

PANCREATINA

8049-47-6

Definición - Pancreatina es una sustancia formada por una mezcla de enzimas, principalmente amilasa, lipasa y proteasa, obtenida del páncreas del cerdo *Sus scrofa* L. var. *domesticus* Gray (Fam. Suidae) o del buey *Bos taurus* L. (Fam. Bovidae). Pancreatina contiene, por cada mg, no menos de 25 Unidades de Actividad de Amilasa, no menos de 2,0 Unidades de Actividad de Lipasa y no menos de 25 Unidades de Actividad de Proteasa. La Pancreatina con mayor poder de digestión puede rotularse como un múltiplo entero de las tres actividades mínimas o puede diluirse mezclándola con lactosa o con sacarosa que contenga no más de 3,25 por ciento de almidón o con Pancreatina con menor poder de digestión. [NOTA—La cantidad de Pancreatina que descompone el almidón a una velocidad inicial tal que hidroliza 0,16 μ Eq de enlace glicosídico por minuto en las condiciones descritas en *Valoración de actividad de amilasa* contiene 1 Unidad de Actividad de Amilasa.]. Una Unidad de Actividad Lipasa corresponde a la cantidad de Pancreatina que libera 1,0 μ Eq de ácido por minuto a un pH de 9,0 y 37 °C en las condiciones descritas en *Valoración de actividad de lipasa*. Una Unidad de Actividad de Proteasa corresponde a la cantidad de Pancreatina que en las condiciones descritas en *Valoración de actividad de proteasa* hidroliza la caseína a una velocidad inicial tal que libera por minuto una cantidad de péptidos no precipitados por ácido tricloroacético que produce la misma absorbancia a 280 nm que 15 nmol de tirosina.

Caracteres generales - Polvo amorfo de color crema, con ligero olor característico no desagradable. Hidroliza grasas a glicerol y ácidos grasos, convierte proteínas en proteasas y sustancias derivadas, y convierte el almidón en dextrinas y azúcares. Su mayor actividad se da en medios neutros o ligeramente alcalinos; algo más que trazas de ácidos minerales o cantidades grandes de hidróxidos alcalinos la hacen inerte. Un exceso de carbonato alcalino también inhibe su acción.

Sustancias de referencia - Sales Biliares SR-FA.
Amilasa y Proteasa de Pancreatina SR-FA.
Lipasa de Pancreatina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases impermeables, a una temperatura menor o igual a 30 °C.

ENSAYOS

Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles <90> - Debe cumplir con los requisitos de la prueba para la ausencia de especies de *Salmonella* y *Escherichia coli*.

Pérdida por secado <680> - Secar al vacío a 60 °C durante 4 horas: no debe perder más de 5,0 % de su peso.

Grasa - Colocar 2,0 g de Pancreatina en un frasco de aproximadamente 50 mL, agregar 20 mL de éter, introducir el tapón y dejar reposar durante 2 horas, mezclando por rotación a intervalos frecuentes. Decantar el éter sobrenadante, con la ayuda de una varilla, sobre un filtro de aproximadamente 7 cm de diámetro, previamente humedecido con éter, y recoger el filtrado en un vaso de precipitados previamente tarado. Repetir la extracción con otras dos porciones de 10 mL de éter cada una, procediendo de la misma manera. Transferir el éter y el resto de la Pancreatina al filtro. Dejar escurrir, evaporar el éter y secar el residuo a 105 °C durante 2 horas: el residuo de grasa obtenido que posee tres o más veces las tres actividades mínimas tiene un peso no mayor de 120 mg (6,0 %); el residuo obtenido que posee menos de tres veces las tres actividades mínimas tiene un peso no mayor de 60 mg (3,0 %).

VALORACIÓN

Actividad de amilasa (Poder de digestión de almidón)

Solución reguladora de fosfato a pH 6,8 - Disolver 13,6 g de fosfato monobásico de potasio en agua para preparar 500 mL de solución. Disolver 14,2 g de fosfato dibásico de sodio anhidro en agua para preparar 500 mL de solución. Mezclar 51 mL de solución de fosfato monobásico de potasio con 49 mL de solución de fosfato dibásico de sodio. Si es necesario, ajustar a un pH de 6,8 mediante la adición gota a gota de la solución apropiada. [NOTA: preparar en el día de su uso.]

Solución de sustrato - Mezclar una porción de almidón soluble purificado equivalente a 2,0 g de sustancia seca con 10 mL de agua y agregar esta mezcla a 160 mL de agua a ebullición. Enjuagar el vaso de precipitados con 10 mL de agua,

112 agregarla a la solución caliente y calentar hasta
113 ebullición, mezclando continuamente. Enfriar
114 a temperatura ambiente y agregar agua para
115 preparar 200 mL. [NOTA: preparar en el día de
116 su uso.]

117 *Preparación estándar* - Pesar exactamente
118 alrededor de 20 mg de Amilasa y Proteasa de
119 Pancreatina SR-FA y transferir a un mortero
120 apropiado. Agregar aproximadamente 30 mL
121 de *Solución reguladora de fosfato a pH 6,8* y
122 homogeneizar durante 5 a 10 minutos.
123 Transferir la mezcla con ayuda de *Solución*
124 *reguladora de fosfato a pH 6,8* a un matraz
125 aforado de 50 mL, diluir a volumen con el
126 mismo solvente y mezclar. Calcular la
127 actividad, en Unidades de Actividad de
128 Amilasa por mL de la solución resultante,
129 empleando la potencia declarada de la
130 sustancia de referencia.

131 *Preparación muestra* - Para Pancreatina que tenga
132 aproximadamente la misma actividad de
133 amilasa que la Amilasa y Proteasa de
134 Pancreatina SR-FA, pesar exactamente
135 alrededor de 40 mg de Pancreatina en un
136 mortero apropiado. [NOTA: Para la
137 Pancreatina que tenga una actividad de amilasa
138 diferente, pesar exactamente la cantidad
139 necesaria para obtener una preparación que
140 tenga una actividad de amilasa por mL
141 correspondiente aproximadamente a la de la
142 *Preparación estándar*.] Agregar
143 aproximadamente 3 mL de *Solución*
144 *reguladora de fosfato a pH 6,8* y homogeneizar
145 durante 5 a 10 minutos. Transferir la mezcla
146 con ayuda de *Solución reguladora de fosfato a*
147 *pH 6,8* a un matraz aforado de 100 mL, diluir
148 a volumen con el mismo solvente y mezclar.

149 *Procedimiento* - Rotular cuatro erlenmeyers de 250
150 mL con tapón como *E*, *M*, *BE* y *BM*. Colocar
151 en cada uno 25,0 mL de *Solución de sustrato*,
152 10 mL de *Solución reguladora de fosfato a pH*
153 *6,8* y 1 mL de solución de cloruro de sodio
154 (11,7 en 1.000), tapar y mezclar. Colocar los
155 erlenmeyers en un baño de agua a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1$
156 $^{\circ}\text{C}$ y dejar que se equilibren. A los erlenmeyers
157 *BM* y *BE* agregar 2 mL de ácido clorhídrico 1
158 M, mezclar y regresarlos al baño de agua.
159 Agregar a los erlenmeyers *M* y *BM* porciones
160 de 1,0 mL de la *Preparación muestra*, y
161 agregar a los erlenmeyers *E* y *BE* 1,0 mL de la
162 *Preparación estándar*. Agitar cada erlenmeyer
163 y regresarlos al baño de agua. Después de 10
164 minutos, cronometrados con exactitud a partir
165 de la adición de la enzima, agregar 2 mL de
166 ácido clorhídrico 1 M a los erlenmeyers *E* y *M*
167 y mezclar. Agregar a cada erlenmeyer,
168 mezclando continuamente, 10,0 mL de iodo
169 0,1 M (SV) e inmediatamente agregar 45 mL
170 de hidróxido de sodio 0,1 M. Colocar los
171 erlenmeyers en la oscuridad a una temperatura

172 entre
173 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. A cada
174 erlenmeyer, agregar 4 mL de ácido
175 sulfúrico 2 N y valorar con tiosulfato de
176 sodio 0,1 N (SV) hasta la desaparición del
177 color azul. Calcular la actividad de
178 amilasa, en Unidades por mg, de la
179 Pancreatina en ensayo por la fórmula
180 siguiente:

$$181 \quad 100(C_E/P_M)(V_{BM} - V_M)/(V_{BE} - V_E)$$

182 donde C_E es la actividad de la amilasa de la
183 *Preparación estándar*, en Unidades por
184 mL; P_M es la cantidad, en mg, de
185 Pancreatina en ensayo; y V_M , V_E , V_{BM} y
186 V_{BE} son los volúmenes, en mL, de
187 tiosulfato de sodio 0,1 N consumidos en
188 por las soluciones de los erlenmeyers *M*
189 *,E*, *BM* y *BE*, respectivamente.

190 **Actividad de la lipasa** (Poder de digestión de
191 grasa)

192 *Solución de goma arábica* - Centrifugar una
193 dispersión de goma arábica (1 en 10)
194 hasta aclarar. Emplear sólo la solución
195 transparente.

196 *Sustrato de aceite de oliva* - Mezclar 165 mL
197 de *Solución de goma arábica*, 20 mL de
198 aceite de oliva y 15 g de hielo picado en
199 el vaso de una licuadora eléctrica. Enfriar
200 la mezcla en un baño de hielo a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y
201 homogeneizar a alta velocidad durante 15
202 minutos, enfriando intermitentemente en
203 un baño de hielo para evitar que la
204 temperatura supere $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Realizar la
205 prueba de aptitud de la mezcla del
206 siguiente modo: colocar una gota del
207 homogenato en un portaobjetos y colocar
208 encima un cubreobjetos presionando
209 suavemente para esparcir el líquido.
210 Analizar todo el campo con gran aumento
211 (objetivo de $43\times$ y ocular de $5\times$),
212 empleando un ocular equipado con un
213 micrómetro calibrado. El sustrato es
214 satisfactorio si el 90 % de las partículas
215 no excede $2\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro y ninguna
216 excede $10\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro.

217 *Solución reguladora* - Disolver 60 mg de
218 tris(hidroximetil)aminometano y 234 mg
219 de cloruro de sodio en agua para preparar
220 100 mL.

221 *Solución de sales biliares* - Preparar una
222 solución que contenga 80,0 mg de Sales
223 Biliares SR-FA por mL.

224 *Preparación estándar* - Suspender
225 aproximadamente 200 mg de Lipasa de
226 Pancreatina SR-FA, exactamente
227 pesados, en aproximadamente 3 mL de
228 agua fría en un mortero, homogeneizar

229 durante 10 minutos y agregar agua fría para
230 obtener una concentración de 8 a 16 Unidades
231 de Actividad de Lipasa por mL. Mantener la
232 suspensión a 4 °C y homogeneizar antes de
233 usar.

234 *Preparación muestra* - Suspender aproximadamente
235 200 mg de Pancreatina, exactamente pesados,
236 en aproximadamente 3 mL de agua fría en un
237 mortero, homogeneizar durante 10 minutos y
238 agregar agua fría para obtener una
239 concentración de 8 a 16 Unidades de Actividad
240 de Lipasa por mL, según la potencia estimada
241 del material en ensayo. Mantener la
242 suspensión a 4 °C y mezclar antes de usar.

243 [NOTA: para cada determinación, extraer entre 5 a
244 10 mL de la suspensión fría, tanto de la
245 *Preparación estándar* como de la *Preparación*
246 *muestra*, y dejar que la temperatura alcance los
247 20 °C antes de transferir el volumen exacto de
248 1,0 mL que se indica en *Procedimiento*].

249 *Procedimiento* - Mezclar 10,0 mL del *Sustrato de*
250 *aceite de oliva*, 8,0 mL de *Solución*
251 *reguladora*, 2,0 mL de *Solución de sales*
252 *biliares* y 9,0 mL de agua en un recipiente con
253 camisa de 50 mL aproximadamente y conectar
254 su cámara externa a un baño de agua
255 controlado con termostato. Cubrir la mezcla y
256 revolver continuamente mediante agitación
257 mecánica. Mantener la mezcla a una
258 temperatura de 37 °C $\pm$ 0,1 °C, y agregar
259 hidróxido de sodio 0,1 M (SV), mediante una
260 microbureta introducida por una abertura en la
261 tapa hasta ajustar potenciométricamente el pH
262 a 9,20 con un sistema de electrodos vidrio-
263 calomel. Agregar 1,0 mL de la *Preparación*
264 *muestra* y luego continuar agregando
265 hidróxido de sodio 0,1 M (SV) durante 5
266 minutos para mantener el pH en 9,0.
267 Determinar el volumen de hidróxido de sodio
268 0,1 M (SV) agregado después de cada minuto.
269 De la misma manera, titular 1,0 mL de
270 *Preparación estándar*. Graficar el volumen de
271 hidróxido de sodio 0,1 M (SV) consumido en
272 función del tiempo. Empleando solo el
273 segmento lineal de la curva, calcular la acidez
274 media liberada por minuto por la *Preparación*
275 *muestra* y la *Preparación estándar*. Calcular la
276 actividad de lipasa, en Unidades, de la
277 Pancreatina en ensayo.

278 **Actividad de proteasa** (Poder de digestión de
279 caseína)

280 *Sustrato de caseína* - Colocar 1,25 g de caseína
281 finamente pulverizada en un erlenmeyer de
282 100 mL que contenga 5 mL de agua, agitar
283 hasta formar una suspensión, agregar 10 mL de
284 hidróxido de sodio 0,1 M, agitar durante 1
285 minuto, agregar 50 mL de agua y agitar durante
286 aproximadamente 1 hora hasta disolver la
287 caseína. La solución resultante debe tener un

288 pH
289 aproximado a 8 (si fuera necesario,
290 ajustar el pH empleando hidróxido de
291 sodio 1 M o ácido clorhídrico 1 M).
292 Transferir la solución a un matraz aforado
293 de 100 mL, diluir a volumen con agua y
294 mezclar. [NOTA: preparar en el día de su
295 uso.]

296 *Solución reguladora* - Disolver 6,8 g de
297 fosfato monobásico de potasio y 1,8 g de
298 hidróxido de sodio en 950 mL de agua en
299 un matraz aforado de 1.000 mL, ajustar a
300 un pH de 7,5 $\pm$ 0,2; empleando hidróxido
301 de sodio 0,2 M, diluir a volumen con agua
302 y mezclar. [NOTA: almacenar esta
303 solución en heladera.]

304 *Solución de ácido tricloroacético* - Disolver 50
305 g de ácido tricloroacético en 1.000 mL de
306 agua. [NOTA: almacenar esta solución a
307 temperatura ambiente]

308 *Papel filtro* - Determinar la aptitud del papel
309 filtro filtrando una porción de 5 mL de la
310 *Solución de ácido tricloroacético* a través
311 del papel y midiendo la absorbancia del
312 filtrado a 280 nm, empleando una porción
313 sin filtrar de la misma *Solución de ácido*
314 *tricloroacético* como blanco: la
315 absorbancia no debe ser mayor de 0,04. Si
316 la absorbancia es mayor de 0,04, el papel
317 de filtro puede lavarse repetidamente con
318 *Solución de ácido tricloroacético* hasta
319 que la absorbancia del filtrado,
320 determinada según se indicó
321 anteriormente, no sea mayor de 0,04.

322 *Preparación estándar* - Agregar
323 aproximadamente 100 mg de Amilasa y
324 Proteasa de Pancreatina SR-FA,
325 exactamente pesados, a 100,0 mL de
326 *Solución reguladora* y mezclar agitando
327 intermitentemente a temperatura
328 ambiente durante aproximadamente 25
329 minutos. Diluir cuantitativamente con
330 *Solución reguladora* para obtener una
331 concentración de aproximadamente 2,5
332 Unidades de Actividad de Proteasa por
333 mL.

334 *Preparación muestra* - Pesar exactamente
335 alrededor de 100 mg de Pancreatina en un
336 mortero. Agregar aproximadamente 3 mL
337 de *Solución reguladora* y homogeneizar
338 durante 5 minutos a 10 minutos.
339 Transferir la mezcla con ayuda de
340 *Solución reguladora* a un matraz aforado
341 de 100 mL, diluir a volumen con el mismo
342 solvente y mezclar. Diluir
343 cuantitativamente con *Solución*
344 *reguladora* para obtener una dilución que
345 coincida con la actividad de la
346 *Preparación estándar*.

347 *Procedimiento* - Rotular tubos de ensayo por
348 duplicado como E_1 , E_2 y E_3 para el estándar y
349 M para la muestra. Agregar a los tubos
350 *Solución reguladora* 2,0 mL a E_1 , 1,5 mL a E_2
351 y M ; y 1,0 mL a E_3 . Agregar 1,0 mL; 1,5 mL
352 y 2,0 mL de la *Preparación estándar* a los
353 tubos E_1 , E_2 y E_3 , respectivamente. Agregar
354 1,5 mL de la *Preparación muestra* a los tubos
355 M . Agregar 5,0 mL de *Solución de ácido*
356 *tricloroacético* a los tubos E_1 , E_2 , E_3 y M y
357 mezclar. Designar estos tubos como E_{1B} , E_{2B} ,
358 E_{3B} y M_B , respectivamente. Preparar un blanco
359 mezclando 3,0 mL de *Solución reguladora* y
360 5,0 mL de *Solución de ácido tricloroacético* en
361 un tubo de ensayo rotulado como B . Colocar
362 todos los tubos en un baño de agua a 40 °C,
363 introducir una varilla de vidrio en cada tubo y
364 dejar que la temperatura se equilibre. Al
365 tiempo cero, agregar a cada tubo, en intervalos
366 cronometrados, 2,0 mL del *Sustrato de*
367 *caseína*, precalentado a la temperatura del
368 baño y mezclar. Al cronometrar 60 minutos de
369 la adición del *Sustrato de caseína* detener la
370 reacción en los tubos E_1 , E_2 , E_3 y M agregando
371 5,0 mL de *Solución de ácido tricloroacético* en
372 los intervalos de tiempo correspondientes,
373 mezclar y retirar todos los tubos del baño.
374 Dejar en reposo durante 10 minutos a
375 temperatura ambiente para la precipitación
376 completa de proteínas y filtrar. Los filtrados
377 deben estar libres de turbidez. Determinar las
378 absorbancias de los filtrados, en celdas de 1
379 cm, a 280 nm, con un espectrofotómetro
380 adecuado empleando el filtrado del blanco
381 (tubo B) para ajustar el instrumento. Corregir
382 los valores de absorbancia para los filtrados de
383 los tubos E_1 , E_2 y E_3 restando los valores de
384 absorbancia los filtrados de los tubos E_{1B} , E_{2B}
385 y E_{3B} , respectivamente, y graficar los valores
386 de absorbancia corregidos en función de los
387 volúmenes correspondientes de la *Preparación*
388 *estándar* empleados en cada caso. Calcular la
389 actividad proteasa de la Pancreatina en ensayo
390 a partir de la curva empleando el valor de
391 absorbancia corregido ($M-M_B$).
392