetileno y asegurado con un cierre de aluminio. Agitar para conseguir una disolución homogénea.

Pueden emplearse las siguientes condiciones para la inyección en espacio de cabeza estático:

	Procedimiento de preparación de muestras		
Parámetros de trabajo	**1**	**2**	**3**
Temperatura de equilibrado (°C)	80	105	80
Tiempo de equilibrado (min)	60	45	45
Temperatura de la línea de transferencia (°C)	85	110	105
Gas portador: *Nitrógeno para cromatografía R o helio para cromatografía R* a una presión apropiada			
Tiempo de presurización (s)	30	30	30
Volumen de inyección (ml)	1	1	1

La cromatografía puede realizarse empleando:

SISTEMA A

— una columna de sílice fundida capilar o semicapilar de 30 m de longitud y 0,32 mm o 0,53 mm de diámetro interno, recubierta de un polímero con enlaces cruzados de policianopropilfenilsiloxano al 6 por ciento y polidimetilsiloxano al 94 por ciento (espesor de la película: de 1,8 µm a 3 µm);

— *nitrógeno para cromatografía R* o *helio para cromatografía R* como gas portador, con una relación de división 1:5, con una velocidad lineal de aproximadamente 35 cm/s;

— un detector de ionización en llama (también puede utilizarse un espectrómetro de masas o un detector de captura electrónica para los disolventes residuales clorados de Clase 1),

manteniendo la temperatura de la columna a 40 °C durante 20 min, después elevándola a una velocidad de 10 °C por min hasta 240 °C y manteniéndola a 240 °C durante 20 min y manteniendo la temperatura de la cabeza del inyector a 140 °C y la del detector a 250 °C. Si hay interferencia de la matriz, utilizar el:

SISTEMA B

— una columna de sílice fundida capilar o semicapilar de 30 m de longitud y 0,32 mm o 0,53 mm de diámetro interno, recubierta de *macrogol 20.000 R* (espesor de la película, 0,25 µm);

— *nitrógeno para cromatografía R* o *helio para cromatografía R* como gas portador, con una relación de división de grupo 1:5, con una velocidad lineal de aproximadamente 35 cm/s;

— un detector de ionización de llama (también puede utilizarse un espectrómetro de masas o un detector de captura electrónica para los disolventes residuales clorados de Clase 1),

manteniendo la temperatura de la columna a 50 °C durante 20 min, después elevándola a una velocidad de 6 °C por min hasta 165 °C y manteniéndola a 165 °C durante 20 min. La temperatura de la cabeza del inyector se mantiene a 140 °C y la del detector a 250 °C.

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución de referencia (a) en la columna descrita en el Sistema A y registrar el cromatograma en condiciones tales que pueda medirse la relación señal-ruido para el 1,1,1-tricloroetano. La relación señal-ruido debe ser al menos 5. En la Figura 2.4.24.-1 se muestra un cromatograma típico.

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución de referencia (a_1) en la columna descrita en el Sistema A. Los picos debidos a los disolventes residuales de Clase 1 son todavía detectables.

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución de referencia (b) en la columna descrita en el Sistema A y registrar el cromatograma en condiciones tales que pueda determinarse la resolución entre el acetonitrilo y el cloruro de metileno. El sistema es adecuado si el cromatograma obtenido se parece al cromatograma que se reproduce en la Figura 2.4.24.-2 y la resolución entre el acetonitrilo y el cloruro de metileno es al menos 1,0.

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución problema en la columna descrita en el Sistema A. Si en el cromatograma obtenido no se observa un pico correspondiente a uno de los picos de disolventes residuales del cromatograma obtenido con las disoluciones de referencia (a) o (b), la sustancia a examinar satisface las exigencias del ensayo. Si alguno de los picos del cromatograma obtenido con la disolución problema corresponde a uno de los picos de disolventes residuales del cromatograma obtenido con las disoluciones de referencia (a) o (b), se emplea el Sistema B.

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución de referencia (a) en la columna descrita en el Sistema B y registrar el cromatograma en condiciones tales que pueda medirse la relación señal-ruido para el benceno. La relación señal-ruido debe ser al menos 5. En la Figura 2.4.24.-3 se muestra un cromatograma típico.

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución de referencia (a_1) en la columna descrita en el Sistema B. Los picos debidos a los disolventes residuales de Clase 1 son todavía detectables.

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución de referencia (b) en la columna descrita en el Sistema B y registrar el cromatograma en condiciones tales que pueda determinarse la resolución entre el acetonitrilo y el tricloroetileno. El sistema es adecuado si el cromatograma obtenido se parece al cromatograma que se reproduce en la Figura 2.4.24.-4 y la resolución entre el acetonitrilo y el tricloroetileno es al menos 1,0.

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución problema en la columna descrita en el Sistema B. Si en el cromatograma obtenido no se observa un pico correspondiente a uno de los picos de disolventes residuales del cromatograma obtenido con las disoluciones de referencia (a) o (b), la sustancia a examinar satisface las exigencias del ensayo. Si alguno de los picos del cromatograma obtenido con la disolución problema corresponde a uno de los picos de disolventes residuales del cromatograma obtenido con las disoluciones de referencia (a) o (b) y se confirma la correspondencia obtenida con el Sistema A, se procede como sigue:

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución de referencia (c) en la columna descrita para el Sistema A o el Sistema B. En caso necesario, ajustar la sensibilidad del detector de manera que la altura del pico correspondiente al disolvente o disolventes residuales identificados corresponde al menos a un 50 por ciento de la escala completa del registrador.

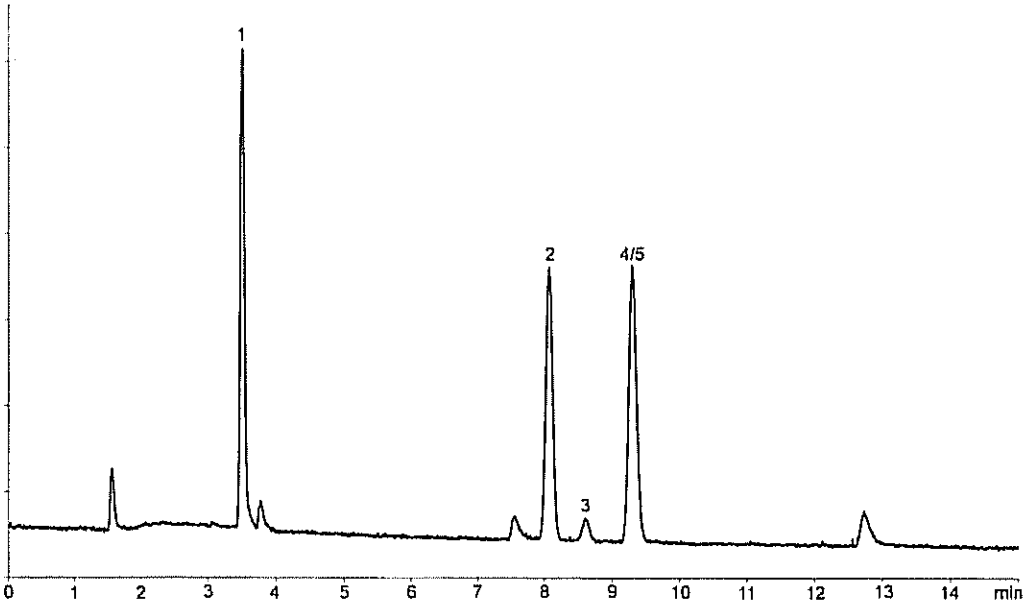
Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución de referencia (d) en la columna. No deben observarse picos de ninguna interferencia.

Inyectar 1 ml de la fase gaseosa de la disolución problema y 1 ml de la fase gaseosa de la disolución de referencia (c) en la columna. Repetir estas inyecciones dos veces.

El área media del pico del disolvente o disolventes residuales en los cromatogramas obtenidos con la disolución problema no es mayor que la mitad del área media de los disolventes residuales correspondientes en los cromatogramas obtenidos con la disolución de referencia (c). El ensayo no es válido a menos que la desviación estándar relativa de las diferencias en las áreas entre los picos de la sustancia a analizar obtenidos a partir de tres pares de inyecciones de la disolución de referencia (c) y la disolución problema sea como máximo del 15 por ciento.

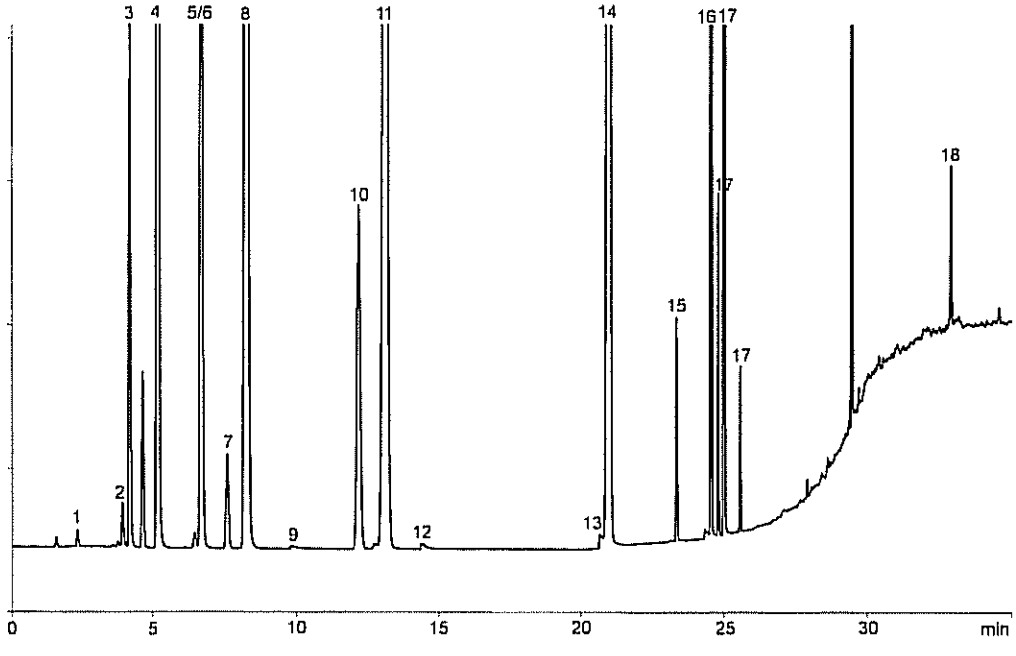
Se muestra un diagrama de flujo del proceso en la Figura 2.4.24.-5.

Cuando existe un disolvente residual (Clase 2 o Clase 3) a un nivel del 0,1 por ciento o mayor, el contenido puede determinarse cuantitativamente por el método de adición estándar.



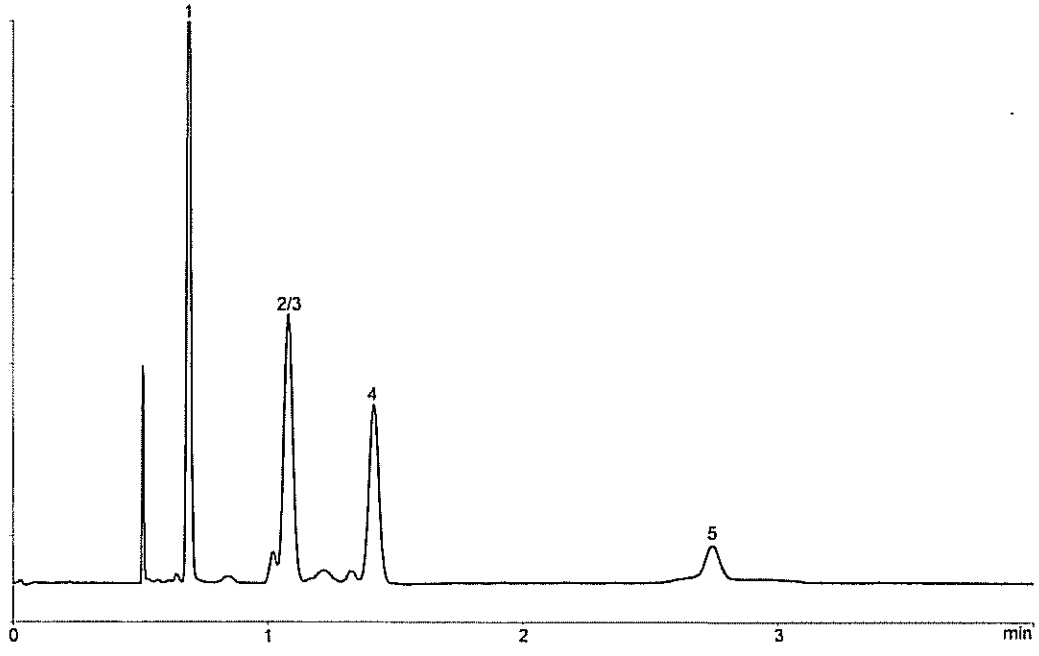
1. 1,1-dicloroetileno 2. 1,1,1-tricloroetano 3. tetracloruro de carbono 4. benceno 5. 1,2-dicloroetano

Figura 2.4.24.-1.—*Cromatograma típico de disolventes de Clase 1 utilizando las condiciones descritas para el Sistema A y el Procedimiento 1. Detector de ionización en llama.*



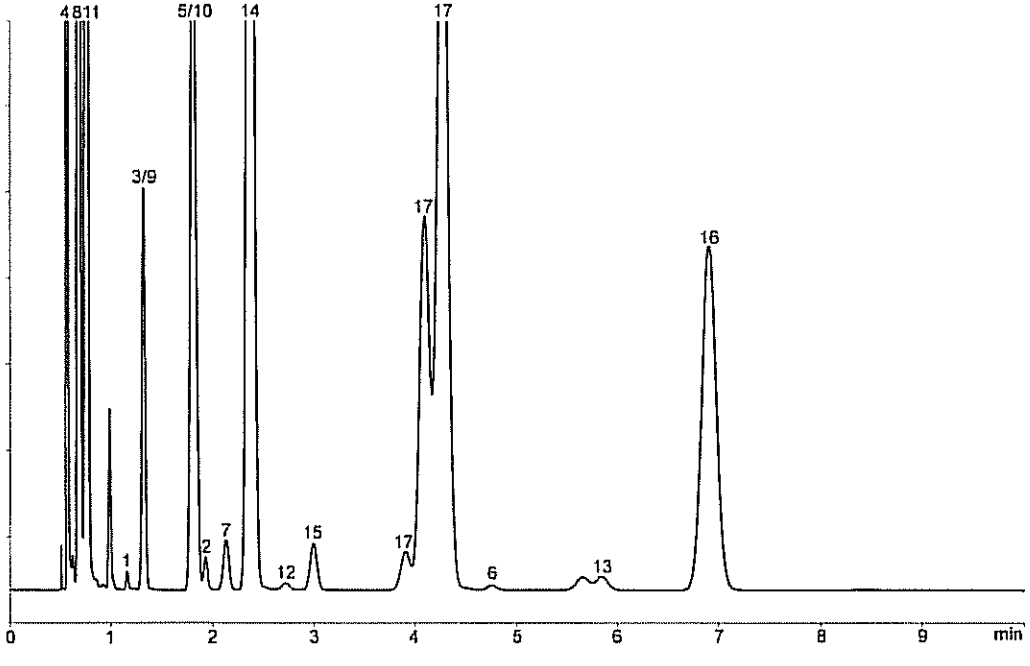
1. metanol	5. *cis*-1,2-dicloroetileno	9. 1,2-dimetoximetano	13. piridina	16. clorobenceno
2. acetonitrilo	6. nitrometano	10. 1,1,2-tricloroetileno	14. tolueno	17. xileno (*orto, meta, para*)
3. diclorometano	7. cloroformo	11. metilciclohexano	15. 2-hexanona	18. tetralina
4. hexano	8. ciclohexano	12. 1,4-dioxano		

Figura 2.4.24.-2.—*Cromatograma de disolventes de Clase 2 utilizando las condiciones descritas para el Sistema A y el Procedimiento 1. Detector de ionización en llama.*



1. 1,1-dicloroetileno 2. 1,1,1-tricloroetano 3. tetracloruro de carbono 4. benceno 5. 1,2-dicloroetano

Figura 2.4.24.-3.—*Cromatograma de disolventes residuales de Clase 1 utilizando las condiciones descritas para el Sistema B y el Procedimiento 1. Detector de ionización en llama.*



1. metanol
2. acetonitrilo
3. diclorometano
4. hexano
5. *cis*-1,2-dicloroetileno
6. nitrometano
7. cloroformo
8. ciclohexano
9. 1,2-dimetoxietano
10. 1,1,2-tricloroetileno
11. metilciclohexano
12. 1,4-dioxano
13. piridina
14. tolueno
15. 2-hexanona
16. clorobenceno
17. xileno (*orto*, *meta*, *para*)
18. tetralina (t_R = 28 min)

Figura 2.4.24.-4.—*Cromatograma típico de disolventes residuales de Clase 2 utilizando las condiciones descritas para el Sistema B y el Procedimiento 1. Detector de ionización en llama.*

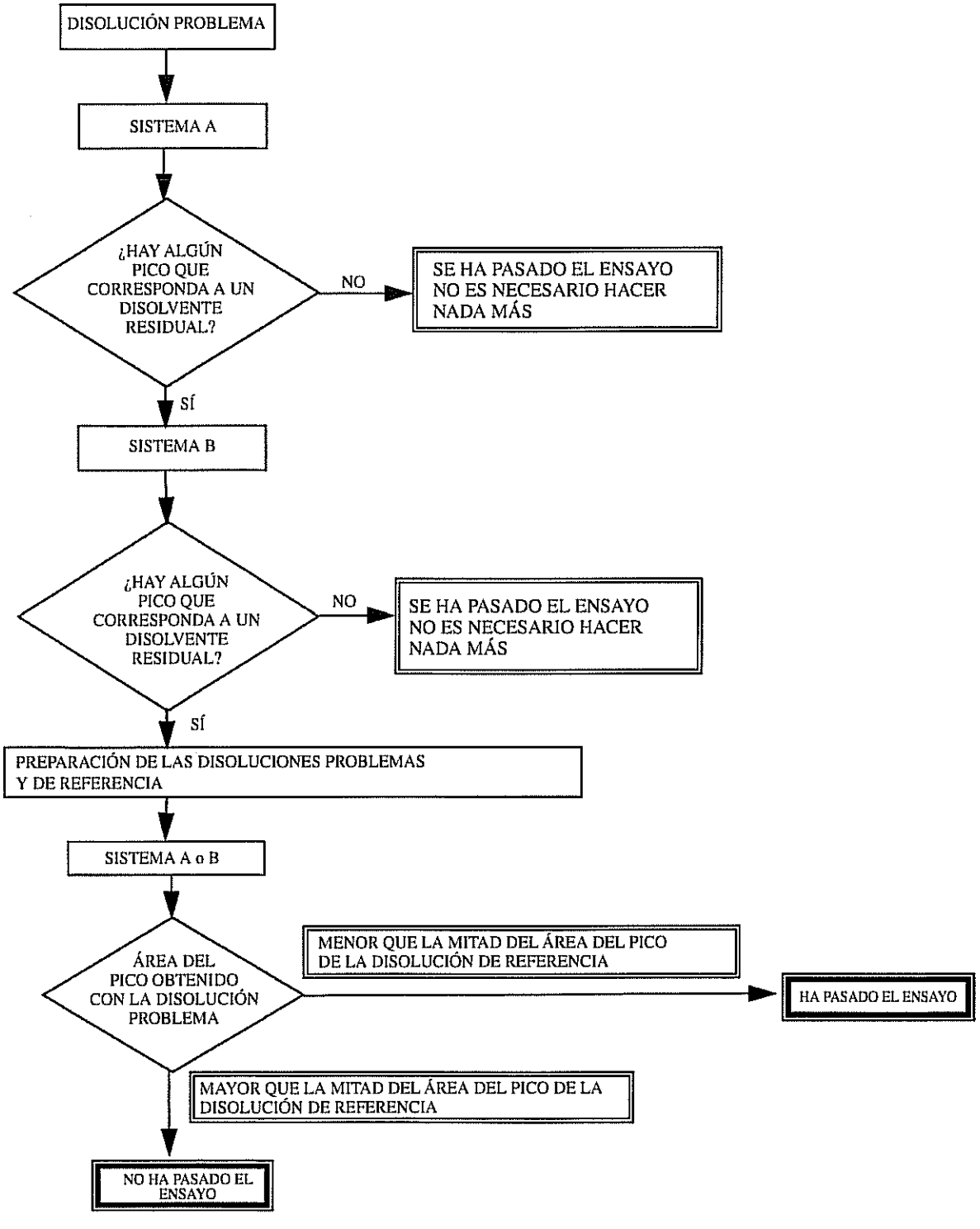


Figura 2.4.24.-5.—*Diagrama relativo a la identificación de disolventes residuales y a la aplicación de ensayos límites*

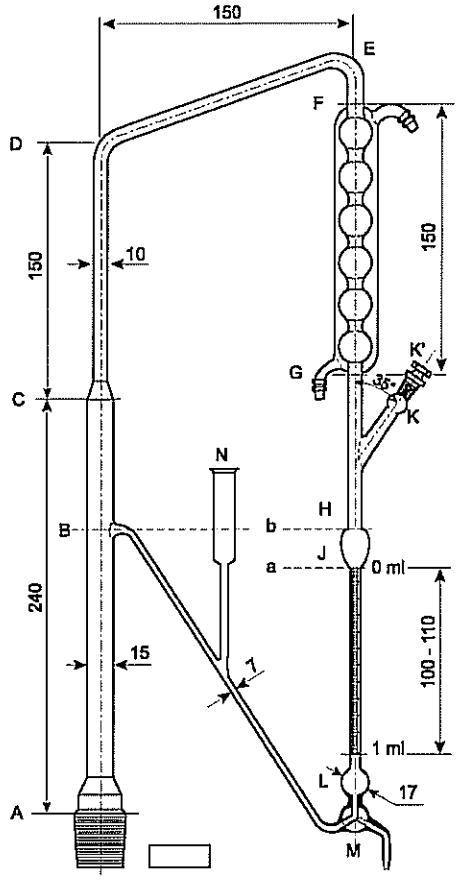


Figura 2.8.12.-1.—*Aparato para la determinación de aceites esenciales en las drogas vegetales. Dimensiones en milímetros*

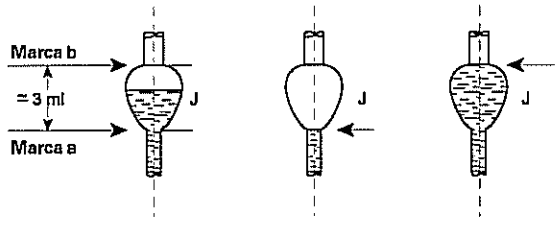


Figura 2.8.12.-2

Cuando el aceite esencial vaya a destinarse a otras operaciones analíticas, la mezcla del mismo con xileno, libre de agua, puede recuperarse del modo siguiente: retirar el tapón (*K'*) e introducir 0,1 ml de una disolución de *fluoresceinato de sodio R* de 1 g/l y 0,5 ml de *agua R*. Reducir el nivel de la mezcla xileno-aceite esencial en el engrosamiento (*L*), mediante la llave de 3 vías. Dejar en reposo durante 5 min y seguidamente dejar que la mezcla fluya lentamente, justo hasta el nivel de la llave (*M*). Abrir dicha llave en sentido inverso a las agujas del reloj, de modo que el agua pueda fluir del tubo de comunicación (*BM*). Enjuagar este último con *acetona R* y luego con un poco de *tolueno R*, vertidos por el tubo de llenado (*N*). Girar de nuevo la llave de tres vías, en el mismo sentido, para recoger la mezcla xileno-aceite esencial en un envase adecuado.

01/2005, 20813

2.8.13. RESIDUOS DE PESTICIDAS

Definición. Para los fines de la Farmacopea, se considera un pesticida toda sustancia o asociación de sustancias que se destine a rechazar, destruir o combatir las plagas y las especies no deseadas de plantas y de animales, que causan daños o resultan perjudiciales para la producción, la transformación, el almacenaje, el transporte o la comercialización de las sustancias medicinales de origen vegetal. El término incluye las sustancias destinadas a la regulación del crecimiento de las plantas, los agentes defoliantes, los agentes desecantes y los productos aplicados a los cultivos, sea antes o después de la cosecha, para proteger los productos frente al deterioro durante el almacenaje y el transporte.

Límites. Salvo indicación contraria en la monografía, la droga a examinar satisface como mínimo los límites indicados en la Tabla 2.8.13.-1. Los límites aplicables a los pesticidas que no figuran en la Tabla 2.8.13.-1 y cuya presencia puede sospecharse por algún motivo se establecen a partir de los límites fijados por las directivas de las Comunidades europeas 76/895 y 90/642, incluyendo sus anexos y las actualizaciones sucesivas. Los límites que se aplican a los pesticidas que no figuran ni en la Tabla 2.8.13.-1 ni en las

directivas comunitarias europeas se calculan mediante la expresión:

$$\frac{DDA \times M}{MDD \times 100}$$

DDA = dosis diaria admisible de la FAO/OMS, en miligramos por kilogramo de masa corporal,

M = masa corporal en kilogramos (60 kg),

MDD = consumo diario de la droga, en kilogramos.

Cuando la droga se destine a la preparación de extractos, tinturas u otras formas farmacéuticas cuyo modo de preparación puede modificar el contenido en pesticidas del producto acabado, los límites se calculan mediante la expresión:

$$\frac{DDA \times M \times E}{MDD \times 100}$$

E = coeficiente de extracción, relacionado con el método de preparación empleado y determinado experimentalmente.

Tabla 2.8.13.-1

Sustancia	Límite mg/kg
Alaclor	0,02
Aldrín y Dieldrín (suma de ambos)	0,05
Azinfos - metilo	1,0
Bromopropilato	3,0
Clordane (suma de los isómeros *cis-*, *trans-* y oxiclordane)	0,05
Clorfenvinfos	0,5
Clorpirifos	0,2
Clorpirifos - metilo	0,1
Cipermetrina (e isómeros)	1,0
DDT (suma de *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDE y *p,p'*-TDE)	1,0
Deltametrina	0,5
Diazinon	0,5
Diclorvos	1,0
Ditiocarbamatos (en CS_2)	2,0
Endosulfán (suma de los isómeros y del sulfato de endosulfán)	3,0
Endrín	0,05
Etión	2,0
Fenitrotión	0,5
Fenvalerato	1,5
Fonofos	0,05
Heptaclor (suma de heptaclor y de heptaclor-epóxido)	0,05
Hexaclorobenceno	0,1
Hexaclorociclohexano - Isómeros (distintos del γ)	0,3
Lindano (γ-Hexaclorociclohexano)	0,6
Malatión	1,0
Metidatión	0,2
Paratión	0,5
Paratión - metilo	0,2
Permetrina	1,0
Fosalona	0,1
Butóxido de piperonilo	3,0
Pirimfos - metilo	4,0
Piretrinas (suma de las)	3,0
Quintoceno (suma de quintoceno, pentacloroanilina y pentaclorofenilsulfuro de metilo)	1,0

En casos excepcionales, pueden autorizarse límites más elevados, sobre todo cuando una planta exige un modo de cultivo particular o presenta un metabolismo o una estructura que pueden dar lugar a un contenido en pesticidas superior al normal.

La autoridad competente puede conceder una exención total o parcial del ensayo cuando se conocen y pueden comprobarse de forma precisa todos los datos retrospectivos del tratamiento (naturaleza y cantidad de los pesticidas empleados, fecha de cada tratamiento durante el cultivo y tras la cosecha) para un lote determinado.

Toma de la muestra a analizar

Método. Para los envases de contenido inferior a 1 kg, homogeneizar cuidadosamente la totalidad del mismo y tomar una muestra suficiente para la realización de los ensayos requeridos. Para los envases de contenido entre 1 kg y 5 kg, tomar una muestra de las partes superior, media e inferior del envase, siendo las tres muestras de un volumen prácticamente idéntico y suficiente para la realización de los ensayos requeridos. Mezclar cuidadosamente las tres muestras. Tomar una muestra de la mezcla, suficiente para la realización de los ensayos requeridos. Para los envases de contenido superior a 5 kg, tomar una muestra de al menos 250 g de las partes superior, media e inferior del envase. Mezclar cuidadosamente las tres muestras. Tomar una muestra de la mezcla, suficiente para la realización de los ensayos requeridos.

Número de muestras. Si el número (*n*) de envases es inferior o igual a 3, tomar muestras de cada envases, siguiendo el procedimiento descrito en Método. Si el número de envases es superior a 3, llevar a cabo el muestreo según la fórmula $\sqrt{n} + 1$, redondeando al número entero inmediatamente superior.

Con objeto de evitar toda modificación física o química de la muestra, ésta debe analizarse de inmediato. Si ello no es posible, conservar la muestra en envases herméticos, de calidad alimentaria, protegidos de la luz y a una temperatura inferior a 0 °C.

Reactivos. Los reactivos y los disolventes deben estar exentos de cualquier contaminante, en especial de pesticidas, que sea susceptible de interferir con los resultados del análisis. A menudo es preciso emplear disolventes de calidad especial o, en su defecto, recientemente destilados en un aparato totalmente de vidrio. En cualquier caso, deben realizarse los ensayos en blanco apropiados.

Equipo. Limpiar los aparatos y, en especial, el material de vidrio de forma que se elimine cualquier traza de pesticidas, por ejemplo sumergiéndolos durante 16 h en una disolución de detergente libre de fosfatos, aclarando con abundante *agua destilada R* y finalmente lavando con acetona y con hexano o heptano.

Análisis cualitativo y cuantitativo de los residuos de pesticidas. Los procedimientos analíticos utilizados deben validarse según las regulaciones vigentes. En particular, satisfacen los criterios siguientes:

— el método escogido, particularmente las etapas de purificación, son adecuados para la combinación del residuo de pesticida con la sustancia a examinar y no está sujeto a interferencias con otras sustancias extraídas en el proceso: deben conocerse los límites de detección y de cuantificación para cada combinación de pesticida y matriz que se analice,

— la recuperación es del 70 por ciento al 110 por ciento para cada pesticida,

— la repetibilidad del método no es inferior a los valores indicados en la Tabla 2.8.13.-2,

— la concentración de las disoluciones problema y de las disoluciones de referencia, así como los ajustes del aparato, son tales que los picos se encuentran en la parte lineal de la respuesta del detector.

Tabla 2.8.13-2

Concentración del analito (mg/kg)	Repetibilidad (Diferencia, ± mg/kg)	Reproducibilidad (Diferencia, ± mg/kg)
0,010	0,005	0,01
0,100	0,025	0,05
1,000	0,125	0,25

Las sección siguiente se da a título de información.

Métodos de análisis de los residuos de pesticidas

INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS, ORGANOCLORADOS Y PIRETROIDES

Los métodos analíticos que se describen seguidamente pueden utilizarse para una determinación de pesticidas tal como se ha descrito en las secciones anteriores. Según cuál sea la sustancia examinada, puede ser necesario realizar modificaciones, en ocasiones importantes, del procedimiento descrito. En cualquier caso, puede ser preciso utilizar además otra columna de polaridad distinta u otro método de detección (como espectrometría de masas), e incluso una técnica analítica distinta (métodos inmunoquímicos, etc.) para confirmar los resultados obtenidos.

El procedimiento siguiente sólo se aplica a las drogas vegetales cuyo contenido en agua no sea superior al 15 por ciento. Las drogas vegetales con mayor contenido en agua pueden desecarse, siempre que se haya demostrado que el proceso de secado empleado no afecta significativamente al contenido en pesticidas.

1. EXTRACCIÓN

Poner en maceración 10 g de la droga a examinar, en polvo grueso, en 100 ml de *acetona R* durante 20 min. Añadir 1 ml de una disolución de 1,8 µg/ml de *carbofenotión R* en *tolueno R*. Homogeneizar con ayuda de un mezclador rápido durante 3 min. Filtrar y lavar el filtro y su contenido con 2 porciones de 25 ml de *acetona R*. Reunir el filtrado y los disolventes de lavado y evaporar hasta casi sequedad utilizando un evaporador rotatorio, a una temperatura no superior a los 40 °C. Añadir algunos mililitros de *tolueno R* y evaporar de nuevo, hasta eliminar por completo la acetona. Disolver el residuo en 8 ml de *tolueno R*. Filtrar por un filtro de membrana (45 µm), enjuagar el matraz y el filtro con *tolueno R* y completar hasta 10,0 ml con el mismo disolvente (disolución A).

2. PURIFICACIÓN

2.1. Insecticidas organofosforados, organoclorados y piretroides. Operar mediante cromatografía de exclusión (*2.2.30*).

La cromatografía se realiza utilizando:

— una columna de acero inoxidable, de 0,30 m de longitud y 7,8 mm de diámetro interior, rellena de *copolímero estireno-divinilbenceno R* (5 µm),

— como fase móvil, a un caudal de 1 ml por minuto, *tolueno R*.

Eficacia de la columna. Inyectar 100 µl de una disolución que contiene 0,5 g/l de *rojo de metilo R* y 0,5 g/l de *azul oracet 2R R* en *tolueno R* y proceder a la cromatografía. La columna sólo es adecuada si el color del eluato cambia del anaranjado al azul después de un volumen de elución de 10,3 ml aproximadamente. Si fuese preciso, calibrar la columna realizando la cromatografía de una mezcla de los insecticidas a analizar, disuelta en *tolueno R* a la concentración apropiada, escogiendo aquél que tenga la masa molecular más baja (por ejemplo, el diclorvos) y el de masa molecular más elevada (por ejemplo, la deltametrina). Determinar la fracción del eluato que contiene estos insecticidas.

Purificación de la disolución a examinar. Inyectar un volumen apropiados de la disolución A (100 µl a 500 µl) y proceder a la cromatografía. Recoger la fracción determinada como se ha indicado anteriormente (disolución B). Los insecticidas organofosforados eluyen normalmente entre 8,8 ml y 10,9 ml, y los insecticidas organoclorados y los piretroides entre 8,5 ml y 10,3 ml.

2.2. Insecticidas organoclorados y piretroides. En una columna cromatográfica de 0,10 m de longitud y 5 mm de diámetro interior, introducir un fragmento de algodón hidrófilo desengrasado y 0,5 g de gel de sílice preparado del modo siguiente: calentar *gel de sílice para cromatografía R* en la estufa a 150 °C durante no menos de 4 h. Dejar enfriar y verter sobre el mismo, gota a gota, una cantidad de *agua R* correspondiente al 1,5 por ciento de la masa del gel de sílice empleado; agitar enérgicamente hasta la eliminación de grumos y proseguir la agitación durante 2 h, utilizando un agitador mecánico. Acondicionar la columna con 1,5 ml de *hexano R*. Pueden utilizarse columnas ya llenas, listas para el uso, que contengan alrededor de 0,5 g de gel de sílice, siempre que se hayan validado previamente.

Concentrar la disolución B en una corriente de *helio para cromatografía R* o de *nitrógeno exento de oxígeno R* hasta casi sequedad y disolver el residuo en un volumen adecuado de *tolueno R* (de 200 µl a 1 ml, según el volumen inyectado en la preparación de la disolución B). Transferir cuantitativamente a la columna y proceder a la cromatografía utilizando 1,8 ml de *tolueno R* como fase móvil. Recoger el eluato (disolución C).

3. ANÁLISIS CUANTITATIVO

3.1. Insecticidas organofosforados. Examinar por cromatografía de gases (*2.2.28*), utilizando el *carbofenotión R* como patrón interno. Puede ser necesario el uso de un segundo patrón interno, para detectar posibles interferencias con el pico del carbofenotión.

Disolución problema. Concentrar la disolución B bajo una corriente de *helio para cromatografía R* hasta casi sequedad y disolver el residuo en 100 µl de *tolueno R*.

Disolución de referencia. Preparar al menos 3 disoluciones en *tolueno R* que contengan el insecticida o los insecticidas a analizar y carbofenotión, a las concentraciones apropiadas para la construcción de una curva de calibrado.

El método cromatográfico puede llevarse a cabo utilizando:

— una columna de sílice fundida, de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interior, cuya pared interior está recubierta de una capa de 0,25 µm de *poli(dimetil)siloxano R*,

— como gas portador, *hidrógeno para cromatografía R;* pueden utilizarse también otros gases portadores como el *helio para cromatografía R* o el *nitrógeno para cromatografía R*, siempre que se valide adecuadamente el método,

— un detector de ionización en llama de nitrógeno-fósforo o un detector de espectrometría de emisión atómica.

La temperatura del bloque de inyección se mantiene a 250 °C y la del detector a 275 °C. La temperatura de la columna se programa del modo siguiente: mantener la temperatura a 80 °C durante 1 min, elevarla hasta 150 °C a razón de 30 °C por minuto y mantener esta temperatura durante 3 min; seguidamente, elevar la temperatura hasta 280 °C a razón de 4 °C por minuto y mantener esta temperatura durante 1 min.

Inyectar el volumen escogido de cada disolución. Cuando los cromatogramas se registran en las condiciones prescritas, los tiempos de retención relativos son aproximadamente los indicados en la Tabla 2.8.13.-3. Calcular el contenido de cada pesticida a partir del área de los picos y de la concentración de las disoluciones.

Tabla 2.8.13.-3

Sustancia	Tiempo de retención relativo
Diclorvos	0,20
Fonofos	0,50
Diazinon	0,52
Paratión - metilo	0,59
Clorpirifos - metilo	0,60
Pirimfos - metilo	0,66
Malatión	0,67
Paratión	0,69
Clorpirifos	0,70
Metidatión	0,78
Etión	0,96
Carbofenotión	1,00
Azinfos - metilo	1,17
Fosalona	1,18

3.2. Insecticidas organoclorados y piretroides. Examinar por cromatografía de gases (*2.2.28*) utilizando el *carbofenotión R* como patrón interno. Puede ser necesario el uso de un segundo patrón interno, para detectar posibles interferencias con el pico del carbofenotión.

Disolución problema. Evaporar con cuidado la disolución C bajo una corriente de *helio para cromatografía R* o de *nitrógeno exento de oxígeno para cromatografía R* hasta casi sequedad y disolver el residuo en 500 µl de *tolueno R*.

Disolución de referencia. Preparar al menos 3 disoluciones en *tolueno R* que contengan el insecticida o los insecticidas a analizar y carbofenotión, a las concentraciones apropiadas para la construcción de una curva de calibrado.

El método cromatográfico puede llevarse a cabo utilizando:

— una columna de sílice fundida, de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interior, cuya pared interior está recubierta de una capa de 0,25 µm de *poli(dimetil)(difenil)siloxano R*,

— como gas portador, *hidrógeno para cromatografía R;* pueden utilizarse también otros gases portadores como el *helio para cromatografía R* o el *nitrógeno para cromatografía R*, siempre que se valide adecuadamente el método,

— un detector de captura de electrones,

— un inyector que permita la inyección directa sobre la columna, en frío.

La temperatura del bloque de inyección se mantiene a 250 °C y la del detector a 275 °C. La temperatura de la columna se programa del modo siguiente: mantener la temperatura a 80 °C durante 1 min, elevarla hasta 150 °C a razón de 30 °C por minuto y mantener esta temperatura durante 3 min; seguidamente, elevar la temperatura hasta 280 °C a razón de 4 °C por minuto y mantener esta temperatura durante 1 min.

Inyectar el volumen escogido de cada disolución. Cuando los cromatogramas se registran en las condiciones prescritas, los tiempos de retención relativos son aproximadamente los indicados en la Tabla 2.8.13.-4. Calcular el contenido de cada pesticida a partir del área de los picos y de la concentración de las disoluciones.

Tabla 2.8.13.-4

Sustancia	Tiempo de retención relativo
α-Hexaclorociclohexano	0,44
Hexaclorobenceno	0,45
β-Hexaclorociclohexano	0,49
Lindane	0,49
δ-Hexaclorociclohexano	0,54
ε-Hexaclorociclohexano	0,56
Heptaclor	0,61
Aldrín	0,68
cis-Heptaclor - epóxido	0,76
o,p'-DDE	0,81
α-Endosulfán	0,82
Dieldrín	0,87
p,p'-DDE	0,87
o,p'-DDD	0,89
Endrín	0,91
β-Endosulfán	0,92
o,p'-DDT	0,95
Carbofenotión	1,00
p,p'-DDT	1,02
cis-Permetrina	1,29
trans-Permetrina	1,31
Cipermetrina *	1,40
Fenvalerato *	1,47 y 1,49
Deltametrina	1,54

* La sustancia presenta numerosos picos.

01/2005, 20814

2.8.14. DETERMINACIÓN DE TANINOS EN DROGAS VEGETALES

Realizar todas las operaciones de extracción y dilución protegidas de la luz.

3.2.S.4.- CONTROL DEL PRODUCTO

3.2.S.4.1.- Especificaciones

3.2.S.4.1.1.- Especificaciones de la planta

En el siguiente cuadro se esquematizan los análisis rutinarios a los que se somete la planta, junto con las especificaciones y resultados obtenidos:

Especificaciones analíticas	Valor requerido	Método	Resultados
Pérdida por desecación	Max.10%	01/v.v.:1587	Conforme
Cenizas	Max.10 %	01/v.v.:1587	Conforme
Granulometría	70%<15mm	2.9.12 (R.F.E.)	
Elementos Extraños	Max. 2%	2.8.2. (Eur. Phar)	Conforme
Metales pesados	(Farmacopea Europea v.v.)	2.4.8 (R.F.E.)	Conforme
Pesticidas		2.8.13 (R.F.E.)	Conforme
Organofosforados	(Real Farmacopea Española v.v.)	2.8.13 (R.F.E.)	
Organoclorados			Conforme
			Conforme
Título	> 0,05% Catequinas totales como EPGCG	HPLC Interno	Conforme
Especificaciones Microbiológicas	**Valor requerido**		**Resultados**
Aerobios Totales	< 100.000 ufc/g	2.6.13 (R.F.E.)	Conforme
Hongos	< 10.000 ufc/g	2.6.13 (R.F.E.)	Conforme
Enterobacterias	< 1.000 ufc/g	2.6.13 (R.F.E.)	Conforme
Salmonela	Ausencia (10 g)	2.6.13 (R.F.E.)	Ausencia
E. Coli	Ausencia (1 g)	2.6.13 (R.F.E.)	Ausencia
Origen de la planta	**Tipo de cultivo**	**Parte utilizada**	
España	Silvestre	Hojas	

- R.F.E. ⇒ Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea v.v.

3.2.S.4.1.2. Especificaciones del extracto

Título	Especificaciones	Metodo
Descripcion, (Apariencia)	Polvo fino Ocre con olor y sabor característico de la planta.	Método Interno
Solubilidad	Soluble en agua y en soluciones hidroalcohólicas	Eur. Ph. (c.v.). 2.2.1. PNT nº MFT-0009
pH	4 – 7	Eur. Ph. (c.v.). 2.2.3. PNT nº MFT-0010
Granulometria (Tamaño de Particula)	> 70% Pasa por 180 µm	Eur. Ph (c.v.) 2.9.12 PNT Nº MFT0015
Humedad	≤5.5%	Eur. Ph. (c.v.). 2.2.32. PNT nº MFT-0006
Densidad	≥ 0,4 g/ml	Eur. Ph.(c.v.). 2.9.15 PNT nº MFT-003
Cenizas	≤ 15.0 %	Eur. Ph. (c.v.). 2.4.16. PNT nº MFT 0002
Concenrtación del principio activo (Título)	0,2% –0,6% EPGCG	HPLC(MCC-V-0024R01)
Disolventes residuales • Ethanol *	< 5000 ppm	Eur. Ph. (c.v.).2.4.24. PNT nº-096
Metales pesados * (Pb, Hg, Cd y As)	< 20 ppm	Eur. Ph. (c.v.). 2.4.8. PNT-034
Aflatoxinas*	≤1.5 ppb	ELISA (PNT-192)
Pesticidas*	Cumple	Eur. Ph (c.v.). 2.8.13. (PNT-052)
Conservantes	Ausencia	---
Aerobios totales	<10.000 ufc/g	Eur. Ph. (c.v.). 2.6.12.; 2.6.13
Hogos y levaduras	<100 ufc/g	Eur. Ph. (c.v.). 2.6.12. ;2.6.13
Enterobacteria	<100 ufc/g	Eur. Ph. (c.v.). 2.6.12. ;2.6.13
E. coli	Absent in 1 g	Eur. Ph. (c.v.). 2.6.12.; 2.6.13
Salmonella	Absent in 10 g	Eur. Ph. (c.v.). 2.6.12.; 2.6.13
S. aureus	Absent	Eur. Ph. (c.v.). 2.6.12.; 2.6.13
P. aeruginosa	Absent	Eur. Ph. (c.v.). 2.6.12.; 2.6.13 PNT nºMMB-0001

* Análisis llevado a cabo por Quantum experimental

Se adjunta la monografía 01/v.v.:0765 de la European Pharmacopoeia de extractos.

04/2008:0765

EXTRACTS

Extracta

DEFINITION

Extracts are preparations of liquid (liquid extracts and tinctures), semi-solid (soft extracts and oleoresins) or solid (dry extracts) consistency, obtained from herbal drugs or animal matter, which are usually in a dry state.

Where medicinal products are manufactured using extracts of animal origin, the requirements of chapter *5.1.7. Viral safety* apply.

Different types of extract may be distinguished. Standardised extracts are adjusted within an acceptable tolerance to a given content of constituents with known therapeutic activity; standardisation is achieved by adjustment of the extract with inert material or by blending batches of extracts. Quantified extracts are adjusted to a defined range of constituents; adjustments are made by blending batches of extracts. Other extracts are essentially defined by their production process (state of the herbal drug or animal matter to be extracted, solvent, extraction conditions) and their specifications.

PRODUCTION

Extracts are prepared by suitable methods using ethanol or other suitable solvents. Different batches of the herbal drug or animal matter may be blended prior to extraction. The herbal drug or animal matter to be extracted may undergo a preliminary treatment, for example, inactivation of enzymes, grinding or defatting. In addition, unwanted matter may be removed after extraction.

Herbal drugs, animal matter and organic solvents used for the preparation of extracts comply with any relevant monograph of the Pharmacopoeia. For soft and dry extracts where the organic solvent is removed by evaporation, recovered or recycled solvent may be used, provided that the recovery procedures are controlled and monitored to ensure that solvents meet appropriate standards before re-use or admixture with other approved materials. Water used for the preparation of extracts is of a suitable quality. Except for the test for bacterial endotoxins, water complying with the section on Purified water in bulk in the monograph on *Purified water (0008)* is suitable. Potable water may be suitable if it complies with a defined specification that allows the consistent production of a suitable extract.

Where applicable, concentration to the intended consistency is carried out using suitable methods, usually under reduced pressure and at a temperature at which deterioration of the constituents is reduced to a minimum. Essential oils that have been separated during processing may be restored to the extracts at an appropriate stage in the manufacturing process. Suitable excipients may be added at various stages of the manufacturing process, for example to improve technological qualities such as homogeneity or consistency. Suitable stabilisers and antimicrobial preservatives may also be added.

Extraction with a given solvent leads to typical proportions of characterised constituents in the extractable matter; during production of standardised and quantified extracts, purification procedures may be applied that increase these proportions with respect to the expected values; such extracts are referred to as 'refined'.

IDENTIFICATION

Extracts are identified using a suitable method.

TESTS

Where applicable, as a result of analysis of the herbal drug or animal matter used for production and in view of the production process, tests for microbiological quality (*5.1.4*), heavy metals, aflatoxins and pesticide residues (*2.8.13*) in the extracts may be necessary.

ASSAY

Wherever possible, extracts are assayed by a suitable method.

LABELLING

The label states:

- the herbal drug or animal matter used;
- whether the extract is liquid, soft or dry, or whether it is a tincture;
- for standardised extracts, the content of constituents with known therapeutic activity;
- for quantified extracts, the content of constituents (markers) used for quantification;
- the ratio of the starting material to the genuine extract (extract without excipients) (DER);
- the solvent or solvents used for extraction;
- where applicable, that a fresh herbal drug or fresh animal matter has been used;
- where applicable, that the extract is 'refined';
- the name and amount of any excipient used including stabilisers and antimicrobial preservatives;
- where applicable, the percentage of dry residue.

Liquid extracts – extracta fluida

DEFINITION

Liquid extracts are liquid preparations of which, in general, 1 part by mass or volume is equivalent to 1 part by mass of the dried herbal drug or animal matter. These preparations are adjusted, if necessary, so that they satisfy the requirements for content of solvent, and, where applicable, for constituents.

PRODUCTION

Liquid extracts are prepared by using ethanol of a suitable concentration or water to extract the herbal drug or animal matter, or by dissolving a soft or dry extract (which has been produced using the same strength of extraction solvent as is used in preparing the liquid extract by direct extraction) of the herbal drug or animal matter in either ethanol of a suitable concentration or water. Liquid extracts may be filtered, if necessary.

A slight sediment may form on standing, which is acceptable as long as the composition of the liquid extract is not changed significantly.

TESTS

Relative density (*2.2.5*). Where applicable, the liquid extract complies with the limits prescribed in the monograph.

Ethanol (*2.9.10*). For alcoholic liquid extracts, carry out the determination of ethanol content. The ethanol content complies with that prescribed.

Methanol and 2-propanol (*2.9.11*): maximum 0.05 per cent *V/V* of methanol and maximum 0.05 per cent *V/V* of 2-propanol for alcoholic liquid extracts, unless otherwise prescribed.

Dry residue (*2.8.16*). Where applicable, the liquid extract complies with the limits prescribed in the monograph, corrected if necessary, taking into account any excipient used.

General monographs

STORAGE

Protected from light.

LABELLING

The label states in addition to the requirements listed above:

- where applicable, the ethanol content in per cent *V/V* in the final extract.

Tinctures – tincturae

DEFINITION

Tinctures are liquid preparations that are usually obtained using either 1 part of herbal drug or animal matter and 10 parts of extraction solvent, or 1 part of herbal drug or animal matter and 5 parts of extraction solvent.

PRODUCTION

Tinctures are prepared by maceration or percolation (outline methodology is given below) using only ethanol of a suitable concentration for extraction of the herbal drug or animal matter, or by dissolving a soft or dry extract (which has been produced using the same strength of extraction solvent as is used in preparing the tincture by direct extraction) of the herbal drug or animal matter in ethanol of a suitable concentration. Tinctures are filtered, if necessary.

Tinctures are usually clear. A slight sediment may form on standing, which is acceptable as long as the composition of the tincture is not changed significantly.

Production by maceration. Unless otherwise prescribed, reduce the herbal drug or animal matter to be extracted to pieces of suitable size, mix thoroughly with the prescribed extraction solvent and allow to stand in a closed container for an appropriate time. The residue is separated from the extraction solvent and, if necessary, pressed out. In the latter case, the 2 liquids obtained are combined.

Production by percolation. If necessary, reduce the herbal drug or animal matter to be extracted to pieces of suitable size. Mix thoroughly with a portion of the prescribed extraction solvent and allow to stand for an appropriate time. Transfer to a percolator and allow the percolate to flow at room temperature slowly making sure that the herbal drug or animal matter to be extracted is always covered with the remaining extraction solvent. The residue may be pressed out and the expressed liquid combined with the percolate.

TESTS

Relative density (*2.2.5*). Where applicable, the tincture complies with the limits prescribed in the monograph.

Ethanol (*2.9.10*). The ethanol content complies with that prescribed.

Methanol and 2-propanol (*2.9.11*): maximum 0.05 per cent *V/V* of methanol and maximum 0.05 per cent *V/V* of 2-propanol, unless otherwise prescribed.

Dry residue (*2.8.16*). Where applicable, the tincture complies with the limits prescribed in the monograph, corrected if necessary, taking into account any excipient used.

STORAGE

Protected from light.

LABELLING

The label states in addition to the requirements listed above:

- for tinctures other than standardised and quantified tinctures, the ratio of starting material to extraction liquid or of starting material to final tincture;
- the ethanol content in per cent *V/V* in the final tincture.

Soft extracts – extracta spissa

DEFINITION

Soft extracts are semi-solid preparations obtained by evaporation or partial evaporation of the solvent used for extraction.

TESTS

Dry residue (*2.8.16*). The soft extract complies with the limits prescribed in the monograph.

Solvents. Residual solvents are controlled as described in chapter *5.4*, unless otherwise prescribed or justified and authorised.

STORAGE

Protected from light.

Oleoresins – oleoresina

DEFINITION

Oleoresins are semi-solid extracts composed of a resin in solution in an essential and/or fatty oil and are obtained by evaporation of the solvent(s) used for their production.

This monograph applies to oleoresins produced by extraction and not to natural oleoresins.

TESTS

Water (*2.2.13*). The oleoresin complies with the limits prescribed in the monograph.

Solvents. Residual solvents are controlled as described in chapter *5.4*, unless otherwise prescribed or justified and authorised.

STORAGE

In an airtight container, protected from light.

Dry extracts – extracta sicca

DEFINITION

Dry extracts are solid preparations obtained by evaporation of the solvent used for their production. Dry extracts have a loss on drying of not greater than 5 per cent *m/m*, unless a loss on drying with a different limit or a test on water is prescribed in the monograph.

TESTS

Water (*2.2.13*). Where applicable, the dry extract complies with the limits prescribed in the monograph.

Loss on drying (*2.8.17*). Where applicable, the dry extract complies with the limits prescribed in the monograph.

Solvents. Residual solvents are controlled as described in chapter *5.4*, unless otherwise prescribed or justified and authorised.

STORAGE

In an airtight container, protected from light.

3.2.S.4.2. Procesos analíticos

3.2.S.4.2.1. Planta: *Agrimonia eupatoria L*

Análisis rutinarios de la planta

Elementos extraños

Satisface el ensayo de elementos extraños.

- Otros elementos extraños: Max. 2%

Método descrito en la Monografía de Farmacopea Europea sobre Planta de Agrimonia *01/v.v.,1587.*

Pérdida por desecación

No más del 10 %, determinada en 1,000 g de droga pulverizada por desecación en una estufa entre 100 °C y 105 °C durante 2h.

Método descrito en la Monografía de Farmacopea Europea sobre Planta de Agrimonia *01/v.v.,1587.*

Granulometría

Para llevar a cabo la determinación del tamaño del troceado de las hojas de Agrimonia, se ha seguido un método visual establecido y registrado previamente mediante el correspondiente Protocolo Normalizado de Trabajo por el Departamento de Control de Calidad.

El tamaño del troceado debe ser menor a 15 mm en el 70% del troceado total.

Pesticidas

Se determina el contenido de pesticidas en la planta siguiendo la técnica y metodología descrita en la Farmacopea Europea v.v. y en la Real Farmacopea Española v.v.(2.8.13 (R.F.E.))

Metales pesados

Se determina el contenido de Metales pesados en la planta siguiendo la técnica y metodología descrita en la Pharmacopea Europea v.v. y en la Real Farmacopea Española v.v.

Cenizas Totales

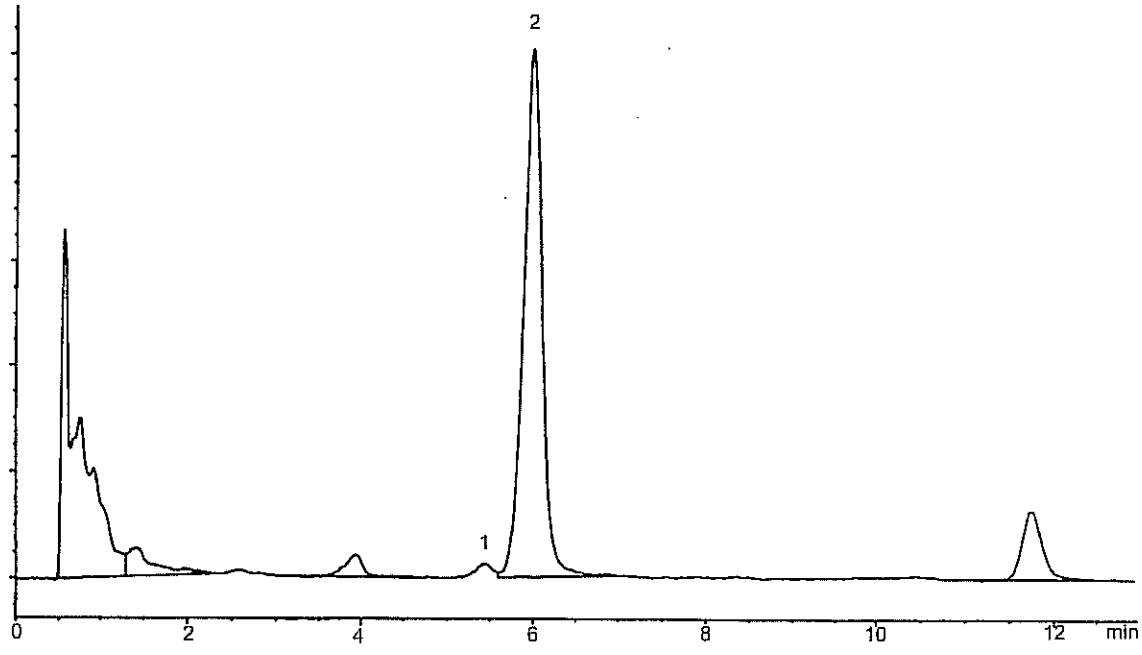
No más del 10 %.

Método descrito en la Monografía de Farmacopea Europea sobre Planta de Agrimonia *01/v.v.,1587.*

Microbiología

Las determinaciones microbiológicas siguen las especificaciones descritas en la Eur. Ph. (v.v.), 2.6.12., y 2.6.13. y en la Real Farmacopea Española v.v.

Para el control microbiológico de la planta se sigue la monografía de productos de categoría 4.A.



1. penduletin 2. casticin

Figure 2147.-1. – *Chromatogram for the assay of casticin in Agnus castus fruit: test solution*

Test solution. Extract 1.000 g of the powdered drug (355) (*2.9.12*) with 40 ml of *methanol R* for 2 min using a suitable-speed homogeniser. Collect the supernatant liquid and filter into a 250 ml flask. Repeat the extraction with a further 40 ml of *methanol R*, collecting the supernatant liquid and filtering as before. Rinse the residue carefully with a small quantity of *methanol R*. Combine the methanol extracts and rinsings and evaporate to dryness *in vacuo* in a water-bath at not more than 30 °C. With the aid of ultrasound, dissolve the residue obtained in *methanol R* and dilute to 20.0 ml with the same solvent. Filter the solution through a membrane filter (0.45 µm). Dilute 1.0 ml to 10.0 ml with *methanol R*.

Reference solution. Dissolve 100.0 mg of *agnus castus fruit standardised dry extract CRS* in 20.0 ml of *methanol R* with the aid of ultrasound for 20 min.

Column:

- *size*: l = 0.125 m, Ø = 3.0 mm;
- *stationary phase*: *octadecylsilyl silica gel for chromatography R* (3 µm);
- *temperature*: 25 °C.

Mobile phase:

- *mobile phase A*: 5.88 g/l solution of *phosphoric acid R*;
- *mobile phase B*: *methanol R*;

Time (min)	Mobile phase A (per cent *V/V*)	Mobile phase B (per cent *V/V*)
0 - 13	50 → 35	50 → 65
13 - 18	35 → 0	65 → 100
18 - 23	0 → 50	100 → 50

Flow rate: 1.0 ml/min.

Detection: spectrophotometer at 348 nm.

Injection: 10 µl.

System suitability: test solution:

- *resolution*: minimum 1.5 between the peaks due to penduletin and casticin (see Figure 2147.-1).

Calculate the percentage content of casticin from the following expression:

$$\frac{F_1 \times m_2 \times p_1 \times 10}{F_2 \times m_1}$$

F_1 = area of the peak due to casticin in the chromatogram obtained with the test solution;

F_2 = area of the peak due to casticin in the chromatogram obtained with the reference solution;

m_1 = mass of the drug used to prepare the test solution, in grams;

m_2 = mass of *agnus castus fruit standardised dry extract CRS* used to prepare the reference solution, in grams;

p_1 = percentage content of casticin in *agnus castus fruit standardised dry extract CRS*.

01/2008:1587
corrected 6.0

AGRIMONY

Agrimoniae herba

DEFINITION

Dried flowering tops of *Agrimonia eupatoria* L.

Content: minimum 2.0 per cent of tannins, expressed as pyrogallol ($C_6H_6O_3$; M_r 126.1) (dried drug).

IDENTIFICATION

A. The stem is green or, more usually, reddish, cylindrical and infrequently branched. It is covered with long, erect or tangled hairs. The leaves are compound imparipennate with 3 or 6 opposite pairs of leaflets, with 2 or 3 smaller leaflets between. The leaflets are deeply dentate to serrate, dark green on the upper surface, greyish and densely tormentose on the lower face. The flowers are

small and form a terminal spike. They are pentamerous and borne in the axils of hairy bracts, the calyces closely surrounded by numerous terminal hooked spires, which occur on the rim of the hairy receptacle. The petals are free, yellow and deciduous. Fruit-bearing obconical receptacles, with deep furrows and hooked bristles, are usually present at the base of the inflorescence.

B. Reduce to a powder (355) (*2.9.12*). The powder is yellowish-green to grey. Examine under a microscope using *chloral hydrate solution R*. The powder shows numerous straight of bent, unicellular, long thick-walled (about 500 µm) trichomes finely warty and sometimes spiraly marked; fragments of parenchyma with prisms and cluster crystals of calcium oxalate; fragments of leaf epidermis with sinuous walls, those of the lower epidermis with abundant stomata, mostly anomocytic but occasionally anisocytic; ovoid to subspherical-pollen grains, with 3 pores and a smooth exine; fragments of glandular trichomes with a multicellular uniseriate stalk and a spherical unicellular or quadricellular head; groups of fibres and spiral and bardered-fitted vessels from the stem.

C. Thin-layer chromatography (*2.2.27*).

Test solution. To 2.0 g of the powdered drug (355) (*2.9.12*) add 20 ml of *methanol R*. Heat with shaking at 40 °C for 10 min. Filter.

Reference solution. Dissolve 1.0 mg of *rutin R* and 1.0 mg of *isoquercitroside R* in 2 ml of *methanol R*.

Plate: *TLC silica gel plate R*.

Mobile phase: *anhydrous formic acid R, water R, ethyl acetate R* (10:10:80 *V/V/V*).

Application: 10 µl, as bands.

Development: over a path of 12 cm.

Drying: at 100-105 °C.

Detection: spray the still warm plate with a 10 g/l solution of *diphenylboric acid aminoethyl ester R* in *methanol R* and then with a 50 g/l solution of *macrogol 400 R* in *methanol R*. Allow the plate to dry in air for 30 min. Examine in ultraviolet light at 365 nm

Results: see below the sequence of the zones present in the chromatograms obtained with the reference and test solutions.

Top of the plate	
	An orange fluorescent zone may be present (quercitroside)
Isoquercitroside: an orange fluorescent zone	An orange fluorescent zone (isoquercitroside)
	An orange fluorescent zone (hyperoside)
Rutin: an orange fluorescent zone	An orange fluorescent zone (rutin)
Reference solution	**Test solution**

TESTS

Loss on drying (*2.2.32*): maximum 10.0 per cent, determined on 1.000 g of the powdered drug (355) (*2.9.12*) by drying in an oven at 105 °C for 2 h.

Total ash (*2.4.16*): maximum 10.0 per cent.

ASSAY

Carry out the determination of tannins in herbal drugs (*2.8.14*). Use a 1.000 g of powdered drug (180) (*2.9.12*).

01/2008:1238

AIR, MEDICINAL

Aer medicinalis

DEFINITION

Compressed ambient air.

Content: 20.4 per cent *V/V* to 21.4 per cent *V/V* of oxygen (O_2).

CHARACTERS

A colourless, odourless gas.

Solubility: at a temperature of 20 °C and a pressure of 101 kPa, 1 volume dissolves in about 50 volumes of water.

PRODUCTION

Carbon dioxide: maximum 500 ppm *V/V*, determined using an infrared analyser (*2.5.24*).

Gas to be examined. Use the substance to be examined. It must be filtered to avoid stray light phenomena.

Reference gas (a). Use a mixture of 79 per cent *V/V* of *nitrogen R1* and 21 per cent *V/V* of *oxygen R* containing less than 1 ppm *V/V* of *carbon dioxide R1*.

Reference gas (b). Use a mixture of 79 per cent *V/V* of *nitrogen R1* and 21 per cent *V/V* of *oxygen R* containing 500 ppm *V/V* of *carbon dioxide R1*.

Calibrate the apparatus and set the sensitivity using reference gases (a) and (b). Measure the content of carbon dioxide in the gas to be examined.

Carbon monoxide: maximum 5 ppm *V/V*, determined using an infrared analyser (*2.5.25*).

Gas to be examined. Use the substance to be examined. It must be filtered to avoid stray light phenomena.

Reference gas (a). Use a mixture of 79 per cent *V/V* of *nitrogen R1* and 21 per cent *V/V* of *oxygen R* containing less than 1 ppm *V/V* of *carbon monoxide R*.

Reference gas (b). Use a mixture of 79 per cent *V/V* of *nitrogen R1* and 21 per cent *V/V* of *oxygen R* containing 5 ppm *V/V* of *carbon monoxide R*.

Calibrate the apparatus and set the sensitivity using reference gases (a) and (b). Measure the content of carbon monoxide in the gas to be examined.

Sulphur dioxide: maximum 1 ppm *V/V*, determined using an ultraviolet fluorescence analyser (Figure 1238.-1).

The apparatus consists of the following:

- a system generating ultraviolet radiation with a wavelength of 210 nm, made up of an ultraviolet lamp, a collimator, and a selective filter; the beam is blocked periodically by a chopper rotating at high speeds;
- a reaction chamber, through which flows the gas to be examined;
- a system that detects radiation emitted at a wavelength of 350 nm, made up of a selective filter, a photomultiplier tube and an amplifier.

Gas to be examined. Use the substance to be examined. It must be filtered.

Reference gas (a). Use a mixture of 79 per cent *V/V* of *nitrogen R1* and 21 per cent *V/V* of *oxygen R*.

Reference gas (b). Use a mixture of 79 per cent *V/V* of *nitrogen R1* and 21 per cent *V/V* of *oxygen R* containing 0.5 ppm *V/V* to 2 ppm *V/V* of *sulphur dioxide R1*.

Identificación del producto vegetal

1. *Identificación A: Identificación Macroscópica.*

- Se realiza dicha identificación, de acuerdo Real Farmacopea Española / Farmacopea Europea sobre *Planta de Agrimonia 01/v.v.,1587.*

2. *Identificación B: Identificación Microscópica.*

- Se realiza dicha identificación, de acuerdo Real Farmacopea Española / Farmacopea Europea sobre *Planta de Agrimonia 01/v.v.,1587.*

Identificación y valoración del marcador en planta.

El análisis bibliográfico señala que las sustancias marcadoras, que además coinciden con parte de los principios activos de este extracto y que provienen de las partes aéreas de Agrimonia, son los Catequinas totales como Epigalocatequinas galato (EPGCG).

Identificación y Valoración por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se determina el contenido en EPGCG. La valoración se desarrolló y validó en base al método interno desarrollado por el Departamento de Control de Calidad de PULEVA BIOTECH/ EXXENTIA.

Describimos a continuación las partes más destacadas del método analíico desarrollado.

✓ Descripción del método:

La cromatografía se llevará a cabo utilizando:

- Columna PRODIGY 5 μM ODS (3) 150 x 4.6 mm.
- La fase móvil va a tener un flujo de 1,0 mm/min y va estar formada por Acetonitrilo y Ácido Fosfórico al 0.1%
- La lectura de las absorbancia será a una λ= 280 nm.
- Volumen de Inyección del Patrón: 2 μl
- Volumen de Inyección de la Muestra: 10 μl
- Tª de la columna: 25 ºC
- La fase móvil va a estar formada por el siguiente gradiente:

Tiempo(minutos)	Acetonitrilo (%)	Ác. Fosfórico 0.1% (%) (v/v)*	Flujo (ml/min)
0	8	92	1.0
35	22	78	1.0
36	22	78	1.0
45	8	92	1.0

- Los tiempos de retención aproximados son:

	Tiempo en min.
Ácido Gálico	2-3
Catequina	8-9
Epigalocatequingalato	13-14

A continuación se resume brevemente el procedimiento llevado a cabo:

Para la preparación de la fase móvil es necesario preparar una solución de tampón fosfato del 50 mM, para ello hay que pesar 0,6804 g de potasio dihidrógeno fosfato se diluye en 90 ml de agua calidad HPLC. Se sonica hasta total disolución del producto y se enrasa a 100 ml con agua.

A partir de esta solución se realizan diluciones 1/10 en agua calidad HPLC; para obtener el tampón fosfato 5 mM, necesario para la fase móvil

Los cálculos se realizarán teniendo en cuenta la siguiente fórmula, expresando los resultados como *% Catequinas Totales (Epigalocatequina galato):*

$$\frac{Am \times Vp \times Cp\ (mg/ml)}{Ap \times Vm \times 10} \times \frac{\text{Volumen de disolución De la muestra (ml)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times R$$

Am = Área de la muestra

Ap = Área del patrón

Vp= Volumen inyectado del patrón

Vm= Volumen inyectado de la muestra

Cp= Concentración del patrón expresada en mg/ml

R= Riqueza del patrón (expresado en % o en fracción decimal)

3.2.S.4.2.2. Extracto seco de Agrimonia

Análisis del extracto. Características Físico Químicas.
Identificación del marcador
Valoración del marcador.

Análisis del extracto. Características físico químicas.

A continuación se procede a realizar una breve explicación de los métodos de determinación de las características Físico- Químicas del extracto seco (Agua 100%(v/v), Relación planta extracto: (4/1)) de *Agrimonia eupatoria L.*

Éstas características incluyen la totalidad de las especificaciones consideradas en el extracto seco.

Descripción: Aspecto y olor
Solubilidad
pH de las soluciones
Granulometría
Volumen y densidad aparente
Perdida por desecación
Cenizas totales
Microbiología

-Aspecto

Procedimiento

Sobre un papel blanco esparcir una capa fina de 0.5 a 2 gramos de la muestra a examinar. Observar con luz visible difusa la homogeneidad, el color y la textura.

Describir e informar cualquier contaminación visible de fibras, partículas extrañas etc.

-Olor

Procedimiento

Sobre un vidrio repartir una capa fina de 0,5 a 2 gramos de la muestra a ensayar. Determinar el olor de la muestra.

Especificaciones

E.S. Agrimonia es un producto de color ocre y con olor y sabor característico de la especie.

- Solubilidad

Aparatos y reactivos

Balanza analítica

Material volumétrico

Alcohol y agua

Procedimiento

Determinar la claridad de la solución e informar cualquier impureza física.

Disolver 1g de E.S. Agrimonia en un volumen de 10 ml de agua y de etanol en relación 40-60% etanol (v/v).

En un tubo de ensayo graduado de vidrio de 20ml, se añade 1 g de muestra problema y se completa el volumen hasta 10 ml con agua, alcohol de 96º ó mezcla hidroalcohólica. Se realiza una agitación suave y se observa la solubilidad.

La solubilidad se determina a 25º C y del sobrenadarte se evapora a sequedad un volumen medio para determinar por pesada, la cantidad de sólido disuelta.

- Grado de limpidez y opalescencia: en tubos de ensayo idénticos de vidrio neutro, incoloro y transparente, de 15-25 mm. de diámetro y fondo plano, introducimos el líquido a examinar y la suspensión de referencia preparada extemporáneamente como se indica:

La columna del líquido en el interior del tubo debe tener una altura de 40 mm. Cinco minutos después de preparar la suspensión de referencia observar los líquidos en el sentido del eje del tubo, sobre fondo negro y con luz diurna difusa.

La difusión de la luz debe ser tal que permita diferenciar fácilmente la solución de referencia del tubo de la suspensión y la del agua.
Limpidez: cuando es igual a la del agua, o bien su opalescencia no es superior a la de la suspensión de referencia.
La solución preparada de E.S. Agrimonia con los distintos disolventes debe ser límpida o parcialmente límpida (soluble o parcialmente soluble).

Especificaciones

Soluble en agua y en soluciones hidroalcohólicas. Estas soluciones deben de ser transparentes y con el color característico del E.S. de Agrimonia. Se observa que 1g es soluble en 10 ml de soluciones hidroalcohólicas con un 40-60% de contenido en alcohol. Se adjunta monografía de la Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea. (v.v.), 2.2.1.

- ***pH***

El pH se mide en pH-metro mediante método potenciométrico, a una temperatura ambiente de 20 – 25ºC.

Procedimiento

Se determina de la forma siguiente, acorde con el PNT interno MFT-0010: "Determinación de pH con el pH-metro modelo Crison pH 25"

Se pesa una cantidad de aproximadamente 0,5 g del extracto en el interior de una probeta de 25 ml de agua. Posteriormente se mide el pH con un pHmetro previamente ajustado con soluciones tampón como se indica en la monografía de la Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea (v.v.).

La técnica de medida es la descrita en la Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea (v.v.) con soluciones estándar de referencia para calibración.

Especificaciones

Los valores de pH deben estar comprendidos entre **4 –7.**

Se adjuntan fotocopias de la Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea (v.v.), 2.2.3.

-Granulometría

El tamaño de partícula de E.S. Agrimonia se ha determinado por un procedimiento que a continuación se exponen:

Tamizado

Para llevar a cabo este procedimiento se han utilizado tamices de malla cuadrada, de diferente numeración.

Los resultados obtenidos de tamaño de partícula en varios lotes es de no menos del 70% en masa pasa a través de un tamiz de 180μm.

Se adjunta Métodos de Farmacotécnica de la Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea (v.v.), 2.9.15. y 2.9.16.

-Volumen y densidad aparente

Se define la densidad como la relación entre la masa de un determinado volumen de la sustancia a 20ºC y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura.

Procedimiento

La densidad para sólidos se mide según el siguiente método interno (MFT-0003: "Determinación de la densidad en extractos de consistencia sólida":
Se pesa un tubo o probeta graduados a 0,1 ml de 15 ml (P1). A continuación se introduce el E.S. Agrimonia entre la marca de 8 ml y 10 ml, eliminar el aire golpeando suavemente el fondo del tubo sobre una base de blanda (para evitar roturas), hasta llegar a una marca de volumen constante. Leer el volumen en cm^3 sobre el tubo graduado. El proceso se realiza a temperatura ambiente cercana a 20 ºC.

Se vuelve a pesar y se anota su peso (P2).

La densidad viene determinada por la fórmula:

[P2-P1] (g) / volumen medido (cm^3) = densidad (g/cm^3)

Especificaciones

La densidad debe ser mayor de **0,4 g/ml.**
Se adjunta monografía de la Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea (v.v.), 2.9.15.

- Perdida por desecación

Objetivo
La pérdida por secado o contenido de humedad del E.S. Agrimonia se determina la cantidad de materia volátil de cualquier clase que es eliminada bajo las condiciones que se especifican.

Aparatos y reactivos
Balanza analítica
Recipiente de pesada con tapón de vidrio esmerilado
Estufa
Desecador

Procedimiento

Tarar un recipiente con tapón de vidrio esmerilado que se ha secado durante 30 minutos en las mismas condiciones que se van a emplear en la determinación.

Poner alrededor de 1 gramos de E.S. Agrimonia en el recipiente, colocar el tapón y pesar con precisión el recipiente y el contenido. Colocar el recipiente abierto en la estufa y secar el E.S. Agrimonia a 105ºC durante 3 horas. Después de este tiempo cerrar el recipiente y dejar enfriar antes de pesar de nuevo. (Procedimiento desarrollado acorde con el PNT interno: MFT-0006 "Determinación de Humedad")

Cálculos

Calcular la pérdida por desecación con la fórmula:

Humedad (%) = [[Pi-Pf]/Pm] x 100

Donde:

Pi es el peso inicial de la muestra y del recipiente

Pf es el peso final de la muestra y del recipiente

Pm es el peso inicial de la muestra

Especificaciones

La perdida por secado o humedad no es mayor de **5,5 %**

Se adjunta monografía de extractos secos de la Real Farmacopea Española-Farmacopea Europea (v.v.). 2.8.17.

- Cenizas totales

Objetivo

El residuo de calcinación se determina en las condiciones prescritas según Farmacopea europea y la Real Farmacopea Española v.v.

Aparatos y reactivos

Balanza analítica

Crisol

Horno mufla

Desecador

Procedimiento

Pesar con precisión 1 gramo de E.S. Agrimonia en un crisol adecuado que previamente ha sido calcinado, enfriado y pesado. Introducir el crisol en el horno mufla y calentar

Procedimiento

Pesar con precisión 1 gramo de E.S. Agrimonia en un crisol adecuado que previamente ha sido calcinado, enfriado y pesado. Introducir el crisol en el horno mufla y calentar

hasta que el producto ha sido completamente calcinado a unos 600ºC ± 25ºC. Enfriar en un desecador, pesar y calcular el porcentaje del residuo. Si la cantidad del residuo obtenido de esta forma excede el límite especificado calcinar de nuevo y proceder de forma idéntica a la descrita.

Continuar la calcinación hasta que se consiga un peso constante (Procedimiento desarrollado acorde con el PNT interno: MFT-0002 "Determinación de Cenizas totales").

Cálculos

Calcular el residuo de calcinación con la fórmula:

Cenizas (%) = [[Pf – Pi] / Pm] x 100

Donde

Pi es el peso inicial del crisol y la muestra

Pf es el peso final del crisol y la muestra calcinada

Pm es el peso inicial de la muestra

Especificaciones

El contenido en cenizas de E.S. Agrimonia es menor de **15%**

Se adjunta monografía de la Real Farmacopea Española- Farmacopea Europea v.v. 2.4.16.

- Microbiología

Las determinaciones microbiológicas siguen las especificaciones descritas en la Eur. Ph. (v.v.), 2.6.12., y 2.6.13. y en la Real Farmacopea Española (v.v.).

Para extracto seco de planta se sigue la monografía de productos de categoría 3B.

Aerobios totales	< 10.000 ufc/g	Eur. Ph. (v.v.). 2.6.12.; 2.6.13
Hongos y levaduras	< 100 ufc/g	Eur. Ph. (v.v.). 2.6.12.; 2.6.13
Enterobacterias	< 100 ufc/g	Eur. Ph. (v.v.). 2.6.12.; 2.6.13
E. coli	Ausencia (1 g)	Eur. Ph. (v.v.). 2.6.12.; 2.6.13
Sallmonella sp	Ausencia (10 g)	Eur. Ph. (v.v.). 2.6.12.; 2.6.13
S. aureus	Ausencia	Eur. Ph. (v.v.). 2.6.12.; 2.6.13
P. aeruginosa	Ausencia	Eur. Ph. (v.v.). 2.6.12.; 2.6.13

2.2. MÉTODOS FÍSICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS

2.2. Métodos físicos y físico-químicos 19
2.2.1. Limpidez y grado de opalescencia de los líquidos 19
2.2.2. Grado de coloración de los líquidos. 22
2.2.3. Determinación potenciométrica del pH. 23
2.2.4. Correspondencia entre la reacción del medio, el pH aproximado y la coloración de algunos indicadores. 25
2.2.5. Densidad relativa 25
2.2.6. Índice de refracción 26
2.2.7. Rotación óptica 26
2.2.8. Viscosidad 27
2.2.9. Método del viscosímetro capilar 27
2.2.10. Método del viscosímetro rotatorio. 28
2.2.11. Intervalo de destilación 28
2.2.12. Punto de ebullición 29
2.2.13. Determinación de agua por arrastre. 29
2.2.14. Punto de fusión - Método del tubo capilar 30
2.2.15. Punto de fusión - Método del tubo capilar abierto 30
2.2.16. Punto de fusión - Método de la fusión instantánea 31
2.2.17. Punto de gota 31
2.2.18. Punto de solidificación 32
2.2.19. Valoraciones amperométricas 32
2.2.20. Valoraciones potenciométricas ... 33
2.2.21. Fluorimetría 33
2.2.22. Espectrometría de emisión atómica. 33
2.2.23. Espectrometría de absorción atómica. 34
2.2.24. Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo 35
2.2.25. Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y en el visible ... 37
2.2.26. Cromatografía en papel 39
2.2.27. Cromatografía en capa fina 39
2.2.28. Cromatografía de gases 41
2.2.29. Cromatografía de líquidos 43
2.2.30. Cromatografía de exclusión por tamaño molecular 44
2.2.31. Electroforesis 45
2.2.32. Pérdida de masa por desecación . 51
2.2.33. Espectrometría de resonancia magnética nuclear 52
2.2.34. Análisis térmico 53
2.2.35. Osmolalidad 55
2.2.36. Determinación potenciométrica de la concentración iónica mediante electrodos selectivos 56
2.2.37. Espectrometría de fluorescencia por rayos X 57
2.2.38. Conductividad 58
2.2.39. Distribución de la masa molecular de los dextranos 59
2.2.40. Espectrofotometría en el infrarrojo cercano 61
2.2.41. Dicroísmo circular 66
2.2.42. Densidad de sólidos 68
2.2.43. Espectrometría de masas 68
2.2.44. Carbono orgánico total en agua destinada a uso farmacéutico 71
2.2.45. Cromatografía de fluidos supercríticos. 72
2.2.46. Técnicas de separación cromatográfica. 73
2.2.47. Electroforesis capilar 78
2.2.48. Espectrometría Raman 84
2.2.49. Método del viscosímetro de bola 86
2.2.54. Isoelectroenfoque 87
2.2.55. Cartografía peptídica 89
2.2.56. Análisis de aminoácidos 93

2.2. MÉTODOS FÍSICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS

01/2005, 20201

2.2.1. LIMPIDEZ Y GRADO DE OPALESCENCIA DE LOS LÍQUIDOS

MÉTODO VISUAL

En tubos de ensayo idénticos, de vidrio neutro, incoloro y transparente, de un diámetro interior de 15-25 mm y de fondo plano, comparar el líquido a examinar y la suspensión de referencia recién preparada como se indica a continuación. La columna de líquido en el interior del tubo debe tener una altura de 40 mm. Cinco minutos después de preparar la suspensión de referencia, comparar las disoluciones, en el sentido del eje del tubo, sobre fondo negro y con luz diurna difusa. La difusión de la luz debe ser tal que permita diferenciar fácilmente la suspensión de referencia I del *agua R* y la suspensión de referencia II de la suspensión de referencia I.

Un líquido se considera *límpido* si su limpidez es igual a la del *agua R* o a la del disolvente utilizado, cuando se observa en las condiciones ya señaladas, o bien si su opalescencia no es superior a la de la suspensión de referencia I.

Disolución de sulfato de hidrazina. Disolver 1,0 g de *sulfato de hidrazina R* en *agua R* y diluir hasta 100,0 ml con el mismo disolvente. Dejar en reposo durante 4-6 h.

Disolución de hexametilentetramina. En un matraz de 100 ml con tapón de vidrio esmerilado, disolver 2,5 g de *hexametilentetramina R* en 25,0 ml de *agua R*.

Suspensión primaria de opalescencia (suspensión de formazina). Añadir 25,0 ml de disolución de sulfato de hidrazina al matraz que contiene la disolución de hexametilentetramina. Mezclar y dejar en reposo durante 24 h. Esta suspensión es estable durante 2 meses, siempre que se

conserve en un envase de vidrio con una superficie interna totalmente lisa. La suspensión no debe adherirse al vidrio y debe mezclarse bien antes de su uso.

Patrón de opalescencia. Diluir 15,0 ml de la suspensión primaria de opalescencia hasta 1000,0 ml con *agua R*. Esta suspensión se prepara extemporáneamente y puede conservarse como máximo 24 h.

Suspensiones de referencia. Preparar las suspensiones de referencia según se indica en la Tabla 2.2.1.-1. Mezclar y agitar antes de su uso.

Tabla 2.2.1.-1

	I	II	III	IV
Patrón de opalescencia	5,0 ml	10,0 ml	30,0 ml	50,0 ml
Agua R	95,0 ml	90,0 ml	70,0 ml	50,0 ml

Patrón de turbidez. La suspensión de formazina preparada mezclando volúmenes iguales de disolución de sulfato de hidrazina y disolución de hexametilentetramina se define como patrón primario de referencia de 4000 UTN (unidades de turbidez nefelométrica). Las suspensiones de referencia I, II, III y IV tienen valores de 3 UTN, 6 UTN, 18 UTN y 30 UTN, respectivamente. Las suspensiones de formazina estabilizadas que pueden usarse para preparar patrones de turbidez diluidos estables están disponibles en el comercio y pueden usarse después de comparación con los patrones preparados como se describe.

La formazina tiene varias características que la convierten en un excelente patrón de turbidez. Puede prepararse de modo reproducible a partir de materias primas valoradas. Sus características físicas la convierten en un buen patrón de calibrado de la difusión de la luz. El polímero de formazina está constituido por cadenas de diferentes longitudes, que se pliegan en configuraciones aleatorias. Esto da como resultado una gran diversidad de formas y tamaños de partículas, que permiten el análisis de diversos tipos de partículas que pueden estar presentes en las muestras reales. Debido a la reproducibilidad, características de difusión de la luz y la trazabilidad de la formazina, se obtienen patrones usados generalmente para establecer los algoritmos de calibrado de los instrumentos y los criterios de validación.

MÉTODOS INSTRUMENTALES

INTRODUCCIÓN

El grado de opalescencia puede determinarse también por métodos instrumentales, que se basan en la medida de la luz absorbida o difundida teniendo en cuenta las homogeneidades de la densidad óptica submicroscópica de disoluciones y suspensiones opalescentes. Dos de dichas técnicas son la nefelometría y la turbidimetría. Para la medida de la turbidez de muestras coloreadas, se usan la turbidimetría de ratio y la nefelometría con una selección de ratio.

El efecto de difusión de la luz por las partículas en suspensión puede medirse mediante observación de la luz transmitida (turbidimetría) o de la luz difundida (nefelometría). La turbidimetría de ratio combina los principios tanto de la nefelometría como de la turbidimetría. La turbidimetría y la nefelometría son útiles para la medición de suspensiones ligeramente opalescentes. Deben usarse suspensiones de referencia producidas en condiciones bien definidas. Para medidas cuantitativas es esencial el trazado de curvas de calibrado, puesto que la relación entre las propiedades ópticas de la suspensión y la concentración de la fase dispersa es, como mucho, semiempírica.

La determinación de la opalescencia de líquidos coloreados se realiza con turbidímetros de ratio o nefelómetros con una selección de ratio, puesto que el color introduce una interferencia negativa, atenuando tanto la luz incidente como la difusa y disminuyendo el valor de la turbidez. El efecto es demasiado grande para muestras incluso moderadamente coloreadas, para las que no pueden usarse nefelómetros convencionales.

La determinación instrumental de la limpidez y opalescencia proporciona un ensayo más discriminatorio, puesto que no depende de la agudeza visual del analista. Los resultados numéricos son sobre todo útiles para el seguimiento de la calidad y el control del proceso, especialmente en estudios de estabilidad. Por ejemplo, pueden proyectarse datos numéricos anteriormente adquiridos sobre la estabilidad para determinar si un lote dado de una formulación farmacéutica o de un principio activo farmacéutico superará los límites de almacenamiento antes de la fecha de caducidad.

NEFELOMETRÍA

Cuando una suspensión se observa en ángulos rectos con la dirección de la luz incidente, el sistema aparece opalescente debido a la reflexión de la luz por las partículas presentes en la suspensión (efecto Tyndall). Una porción del haz de luz que atraviesa un líquido turbio es transmitida, otra porción es absorbida y la porción restante es difundida por las partículas en suspensión. Si la medida se efectúa a un ángulo de 90° con el haz de luz, la luz difundida por las partículas en suspensión puede utilizarse para la determinación de su concentración, siempre que permanezcan constantes el número y tamaño de las partículas que influyen sobre la difusión. La suspensión de referencia debe mantener un grado constante de turbidez y las suspensiones de la muestra y de referencia deben prepararse en condiciones idénticas. El efecto Tyndall depende tanto del número de partículas como de su tamaño. Las medidas nefelométricas son más fiables en intervalos de turbidez baja, donde existe una relación lineal entre los valores expresados en unidad de turbidez nefelométrica (UTN) y las señales relativas procedentes del detector. A medida que aumenta el grado de turbidez, no todas las partículas están expuestas a la luz incidente y la radiación difundida por otras partículas es interrumpida en su camino al detector. Los valores nefelométricos máximos que pueden medirse de forma fiable son del orden de 1750-2000 UTN. Debe demostrarse la linealidad trazando una curva de calibrado con al menos cuatro concentraciones.

TURBIDIMETRÍA

La propiedad óptica expresada como turbidez es la interacción entre la luz y las partículas en suspensión en un líquido. Es una expresión de la propiedad óptica que hace que la luz se difunda y sea absorbida en lugar de transmitida en línea recta a través de la muestra. La cantidad de

material sólido en suspensión puede determinarse por la medida de la luz transmitida. Cuando los tamaños de las partículas en suspensión son uniformes y homogéneos se obtiene una relación lineal entre la turbidez y la concentración. Esta condición se cumple sólo en suspensiones muy diluidas que contengan partículas pequeñas. La linealidad entre la turbidez y la concentración debe establecerse trazando una curva de calibrado con al menos 4 concentraciones.

TURBIDIMETRÍA DE RATIO

En la turbidimetría de ratio se determina la relación entre la medida de la luz transmitida y la medida de la luz difundida a 90°. Este procedimiento permite compensar la disminución de la luz debido al color de la muestra. La influencia del color de la muestra puede también eliminarse usando como fuente de luz del instrumento un diodo emisor de luz en el infrarrojo (LED-IR) a 860 nm. Los detectores con fotodiodo del instrumento reciben y miden, por una parte, la luz emergente difundida en un ángulo de 90° y, por otra, la luz difundida hacia delante de la muestra (luz reflejada) y la luz transmitida directamente a través de la muestra. Los resultados de la medida se expresan en UTN (ratio) y se obtienen calculando la relación entre los valores medidos para la luz difusa en un ángulo de 90° y para la suma de los componentes de difunsión hacia delante y de transmisión. En la turbidimetría de ratio, la influencia de la luz parásita es despreciable. Los nefelómetros se usan para medir el grado de opalescencia de líquidos incoloros.

Las medidas de las suspensiones de referencia I-IV con un turbidímetro de ratio presentan una relación lineal entre las concentraciones y los valores UTN obtenidos. Las suspensiones de referencia I-IV (Ph. Eur.) pueden usarse como calibradores del instrumento.

Tabla 2.2.1-2

Suspensiones de formazina	Valores de opalescencia (UTN)
Suspensión de referencia I	3
Suspensiones de referencia II	6
Suspensión de referencia III	18
Suspensión de referencia IV	30
Patrón de opalescencia	60
Suspensión primaria de opalescencia	4000

DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL DE LA OPALESCENCIA

Los requisitos de las monografías se refieren a las medidas obtenidas por el método de examen visual con las suspensiones de referencia definidas. Pueden también usarse métodos instrumentales para determinar el cumplimiento de los requisitos de las monografías una vez que se haya establecido la idoneidad del instrumento, como se describe a continuación, y se haya calibrado con las suspensiones de referencia I-IV y con *agua R* o el disolvente utilizado.

Aparato. Los turbidímetros de ratio o nefelómetros con una selección de ratio utilizan como fuente de luz una lámpara de wolframio con sensibilidad espectral a aproximadamente 550 nm, que trabaja a una temperatura de color del filamento de 2700 K o bien un LED-IR que tenga un máximo de emisión a 860 nm con un ancho de banda espectral de 60 nm. También pueden utilizarse otras fuentes de luz adecuadas. Los fotodiodos de silicio y los fotomultiplicadores se utilizan generalmente como detectores y registran los cambios de la luz difusa o transmitida por la muestra. La luz difundida a 90 ± 2,5° es detectada por el detector primario. Otros detectores son los que detectan la radiación retrodifusa y difusa hacia delante, así como la luz transmitida. Los instrumentos utilizados se calibran frente a patrones de turbidez conocida y son capaces de realizar la determinación automática de la turbidez. Los resultados de los ensayos expresados en unidades UTN son proporcionados directamente por el instrumento y comparados con los requisitos de la monografía considerada.

Son adecuados los instrumentos que satisfacen los siguientes requisitos:

— *Unidades de medida*: UTN. La UTN se basa en la turbidez de un patrón primario de referencia de formazina. También se utilizan las UTF (unidades de turbidez de formazina) o UNF (unidades de nefelometría de formazina) que son equivalentes a las UTN en regiones bajas (hasta 40 UTN). Estas unidades se usan en los 3 métodos instrumentales: nefelometría, turbidimetría y turbidimetría de ratio.

— *Intervalo de medida*: 0,01-1100 UTN.

— *Resolución*: 0,01 UTN en el intervalo 0-10 UTN, 0,1 UTN en el intervalo 10-100 UTN y 1 UTN para el intervalo > 100 UTN. El instrumento se calibra y controla con patrones de referencia de formazina.

— *Precisión*: 0-10 UTN: ± 0,01 UTN. 10-1000 UTN: ± 5 por ciento.

— *Repetibilidad*: 0-10 UTN: ± 0,01 UTN. 10-1000 UTN: ± 2 por ciento del valor medido.

— *Calibrado*: con 4 suspensiones de referencia de formazina comprendidas en el intervalo de medida. Pueden usarse las suspensiones de referencia descritas en este capítulo o patrones de referencia adecuados calibrados frente a las suspensiones de referencia primarias.

— *Luz parásita*: es una fuente de error significativa en medidas turbidimétricas a bajo nivel; la luz parásita alcanza el detector de un sistema óptico, sin venir de la muestra; < 0,15 UTN para el intervalo 0-10 UTN, < 0,5 UTN para el intervalo 10-1000 UTN.

Para la evaluación del cumplimiento de los requisitos de las monografías, en lugar del examen visual pueden utilizarse instrumentos que satisfagan las características anteriores y hayan sido verificados utilizando las suspensiones de referencia descritas en método visual.

Pueden usarse instrumentos con características de intervalo de medida, resolución, precisión y repetibilidad distintas de las antes mencionadas, siempre que estén suficientemente validados y sirvan para el uso deseado. La metodología utilizada para la sustancia/producto específico a analizar debe también ser validada para demostrar su capacidad analítica. El instrumento y metodología deben adaptarse a las características del producto a examinar.

Tabla 2.2.2.-2.—*Disoluciones de referencia P*

Disolución de referencia	Volumen en mililitros	
	Disolución patrón P	Ácido clorhídrico (10 g/l HCl)
P_1	75,0	25,0
P_2	50,0	50,0
P_3	37,5	62,5
P_4	25,0	75,0
P_5	12,5	87,5
P_6	5,0	95,0
P_7	2,5	97,5
P_8	1,5	98,5
P_9	1,0	99,0

Tabla 2.2.2.-3.—*Disoluciones de referencia PA*

Disolución de referencia	Volumen en mililitros	
	Disolución patrón PA	Ácido clorhídrico (10 g/l HCl)
PA_1	100,0	0,0
PA_2	75,0	25,0
PA_3	50,0	50,0
PA_4	25,0	75,0
PA_5	12,5	87,5
PA_6	5,0	95,0
PA_7	2,5	97,5

Tabla 2.2.2.-4.—*Disoluciones de referencia A*

Disolución de referencia	Volumen en mililitros	
	Disolución patrón A	Ácido clorhídrico (10 g/l HCl)
A_1	100,0	0,0
A_2	75,0	25,0
A_3	50,0	50,0
A_4	25,0	75,0
A_5	12,5	87,5
A_6	5,0	95,0
A_7	2,5	97,5

Tabla 2.2.2.-5.—*Disoluciones de referencia AV*

Disolución de referencia	Volumen en mililitros	
	Disolución patrón AV	Ácido clorhídrico (10 g/l HCl)
AV_1	25,0	75,0
AV_2	15,0	85,0
AV_3	8,5	91,5
AV_4	5,0	95,0
AV_5	3,0	97,0
AV_6	1,5	98,5
AV_7	0,75	99,25

Tabla 2.2.2.-6.—*Disoluciones de referencia R*

Disolución de referencia	Volumen en mililitros	
	Disolución patrón R	Ácido clorhídrico (10 g/l HCl)
R_1	100,0	0,0
R_2	75,0	25,0
R_3	50,0	50,0
R_4	37,5	62,5
R_5	25,0	75,0
R_6	12,5	87,5
R_7	5,0	95,0

Conservación

Para el método I, las disoluciones de referencia pueden conservarse en tubos de ensayo sellados, de vidrio neutro, incoloro y transparente, con un diámetro exterior de 12 mm y protegidas de la luz.

Para el método II, preparar las disoluciones de referencia inmediatamente antes del uso, a partir de las disoluciones patrón.

01/2005, 20203

2.2.3. DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA DEL pH

El pH es un valor que representa convencionalmente la concentración de iones hidrógeno de una disolución acuosa. Por razones prácticas se define de una manera experimental. El pH de una disolución a examinar se expresa en relación a una disolución de referencia (pH_S), según la ecuación:

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k}$$

en la que E es el potencial, expresado en voltios, de la celda que contiene la disolución a examinar y E_s es el potencial, expresado en voltios, de la celda que contiene la disolución de pH conocido (pH_s), k es la variación de potencial por variación de unidad de pH, expresada en voltios y calculada por la ecuación de Nernst.

Tabla 2.2.3.-1.—*Valores de k a distintas temperaturas*

Temperatura °C	k (V)
15	0,0572
20	0,0582
25	0,0592
30	0,0601
35	0,0611

La determinación potenciométrica del pH se realiza por medición de la diferencia de potencial entre 2 electrodos adecuados, sumergidos en la disolución a examinar: uno de ellos es un electrodo sensible a los iones hidrógeno (el más

frecuente es el electrodo de vidrio) y el otro es un electrodo de referencia (por ejemplo, un electrodo de calomelanos saturado).

Aparato. El aparato de medida es un voltímetro con una resistencia de entrada al menos 100 veces superior a la de los electrodos empleados. Normalmente está graduado en unidades de pH y tiene una sensibilidad tal que pueda conseguirse una discriminación de, como mínimo, 0,05 unidades de pH o al menos 0,003 V.

Procedimiento. Salvo indicación contraria en la monografía, todas las mediciones se realizan a la misma temperatura (20-25 °C). La Tabla 2.2.3.-2 indica la variación de pH, en función de la temperatura, de algunas disoluciones tampón de referencia utilizadas para el calibrado. Para una eventual corrección de la temperatura, se recomienda seguir las instrucciones del fabricante. El aparato se calibra con la disolución tampón de hidrogenoftalato de potasio (patrón primario) y otra disolución tampón de distinto pH (preferiblemente una de las que figuran en la Tabla 2.2.3.-2). El pH de una tercera disolución tampón de pH intermedio, leído en la escala, no debe diferir en más de 0,05 unidades de pH del valor correspondiente a dicha disolución. Sumergir los electrodos en la disolución a examinar y realizar la lectura en las mismas condiciones que para las disoluciones tampón.

En el caso de utilizar el aparato con frecuencia, debe efectuarse un control regularmente. En caso contrario, es indispensable realizar dicho control antes de cada medida.

Todas las disoluciones a examinar y las disoluciones tampón de referencia deben prepararse con *agua exenta de dióxido de carbono R.*

Tabla 2.2.3.-2.—*Variación del pH en las disoluciones tampón en función de la temperatura*

Temperatura en °C	Tetraoxalato de potasio 0,05 M	Hidrogenotartrato de potasio (sat. a 25 °C)	Dihidrogenocitrato de potasio 0,05 M	Hidrogenoftalato de potasio 0,05 M	Dihidrogenofosfato de dipotasio 0,025 M + hidrogenofosfato de sodio 0,025 M	Dihidrogenofosfato de potasio 0,0087 M + hidrogenofosfato de sodio 0,0303 M	Tetraborato de sodio 0,01 M	Carbonato de sodio 0,025 M + hidrogenocarbonato de sodio 0,025 M	Hidróxido de calcio saturado a 25° C
	$C_4H_3KO_8$, $2H_2O$	$C_4H_5KO_6$	$C_6H_7KO_7$	$C_8H_5KO_4$	KH_2PO_4 + Na_2HPO_4	KH_2PO_4 + Na_2HPO_4	$Na_2B_4O_7$, $10H_2O$	Na_2CO_3 + $NaHCO_3$	$Ca(OH)_2$
15	1,67		3,80	4,00	6,90	7,45	9,28	10,12	12,81
20	1,68		3,79	4,00	6,88	7,43	9,23	10,06	12,63
25	1,68	3,56	3,78	4,01	6,87	7,41	9,18	10,01	12,45
30	1,68	3,55	3,77	4,02	6,85	7,40	9,14	9,97	12,29
35	1,69	3,55	3,76	4,02	6,84	7,39	9,10	9,93	12,13
$\frac{\Delta pH^{(1)}}{\Delta t}$	+ 0,001	- 0,0014	- 0,0022	+ 0,0012	- 0,0028	-0,0028	- 0,0082	- 0,0096	-0,034

(1) Variación del pH por cada grado Celsius.

PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES TAMPÓN DE REFERENCIA

Tetraoxalato de potasio 0,05 M. Disolver 12,61 g de $C_4H_3KO_8,2H_2O$ en *agua exenta de dióxido de carbono R* y diluir hasta 1000,0 ml con el mismo disolvente.

Hidrogenotartrato de potasio saturado a 25 °C. Agitar enérgicamente un exceso de $C_4H_5KO_6$ en *agua exenta de dióxido de carbono R* a 25 °C. Filtrar o decantar. Preparar extemporáneamente.

Dihidrogenocitrato de potasio 0,05 M. Disolver 11,41 g de $C_6H_7KO_7$ en *agua exenta de dióxido de carbono R* y diluir hasta 1000,0 ml con el mismo disolvente. Preparar extemporáneamente.

Hidrogenoftalato de potasio 0,05 M. Disolver en *agua exenta de dióxido de carbono R* 10,13 g de $C_8H_5KO_4$, secados previamente durante 1 h a 110 – 2 °C y diluir hasta 1000,0 ml con el mismo disolvente.

Dihidrogenofosfato de potasio 0,025 M + hidrogenofosfato de sodio 0,025 M. Disolver en *agua exenta de dióxido de carbono R* 3,39 g de KH_2PO_4 y 3,53 g de Na_2HPO_4, desecados previamente a 120 ± 2 °C durante 2 h y diluir hasta 1000,0 ml con el mismo disolvente.

Dihidrogenofosfato de potasio 0,0087 M + hidrogenofosfato de sodio 0,0303 M. Disolver en *agua exenta de dióxido de carbono R* 1,18 g de KH_2PO_4 y 4,30 g de Na_2HPO_4, desecados previamente a 120 ± 2 °C durante 2 h y diluir hasta 1000,0 ml con el mismo disolvente.

Tetraborato de sodio 0,01 M. Disolver 3,80 g de $Na_2B_4O_7,10H_2O$ en *agua exenta de dióxido de carbono R* y diluir hasta 1000,0 ml con el mismo disolvente. Conservar protegido del dióxido de carbono atmosférico.

Carbonato de sodio 0,025 M + hidrogenocarbonato de sodio 0,025 M. Disolver 2,64 g de Na_2CO_3 y 2,09 g de $NaHCO_3$ en *agua exenta de dióxido de carbono R* y diluir hasta 1000,0 ml con el mismo disolvente. Conservar protegido del dióxido de carbono atmosférico

Hidróxido de calcio, saturado a 25 °C. Agitar un exceso de *hidróxido de calcio R* con *agua exenta de dióxido de carbono R* y decantar a 25 °C. Conservar protegido del dióxido de carbono atmosférico.

CONSERVACIÓN

Conservar las disoluciones tampón en envases herméticos químicamente resistentes apropiados, tales como frascos de vidrio tipo I o envases de plástico apropiados para disoluciones acuosas.

01/2005, 20204

2.2.4. CORRESPONDENCIA ENTRE LA REACCIÓN DEL MEDIO, EL pH APROXIMADO Y LA COLORACIÓN DE ALGUNOS INDICADORES

Salvo que en la Tabla 2.2.4.-1 se indique lo contrario, añadir 0,1 ml de disolución de indicador a 10 ml de la disolución a examinar.

Tabla 2.2.4.-1

Reacción	pH	Indicador	Coloración
Alcalina	> 8	*Papel de tornasol, rojo R* *Disolución de azul de timol R* (0,05 ml)	Azul Gris o azul-violácea
Débilmente alcalina	8,0 - 10,0	*Disolución de fenolftaleína R* (0,05 ml) *Disolución de azul de timol R* (0,05 ml)	Incolora o rosa Gris
Fuertemente alcalina	> 10	*Papel de fenolftaleína R* *Disolución de azul de timol R* (0,05 ml)	Roja Azul-violácea
Neutra	6,0 - 8,0	*Disolución de rojo de metilo R* *Disolución de rojo de fenol R* (0,05 ml)	Amarilla
Neutra al rojo de metilo	4,5 - 6,0	*Disolución de rojo de metilo R*	Roja anaranjada
Neutra a la fenolftaleína	< 8,0	*Disolución de fenolftaleína R* (0,05 ml)	Incolora, rosa o roja tras adición de 0,05 ml de base 0,1 M
Ácida	< 6	*Disolución de rojo de metilo R* *Disolución de azul de bromotimol R1*	Anaranjada o roja Amarilla
Débilmente ácida	4,0 - 6,0	*Disolución de rojo de metilo R* *Disolución de verde de bromocresol R*	Anaranjada Verde o azul
Fuertemente ácida	< 4	*Papel de rojo Congo R*	Verde o azul

01/2005, 20205

2.2.5. DENSIDAD RELATIVA

La densidad relativa $d_{t_2}^{t_1}$ de una sustancia es la relación entre la masa de un determinado volumen de la sustancia a la temperatura t_1 y la masa de un volumen igual de agua a la temperatura t_2.

Salvo indicación contraria, se utiliza la densidad relativa d_{20}^{20}. La densidad relativa también se expresa frecuentemente como d_4^{20}. También puede usarse la densidad ρ_{20}, definida como la masa de una unidad de volumen de la sustancia a 20 °C, expresada en kilogramos por metro cúbico o gramos por centímetro cúbico (1 $kg \cdot m^{-3} = 10^{-3}\ g \cdot cm^{-3}$). Estas cantidades están relacionadas por las siguientes ecuaciones en las que la densidad se expresa en gramos por centímetro cúbico:

$$\rho_{20} = 0{,}998203 \times d_{20}^{20} \text{ o } d_{20}^{20} = 1{,}00180 \times \rho_{20}$$

$$\rho_{20} = 0{,}999972 \times d_4^{20} \text{ o } d_4^{20} = 1{,}00003 \times \rho_{20}$$

$$d_4^{20} = 0{,}998230 \times d_{20}^{20}$$

La densidad relativa o densidad se mide con la precisión en cuanto al número de decimales prescrito en la monografía utilizando un picnómetro (sólidos o líquidos), una balanza hidrostática (sólidos), un hidrómetro (líquidos) o un densitómetro digital con un transductor oscilante (líquidos y gases). Cuando la determinación se realiza por pesada, se desprecia la flotabilidad del aire, que puede introducir un error de 1 unidad en el tercer decimal. Cuando se usa un densitómetro, no influye la flotabilidad del aire.

Densitómetro con transductor oscilante. El aparato consiste en:

— un tubo en forma de U, generalmente de vidrio borosilicatado, que contiene el líquido a examinar;

— un sistema de excitación magnetoeléctrico o piezoeléctrico que hace vibrar el tubo como un oscilador en voladizo a una frecuencia característica que depende de la densidad del líquido a examinar;

— medios para medir el período de oscilación (T) que puede ser convertido por el aparato para proporcionar una lectura directa de la densidad, o que puede servir para calcular la densidad usando las constantes A y B descritas a continuación.

La frecuencia de resonancia (f) es una función de la constante de resorte (c) y la masa (m) del sistema:

$$f^2 = \frac{1}{T^2} = \frac{c}{m} \times \frac{1}{4\pi^2}$$

Por tanto:

$$T^2 = \left(\frac{M}{c} + \frac{\rho \times V}{c}\right) \times 4\pi^2$$

M = masa del tubo,

V = volumen interno del tubo.

La introducción de 2 constantes

$$A = c/\,(4\pi^2 \times V)$$

y

$$B = M/V$$

conduce a la ecuación clásica del transductor oscilante:

$$\rho = A \times T^2 - B$$

Las constantes A y B se determinan haciendo funcionar el instrumento con el tubo en forma de U relleno de 2 muestras diferentes de densidad conocida, por ejemplo, *agua R* desgasificada y aire. Las medidas de control se realizan diariamente utilizando *agua R* desgasificada. Los resultados proporcionados por la medida de control con *agua R* desga-

01/2005, 20915

2.9.15. VOLUMEN APARENTE

El ensayo de volumen aparente tiene como objetivo determinar, bajo condiciones definidas, los volúmenes aparentes antes y después de sedimentar, la capacidad de sedimentación y las densidades aparentes de sólidos divididos (por ejemplo, polvos, granulados).

APARATO

El aparato (véase la Figura 2.9.15.-1) consta de lo siguiente:

— un aparato de sedimentación capaz de producir en 1 min 250 ± 15 golpes suaves de una altura de 3 ± 0,2 mm. El soporte para la probeta, con su dispositivo de fijación, tiene una masa de 450 ± 5 g.

— una probeta de 250 ml, graduada en intervalos de 2 ml, con una masa de 220 ± 40 g.

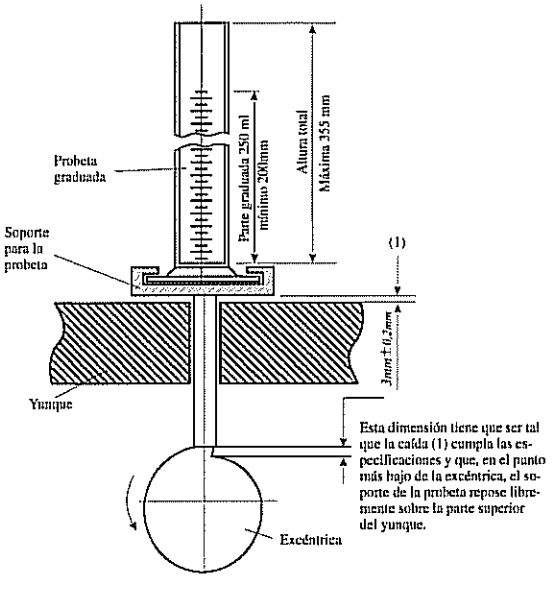


Figura 2.9.15.-1

PROCEDIMIENTO

Introducir en la probeta seca 100,0 g (m g) de la sustancia sometida a examen, sin compactar. Si esto no es posible, seleccionar un peso de muestra adecuado para obtener un volumen aparente comprendido entre 50 ml y 250 ml y especificar dicho peso en el cálculo del resultado. Asegurar la probeta en su soporte. Leer el volumen aparente sin sedimentar V_0 con una aproximación de un mililitro. Efectuar 10, 500 y 1250 golpes y leer los correspondientes volúmenes V_{10}, V_{500} y V_{1250} con una aproximación de un mililitro. Si la diferencia entre V_{500} y V_{1250} es mayor que 2 ml, volver a efectuar 1250 golpes.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

a) Volúmenes aparentes:

— volumen aparente antes de sedimentar o volumen bruto: V_0 ml,

— volumen aparente después de sedimentar o volumen sedimentado: V_{1250} ml o V_{2500} ml.

b) Capacidad de sedimentación: diferencia V_{10} ml - V_{500} ml.

c) Densidades aparentes:

Las densidades aparentes se expresan como sigue:

— densidad aparente antes de sedimentar o densidad del producto bruto: m/V_0 (gramos por mililitro), (densidad de llenado),

— densidad aparente después de sedimentar o densidad del producto compactado: m/V_{1250} o m/V_{2500} (gramos por mililitro), (densidad golpeada).

01/2005, 20916

2.9.16. CAPACIDAD DE FLUJO

El ensayo de capacidad de flujo tiene por objetivo determinar la capacidad de sólidos divididos (por ejemplo, polvos y granulados) para fluir verticalmente, bajo condiciones definidas.

APARATO

Según las propiedades de flujo del material sometido a examen se emplean embudos con o sin vástago, con diferentes ángulos y diámetros del orificio (véanse las Figuras 2.9.16.-1 y 2.9.16.-2). El embudo se mantiene en posición vertical mediante un dispositivo adecuado. El montaje debe estar protegido contra vibraciones.

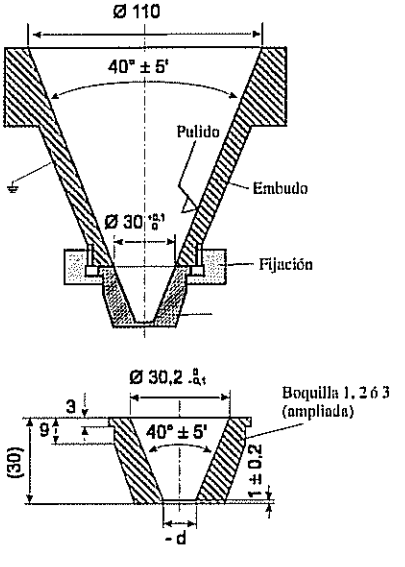


Figura 2.9.16.-1.—*Modelo de un embudo de flujo y de su boquilla. La boquilla está construida en acero inoxidable, resistente al ácido (V4A, CrNi) Dimensiones en milímetros*

Boquilla n.º	Diámetro (d) del orificio abierto (milímetros)
1	10 ± 0,01
2	15 ± 0,01
3	25 ± 0,01

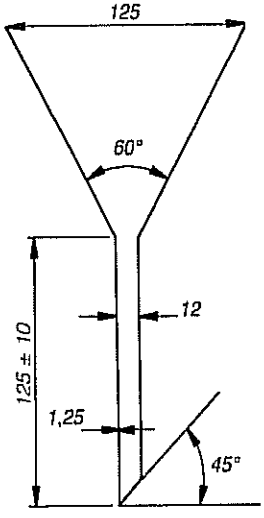


Figura 2.9.16.-2
Dimensiones en milímetros

PROCEDIMIENTO

Introducir sin compactar en un embudo seco, cuyo orificio inferior ha sido bloqueado por un medio adecuado, una muestra de la sustancia sometida a examen, pesada con un 0,5 por ciento de precisión. La cantidad de muestra depende del volumen aparente y del aparato utilizado. Destapar el embudo por la parte inferior y medir el tiempo necesario para que toda la muestra salga del embudo. Llevar a cabo tres determinaciones.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La capacidad de flujo se expre- sa en segundos y décimas de segundo con relación a 100 g de muestra.

Los resultados dependen de las condiciones de conservación del material sometido a examen.

Los resultados pueden expresarse como sigue:

a) como la media de las 3 determinaciones, si ninguno de los valores individuales se desvía del valor medio más del 10 por ciento,

b) como un intervalo, si los valores individuales se desvían del valor medio más del 10 por ciento,

c) en forma gráfica, como una curva de la masa frente al tiempo de flujo,

d) como un tiempo infinito, si la muestra no llega a caer completamente.

01/2005, 20917

2.9.17. VOLUMEN EXTRAÍBLE

Las preparaciones inyectables pueden presentarse en envases unidosis, tales como ampollas, cartuchos o jeringas precargadas, rellenas con un volumen suficiente para permitir la administración del volumen nominal indicado en la etiqueta.

Para cumplir los requisitos de volumen extraíble el envase se rellena con un volumen ligeramente en exceso al volumen nominal. El volumen en exceso depende de las características del producto. El envase unidosis no debe de contener una cantidad con relación al volumen nominal que presente riesgo si el contenido se administra en su totalidad.

Las suspensiones y emulsiones deben agitarse antes de retirar el contenido y antes de la determinación de la densidad. Las preparaciones oleosas y viscosas pueden calentarse de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta, si fuera necesario, y agitarse enérgicamente inmediatamente antes de retirar el contenido, el cual se enfría a continuación a 25 °C antes de medir el volumen.

ENVASES UNIDOSIS

Seleccionar un envase si el volumen nominal es 10 ml o mayor, 3 envases si el volumen nominal es mayor que 3 ml y menor que 10 ml o 5 envases si el volumen nominal es 3 ml o inferior. Tomar individualmente el contenido total de cada envase seleccionado con una jeringa hipodérmica seca de una capacidad no superior a 3 veces el volumen que ha de medirse, y provista de una aguja de calibre 21 de una longitud no menor que 2,5 cm. Expulsar las burbujas de aire de la jeringa y la aguja, descargar el contenido de la jeringa, sin vaciar la aguja, en una probeta seca normalizada (cuya graduación indica el volumen contenido y no el vertido) de un tamaño tal que el volumen medido ocupe al menos el 40 por ciento del volumen graduado. Alternativamente, puede calcularse el volumen del contenido en mililitros dividiendo la masa en gramos por la densidad.

Para la medida puede mezclarse el contenido de 2 ó 3 envases con un volumen nominal de 2 ml o menor, siempre que se utilice para cada envase una jeringa montada seca individual. El contenido de envases de 10 ml o mayor puede determinarse abriendo dichos envases y vaciando su contenido directamente en la probeta graduada o en un vaso tarado.

En el caso de envases examinados individualmente el volumen no es menor que el volumen nominal; en el caso de envases con un volumen nominal de 2 ml o inferior, el volumen no es menor que la suma de los volúmenes nominales de los envases considerados colectivamente.

ENVASES MULTIDOSIS

Para preparaciones inyectables en envases multidosis cuya etiqueta indica que contienen un número específico de dosis de un volumen establecido, seleccionar un envase y proseguir como se ha indicado para los envases unidosis utilizando el mismo número de jeringas individuales que de dosis especificadas.

El volumen es tal que cada jeringa suministra una cantidad no inferior a la dosis indicada.

10,0 ml de C-3 se diluyen con *agua R* (DF = 100.000) hasta 100 ml: C-4

Comenzando con la dilución C-4 cada miembro del panel determina la dilución que conserva todavía un sabor amargo. Esta disolución se denomina D. Denominar Y al FD de la disolución D.

Comenzando con la disolución D preparar las siguientes secuencias de diluciones:

Disolución D (ml)	1,2	1,5	2,0	3,0	6,0	8,0
agua R (ml)	8,8	8,5	8,0	7,0	4,0	2,0

Determinar el número de mililitros de la disolución D que, cuando se diluye hasta 10,0 ml con *agua R*, todavía conserva un sabor amargo (X).

Calcular el índice de amargor para cada miembro del panel por la expresión:

$$\frac{Y \times k}{X \times 0{,}1}$$

Calcular el índice de amargor de la muestra a examinar como el valor medio de todos los miembros del panel.

01/2005, 20816

2.8.16. RESIDUO SECO DE EXTRACTOS

En una cápsula de fondo plano de aproximadamente 50 mm de diámetro y aproximadamente 30 mm de altura, introducir rápidamente 2,00 g o 2,0 ml del extracto a examinar. Evaporar hasta sequedad sobre un baño de agua y secar en una estufa a 100-105 °C durante 3 h. Dejar enfriar en un desecador sobre *pentóxido de difósforo R* o *gel de sílice anhidra R* y pesar. Calcular el resultado como porcentaje *m/m* o en gramos por litro.

01/2005, 20817

2.8.17. PÉRDIDA POR DESECACIÓN DE EXTRACTOS

En una cápsula de fondo plano de aproximadamente 50 mm de diámetro y aproximadamente 30 mm de altura, pesar rápidamente 0,50 g del extracto a examinar, finamente pulverizado. Desecar en una estufa a 100-105 °C durante 3 h. Dejar enfriar en un desecador sobre *pentóxido de difósforo R* o *gel de sílice anhidra R* y pesar. Calcular el resultado como un porcentaje *m/m*.

01/2005, 20415

2.4.15. NÍQUEL EN POLIOLES

Determinar el níquel por espectrofotometría de absorción atómica (*Método II, 2.2.23*).

Disolución problema. Disolver 20,0 g de la sustancia a examinar en una mezcla de volúmenes iguales de *ácido acético diluido R* y *agua R*; completar hasta 100,0 ml con la misma mezcla de disolventes. Añadir 2,0 ml de una disolución saturada de *pirrolidinaditiocarbamato de amonio R* (aproximadamente de 10 g/l) y 10,0 ml de *metil isobutil cetona R*. Agitar la disolución resultante durante 30 s protegida de la luz intensa y a continuación dejar que las dos capas se separen. Utilizar la capa de metil isobutil cetona.

Disoluciones de referencia. Preparar tres disoluciones de referencia en las mismas condiciones que la disolución problema, pero añadiendo 0,5 ml, 1,0 ml y 1,5 ml respectivamente de una *disolución patrón de níquel (10 ppm Ni) R*, además de los 20,0 g de la sustancia a examinar.

Ajustar el aparato a cero utilizando la *metil isobutil cetona R*, tratada como se ha descrito en la preparación de la disolución problema, pero sin añadir la sustancia a examinar. Medir la absorbancia a 232,0 nm utilizando como fuente de radiación una lámpara de cátodo hueco de níquel y una llama de aire-acetileno.

Salvo indicación contraria de la monografía, la sustancia sometida a examen no contiene más de 1 ppm de níquel.

01/2005, 20416

2.4.16. CENIZAS TOTALES

Calentar al rojo un crisol de sílice o de platino durante 30 minutos. Antes de pesarlo, dejar que se enfríe en un desecador. Salvo indicación contraria, introducir en el crisol 1,00 g de sustancia o de producto pulverizado. Distribuir uniformemente la muestra del ensayo en el interior del crisol. Desecar durante 1 h a 100-105 °C y después calcinar en un horno mufla, a una temperatura de 600 ± 25 °C. La muestra no debe incendiarse en ningún momento de la operación. Después de cada calcinación, dejar enfriar el crisol en el desecador. Si tras una calcinación prolongada las cenizas contienen aún partículas negras, suspender las cenizas con agua caliente y filtrar por un filtro sin cenizas. Calcinar de nuevo el residuo con el filtro. Reunir el filtrado y las cenizas, evaporar a sequedad prudentemente y calcinar hasta masa constante.

01/2005, 20417

2.4.17. ALUMINIO

En un embudo de decantación, introducir la disolución prescrita y agitarla 2 veces con 20 ml y 1 vez con 10 ml de una *disolución de hidroxiquinoleína R* de 5 g/l en *cloroformo R*. Reunir las disoluciones clorofórmicas y completar hasta 50,0 ml con *cloroformo R* (disolución problema).

Preparar un patrón, en iguales condiciones, utilizando la disolución de referencia prescrita.

Preparar un ensayo en blanco, en las mismas condiciones, utilizando la disolución prescrita para el blanco.

Medir la intensidad de la fluorescencia (*2.2.21*) de la disolución problema (I_1), del patrón (I_2) y del ensayo en blanco (I_3) utilizando un haz de luz de excitación de 392 nm y un filtro secundario con un banda de transmisión centrada en 518 nm o un monocromador regulado a la misma longitud de onda.

La fluorescencia (I_1 - I_3) de la disolución problema no debe ser superior a la del patrón (I_2 - I_3).

01/2005, 20418
corregido

2.4.18. FORMALDEHÍDO LIBRE

Utilizar el método A salvo indicación contraria. El método B es conveniente para vacunas a las que se ha añadido metabisulfito de sodio para neutralizar el exceso de formaldehído.

MÉTODO A

Para vacunas de uso humano, preparar una dilución 1/10 de la vacuna a examinar. En el caso de toxoides bacterianos para uso veterinario, preparar una dilución 1/25 de la vacuna a examinar.

A 1 ml de la dilución, añadir 4 ml de *agua R* y 5 ml de *reactivo de acetilacetona R1*. Mantener el tubo en un baño de agua a 40 °C durante 40 min. Examinar las disoluciones según el eje vertical de los tubos. La disolución no está más intensamente coloreada que una disolución patrón, preparada simultáneamente y en las mismas condiciones, reemplazando la dilución de la vacuna a examinar por 1 ml de una dilución de *disolución de formaldehído R* que contenga 20 µg de formaldehído (CH_2O) por mililitro.

MÉTODO B

Disolución problema. Preparar una dilución 1/200 de la vacuna a examinar con *agua R*. Si la vacuna es una emulsión, preparar una dilución equivalente utilizando la fase acuosa separada por un procedimiento adecuado (véase a continuación). Si uno de los métodos descritos a continuación se utiliza para la separación de la fase acuosa, se emplea una dilución 1/20 de ésta.

Disoluciones de referencia. Preparar disoluciones que contengan 0,25 g/l, 0,50 g/l, 1,00 g/l y 2,00 g/l de CH_2O por dilución de *disolución de formaldehído R* con *agua R*. Preparar una dilución 1/200 de cada disolución con *agua R*.

A 0,5 ml de la disolución problema y de cada una de las disoluciones de referencia en tubos de ensayo, añadir 5,0 ml de una disolución recién preparada de 0,5 g/l de *hidrocloruro de metilbenzotiazolona-hidrazona R*. Cerrar los tubos, agitar y dejar en reposo durante 60 min. Añadir 1 ml de *reactivo de cloruro de hierro(III)-ácido sulfámico R* y dejar en reposo durante 15 min. Medir la absorbancia (*2.2.25*) de las disoluciones a 628 nm. Calcular el contenido de formaldehído en la vacuna a examinar a partir de la curva de calibrado obtenida utilizando las disoluciones de referencia.

01/2005, 20612

2.6.12. CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN PRODUCTOS NO OBLIGATORIAMENTE ESTÉRILES (RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS VIABLES TOTALES)

El ensayo descrito a continuación permite la enumeración cuantitativa de bacteria mesófilas y hongos que pueden crecer en condiciones aerobias.

Los ensayos se diseñan en primer lugar para determinar si una sustancia que es objeto de una monografía en la Farmacopea satisface o no los requisitos especificados en la monografía en cuestión. Cuando se utiliza para tales propósitos seguir las instrucciones que se dan más abajo, incluyendo el número de muestras que hay que tomar y la interpretación de los resultados como se indican más abajo. Los ensayos pueden ser utilizados además para el ensayo de *Eficacia de la conservación antimicrobiana* (*5.1.3*) como se describe en la Farmacopea. También se pueden utilizar para determinar la calidad de las materias primas y en asociación con las indicaciones de *Calidad microbiológica de las preparaciones farmacéuticas* (*5.1.4*). Cuando se utiliza para tales propósitos, por ejemplo para un fabricante de materias primas y/o para la monitorización de productos finales o para procesos de validación, la metodología de los ensayos incluido el número de muestras que hay que tomar y la interpretación de los resultados son motivo de acuerdo entre el fabricante y la Autoridad competente.

Realizar el recuento en condiciones que eviten cualquier riesgo de contaminación accidental del producto a examinar. Asegurarse de que las precauciones tomadas para evitar contaminaciones no afectan a ninguno de los microorganismos cuya presencia deba ser puesta de manifiesto en el ensayo. Si el producto a examinar posee propiedades antimicrobianas deben ser neutralizadas adecuadamente. Si se utilizan inactivadores para este propósito se debe demostrar su eficacia y su ausencia de toxicidad contra los microorganismos.

Determinar el recuento de microorganismos aerobios viables totales mediante el método de filtración a través de membrana, o mediante recuento en placa, como se prescriba en la monografía.

El método del Número Más Probable (NMP) se reserva para el recuento de bacterias cuando otro método no sea posible. La elección del método puede basarse en factores tales como la naturaleza del producto y el número de microorganismos esperados. Cualquier método elegido debe ser validado apropiadamente.

Cuando se utiliza en unión al capítulo 5.1.3 o 5.1.4, se pueden utilizar el método de recuento en placa, el de extensión en superficie y el de filtración a través de membrana.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Plan de muestreo. El muestreo de los productos debe seguir un plan de muestreo bien definido. El plan de muestreo dependerá de factores tales como el tamaño del lote, el riesgo para la salud asociada a unos productos excesivamente contaminados, las características del producto y el nivel de contaminación esperado. A menos que se indique otra cosa, utilizar muestra(s) de 10 g o de 10 ml de la sustancia o de la preparación a examinar tomando las precauciones dichas anteriormente. Seleccionar la(s) muestra(s) de forma aleatoria del material a granel o de los envases disponibles de la preparación. Si fuera necesario, para obtener la cantidad requerida, mezclar el contenido de un número suficiente de envases para obtener cada muestra, dependiendo de la naturaleza de la sustancia o de la preparación a examinar.

Un ejemplo de plan de muestreo aplicable a productos donde la homogeneidad con respecto a la distribución de los microorganismos puede ser un problema, es el plan de muestreo de clase tres. En este caso cinco muestras de cada lote se investigan por separado. Las tres clases de reconocimiento son: (i) muestras aceptables, por ejemplo muestras que contienen menos de *m* unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o mililitro, donde *m* es el límite específico en la monografía relacionada; (ii) muestras límite, por ejemplo con más de *m* UFC pero menos de 10 *m* UFC por gramo o por mililitro; (iii) muestras defectuosas, por ejemplo contienen más de 10 *m* UFC por gramo o por mililitro.

Productos hidrosolubles. Disolver o diluir 10 g o 10 ml de la muestra a examinar en una disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 o en otro líquido apropiado. Normalmente se prepara una dilución decimal. Sin embargo, las características de algunos productos pueden hacer necesaria la utilización de otras relaciones. Si se sabe que el producto tiene actividad antimicrobiana, se puede añadir al diluyente un agente inactivante. Si fuera necesario ajustar el pH aproximadamente a 7 y preparar otra serie de diluciones decimales utilizando el mismo diluyente.

Productos de naturaleza no lipídica insolubles en agua. Suspender 10 g o 10 ml de la muestra a examinar en una disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 o en otro líquido apropiado. En general se prepara una suspensión 1 a 10, pero las características de algunos productos pueden hacer necesaria la utilización de volúmenes más grandes. Puede añadirse un agente tensoactivo apropiado, como polisorbato 80 a la concentración de 1 g/l, para facilitar la suspensión de sustancias de difícil humectación. Si se sabe que el producto tiene actividad antimicrobiana, se puede añadir al diluyente un agente inactivador. Si fuera necesario ajustar el pH de la suspensión a un valor aproximado a 7 y preparar otra serie de diluciones decimales utilizando el mismo diluyente.

Productos de naturaleza lipídica. Homogeneizar 10 g o 10 ml del producto a examinar con no más de la mitad de su peso de polisorbato 80 estéril o cualquier otro agente tensoactivo apropiado, calentados en caso necesario a una temperatura que no exceda los 40 °C y en casos excepcionales calentar hasta una temperatura de 45 °C. Mezclar cuidadosamente y si fuera necesario mantener la temperatura en un baño de agua o en una incubadora. Añadir una cantidad suficiente de disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 previamente calentada para obtener una dilución decimal del producto original. Mezclar cuidadosamente mientras se mantiene la temperatura durante el mínimo tiempo necesario para la formación de una emulsión, sin exceder en ningún caso los 30 min. Se pueden preparar otra serie de diluciones decimales utilizando una disolución de peptona-cloruro tamponada a pH 7,0 que contenga una concentración adecuada de polisorbato 80 estéril u otro agente tensoactivo estéril.

Parches transdérmicos. Separar las cubiertas protectoras (por la línea de separación) de diez parches de la prepara-

ción transdérmica utilizando unas pinzas estériles y colocarlas, con el lado adherente situado boca arriba, sobre cubetas de plástico o de vidrio estériles. Cubrir la superficie adherente con gasa estéril (o con un filtro-malla de monofilamentos de polímero), si es necesario, y transferir los diez parches a un volumen mínimo de 500 ml de disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 que contenga inactivadores adecuados tales como polisorbato 80 y/o lecitina. Agitar enérgicamente la preparación durante al menos 30 min (preparación A). Preparar otros diez parches de la misma manera, colocarlos en un volumen de 500 ml como mínimo, de medio D y agitar enérgicamente durante al menos 30 min (preparación B).

EXAMEN DEL PRODUCTO

Filtración a través de membrana. Utilizar filtros de membrana con un diámetro nominal de poro de 0,45 µm como máximo y cuya eficacia para retener bacterias haya sido demostrada. El tipo de material de filtro se elige de tal forma que la eficacia en la retención de bacterias no se afecte por los componentes de la muestra a investigar. Por ejemplo, las membranas de nitrato de celulosa se utilizan para disoluciones acuosas, oleosas o débilmente alcohólicas y las membranas de acetato de celulosa se utilizan para disoluciones fuertemente alcohólicas. Los equipos de filtración se diseñan para permitir la transferencia del filtro al medio de cultivo.

Transferir una cantidad adecuada de la muestra preparada como se describe en la sección "Preparación de la muestra" (preferiblemente representadas por 1 g del producto, o menos si se espera un elevado número de unidades formadoras de colonias) a dos filtros de membrana y filtrar inmediatamente. Lavar cada filtro tres veces con 100 ml de un líquido adecuado, como una disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0, cada vez. A esta disolución se pueden añadir agentes tensoactivos como polisorbato 80, o inactivadores de agentes antimicrobianos. Si está validado, se pueden utilizar menos de tres lavados. Transferir uno de los filtros de membrana, destinado principalmente al recuento de bacterias a la superficie de una placa de medio sólido adecuado, como el medio sólido B y el otro filtro, destinado al recuento de hongos, a la superficie de una placa de medio sólido adecuado, como el medio sólido C. Incubar la placa de medio sólido B a una temperatura de 30 °C a 35 °C y la placa de medio sólido C a una temperatura de 20 °C a 25 °C, ambas durante 5 días, a menos que un plazo más corto permita obtener un recuento fiable. Seleccionar las placas con el mayor número de colonias pero con menos de 100 colonias y calcular el número de unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro de producto.

Para el examen de parches transdérmicos, filtrar 50 ml de la preparación A por separado a través de dos membranas estériles. Transferir uno de los filtros de membrana sobre el medio sólido B para el recuento de microorganismos aerobios totales y el otro filtro sobre el medio sólido C para el recuento de hongos.

MÉTODOS DE RECUENTO EN PLACA

a. Método de dilución en masa. Utilizando placas de Petri de 9 cm de diámetro añadir a cada una de ellas 1 ml de la muestra preparada como se describe en la sección "Preparación de la muestra" y de 15 ml a 20 ml de un medio sólido fundido adecuado para el cultivo de bacterias (como el medio sólido B), o de 15 ml a 20 ml de un medio sólido fundido adecuado para el cultivo de hongos (como el medio sólido C) a no más de 45 °C. Si se utilizan placas Petri mayores la cantidad de medio sólido se incrementa proporcionalmente. Preparar para cada medio al menos dos placas Petri para cada dilución. Incubar las placas de 30 °C a 35 °C (de 20 °C a 25 °C para hongos) durante 5 días, a menos que un plazo más corto permita obtener un recuento más fiable. Seleccionar las placas correspondientes a una dilución que muestre el mayor número de colonias pero menos de 300 (100 colonias para hongos). Obtener la media aritmética del recuento y calcular el número de unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro.

b. Método de extensión en superficie. Utilizar placas de Petri de 9 cm de diámetro, añadir a cada placa de 15 ml a 20 ml de un medio sólido fundido adecuado para el cultivo de bacterias (como el medio sólido B), o de 15 ml a 20 ml de un medio sólido fundido adecuado para el cultivo de hongos (como el medio sólido C) a no más de 45 °C y dejar solidificar. Si se utilizan placas Petri mayores la cantidad de medio sólido se incrementa proporcional-mente. Secar las placas en una campana de flujo laminar (LAF) o en una incubadora. Sembrar y extender un volumen de no menos de 0,1 ml de la muestra preparada como se describe en la sección "Preparación de la muestra" sobre la superficie del medio. Utilizar al menos dos placas Petri para cada medio y para cada dilución. Para la incubación y para el cálculo del número de unidades formadoras de colonias proceder como se describe en el método de dilución en masa.

MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

La precisión y la exactitud del método del número más probable (NMP) son menores que las del método de filtración por membrana o que las de los métodos de recuento en placa. Resultados poco fiables se obtienen para el recuento de mohos. Por esta razón el método NMP se reserva para la cuantificación de microorganismos cuando ningún otro método es adecuado. Si la utilización del método está justificada, proceder como sigue.

Preparar una serie de al menos tres diluciones decimales sucesivas del producto como se describe en la sección "Preparación de la muestra". De cada dilución se utilizan tres alícuotas de 1 g o de 1 ml para inocular tres tubos que contengan de 9 ml a 10 ml de un medio líquido adecuado (como el caldo de cultivo A). Si fuera necesario, se puede añadir al medio un agente tensoactivo como polisorbato 80, o un inactivador de agentes antimicrobianos. Así, si se preparan tres series de diluciones se inoculan nueve tubos. Incubar todos los tubos durante cinco días de 30 °C a 35 °C. Registrar para cada dilución el número de tubos que presentan crecimiento microbiano. Si la lectura de los resultados es difícil o poco fiable debido a la naturaleza del producto a examinar, subcultivar en el mismo caldo de cultivo o en un medio sólido adecuado (como el medio sólido B), entre 18 h y 24 h a la misma temperatura y utilizar estos resultados. Determinar el número más probable de microorganismos por gramo o por mililitro del producto a examinar según la Tabla 2.6.12.-1.

Tabla 2.6.12.-1.—*Valores del número más probable de microorganismos*

Tres tubos de cada nivel de dilución							
Número de tubos positivos			NMP por gramo	Categoría*		95% límite de confianza	
0,1 g	0,01 g	0,001 g		1	2		
0	0	0	<3			-	-
0	1	0	3		x	<1	17
1	0	0	3	x		1	21
1	0	1	7		x	2	27
1	1	0	7	x		2	28
1	2	0	11		x	4	35
2	0	0	9	x		2	38
2	0	1	14		x	5	48
2	1	0	15	x		5	50
2	1	1	20		x	8	61
2	2	0	21	x		8	63
3	0	0	23	x		7	129
3	0	1	38	x		10	180
3	1	0	43	x		20	210
3	1	1	75	x		20	280
3	2	0	93	x		30	390
3	2	1	150	x		50	510
3	2	2	210		x	80	640
3	3	0	240	x		100	1400
3	3	1	460	x		200	2400
3	3	2	1100	x		300	4800
3	3	3	>1100			-	-

* Categoría 1: Resultados normales, obtenidos en el 95 por ciento de los casos.
Categoría 2: Resultados menos probables, obtenidos en sólo el 4 por ciento de los casos. No se usan para decisiones impotantes. Los resultados que son incluso menos probables que los de la cateogría 2 no se mencionan y son siempre inaceptables.

CONTROL DE LA EFICACIA DEL MEDIO Y CONTROL DE LA VALIDEZ DE LOS MÉTODOS DE RECUENTO

Cultivar las cepas de bacterias testigo por separado en envases con un medio líquido adecuado (como el caldo de cultivo A) e incubar de 30 °C a 35 °C de 18 h a 24 h. Cultivar las cepas de hongos testigo por separado en envases con un medio sólido adecuado (como el medio C sin antibióticos) e incubar de 20 °C a 25 °C durante 48 h para *Candida albicans* y de 20 °C a 25 °C durante 7 días para *Aspergillus niger*.

Staphylococcus aureus	ATCC 6538 P (NCIMB 9518, CIP 4.83)
Escherichia coli	ATCC 8739 (NCIMB 8545, CIP 53.126)
Bacillus subtilis	ATCC 6633 (NCIMB 8054, CIP 52.62)
Candida albicans	ATCC 10231 (NCPF 3179, IP 48.72)
Aspergillus niger	ATCC 16404 (IMI 149007, IP 1431.83)

Utilizar una disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0, con el fin de obtener suspensiones de referencia que contengan aproximadamente 100 colonias por mililitro. Utilizar por separado las suspensiones de referencia de cada microorganismo como control de los métodos de recuento, en presencia o en ausencia del producto a examinar. Cuando se realiza el ensayo mediante el método de filtración por membrana o el método de recuento en placa, el recuento obtenido de cualquier microorganismo a examinar no difiere en más de un factor de cinco a partir del valor calculado a partir del inóculo. Cuando se realiza el ensayo con el método del número más probable de microorganismos el valor calculado a partir del inóculo se encuentra dentro del 95 por ciento de los límites de confianza de los resultados obtenidos. Para el ensayo de esterilidad del medio y del diluyente y de la eficacia del método de asepsia aplicado, realizar el método utilizando una disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 como preparación del ensayo. No debe haber crecimiento de microorganismos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El recuento de bacterias se considerará igual a la media del número de unidades formadoras de colonias encontradas en el medio sólido B. El recuento de hongos se considerará igual a la media del número de unidades formadoras de colonias encontradas en el medio sólido C. El recuento de microorganismos aerobios viables totales es la suma del recuento de bacterias y el recuento de los hongos como se describe más arriba. Si existe la evidencia que el mismo tipo de microorganismos crece en los dos medios, esto puede ser corregido. Si el recuento se realiza mediante el método del número más probable el valor calculado es el recuento de bacterias.

Si se indica un límite en una monografía, se interpreta de la siguiente manera:

10^2 microorganismos: límite máximo de aceptación: 5×10^2,

10^3 microorganismos: límite máximo de aceptación: 5×10^3, etc.

Si se utiliza un plan de muestreo como por ejemplo el plan de muestreo de tres-clases, proceder como sigue:

Calcular el recuento de microorganismos aerobios viables totales por separado de cada una de las cinco muestras. La sustancia o la preparación satisface el ensayo si las siguientes condiciones se cumplen: (i) ninguno de los recuentos individuales de los microorganismos aerobios viables totales supera el límite indicado en un factor de diez o más (p.e. no "muestras no aceptables"), y (ii) no más de dos de los recuentos individuales de los microorganismos aerobios viables totales se encuentran entre el límite indicado y diez veces este límite (por ejemplo no más de dos "muestras límite").

Las disoluciones y los medios de cultivo recomendados se describen en el capítulo general *2.6.13.*

01/2005, 20613 corregido

2.6.13. CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN PRODUCTOS NO OBLIGATORIAMENTE ESTÉRILES (ENSAYOS PARA MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS)

Este método general propone la utilización de determinados medios selectivos. Una característica común a todos los medios selectivos es que no son detectados los microorganismos dañados subletalmente. Como estos microorganismos dañados subletalmente son importantes para la calidad del producto, se debe incluir una revivificación en los procesos de examen que dependen de medios selectivos.

Si el producto a examinar tiene actividad antimicrobiana, debe ser neutralizado adecuadamente.

Enterobacterias y otras bacterias gram-negativas

Aunque el ensayo ha sido diseñado para detectar bacterias que pertenezcan a la familia Enterobateriaceae, se reconoce que pueden ser recuperados otros tipos de organismos (por ejemplo *Aeromonas* y *Pseudomonas*).

Detección de bacterias. Preparar el producto a examinar de la forma descrita en el método general *2.6.12*, pero utilizando el medio líquido D en lugar de la disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0, homogeneizar e incubar a 35-37 °C durante un tiempo suficiente para revivificar las bacterias pero insuficiente para favorecer su multiplicación (normalmente 2 h pero no más de 5 h). Agitar el envase, transferir un volumen del líquido (homogeneizado A), correspondiente a 1 g o 1 ml del producto a examinar, a 100 ml del medio de enriquecimiento E e incubar a 35-37 °C durante 18-48 h. Realizar subcultivos en placas del medio de agar-agar F. Incubar a 35-37 °C durante 18-24 h. El producto a examinar satisface el ensayo si no se desarrolla ninguna colonia de bacterias gram-negativas en ninguna de las placas.

Evaluación cuantitativa. Inocular cantidades apropiadas del medio líquido de enriquecimiento E con el homogeneizado A o con diluciones del mismo, que contengan respectivamente 0,1 g, 0,01 g y 0,001 g (o bien 0,1 ml, 0,01 ml y 0,001 ml) del producto a examinar. Incubar a 35-37 °C durante 24-48 h. A partir de cada cultivo, realizar subcultivos sobre el medio de agar-agar F con el fin de aislar selectivamente las colonias que se desarrollen. Incubar a 35-37 °C durante 18-24 h. Un crecimiento de colonias bien desarrolladas de bacterias gram-negativas, generalmente rojas o rojizas, constituye un resultado positivo. Anotar la cantidad mínima del producto a examinar que dé resultado positivo y la cantidad máxima que dé resultado negativo. A partir de la Tabla 2.6.13.-1 determinar el número probable de bacterias.

Tabla 2.6.13.-1

Resultados para cantidades de producto de:			Número probable de bacterias por gramo de producto
0,1 g o 0,1 ml	0,01 g o 0,01 ml	0,001 g o 0,001 ml	
+	+	+	Más de 10^3
+	+	–	Menos de 10^3 y más de 10^2
+	–	–	Menos de 10^2 y más de 10
–	–	–	Menos de 10

Para el ensayo de parches transdérmicos, filtrar 50 ml de la preparación B como se describe en el método general *2.6.12* a través de un filtro de membrana estéril, colocar la membrana en 100 ml del medio líquido de enriquecimiento E, e incubar a 35-37 °C durante 18-24 h. Después de la incubación, extender sobre el medio de agar-agar F para la detección de enterobacterias y otros microorganismos gram-negativos.

Escherichia coli

Preparar el producto a examinar de la forma descrita en el método general *2.6.12* y utilizar 10 ml o la cantidad correspondiente a 1 g o 1 ml para inocular 100 ml del medio líquido A, homogeneizar e incubar a 35-37 °C durante 18-48 h. Agitar el envase, transferir 1 ml a 100 ml del medio líquido G e incubar a 43-45 °C durante 18-24 h. Realizar subcultivos en placas del medio de agar-agar H a 35-37 °C durante 18-72 h. El crecimiento de colonias rojas, generalmente no mucoides, de bacilos gram-negativos, indica la posible presencia de *E. coli*. Esto puede confirmarse por reacciones bioquímicas adecuadas como la formación de indol. La muestra satisface el ensayo si no se observan dichas colonias o si las reacciones bioquímicas de confirmación resultan negativas.

Salmonella

Preparar el producto a examinar de la forma descrita en el método general *2.6.12*, pero utilizando el medio líquido A en lugar de la disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0, homogeneizar e incubar a 35-37 °C durante 18-24 h. Transferir 1 ml del medio de enriquecimiento a 10 ml del medio líquido I e incubar a 41-43 °C durante 18-24 h. Realizar subcultivos en al menos 2 medios sólidos diferentes, elegidos entre los siguientes: medio de agar-agar J, medio de agar-agar K y medio de agar-agar L. Incubar a 35-37 °C durante 18-72 h. La aparición de cultivos con las siguientes características indica la posible presencia de bacterias del género *Salmonella*:

sobre medio de agar-agar J:	colonias bien desarrolladas, incoloras,
sobre medio de agar-agar K:	colonias bien desarrolladas, rojas, que pueden presentar o no centros negros,
sobre medio de agar-agar L:	colonias pequeñas, transparentes, incoloras o de una coloración que puede variar desde rosa hasta blanca opaca, a menudo rodeadas de una zona rosa o roja.

Transferir por separado unas cuantas colonias sospechosas al medio de agar-agar M dispuesto en tubos, mediante inoculación en superficie y en profundidad. La presencia de salmonellas queda confirmada provisionalmente si en la inoculación en profundidad, pero no en la realizada en superficie, se produce un cambio de color del rojo al amarillo, acompañado generalmente de formación de gas, con o sin producción de sulfuro de hidrógeno en el agar-agar. Puede efectuarse una confirmación definitiva mediante reacciones bioquímicas y serológicas apropiadas. El producto a examinar satisface el ensayo si no se observan colonias del tipo descrito o si las reacciones bioquímicas y serológicas de confirmación son negativas.

Pseudomonas aeruginosa

Preparar el producto a examinar de la forma descrita en el método general *2.6.12* y utilizar 10 ml o la cantidad correspondiente a 1 g o 1 ml para inocular 100 ml del medio líquido A, homogeneizar e incubar a 35-37 °C durante 18-48 h. Realizar subcultivos en una placa del medio de agar-agar N e incubarlos a 35-37 °C durante 18-72 h. La sustancia a examinar satisface el ensayo si no se detecta crecimiento de microorganismos. Si aparecen colonias formadas por bacilos gram-negativos, transferir parte de las colonias aisladas morfológicamente diferentes al medio líquido A e incubar a 41-43 °C durante 18-24 h. La muestra satisface el ensayo si no se produce crecimiento a 41-43 °C.

Para el ensayo de parches transdérmicos, filtrar 50 ml de la preparación A como se describe en el método general *2.6.12* a través de un filtro de membrana estéril, colocar la membrana en 100 ml del medio líquido A e incubar a 35-37 °C durante 18-48 h. Después de la incubación, extender sobre el medio de agar-agar N.

Staphylococcus aureus

Preparar el producto a examinar de la forma descrita en el método general *2.6.12* y utilizar 10 ml o la cantidad correspondiente a 1 g o 1 ml para inocular 100 ml del medio líquido A, homogeneizar e incubar a 35-37 °C durante 18-48 h. Realizar subcultivos en una placa del medio de agar-agar O e incubarlos a 35-37 °C durante 18-72 h. La aparición de colonias negras de cocos gram-positivos, a menudo rodeadas de una zona transparente, constituye un indicio de la presencia de *S. aureus*. La confirmación puede efectuarse mediante reacciones bioquímicas adecuadas como las pruebas de la coagulasa y de la desoxirribonucleasa. El producto a examinar satisface el ensayo si no se observan colonias del tipo descrito en el medio de agar-agar O o si las reacciones bioquímicas de confirmación son negativas.

Para el ensayo de parches transdérmicos, filtrar 50 ml de la preparación A como se describe en el método general *2.6.12* a través de un filtro de membrana estéril, colocar la membrana en 100 ml del medio líquido A e incubar a 35-37 °C durante 18-48 h. Después de la incubación, extender sobre el medio de agar-agar O.

Propiedades nutritivas y selectivas de los medios y validez del ensayo

Los ensayos descritos a continuación deben realizarse al menos en cada lote de medio deshidratado.

Proceder como sigue. Cultivar por separado cada una de las siguientes cepas de referencia, en tubos que contengan medios adecuados como los indicados, a 30-35 °C durante 18-24 h:

Staphylococcus aureus	por ejemplo ATCC 6538 (NCIMB 9518, CIP 4.83): medio líquido A,
Pseudomonas aeruginosa	por ejemplo ATCC 9027 (NCIMB 8626, CIP 82.118): medio líquido A,
Escherichia coli	por ejemplo ATCC 8739 (NCIMB 8545, CIP 53.126): medio líquido A,
Salmonella typhimurium	no se recomienda ninguna cepa de referencia (se puede emplear también una salmonella no patógena para el hombre, como Salmonella abony (NCTC 6017, CIP 80.39)): medio líquido A.

Realizar diluciones de cada cultivo utilizando disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0, con el fin de obtener suspensiones que contengan unos 1000 microorganismos viables por mililitro. Mezclar volúmenes iguales de cada suspensión y utilizar 0,4 ml (que corresponden aproximadamente a 100 microorganismos de cada cepa) como inóculo en los ensayos para la detección de *S. aureus, P. aeruginosa, E. coli* y *Salmonellae*, en presencia y en ausencia del producto a examinar. Debe obtenerse un resultado positivo para los respectivos microorganismos.

Clostridios

Los ensayos que se describen a continuación tienen diversas finalidades. El primero de los métodos se utiliza para productos de los que resulta esencial excluir la contaminación por clostridios, lo que hace necesario demostrar su ausencia. Generalmente en dichos productos el recuento total de microorganismos es bajo. El segundo método constituye un ensayo semicuantitativo de *Clostridium perfringens* y se destina a productos en los que el nivel de contaminación con esta especie constituye un índice de calidad.

1. *Ensayo de Clostridios*

Preparar el producto a examinar de la forma descrita en el método general *2.6.12*. Tomar 2 porciones iguales de la preparación correspondientes a 1 g o 1 ml del producto a examinar. Calentar 1 porción a 80 °C durante 10 min y enfriarla rápidamente. No calentar la otra porción. Transferir 10 ml de cada una de las porciones homogeneizadas a 2 envases (38 mm × 200 mm) o a otros envases adecuados, que contengan 100 ml del medio P. Incubar en condiciones anaerobias a 35-37 °C durante 48 h. Después de esta incubación, realizar subcultivos de cada tubo en el medio Q con gentamicina, incubando en condiciones anaerobias a 35-37 °C

durante 48 h. Si no se detecta crecimiento de microorganismos, el producto satisface el ensayo.

Si hubiera crecimiento, volver a realizar subcultivos de cada uno de los tipos de colonias formadas en el medio Q, sin gentamicina, incubando tanto en condiciones aerobias como anaerobias. La observación de crecimiento solamente anaerobio de bacilos gram-positivos (con formación o no de endosporas), negativos para la reacción de la catalasa, indica que se trata de *Clostridium spp*. Si fuera necesario, comparar el aspecto de las colonias que crecen en ambas placas, empleando el ensayo de la catalasa para eliminar *Bacillus spp*, aerobios o facultativamente anaerobios, que dan positiva dicha reacción. Este ensayo se puede aplicar sobre colonias aisladas en agar-agar, o bien indirectamente previa transferencia de las bacterias a portaobjetos de vidrio, depositando sobre las células una gota de *disolución diluida de peróxido de hidrógeno R*. La formación de burbujas de gas indica que es positiva la reacción de la catalasa.

2. *Recuento de Clostridium perfringens*

Preparar el producto a examinar como se describe en el método general *2.6.12* y preparar diluciones 1:100 y 1:1000 en disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0. Determinar el número más probable de bacterias como se ha descrito en recuento de microorganismos aerobios viables totales *2.6.12*, utilizando el medio de cultivo R en tubos o en otros envases adecuados que tengan una pequeña campana Durham. Mezclar con la mínima agitación posible e incubar a 45,5-46,5 °C durante 24-48 h. Los envases que presenten ennegrecimiento, debido a la formación de sulfuro de hierro(II), así como abundante gas en la campana de Durham (al menos 1/10 del volumen) indican la presencia de *Cl. perfringens*. Estimar el número más probable de *Cl. perfringens* utilizando la Tabla 2.6.13.-2.

Tabla 2.6.13.-2.—*Valores del número más probable (NMP) de bacterias*

3 tubos de cada nivel de dilución							
Número de tubos positivos			NMP por gramo	Categoría*		Límites de confianza del 95 por ciento	
0,1 g	0,01 g	0,001 g		1	2		
0	0	0	<3			-	-
0	1	0	3		x	<1	17
1	0	0	3	x		1	21
1	0	1	7		x	2	27
1	1	0	7	x		2	28
1	2	0	11		x	4	35
2	0	0	9	x		2	38
2	0	1	14		x	5	48
2	1	0	15	x		5	50
2	1	1	20		x	8	61
2	2	0	21	x		8	63
3	0	0	23	x		7	129
3	0	1	38	x		10	180
3	1	0	43	x		20	210
3	1	1	75	x		20	280
3	2	0	93	x		30	390
3	2	1	150	x		50	510
3	2	2	210		x	80	640
3	3	0	240	x		100	1400
3	3	1	460	x		200	2400
3	3	2	1100	x		300	4800
3	3	3	>1100			-	-

* Categoría 1: resultados normales, obtenidos en el 95 por ciento de los casos.
Categoría 2: resultados menos probables, obtenidos sólo en el 4 por ciento de los casos. Se desaconseja usar estos resultados para decisiones importantes. Los resultados que son todavía menos probables que los de la categoría 2 no se mencionan y son siempre inaceptables.

Controles

Utilizar las cepas siguientes:

Para el método 1: *Clostridium sporogenes*, por ejemplo ATCC 19404 (NCTC 532) o CIP 79.3,

Para el método 2: *Clostridium perfringens*, por ejemplo ATCC 13124 (NCIMB 6125, NCTC 8237, CIP 103 409).

Si fuera necesario, combinar con *Cl. sporogenes* para comprobar la selectividad y las condiciones anaerobias.

La sección siguiente se incluye para información.

DISOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO RECOMENDADOS

Las disoluciones y medios de cultivo siguientes han resultado satisfactorios para aplicarlos en los ensayos de contaminación microbiana indicados en la Farmacopea. Es posible utilizar otros medios, siempre que tengan propiedades nutritivas y selectivas semejantes para los microorganismos cuyo ensayo se realiza.

Disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0

Dihidrogenofosfato de potasio	3,6 g
Hidrogenofosfato de sodio dihidrato	7,2 g, equivalente a fosfato 0,067 M
Cloruro de sodio	4,3 g
Peptona (de carne o de caseína)	1,0 g
Agua purificada	1000 ml

A esta disolución pueden añadirse agentes tensioactivos o inactivadores de agentes antimicrobianos como:

Polisorbato 80	1 g/l a 10 g/l.

Esterilizar mediante calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio líquido A (caldo con hidrolizado de caseína y soja)

Hidrolizado pancreático de caseína	17,0 g
Hidrolizado papaínico de soja	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Hidrogenofosfato de potasio	2,5 g
Glucosa monohidrato	2,5 g
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,3 ± 0,2. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio de agar-agar B (agar-agar con hidrolizado de caseína y soja)

Hidrolizado pancreático de caseína	15,0 g
Hidrolizado papaínico de soja	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,3 ± 0,2. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio de agar-agar C (agar-agar Sabouraud-glucosa con antibióticos)

Peptonas (de carne y de caseína)	10,0 g
Glucosa monohidrato	40,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 5,6 ± 0,2. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min. Inmediatamente antes de su uso, añadir 0,10 g de bencilpenicilina sódica y 0,10 g de tetraciclina por litro de medio, en forma de disoluciones estériles. Alternativamente, es posible añadir 50 mg de cloranfenicol por litro de medio, antes de la esterilización.

Medio líquido D (caldo de lactosa monohidrato)

Extracto de carne de vaca	3,0 g
Hidrolizado pancreático de gelatina	5,0 g
Lactosa monohidrato	5,0 g
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 6,9 ± 0,2. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min y enfriar inmediatamente.

Medio líquido enriquecido E (caldo Mossel para enriquecimiento de Enterobacterias)

Hidrolizado pancreático de gelatina	10,0 g
Glucosa monohidrato	5,0 g
Bilis de buey deshidratada	20,0 g
Dihidrogenofosfato de potasio	2,0 g
Hidrogenofosfato de sodio dihidrato	8,0 g
Verde brillante	15 mg
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después del calentamiento sea 7,2 ± 0,2. Calentar a 100 °C durante 30 min y enfriar inmediatamente.

Medio de agar-agar F (agar-agar con violeta cristal, rojo neutro y bilis, con glucosa)

Extracto de levadura	3,0 g
Hidrolizado pancreático de gelatina	7,0 g
Sales biliares	1,5 g
Lactosa monohidrato	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Glucosa monohidrato	10,0 g
Agar-agar	15,0 g
Rojo neutro	30 mg
Violeta cristal	2 mg

Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después del calentamiento sea 7,4 ± 0,2. Calentar a ebullición; no debe emplearse autoclave.

Medio líquido G (caldo MacConkey)

Hidrolizado pancreático de gelatina	20,0 g
Lactosa monohidrato	10,0 g
Bilis de buey deshidratada	5,0 g
Púrpura de bromocresol	10 mg
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,3 ± 0,2. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio de agar-agar H (agar-agar MacConkey)

Hidrolizado pancreático de gelatina	17,0 g
Peptonas (de carne y de caseína)	3,0 g
Lactosa monohidrato	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Sales biliares	1,5 g
Agar-agar	13,5 g
Rojo neutro	30,0 mg
Violeta cristal	1 mg
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,1 ± 0,2. Calentar a ebullición durante 1 min con agitación constante; luego esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio líquido I (caldo con tetrationato, bilis y verde brillante)

Peptona	8,6 g
Bilis de buey desecada	8,0 g
Cloruro de sodio	6,4 g
Carbonato de calcio	20,0 g
Tetrationato de potasio	20,0 g
Verde brillante	70 mg
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después del calentamiento sea 7,0 ± 0,2. Calentar hasta inicio de la ebullición. No repetir el calentamiento.

Medio de agar-agar J (agar-agar con desoxicolato y citrato)

Extracto de carne de vaca	10,0 g
Peptona de carne	10,0 g
Lactosa monohidrato	10,0 g
Citrato de sodio	20,0 g
Citrato de hierro(III)	1,0 g
Desoxicolato de sodio	5,0 g
Agar-agar	13,5 g
Rojo neutro	20 mg
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después del calentamiento sea 7,3 ± 0,2. Calentar suavemente hasta ebullición, hervir durante 1 min, enfriar hasta 50 °C y transferir a placas de Petri. No calentar en autoclave.

Medio de agar-agar K (agar-agar con desoxicolato, lisina y xilosa)

Xilosa	3,5 g
L-Lisina	5,0 g
Lactosa monohidrato	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Rojo de fenol	80 mg
Agar-agar	13,5 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Citrato de amonio y hierro(III)	0,8 g
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después del calentamiento sea 7,4 ± 0,2. Calentar hasta el inicio de la ebullición, enfriar hasta 50 °C y transferir a placas de Petri. No calentar en autoclave.

Medio de agar-agar L (agar-agar con sacarosa, lactosa monohidrato, rojo de fenol y verde brillante)

Peptonas (de carne y de caseína)	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa monohidrato	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Agar-agar	20,0 g
Rojo de fenol	80 mg
Verde brillante	12,5 mg
Agua purificada	1000 ml

Calentar a ebullición durante 1 min. Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 6,9 ± 0,2. Inmediatamente antes de su uso, esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min, enfriar hasta 50 °C y transferir a placas de Petri.

Medio de agar-agar M (agar-agar con triple azúcar y hierro)

Extracto de carne de vaca	3,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Peptonas (de caseína y de carne)	20,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g

Lactosa monohidrato	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Glucosa monohidrato	1,0 g
Citrato de amonio y hierro(III)	0,3 g
Tiosulfato de sodio	0,3 g
Rojo de fenol	25 mg
Agar-agar	12,0 g
Agua purificada	1000 ml

Calentar a ebullición durante 1 min, con agitación. Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,4 ± 0,2. Llenar tubos hasta una tercera parte de su altura, esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min y dejar que se enfríe en posición inclinada, de modo que se obtenga una parte profunda y una superficie en pendiente.

Medio de agar-agar N (agar-agar con cetrimida)

Hidrolizado pancreático de gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10,0 g
Cetrimida	0,3 g
Agar-agar	13,6 g
Agua purificada	1000 ml
Glicerol	10,0 ml

Calentar a ebullición durante 1 min con agitación. Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,2 ± 0,2. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio de agar-agar O (agar-agar Baird-Parker)

Hidrolizado pancreático de caseína	10,0 g
Extracto de carne de vaca	5,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Agar-agar	20,0 g
Glicina	12,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Agua purificada	950 ml

Calentar a ebullición durante 1 min con agitación. Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 6,8 ± 0,2. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min, enfriar a 45-50 °C y añadir 10 ml de una disolución estéril de 10 g/l de telurito de potasio y 50 ml de emulsión de yema de huevo.

Medio P (medio reforzado para clostridios)

Extracto de carne de vaca	10,0 g
Peptona	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Almidón soluble	1,0 g
Glucosa monohidrato	5,0 g
Hidrocloruro de cisteína	0,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Acetato de sodio	3,0 g
Agar-agar	0,5 g
Agua purificada	1000 ml

Hidratar el agar-agar y disolver por calentamiento hasta ebullición bajo agitación continua. Si es preciso, ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea aproximadamente 6,8. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio Q (agar-agar Columbia)

Hidrolizado pancreático de caseína	10,0 g
Hidrolizado péptico de carne	5,0 g
Hidrolizado pancreático de corazón	3,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Almidón de maíz	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar-agar, según su capacidad gelificante	de 10,0 g a 15,0 g
Agua purificada	1000 ml

Hidratar el agar-agar y disolver por calentamiento a ebullición bajo agitación continua. Si es preciso, ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,3 ± 0,2. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min. Dejar que se enfríe hasta 45-50 °C; añadir, cuando proceda, sulfato de gentamicina hasta una concentración de 20 mg de gentamicina base y verter en placas de Petri.

Medio R (medio con lactosa monohidrato y sulfito)

Hidrolizado pancreático de caseína	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Lactosa monohidrato	10,0 g
Hidrocloruro de cisteína	0,3 g
Agua purificada	1000 ml

Disolver, ajustar a pH 7,1 ± 0,1 y envasar en cantidades de hasta 8 ml, en tubos de 16 mm ×160 mm que contengan una pequeña campana de Durham. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min y conservar a 4 °C.

Antes de su uso, calentar el medio en un baño de agua durante 5 min y enfriar. Añadir a cada tubo 0,5 ml de una disolución de 12 g/l de *metabisulfito de sodio R* y 0,5 ml de una disolución de 10 g/l de citrato de amonio y hierro(III), ambas recién preparadas y filtradas a través de membranas (tamaño de poro: 0,45 µm).

Medio de agar-agar S (R2A)

Extracto de levadura	0,5 g
Peptona de proteosa	0,5 g
Hidrolizado de caseína	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Almidón	0,5 g

Hidrogenofosfato de potasio	0,3 g
Sulfato de magnesio, anhidro	0,024 g
Piruvato de sodio	0,3 g
Agar-agar	15,0 g
Agua purificada	1000 ml

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,2 ± 0,2. Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

AGENTES NEUTRALIZANTES

Se pueden utilizar agentes neutralizantes para neutralizar la actividad de los agentes antimicrobianos. Se pueden añadir a la disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0, preferentemente antes de la esterilización. Si se utilizan se debe demostrar su eficacia y su ausencia de toxicidad frente a los microorganismos.

Un líquido neutralizante típico tiene la siguiente composición:

Polisorbato 80	30 g
Lecitina (huevo)	3 g
Hidrocloruro de histidina	1 g
Peptona (de carne o de caseína)	1 g
Cloruro de sodio	4,3 g
Dihidrogenofosfato de potasio	3,6 g
Hidrogenofosfato de sodio dihidrato	7,2 g
Agua purificada	1000 ml

Esterilizar mediante calentamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Si la disolución no tiene suficiente capacidad de neutralización, puede incrementarse la concentración de polisorbato 80 o de lecitina. Alternativamente, se pueden añadir los agentes neutralizantes mencionados en la Tabla 2.6.13.-3.

Tabla 2.6.13.-3.—*Inactivadores de agentes antimicrobianos para añadir a la disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0*

TIPO DE AGENTE ANTIMICROBIANO	INACTIVADOR	CONCENTRACIÓN	COMENTARIO
Fenólicos	Laurilsulfato de sodio Polisorbato 80 y lecitina Yema de huevo	4 g/l 30 g/l y 3 g/l 5 ml/l-50 ml/l	Añadir después de la esterilización de la disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0
Órgano-mercuriales	Tioglicolato de sodio	0,5 g/l-5 g/l	
Halógenos	Tiosulfato de sodio	5 g/l	
Compuestos de amonio cuaternario	Yema de huevo	5 ml/l-50 ml/l	Añadir después de la esterilización de la disolución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0

01/2005, 20614

2.6.14. ENDOTOXINAS BACTERIANAS

El ensayo de endotoxinas bacterianas se utiliza para detectar o cuantificar endotoxinas procedentes de bacterias gram-negativas utilizando el lisado de amebocitos del cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*). Puede efectuarse por 3 técnicas: gelificación, basada en la formación de gel; turbidimetría, basada en el desarrollo de turbidez después de escisión de un sustrato endógeno; y colorimetría, basada en el desarrollo de color después de escisión de un complejo sintético de péptido-cromógeno.

En el presente capítulo se describen los 6 métodos siguientes:

Método A. Gelificación: ensayo límite

Método B. Gelificación: ensayo semi-cuantitativo

Método C. Turbidimetría cinética

Método D. Colorimetría cinética

Método E. Colorimetría en el punto final

Método F. Turbidimetría en el punto final

Aplicar cualquiera de los 6 métodos de ensayo. En caso de duda o discrepancia, la decisión final se basa en el método A salvo indicación contraria en la monografía.

El ensayo se realiza de manera que evite la contaminación por endotoxinas.

Aparatos

Despirogenar todos los aparatos de vidrio y los resistentes al calor en una estufa de aire caliente utilizando un proceso validado. El tiempo y la temperatura mínimos utilizados son 30 minutos y 250 °C. Si se emplean aparatos de plástico, tales como placas de microtitulación y puntas de pipetas para pipeteadores automáticos, debe comprobarse la ausencia de endotoxinas detectables y la no interferencia de este material en el ensayo.

NOTA: En este capítulo, el término «tubo» se utiliza para todos los tipos de recipientes, tales como pocillos de placas de microtitulación.

Identificación y valoración del marcador

Para llevar acabo la valoración y la identificación del marcador se utilizó un método que garantiza de forma inequívoca la composición del Extracto seco de Agrimonia. Se ha desarrollado un método interno descrito en el procedimiento de trabajo: MCC-V-0024, el cual ha sido validado por el departamento de Control de Calidad e I+D de PULEVA BIOTECH/ EXXENTIA. Las características técnicas del mismo se han descrito en la página 24 del presente EDMF.

3.2.S.4.3. Validación de los procesos analíticos

La Validación del método de análisis se ha llevado a cabo en los laboratorios de Puleva Biotech/Puleva Biotech/ Exxentia obteniéndose resultados favorables que demuestran la fiabilidad del método. Este método es utilizado por Puleva Biotech/ Exxentia en otros extractos y la experiencia obtenida junto con los resultados de la validación apoyan la elección del método.

El objetivo general de este estudio de validación es demostrar que el método propuesto sirve para determinar cualitativa y cuantitativamente el contenido en EPGCG del extracto de las hojas de la planta medicinal *Agrimonia eupatoria* L. Esta se ha llevado a cabo en varias fases:

Fase I.

Determinación de la Selectividad, Linealidad y Precisión-Reproducibilidad utilizando el patrón del EPGCG.

Fase II.

Determinación de la Selectividad, Linealidad, Reproducibilidad-Repetibilidad de las EPGCG contenidas en el extracto fluido de la hoja de Agrimonia.

Fase III.

Determinación de la Selectividad, Linealidad, Reproducibilidad y Repetibilidad de las EPGCG contenidas en el extracto seco de la hoja de Agrimonia.

- El método seguido es cromatografía líquida HPLC en fase reversa y elución isocrática.

- El equipo utilizado ha sido un cromatógrafo marca AGILENT SERIE 1200 con desgasificador modelo 1200 Series vacuum degasser, bomba cuaternaria modelo 1200 Series quaternary pump, inyector automático modelo 1200 Series autosampler, columna termostatizada modelo 1200 Series thermostatted column compartment

Con los datos que se han obtenido se observa que el método es válido a la identificación, determinación y cuantificación de las EPGCG, marcador elegido para el control de Calidad de la Agrimonia, tanto en la planta como en el extracto fluido el extracto seco.

Selectividad y especificidad

- Los picos de los marcadores para el extracto son identificados con los patrones correspondientes. La identificación es siempre positiva.

- Ninguno de los patrones interfiere con los excipientes.

Linealidad

- El método analítico se puede considerar lineal y prácticamente proporcional en el intervalo de concentraciones estudiado (80-120% respecto al producto final) ya que, de acuerdo con los datos resumidos en la estadística del punto 4:

- El coeficiente de correlación r^2 es superior a 0,99 ($p > 99,99$ %)

- En cuanto al rango, se puede considerar aceptable el intervalo de concentraciones comprendido desde el 80 % al 120% del contenido total en EPGCG, dada la buena repetibilidad obtenida en dichos puntos, así como la recuperación aceptable obtenida en los mismos.

Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)

- La Repetibilidad es buena ya que con una dilución media se obtienen RSD% < 5%.
- La Precisión intermedia es buena ya que el RSD% global de los días 1 y 2 es siempre inferior a la suma de las RSD% individuales y además la RSD% global es inferior a 5%.

3.2.S.4.4 Análisis de los lotes

A continuación se adjunta el boletín correspondiente al lote de planta utilizado para la fabricación del extracto. Partiendo de un único lote de planta, se elaboraron tres sublotes de Extracto Seco de hojas de Agrimonia cuyos boletines se adjuntan a continuación.

Certificado de análisis de la planta

PM AOS-A012905 L -AGI

Certificados de análisis del Extracto Seco de *Agrimonia eupatoria L*

A-011006-AGI
A-021106-AGI
A-031206-AGI

PULEVA Biotech eXxentia

Agrimonia eupatoria L.	
Nombre Comercial: Agrimonia **Nombre Inglés:** Agrimony	**Nº de Lote** PM AOS-A012905-L-AGI

Proveedor: Amoros

Dirección del Proveedor: Centro Industrial Santiga. C/Flassaders, nave 16.
08130 BARCELONA

Origen: España **Tipo de Cultivo:** Silvestre **Parte Empleada:** Hojas	**Año de Recolección:** 2006 **Olor:** Característico **Color:** verde oscuro(superior), gris(inferior)

Especificaciones Analíticas	**Valor requerido**	**Resultados**
Humedad	Max. 10%	OK
Cenizas	Max. 10%	OK
Granulometría	70% <15 mm	OK
Materias Extrañas	< 2%	OK
Metales Pesados	(Real Farmacopea Española v.v.)	OK
Pesticidas		
Organofosforados	ppm	
Organoclorados	ppm	OK
	(Real Farmacopea Española v.v.)	OK
Título	> 0,05% Catequinas totales como EPGCG	OK

Especificaciones Microbiológicas	**Valor requerido** (Real Farmacopea Española)	**Resultados**
Aerobios Totales	< 100.000 ufc/g	OK
Hongos	< 10.000 ufc/g	OK
Enterobacterias	< 1.000 ufc/g	OK
Salmonela	Ausencia (10 g)	Ausencia
E. Coli	Ausencia (1 g)	Ausencia

Identificación	**Ref./ Especif.**	**Resultado**
1.- Macroscópica	Real Farmacopea Española v.v.	Positiva
2.- Microscópica	Real Farmacopea Española v.v.	Positiva

CERTIFICADO DE ANALISIS

Producto:	**E.S. AGRIMONIA**	**Nº de lote:** **A011006-AGI**
Nombre botánico:	*Agrimonia eupatoria L.*	
Parte usada:	Hojas	**Fecha Caducidad:** 11-jun-2011
Código Producto:	FAENAGIR003	
Ratio:	4:1	
Descripción:	Polvo de color ocre de olor y sabor característico de la planta	
Solubilidad:	Parcialmente soluble en soluciones hidroalcohólicas	
Excipientes	Dioxido de Silicio	

ANALISIS	ESPECIFICACION	METODOS	RESULTADOS
pH	4,0 -7,0	Eu. Pharm. versión vigente (v.v.) (2.2.3)	5,4
Humedad (%)	≤ 5,5	Eu. Pharm. v.v. (2.2.32)	3,8
Cenizas (%)	≤ 15,0	Eu. Pharm. v.v. (2.4.16)	7,9
Ensayo (%)	0,2 -0,6 EPGCG	HPLC (MCC-V-0024R01)	0,23
Densidad aparente (g/ml)	≥ 0,40	Eu. Pharm. v.v. (2.9.15)	0,77
Tamaño partícula (%) > 180 µm 180-150 µm 150-100 µm < 100 µm	min 70% <180 mm	Eu. Pharm. v.v. (2.9.12)	 18,3% 5,0% 16,0% 60,7%
Microbiología Aerobios (ufc/g) Enterobacteria (ufc/g) Escherichia coli (1 g) Salmonella sp. (10 g) Hongos (ufc/g) S. aureus (1 g) P. aeruginosa (1 g)	 < 10000 < 100 Ausencia Ausencia < 100 Ausencia Ausencia	Eu. Pharm. v.v. (2.6.13)	 Cumple Cumple Ausencia Ausencia Cumple Ausencia Ausencia
Disolv. residuales Etanol (ppm)	< 5000	Eu. Pharm. v.v. (2.4.24)	Cumple Cumple
Metales pesados (ppm) (Plomo, Arsénico, Mercurio, Cadmio)	Max 20,0	Eu. Pharm. v.v. (2.4.8)	Cumple
Pesticidas	Eu. Pharm.	Eu. Pharm. v.v. (2.8.13)	Cumple
Aflatoxinas	≤ 1,5 ppb		Cumple

Conservación: Conservar en recipientes cerrados y protegido de la luz
País de origen: España

Realizado por:	Aprobado por:	DECISION:
Técnico Control Calidad	Jefe Control de Calidad	Fecha: Mayo 2009

Especificación versión: SPEC-000

CERTIFICADO DE ANALISIS

Producto:	**E.S. AGRIMONIA**	**Nº de lote:** **A021106-AGI**
Nombre botánico:	*Agrimonia eupatoria L.*	
Parte usada:	Hojas	**Fecha Caducidad:** 11-jun-2011
Código Producto:	FAENAGIR003	
Ratio:	4:1	
Descripción:	Polvo de color ocre de olor y sabor característico de la planta	
Solubilidad:	Parcialmente soluble en soluciones hidroalcohólicas	
Excipientes	Dioxido de Silicio	

ANALISIS	ESPECIFICACION	METODOS	RESULTADOS
pH	4,0 -7,0	Eu. Pharm. versión vigente (v.v.) (2.2.3)	5,3
Humedad (%)	≤ 5,5	Eu. Pharm. v.v. (2.2.32)	3,9
Cenizas (%)	≤ 15,0	Eu. Pharm. v.v. (2.4.16)	7,8
Ensayo (%)	0,2 -0,6 EPGCG	HPLC (MCC-V-0024R01)	0,25
Densidad aparente (g/ml)	≥ 0,40	Eu. Pharm. v.v. (2.9.15)	0,74
Tamaño partícula (%) > 180 µm 180-150 µm 150-100 µm < 100 µm	min 70% <180 mm	Eu. Pharm. v.v. (2.9.12)	 18,2% 4,0% 15,0% 62,8%
Microbiología Aerobios (ufc/g) Enterobacteria (ufc/g) Escherichia coli (1 g) Salmonella sp. (10 g) Hongos (ufc/g) S. aureus (1 g) P. aeruginosa (1 g)	 < 10000 < 100 Ausencia Ausencia < 100 Ausencia Ausencia	Eu. Pharm. v.v. (2.6.13)	 Cumple Cumple Ausencia Ausencia Cumple Ausencia Ausencia
Disolv. residuales Etanol (ppm)	< 5000	Eu. Pharm. v.v. (2.4.24)	Cumple Cumple
Metales pesados (ppm) (Plomo, Arsénico, Mercurio, Cadmio)	Max 20,0	Eu. Pharm. v.v. (2.4.8)	Cumple
Pesticidas	Eu. Pharm.	Eu. Pharm. v.v. (2.8.13)	Cumple
Aflatoxinas	≤ 1,5 ppb		Cumple

Conservación: Conservar en recipientes cerrados y protegido de la luz
País de origen: España

Realizado por:	Aprobado por:	DECISION:
Técnico Control Calidad	Jefe Control de Calidad	

Especificación versión: SPEC-000

CERTIFICADO DE ANALISIS

Producto:	**E.S. AGRIMONIA**	**Nº de lote:** **A031206-AGI**
Nombre botánico:	*Agrimonia eupatoria L.*	
Parte usada:	Hojas	**Fecha Caducidad:** 12-jun-2011
Código Producto:	FAENAGIR003	
Ratio:	4:1	
Descripción:	Polvo de color ocre de olor y sabor característico de la planta	
Solubilidad:	Parcialmente soluble en soluciones hidroalcohólicas	
Excipientes	Dioxido de Silicio	

ANALISIS	ESPECIFICACION	METODOS	RESULTADOS
pH	4,0 -7,0	Eu. Pharm. versión vigente (v.v.) (2.2.3)	5,5
Humedad (%)	≤ 5,5	Eu. Pharm. v.v. (2.2.32)	4,0
Cenizas (%)	≤ 15,0	Eu. Pharm. v.v. (2.4.16)	7,8
Ensayo (%)	0,2 -0,6 EPGCG	HPLC (MCC-V-0024R01)	0,25
Densidad aparente (g/ml)	≥ 0,40	Eu. Pharm. v.v. (2.9.15)	0,75
Tamaño partícula (%) > 180 µm 180-150 µm 150-100 µm < 100 µm	min 70% <180 mm	Eu. Pharm. v.v. (2.9.12)	 18,0% 6,0% 14,0% 62,0%
Microbiología Aerobios (ufc/g) Enterobacteria (ufc/g) Escherichia coli (1 g) Salmonella sp. (10 g) Hongos (ufc/g) S. aureus (1 g) P. aeruginosa (1 g)	 < 10000 < 100 Ausencia Ausencia < 100 Ausencia Ausencia	Eu. Pharm. v.v. (2.6.13)	 Cumple Cumple Ausencia Ausencia Cumple Ausencia Ausencia
Disolv. residuales Etanol (ppm)	< 5000	Eu. Pharm. v.v. (2.4.24)	Cumple Cumple
Metales pesados (ppm) (Plomo, Arsénico, Mercurio, Cadmio)	Max 20,0	Eu. Pharm. v.v. (2.4.8)	Cumple
Pesticidas	Eu. Pharm.	Eu. Pharm. v.v. (2.8.13)	Cumple
Aflatoxinas	≤ 1,5 ppb		Cumple

Conservación: Conservar en recipientes cerrados y protegido de la luz
País de origen: España

Realizado por:	Aprobado por:	DECISION:
Técnico Control Calidad	Jefe Control de Calidad	Fecha: Mayo 2009

Especificación versión: SPEC-000

3.2.S.4.5.Justificación de las especificaciones

Las especificaciones utilizadas en este extracto están basadas en las reflejadas en las monografías de otros extractos similares, de las farmacopeas, Real Farmacopea Española v.v. y European Pharmacopoeia v.v.

Los valores indicados en las especificaciones de este Extracto están justificados por los valores obtenidos en los lotes piloto. Se utilizan valores ± 10% sobre los mínimos y máximos obtenidos experimentalmente.

El marcador de Calidad utilizado se basa en las dosis de los estudios clínicos recogidos en la bibliografía referente a *Agrimonia eupatoria L*

3.2.S.5.- Referencias de los estándares o materiales

3.2.S.5.1.- Control de reactivos y disolventes.

Los materiales de partida se manipulan siguiendo un procedimiento de inspección que describe las siguientes áreas:

a) Recepción del producto.
b) Almacenamiento en zona de cuarentena
c) Muestreo.
d) Ensayo analítico.
e) Aceptación o rechazo por control de calidad.
f) Almacenamiento en la zona de materias primas correspondiente.

Estos procedimientos se realizan de acuerdo con nuestro sistema general de muestreo de forma que cada material de partida se ensaya y se muestrea antes de su utilización a menos que el material garantice su aceptación basado en el certificado de análisis del proveedor.

El Departamento de Control de Calidad, se encarga de realizar el muestreo y de recibir las muestras para el ensayo.

Control de Calidad determina:

a) Cual es el número de muestras que se han de tomar según el documento Standard Operating Procedure.

b) Los recipientes que se van a usar en el control de calidad

c) Se utilizarán utensilios adecuados y limpios para la toma de muestra

El muestreo se lleva a cabo según el Standard Operating Procedure (MIL-STD 105E). En general este procedimiento establece que se tomen $\sqrt{N+1}$ unidades, siendo N el número de unidades del lote, excepto para materiales líquidos

entregados en tanques en cuyo caso se toma una sola muestra de cada uno de ellos.

d) Ensayo analítico.

e) Aceptación o rechazo del lote.

f) Almacenamiento en la zona de materias primas correspondiente.

- *Reactivos y disolventes utilizados para la valoración por HPLC:*

Reactivos	**Grado**
Acetonitrilo	HPLC
Acido Fosfórico 85%	Reactivo

Patrón de referencia del marcador:

Epigalocatequina galato (EPGCG)

3.2.S.6.SISTEMAS DE ALMACENAMIENTO

3.2.S.6.1.- Envasado

Los envases comerciales utilizados son considerados aptos para utilización con el EXTRACTO SECO DE AGRIMONIA. Protegen al producto de la luz, contaminación por otros polvos, humedad y vapores y no sufren pérdidas durante las condiciones normales de manipulación, almacenamiento y transporte.

El E.S. de Agrimonia se envasa en tambores de cartón cilíndricos con una capacidad entre 25-50 kg. Los tambores presentan una serie de características:

- Calidad de papel: Semi-cra
- Fondos y tapas de tafibra
- Grosor de 5 mm
- Se utiliza chapa galvanizada para los cierres y Dextrina para unificar las capas.

Dentro del tambor se colocan dos bolsas de polietileno transparentes de baja densidad, la interna contiene el producto y la segunda, contiene en su interior a la primera con el producto, protegiendo a este de posibles agresiones externas. Las bolsas se cierran con un cable recubierto de nylon. Una bolsa conteniendo un desecante se incluye en el espacio entre las dos bolsas con el objeto de reducir la humedad. La bolsa con el desecante no está en contacto con el producto. La presencia de esta bolsa está indicada en la etiqueta. Las bolsas con el producto son protegidas de la luz y almacenadas a una temperatura inferior a 25ºC en envases de cartón cilíndrico, cerrado y fuera de la humedad ambiente.

Para presentaciones de menor capacidad se utilizan botes de polietileno de color blanco con tapones de polietileno introduciendo en su interior una bolsa con silicagel y son herméticamente cerrados.

3.2.S.6.2.- *Etiquetado*

Para E.S. Agrimonia se realizan dos etiquetas una llamada CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO y otra DIRECCIÓN.

La etiqueta de características del producto, está situada en el lateral del tambor y contiene la siguiente información:

- Nombre del producto
- Ratio y cantidad de marcadores
- Solventes
- Excipientes usados
- Fecha de fabricación
- Fecha de caducidad
- Peso
- Número de lote
- Contiene bolsa con desecante

Se adjunta un ejemplo del etiquetaje utilizado:

Puleva Biotech
Exxentia
We standardize nature

E.S. Agrimonia0,2-0,6 % EPGCG
Agrimonia eupatoria L
Agua 100%. 4/1
Batch nº: Y012103
25 kg

Man. Date: 26-04-02 Expiry date: 26-04-05

Excipientes: Dioxido de Silicio
CONTIENE BOLSA CON DESECANTE

Puleva Biotech/Exxentia **TEL.: + 34 91 778 86 86**
www.pulevabiotech.es **FAX: + 34 91 778 86 86**

La etiqueta de dirección contiene la siguiente información:

- Nombre del destinatario
- Dirección del destinatario

Debe conservarse en envases herméticos y protegidos de la luz.
Se adjunta un ejemplo del etiquetaje utilizado:

Puleva Biotech
Exxentia
We standardize nature

NOMBRE

DIRECCION

Puleva Biotech/Exxentia **TEL.: + 34 91 778 86 86**
www.pulevabiotech.es **FAX: + 34 91 778 86 86**

El etiquetado de un lote con la etiqueta comercial se realiza sobre el embalaje y el material aceptado y la operación se realiza al preparar un embarco para el cliente.

3.2.S.7. ESTABILIDAD

Se ha preparado un programa de ensayo diseñado para valorar las características de estabilidad de cualquiera de nuestros productos. En dicho programa se establece el calendario de toma y análisis de muestras.

Los parámetros que se decide controlar durante el estudio de estabilidad son aquellos que pueden definir si hay algún cambio significativo en las propiedades y en la estabilidad del extracto seco de *Agrimonia eupatoria L* (Agua 100% (v/v), Relación planta extracto: (4/1)).

En base a esto los parámetros medidos son los siguientes:

- Aspecto físico
- Cenizas totales
- PH
- Humedad
- Contenido en EPGCG
- Microbiología.

Los resultados de los ensayos de estabilidad son utilizados para determinar las condiciones de almacenamiento apropiadas y los períodos de caducidad.

Describimos a continuación, el protocolo para los estudios de estabilidad.

3.2.S.7.1. Resumen de estabilidad y conclusiones

Objetivos

Se realizan los estudios y medidas que permiten la valoración de la estabilidad de los extracto seco de Agrimonia (*Agrimonia eupatoria* L.) en cámaras climáticas de condiciones normales (zona climática II: 25º ± 2ºC, 60 ± 5% de Humedad Relativa HR) y condiciones intermedias (30º±2ºC and 65%±5% HR).

Los estudios de estabilidad se han realizado de acuerdo a la "Note for guidance on Stability testing of new active substances and medical products" (CPMP/ICH/380/95 y CVMP/VICH/899/99) y la "Note for guidance on stability testing of existing active substances and related finished products" (CPMP/QWP/122/02 y EMEA/CVMP/846/99).

Paralelamente, se ha preparado un programa de almacenamiento y un calendario de ensayos (PNT MGC-0012 PLAN GENERAL DE SEGUIMIENTO DE ESTABILIDAD) diseñado para valorar las características de estabilidad de cualquiera de nuestros productos. Igualmente, se ha preparado un protocolo para los estudios de estabilidad en condiciones normales y aceleradas de los ingredientes farmacéuticos activos del Extracto Seco (PNT MGC0013, PROTOCOLO DE ESTABILIDAD PARA UN PRODUCTO DETERMINADO).

Los resultados de los ensayos de estabilidad que se presentarán en este informe son utilizados para determinar las condiciones de almacenamiento apropiadas y proponer los períodos de caducidad del Extracto Seco de Agrimonia.

Aplicación

Estabilidad en condiciones normales:

Se ha realizado el programa sobre los tres primeros lotes piloto del Extracto Seco de Agrimonia (Y-010611-F-AGR; Y-011011-F-AGR; Y-031502-F-AGR).

Estabilidad en condiciones intermedias:

Se ha realizado el programa sobre los tres primeros lotes piloto del Extracto Seco de Agrimonia (Y-010611-F-AGR; Y-011011-F-AGR; Y-031502-F-AGR).

Responsabilidades

Serán responsables de estos estudios:

1.- Validaciones y Estabilidad: Realiza los ensayos y determinaciones estipulados en el protocolo.

2.- Validaciones y Estabilidad: Notifica cualquier desviación en las condiciones de almacenamiento de los lotes, bajo el estudio de estabilidad que se especifican en este registro a Dirección Técnica y a Garantía de Calidad.

3.- Departamento de Registros: Elaboración del Registro Farmacéutico incluyendo los resultados de estabilidad proporcionados por departamento de Validaciones y Estabilidad.

4.- La documentación elaborada para el estudio de estabilidad será revisada por Garantía de Calidad.

Procedimiento

1.- Para cada lote del estudio, preparar al menos 16 muestras, cada una con 25 g mínimo de Extracto Seco de Agrimonia.

2.- Almacenamos las muestras en dobles bolsas de polietileno de cierre hermético, con 2 bolsas de silica gel entre ellas guardadas en bidones o tambores de cartón y correctamente etiquetadas.

3.- Para el estudio en **condiciones normales** se colocan los recipientes con las muestras en una cámara climática de ambiente controlado en las condiciones de la zona climática correspondiente a Madrid, es decir, la zona climática II: 25º ± 2ºC, 60% ± 5% HR, durante un período de un año.

Para estudiar la estabilidad del producto en **condiciones intermedias**, se colocan los recipientes en una cámara climática de ambiente controlado en las condiciones intermedias: 30º±2ºC y 65%±5% HR, durante un período de 12 meses.

Las cámaras climáticas han sido cualificadas de forma externa por la empresa Proycal según protocolo MGC0011 "Organización y funcionamiento de las cámaras climáticas (Zona climática II)".

4.- Los parámetros de control de propiedades físico químicos y análisis fueron: Aspecto físico, densidad, pH, Humedad, Contenido en marcador (Catequinas totales, EPGCG y Microbiología.

5.- Los resultados del ensayo se documentaron realizando un certificado de análisis y una tabla de resultados. Este certificado junto con la correspondiente documentación se envió a Garantía de Calidad para su revisión.

6.- Al final del estudio, Validaciones y Estabilidad envía los resultados de estabilidad al Departamento de Registros como informe actual con los cromatogramas, datos y cálculos estadístico utilizados para su elaboración.

Condiciones de estabilidad

Estabilidad en condiciones intermedias

La estabilidad en estas condiciones se realiza manteniendo las muestras en una cámara climática de estabilidad a 30º±2ºC y 65%±5% HR. Se realizan 5 tomas de muestras para la determinación de los parámetros descritos anteriormente en el punto 4 del procedimiento, en los periodos de tiempo de acuerdo al siguiente esquema y siguiendo el calendario obligatorio a partir del Tiempo 0 en la primera toma de muestras:

Toma de muestras	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
Tiempo	0 meses	3 mes	6 meses	9 meses	12 meses

Estabilidad en condiciones normales

La estabilidad en estas condiciones se realiza manteniendo las muestras en una cámara climática de estabilidad a 25º±2ºC y 60%±5% de HR. Se realizaran 8 tomas de muestras para la determinación de los parámetros descritos anteriormente en el punto 4 del procedimiento, en los periodos de tiempo de acuerdo al siguiente esquema y siguiendo el calendario obligatorio a partir del Tiempo 0 en la primera toma de muestras:

Toma de muestras	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
Tiempo	0 meses	3 mes	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses

Estabilidad de los extractos secos de agrimonia:

Estudio de estabilidad intermedia:

Se ha realizado con 3 lotes semi-industriales piloto (Y-010611-F-AGR; Y-011011-F-AGR ;Y-031502-F-AGR). Se mantienen las muestras en cámara climática a 30º±2ºC and 65%±5% HR de humedad, durante un período de tiempo de 1 a 12 meses según el calendario previsto.

Los resultados obtenidos hasta el momento (12 meses), demuestran un comportamiento aceptable del Extracto Seco de Agrimonia, manteniéndose dentro de especificaciones los parámetros críticos considerados y no observándose variaciones estadísticamente significativas de los mismos.

b.- Estudio de estabilidad normal :

Actualmente se está efectuando el seguimiento de 3 lotes semi-industriales pilotos mediante controles periódicos según calendario previsto. Los datos disponibles hasta la fecha abarcan hasta 12 meses (Y-010611-F-AGR; Y-011011-F-AGR; Y-031502-F-AGR) almacenados en condiciones de zona climática II (25ºC ± 2ºC y 60% ± 5% HR).

Para los tres lotes estudiados, los parámetros del extracto seco de Agrimonia, en la fecha del último análisis, cumplen las especificaciones, no observándose variaciones anormales estadísticamente significativas.

Evaluación de los resultados:

Tras conservar el Extracto Seco en las condiciones climáticas anteriormente especificadas durante 12 **meses, en la cámara climática de condiciones ambientales e intermedias**, en sus respectivos envases, los controles realizados no señalan ningún tipo de alteración significativa referente al aspecto físico, cualidades físico-químicas y contenido en marcadores de calidad, encontrándose las variaciones de estos parámetros dentro de los límites admitidos en las especificaciones.

Así pues se puede considerar que en este período, tanto en el aspecto cualitativo como en el aspecto cuantitativo, no existe ni alteración en el contenido de marcadores activos, ni en las propiedades físico-químicas o de aspecto físico.

Período de validez propuesto:

De acuerdo con el estudio de estabilidad desarrollado y en base a los resultados obtenidos hasta el momento y a la experiencia de Puleva Biotech/ Exxentia en este tipo de productos, se propone una caducidad de 3 años para el Extracto seco de Agrimonia.

Independientemente de estos resultados, los estudios de estabilidad en condiciones normales e intermedias continuarán hasta completar los 3 años propuestos como período de validez.

REALIZADO POR:	REVISADO POR:
VB	
FECHA: 18-5-2009	FECHA: 18-05-09

3.2.S.7.2. Datos de Estabilidad

ESTABILIDAD NORMAL DEL EXTRACTO SECO DE AGRIMONIA.

ANÁLISIS DE CATEQUINAS TOTALES COMO EPGCG

Tabla 1

MARCADOR	T=0 Mes	T=3Meses	T=6Meses	T=9Meses	T=12 Meses
Y010611-AGR	0,40% 0,40% 0,40%	0,43% 0,44% 0,43%	0,41% 0,41% 0,40%	0,39% 0,41% 0,37%	0,38% 0,36% 0,39%
Promedio +/- DE	*0,40 ±0,00*	*0,43 ±0,01*	*0,41 ±0,01*	*0,39 ±0,02*	*0,38 ±0,02*
Y011011-AGR	0,39% 0,40% 0,40%	0,43% 0,43% 0,40%	0,42% 0,39% 0,42%	0,39% 0,43% 0,37%	0,40% 0,37% 0,39%
Promedio +/- DE	*0,39 ±0,00*	*0,42 ±0,02*	*0,41 ±0,02*	*0,40 ±0,03*	*0,39 ±0,01*
Y031502- AGR	0,40% 0,40% 0,40%	0,40% 0,41% 0,43%	0,43% 0,40% 0,38%	0,41% 0,39% 0,40%	0,41% 0,37% 0,40%
Promedio +/- DE	*0,40 ±0,00*	*0,41 ±0,01*	*0,40 ±0,03*	*0,40 ±0,01*	*0,39 ±0,02*

ESTABILIDAD INTERMEDIA DEL EXTRACTO SECO DE AGRIMONIA.

ANÁLISIS DE CATEQUINAS TOTALES COMO EPGCG

Tabla 2

MARCADOR	T=0 Mes	T=3Meses	T=6Meses	T=9Meses	T=12 Meses
Y010611-AGR	0,40% 0,40% 0,40%	0,42% 0,42% 0,42%	0,40% 0,40% 0,38%	0,40% 0,36% 0,40%	0,36% 0,37% 0,36%
Promedio +/- DE	*0,40 ±0,00*	*0,42 ±0,00*	*0,40 ±0,01*	*0,39 ±0,02*	*0,37 ±0,01*
Y011011-AGR	0,39% 0,40% 0,40%	0,44% 0,43% 0,43%	0,42% 0,41% 0,41%	0,38% 0,38% 0,37%	0,36% 0,37% 0,37%
Promedio +/- DE	*0,39 ±0,00*	*0,43 ±0,01*	*0,41 ±0,01*	*0,38 ±0,01*	*0,37 ±0,00*
Y031502- AGR	0,40% 0,40% 0,40%	0,42% 0,44% 0,41%	0,42% 0,38% 0,41%	0,40% 0,41% 0,36%	0,39% 0,35% 0,39%
Promedio +/- DE	*0,40 ±0,00*	*0,42 ±0,02*	*0,40 ±0,02*	*0,39 ±0,03*	*0,38 ±0,02*

RESULTADO DE ESTABILIDAD NORMAL DEL EXTRACTO SECO DE AGRIMONIA

Lote Y-010611-AGR. **PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS, MICROBIOLÍOGICAS Y ASPECTO FÍSICO**

Tabla 3.

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	T = 0 Meses	T = 3 Meses	T = 6 Meses	T = 9 Meses	T = 12 Meses
Apariencia	Polvo color ocre	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
pH	4- 7	5.52	5.41	5.27	5.32	5.41
Humedad (%)	< 5,5 %	4,1	4,0	4,2	3,8	3,5
Cenizas (%)	< 15 %	8,0	8,0	7,7	7,6	7,2
Densidad (g/ml)	>0,40 g/ml	0,758	0,746	0,742	0,729	0,732
Microorganismos Totales	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g
Hongos y levaduras	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
Enterobacterias	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
E. Coli (1g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Ps aeruginosa	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salmonella sp (10 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Staphylococus	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Lote Y-011011-AGR **PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS, MICROBIOLÍOGICAS Y ASPECTO FÍSICO**

Tabla 4

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	T = 0 Meses	T = 3 Meses	T = 6 Meses	T = 9 Meses	T = 12 Meses
Apariencia	Polvo color ocre	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
pH	4- 7	5.44	5.40	5.37	5.22	5.11
Humedad (%)	< 5,5 %	4,0	3,8	3,8	3,6	3,4
Cenizas (%)	< 15 %	8,1	8,0	7,9	7,7	7,5
Densidad (g/ml)	>0,40 g/ml	0,769	0,753	0,747	0,739	0,742
Microorganismos Totales	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g
Hongos y levaduras	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
Enterobacterias	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
E. Coli (1 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Ps aeruginosa	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salmonella sp (10 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Staphylococus	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Lote Y-031502-AGR **PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS, MICROBIOLÍOGICAS Y ASPECTO FÍSICO**

Tabla 5

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	T = 0 Meses	T = 3 Meses	T = 6 Meses	T = 9 Meses	T = 12 Meses
Apariencia	Polvo color ocre	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
pH	4- 7	5.32	5.61	5.37	5.46	5.35
Humedad (%)	< 5,5 %	3,9	4,0	4,1	3,9	3,6
Cenizas (%)	< 15 %	7,9	8,1	7,6	7,8	7,5
Densidad (g/ml)	>0,40 g/ml	0,748	0,741	0,732	0,725	0,729
Microorganismos Totales	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g
Hongos y levaduras	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
Enterobacterias	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
E. Coli (1 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Ps aeruginosa	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salmonella sp (10 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Staphylococus	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

ESTABILIDAD INTERMEDIA DEL EXTRACTO HIDROSECO DE AGRIMONIA.

Lote Y-010611-AGR. **PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS, MICROBIOLÍOGICAS Y ASPECTO FÍSICO**

Tabla 6

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	T = 0 Meses	T = 3 Meses	T = 6 Meses	T = 9 Meses	T = 12 Meses
Apariencia	Polvo color ocre	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
pH	4- 7	5.52	5.47	5.56	5.44	5.48
Humedad (%)	< 5,5 %	4,1	4,0	3,8	3,7	3,4
Cenizas (%)	< 15 %	8,0	7,8	7,7	7,5	7,1
Densidad (g/ml)	>0,40 g/ml	0,758	0,749	0,751	0,732	0,746
Microorganismos Totales	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g
Hongos y levaduras	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
Enterobacterias	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
E. Coli (1g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Ps aeruginosa	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salmonella sp (10 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Staphylococus	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Lote Y-011011-AGR **PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS, MICROBIOLÍOGICAS Y ASPECTO FÍSICO**

Tabla 7

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	T = 0 Meses	T = 3 Meses	T = 6 Meses	T = 9 Meses	T = 12 Meses
Apariencia	Polvo color ocre	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
pH	4- 7	5.44	5.42	5.34	5.32	5.41
Humedad (%)	< 5,5 %	4,0	4,0	3,7	3,5	3,1
Cenizas (%)	< 15 %	8,1	7,9	7,6	7,6	7,4
Densidad (g/ml)	>0,40 g/ml	0,769	0,757	0,738	0,741	0,736
Microorganismos Totales	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g
Hongos y levaduras	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
Enterobacterias	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
E. Coli (1g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Ps aeruginosa	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salmonella sp (10 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Staphylococus	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Lote Y-031502-AGR **PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS, MICROBIOLÍOGICAS Y ASPECTO FÍSICO**

Tabla 8

ENSAYO	ESPECIFICACIONES	T = 0 Meses	T = 3 Meses	T = 6 Meses	T = 9 Meses	T = 12 Meses
Apariencia	Polvo color ocre	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
pH	4- 7	5.32	5.40	5.36	5.22	5.47
Humedad (%)	< 5,5 %	3,9	3,9	3,7	3,4	3,1
Cenizas (%)	< 15 %	7,9	8,0	7,6	7,2	7,0
Densidad (g/ml)	>0,40 g/ml	0,748	0,753	0,734	0,739	0,741
Microorganismos Totales	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g	$<10^4$ UFC/g
Hongos y levaduras	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
Enterobacterias	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
E. Coli (1 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Ps aeruginosa	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salmonella sp (10 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Staphylococus	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia