

INSULINA ASPÁRTICA BIFÁSICA

SUSPENSIÓN INYECTABLE

Definición - La Suspensión Inyectable de Insulina Aspártica Bifásica es una suspensión amortiguada estéril de *Insulina Aspártica* formando un complejo con *Sulfato de Protamina* en una solución de *Insulina Aspártica*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la sumatoria de insulina aspártica C₂₅₆H₃₈₁N₆₅O₇₉S₆, insulina aspártica A21Asp, insulina aspártica B3Asp, insulina aspártica B3isoAsp e insulina aspártica B28isoAsp (determinada como el contenido total de insulina aspártica e insulina aspártica soluble complejada con protamina sulfato). Debe contener Insulina Aspártica soluble C₂₅₆H₃₈₁N₆₅O₇₉S₆

Cantidad declarada de Insulina Aspártica soluble (%)	Cantidad declarada de Protamina complejado con Insulina Aspártica (%)	Especificación (%)
30	70	24 a 36
50	50	42 a 58
70	30	62 a 78

La Suspensión Inyectable de Insulina Aspártica Bifásica debe cumplir los requisitos para *Inyectables* en 1050. *Formas farmacéuticas* y con las siguientes especificaciones. [NOTA: 100 unidades son equivalentes a 3,50 mg de insulina aspártica.]

Caracteres generales - Suspensión de color blanca o casi blanca que sedimenta cuando está en reposo, dando lugar a un sedimento blanco y un líquido sobrenadante incoloro o casi incoloro; el sedimento se resuspende fácilmente por agitación suave. Cuando se examina al microscopio las partículas aparecen como cristales cilíndricos alargados, la mayoría de un tamaño superior a 1 µm que raramente excede los 60 µm, sin que existan agregados grandes.

Sustancia de referencia - Insulina Aspártica SR-FA.

CONSERVACIÓN

42

43

44

En envases herméticos, con cierre de seguridad, apirógenos y estériles. Conservar de 2 a 8°C. No congelar. Proteger de la luz.

49

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración para Insulina Aspártica*. El tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina aspártica en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

58

Determinación del pH <250>

59

Entre 6,9 y 7,8.

60

Proteínas relacionadas

Sistema cromatográfico, Solución de hidróxido de sodio diluido, Solución A, Solución B, Fase móvil, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración Para Insulina Aspártica*.

67

Solución muestra - Emplear la *Preparación muestra* de *Valoración Para Insulina Aspártica*.

70

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 10 µL de la *Solución muestra*. Calcular el porcentaje de cada proteína relacionada con relación al pico principal, ignorando los picos correspondientes a protamina y los conservantes: la respuesta del pico correspondiente a insulina aspártica B28isoAsp no debe ser mayor al 2,5 %; la sumatoria de las respuestas debidas a insulina aspártica A21Asp, insulina aspártica B3Asp e insulina aspártica B3isoAsp, no debe ser mayor a 5,0 %; y, la suma de las respuestas de todas las impurezas restantes no debe ser mayor a 3,5 %.

86

Impurezas con peso molecular mayor que la insulina Aspártica

87

Sistema cromatográfico - Examinar por cromatografía de exclusión por tamaño molecular, empleando un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de 30 cm × 7,5 mm con fase

88

89

90

91

92

93

estacionaria constituida por gel de sílice hidrofílico de 5 a 10 μm de diámetro con un tamaño de poro de 12 – 12,5 nm, en un grado apropiado para la separación del monómero de insulina de los dímeros y polímeros. El caudal debe ser aproximadamente 0,5 mL por minuto.

Solución de arginina - Preparar una solución de L-arginina en agua de aproximadamente 1 mg por mL.

Fase móvil - Solución de arginina, acetonitrilo y ácido acético glacial (65:20:15). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

[NOTA: Conservar la *Solución de resolución* y la *Solución muestra*, a una temperatura de entre 2 °C y 10 °C. Si se emplea un inyector automático mantener la temperatura entre 2 °C y 10 °C].

Solución de resolución - Emplear una solución de insulina de aproximadamente 4 mg por mL, que contenga más de 0,4 % de proteínas de alto peso molecular. Se puede emplear una suspensión inyectable de insulina aspártica bifásica, que ha sido aclarada con una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 M, para que contenga el porcentaje indicado de proteínas de elevada masa molecular o se puede utilizar una solución preparada a partir de insulina aspártica, disuelta en ácido clorhídrico 0,01 M. También puede obtenerse, dejando reposar insulina aspártica en polvo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 días.

Preparación muestra - Agitar la Suspensión Inyectable de Insulina Aspártica Bifásica con el fin de obtener una muestra homogénea, luego agregar 4 μL de ácido clorhídrico 6 M por mL, para obtener una solución límpida. Si la suspensión no se vuelve límpida dentro de los 5 minutos siguientes a la adición inicial de ácido clorhídrico, agregar más ácido clorhídrico 6 M en alícuotas menores a 4 μL por mL hasta la solubilización.

Las preparaciones con concentraciones mayores a 100 UI por mL deben ser diluidas con ácido clorhídrico 0,01 M con el fin de evitar la sobrecarga de la columna con el monómero de insulina.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Antes de emplear una columna nueva, cromatografiar la *Solución de resolución* al menos tres veces según se indica en *Procedimiento*: se deben obtener resultados repetitivos en dos inyecciones consecutivas para verificar que la columna esté equilibrada. [NOTA: si se analizan muestras que contienen protamina, el equilibrado de la columna se realiza empleando una solución que contenga protamina.]

Cromatografiar la *Solución de Resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención deben ser aproximadamente entre 13 y 17 minutos para los complejos de insulina aspártica poliméricos o complejos covalentes de insulina-protamina; 17,5 minutos para los dímeros de insulina; 20 minutos

para los monómeros de insulina aspártica y 22 minutos para las sales. [NOTA: Si la *Solución de resolución* hubiera sido preparada a partir de una solución de insulina que contiene conservantes, como por ejemplo metilparabeno, *m*-cresol o fenol, estos compuestos deben eluir más tarde.]. La relación pico/valle *p/v* determinada por la relación entre la altura del pico del dímero *H_p* y la altura del valle de separación entre los picos del monómero y del dímero *H_v* debe ser mayor o igual a 2,0.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo 100 μL de la *Solución muestra*, registrar el cromatograma durante al menos 35 minutos y medir las respuestas de los picos. Ignorar cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el pico de insulina. La suma de las respuestas de los picos con un tiempo de retención menor que el del pico de insulina no debe ser mayor de 3,0 % (para las preparaciones que contienen protamina) de la respuesta total de los picos.

179 **Cinc total**

[NOTA: preparar la *Solución madre del estándar de Cinc*, *Soluciones estándar* y la *Solución muestra* inmediatamente antes de su uso].

Solución madre del estándar de Cinc (10 μg por mL) - Realizar una dilución 1 en 10 de la *Solución de Cinc* (100 ppm Zn) (SL) con agua.

Soluciones estándar - Preparar soluciones que contengan 0,2 μg ; 0,4 μg ; 0,6 μg ; 0,8 μg y 1,0 μg de cinc por mililitro mediante la dilución de la *Solución madre del estándar de Cinc* (10 μg por mL) con ácido clorhídrico 0,01 M.

Solución muestra - Agitar suavemente la Suspensión Inyectable de Insulina Aspártica Bifásica y diluir un volumen que contenga 100 UI de insulina a 25,0 mL con ácido clorhídrico 0,01 M. Diluir la solución obtenida anteriormente con ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una solución que contenga por ejemplo, entre 0,1 y 1,0 μg de cinc por mL.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de las *Soluciones estándar* y la *Solución muestra* en la línea de emisión del cinc a 213,9 nm, con un espectrofotómetro de absorción atómica (ver 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*) equipado con una lámpara de cinc de cátodo hueco y una llama de acetileno-aire (aproximadamente 2 litros de acetileno y 11 litros de aire por

213 minuto). Graficar las absorbancias de las *Soluciones*
 214 *estándar* en función de la concentración en µg por
 215 mL de cinc y determinar la concentración de cinc en
 216 µg por mL en la *Solución muestra*: no debe contener
 217 más de 40 µg cada 100 unidades de insulina
 218 aspártica.

219 **Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>**
 220 Debe contener menos de 80 Unidades de
 221 Endotoxina cada 100 unidades de insulina aspártica.

222 **Ensayos de esterilidad <370>**
 223 Debe cumplir con los requisitos.

225 VALORACIÓN

226 *Para Insulina Aspártica*

227 *Sistema cromatográfico* - Emplear un equipo
 228 para cromatografía de líquidos con un detector
 229 ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 25
 230 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por
 231 octadecilsilano químicamente unido a partículas
 232 porosas de sílice de 5 µm de diámetro. Mantener la
 233 columna a 35 °C. El caudal debe ser
 234 aproximadamente 1 mL por minuto. Programar el
 235 cromatógrafo del siguiente modo:
 236

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0 - 35	58	42	Isocrático
35 - 40	58→20	42→80	Gradiente lineal
40 - 45	20	80	Isocrático
45 - 46	20→58	80→42	Gradiente lineal
			Re-equilibrio
46 - 60	58	42	

237 *Solución de hidróxido de sodio diluido* -
 238 Disolver 8,5 g de hidróxido de sodio en agua y diluir
 239 a 100 mL con el mismo solvente.

240 *Solución A* - Disolver 70 g de sulfato de sodio
 241 anhidro en 4,5 litros de agua. Agregar 6,5 mL de
 242 ácido fosfórico y ajustar a pH 3,4 con una *Solución*
 243 *de hidróxido de sodio diluido*, si fuera necesario.
 244 Diluir a 5 litros con agua, filtrar y desgasificar.
 245 Mezclar 9 volúmenes de la solución con 1 volumen
 246 de acetonitrilo.

247 *Solución B* - Volúmenes iguales de agua y
 248 Acetonitrilo.

249 *Fase móvil* - Emplear mezclas variables de
 250 *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema*
 251 *cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios (ver
 252 *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

253 [NOTA: conservar las soluciones preparadas a
 254 continuación entre 2 °C y 8 °C y emplear dentro de
 255 las 48 horas de su preparación].

256 *Preparación muestra* - Diluir, si fuera necesario,
 257 la preparación a examinar con Ácido clorhídrico
 258 0,01 M para obtener una solución que contenga 100
 259 unidades de insulina aspártica por mL (equivalente

260 aproximadamente a 3,5 mg por mL de
 261 insulina aspártica). Agregar 4 µL de ácido
 262 clorhídrico 6 M por cada mL la solución
 263 anterior para obtener una solución
 264 transparente.

265 *Preparación estándar* - Disolver el
 266 contenido de un envase de Insulina
 267 Aspártica SR-FA en ácido clorhídrico 0,01
 268 M para obtener una solución de
 269 aproximadamente 4 mg de insulina
 270 aspártica por mL.

271 *Solución de resolución* - Emplear una
 272 solución que contenga no menos del 1 % de
 273 insulina aspártica B3Asp e insulina
 274 aspártica A21Asp. Esto se puede lograr
 275 almacenando la *Preparación estándar A* a
 276 temperatura ambiente por hasta 3 días.
 277 Mantener la solución de 2-8 °C y utilizar
 278 dentro de las 72 horas.

279 *Aptitud del sistema* (ver 100.
 280 *Cromatografía*) - Cromatografiar la
 281 *Preparación estándar* según se indica en
 282 *Procedimiento*: el tiempo de retención del
 283 pico correspondiente a insulina aspártica
 284 debe encontrarse entre 20 y 26 minutos.
 285 Cromatografiar la *Solución de resolución*
 286 según se indica en *Procedimiento*: los
 287 tiempos de retención relativos al pico de
 288 insulina aspártica deben ser
 289 aproximadamente 0,9 para B28isoAsp
 290 insulina aspártica; 1,3 para B3Asp insulina
 291 aspártica más A21 Asp insulina aspártica
 292 (generalmente coeluyen); 1,5 para
 293 B3isoAsp insulina aspártica; la resolución
 294 R entre el pico correspondiente a insulina
 295 aspártica y el pico correspondiente a
 296 insulina aspártica A21Asp e insulina
 297 aspártica B3Asp debe ser mayor o igual a
 298 1,6; el factor de simetría para el pico debido
 299 a insulina aspártica no debe ser mayor a 1,8.

300 *Procedimiento* - Inyectar por separado en
 301 el cromatógrafo volúmenes iguales
 302 (aproximadamente 10 µL) de la
 303 *Preparación muestra* y la *Preparación*
 304 *estándar* y registrar las respuestas de los
 305 picos principales. Calcular la cantidad de
 306 C₂₅₆H₃₈₁N₆₅O₇₉S₆ insulina aspártica
 307 B28isoAsp, insulina aspártica A21Asp,
 308 B3Asp insulina aspártica e insulina
 309 aspártica B3isoAsp (determinada como el
 310 contenido total de insulina aspártica e
 311 insulina aspártica soluble complejada con
 312 protamina sulfato), en la *Solución*
 313 *Inyectable* de Insulina Aspártica, de
 314 acuerdo a la cantidad declarada.

315 *Para Insulina Aspártica soluble*

316 *Sistema cromatográfico* - Emplear un
 317 equipo para cromatografía de exclusión por
 318 tamaño con un detector a una longitud de

ROTULADO

onda de 280 nm y una columna de acero inoxidable de 30 cm × 7,8 mm con fase estacionaria constituida por sílica gel hidrofílico para cromatografía (10 µm). El caudal debe ser aproximadamente 2 mL por minuto. Inyección 50 µL de cada solución. Utilice elución isocrática y la fase móvil descrita debajo. El tiempo de corrida es 2,5 veces el tiempo de retención de insulina aspártica.

Fase móvil – Ácido acético 2,5 M.

[NOTA: mantener la temperatura de soluciones preparadas a continuación entre 2 y 8 °C].

Solución A - Preparar una solución de aproximadamente 60,5 mg de tris(hidroximetil)aminometano por mL, 45 mg de edetato de disodio por mL y 1,80 % (v/v) de ácido clorhídrico 4 M en agua. El pH de la solución final debe ser aproximadamente 8,6.

Preparación muestra A - Transferir el contenido, previamente resuspendido, de Suspensión Inyectable de Insulina Aspártica Bifásica a un tubo de centrífuga. Agregar 50 µL de *Solución A* cada 3 mL de muestra y mezclar durante 5 segundos empleando un vórtex. Tapar el tubo y dejar en reposo a 25 °C durante 1 hora. Centrifugar 10 minutos a 1.500 g manteniendo la temperatura entre 21 °C y 25 °C y retener el líquido sobrenadante. Repetir el proceso comenzando desde el agregado de los 50 µL de *Solución A*, hasta retener el líquido sobrenadante. Agregar 4 µL de ácido clorhídrico 6 M por mL de líquido sobrenadante transparente y mezclar.

Preparación muestra B - Transferir el contenido de un envase de Suspensión Inyectable de Insulina Aspártica Bifásica a un recipiente apropiado, agregar 4 µL de ácido clorhídrico 6 M por cada mL de suspensión y mezclar.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Cromatografiar la *Preparación estándar B* según se indica en *Procedimiento*: la eficiencia de la columna determinada para el pico correspondiente a insulina aspártica debe ser mayor o igual a 1.000 platos teóricos.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Preparación muestra A* y la *Preparación muestra B* y registrar las respuestas de los picos principales durante al menos 2,5 veces el tiempo de retención de insulina aspártica. Calcular el contenido de insulina aspártica soluble empleando la fórmula siguiente:

$$\frac{A_{MA} \times (3.000 + 50)}{A_{MB} \times 3.000} \times 100$$

en la cual A_{MA} es la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Preparación muestra A* y A_{MB} es la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Preparación muestra B*.

376

Indicar en el rótulo la proporción de insulina aspártica soluble en la suspensión se insulina aspártica protamina empleada en la elaboración de Suspensión Inyectable de Insulina Aspártica Bifásica. Indicar en el rótulo la potencia en Unidades por mL.

383