

INSULINA ASPÁRTICA

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Insulina Aspártica es una solución estéril y neutra de *Insulina Aspártica* en *Agua para inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{256}H_{381}N_{65}O_{79}S_6$. La Solución Inyectable de Insulina Aspártica debe cumplir los requisitos para *Inyectables* en 1050. *Formas farmacéuticas* y con las siguientes especificaciones. [NOTA: 100 unidades equivalen a 3,50 mg de insulina aspártica.]

Caracteres generales - Líquido incoloro, libre de turbidez y materia extraña. Durante su almacenamiento pueden depositarse trazas de un sedimento muy fino.

Sustancia de referencia - Insulina Aspártica SR-FA.

CONSERVACIÓN

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

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. 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*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,9 y 7,8.

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*.

Solución muestra - Emplear la *Preparación muestra* de *Valoración*.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 10 µL de la *Solución muestra*. Calcular el porcentaje de cada proteína relacionada con relación al pico principal: 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 %.

Impurezas con peso molecular mayor que la insulina Aspártica

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 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 preparación inyectable de insulina aspártica, tanto si es una solución como una suspensión, 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 - Agregar a la *Solución Inyectable de Insulina Aspártica* 4 µL de ácido clorhídrico 6 M por mL, para obtener una solución límpida.

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

107 sobrecarga de la columna con el monómero de
108 insulina.

109 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*) -
110 Cromatografiar la *Solución de Resolución* y
111 registrar las respuestas de los picos según se indica
112 en *Procedimiento*: los tiempos de retención deben
113 ser aproximadamente entre 13 y 17 minutos para los
114 complejos de insulina aspártica poliméricos; 17,5
115 minutos para los dímeros de insulina; 20 minutos
116 para los monómeros de insulina aspártica y 22
117 minutos para las sales. [NOTA: Si la *Solución de*
118 *resolución* hubiera sido preparada a partir de una
119 solución de insulina que contiene conservantes,
120 como por ejemplo metilparabeno, *m*-cresol o fenol,
121 estos compuestos deben eluir más tarde]. La relación
122 pico/valle *p/v* determinada por la relación entre la
123 altura del pico del dímero *Hp* y la altura del valle de
124 separación entre los picos del monómero y del
125 dímero *Hv* debe ser mayor o igual a 2,0.

126 *Procedimiento* - Inyectar en el cromatógrafo 100
127 µL de la *Solución muestra*, registrar el
128 cromatograma durante al menos 35 minutos y medir
129 las respuestas de los picos. Ignorar cualquier pico
130 con un tiempo de retención mayor que el pico de
131 insulina. La suma de las respuestas de los picos con
132 un tiempo de retención menor que el del pico de
133 insulina no debe ser mayor de 2,0 % (para las
134 preparaciones que no contienen protamina) de la
135 respuesta total de los picos.

136 Cinc total

137 [NOTA: preparar la *Solución madre del estándar*
138 *de Cinc*, las *soluciones estándar* y la *Solución*
139 *muestra* inmediatamente antes de su uso].

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

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

148 *Solución muestra* - Diluir un volumen de
149 *Solución Inyectable de Insulina Aspártica* que
150 contenga aproximadamente 100 unidades de
151 insulina aspártica a 25,0 mL con ácido clorhídrico
152 0,01 M. Diluir la solución obtenida anteriormente
153 con ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una
154 solución que contenga por ejemplo, entre 0,1 y 1,0
155 µg de cinc por mL.

156 *Procedimiento* - Determinar las absorbancias de
157 las *Soluciones estándar* y la *Solución muestra* en la
158 línea de emisión del cinc a 213,9 nm, con un
159 espectrofotómetro de absorción atómica equipado
160 con una lámpara de cinc de cátodo hueco y una llama
161 de acetileno-aire (aproximadamente 2 litros de
162 acetileno y 11 litros de aire por minuto). Graficar las
163 absorbancias de las *Soluciones estándar* en función
164 de la concentración en µg por mL de cinc y
165 determinar la cantidad de cinc en la *Solución*

166 *muestra*: no debe contener más de 40 µg
167 cada 100 unidades de insulina aspártica.

168

169 **Ensayo de endotoxinas bacterianas**
170 <330>

171 Debe contener menos de 80 Unidades
172 de Endotoxina cada 100 unidades de
173 insulina aspártica.

174 **Ensayos de esterilidad** <370>

175 Debe cumplir con los requisitos.

176 VALORACIÓN

177 *Sistema cromatográfico* - Emplear un
178 equipo para cromatografía de líquidos
179 con un detector ultravioleta ajustado a
180 214 nm y una columna de 25 cm × 4,6
181 mm con fase estacionaria constituida por
182 octadecilsilano químicamente unido a
183 partículas porosas de sílice de 5 µm de
184 diámetro. Mantener la temperatura de la
185 columna a 35 °C. El caudal debe ser
186 aproximadamente 1,0 mL por minuto.
187 Programar el cromatógrafo del siguiente
188 modo:

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
46 - 60	58	42	Re-equilibrio

190 *Solución de hidróxido de sodio*
191 *diluido* - Disolver 8,5 g de hidróxido de
192 sodio en agua y diluir a 100 mL con el
193 mismo solvente.

194 *Solución A* - Disolver 70 g de sulfato
195 de sodio anhidro en 4,5 litros de agua.
196 Agregar 6,5 mL de ácido fosfórico y
197 ajustar a pH 3,4 con *Solución de*
198 *hidróxido de sodio diluido*, si fuera
199 necesario. Diluir a 5 litros con agua,
200 filtrar y desgasificar. Mezclar 9
201 volúmenes de la solución con 1 volumen
202 de acetonitrilo para cromatografía.

203 *Solución B* - Agua y acetonitrilo
204 (50:50). Filtrar y desgasificar.

205 *Fase móvil* - Emplear mezclas
206 variables de *Solución A* y *Solución B*
207 según se indica en *Sistema*
208 *cromatográfico*. Hacer los ajustes
209 necesarios (ver *Aptitud del sistema* en
210 100. *Cromatografía*).

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

214 *Preparación estándar* - Disolver el contenido de
215 un vial de insulina aspártica SR-FA en ácido
216 clorhídrico 0,01 M para obtener una solución que
217 contenga 4 mg de insulina aspártica por mL.

218 *Preparación muestra* - Diluir, si fuera necesario,
219 la Solución Inyectable de Insulina Aspártica con
220 ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una solución
221 que contenga 100 unidades de insulina aspártica por
222 mL (equivalente a aproximadamente 0,35% p/v (3,5
223 mg/mL) de insulina Aspártica). Agregar 4 µL de
224 ácido clorhídrico 6 M por mL a esta solución para
225 obtener una solución transparente.

226 *Solución de resolución* - Emplear una solución
227 apropiada que contenga no menos de 1 % de insulina
228 aspártica B3Asp y de insulina aspártica A21Asp.
229 Esto se puede lograr manteniendo *Preparación*
230 *estándar* a temperatura ambiente de uno a tres días.
231 Emplear dentro de las 72 horas.

232 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*) -
233 Cromatografiar la *Preparación estándar* según se
234 indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención del
235 pico correspondiente a insulina aspártica debe
236 encontrarse entre 20 y 26 minutos. Cromatografiar
237 la *Solución de resolución* según se indica en
238 *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos al
239 pico de insulina aspártica deben ser
240 aproximadamente 0,9 para B28isoAsp insulina
241 aspártica; 1,3 para B3Asp insulina aspártica más
242 A21 Asp insulina aspártica (generalmente
243 coeluyen); 1,5 para B3isoAsp insulina aspártica; la
244 resolución *R* entre el pico correspondiente a insulina
245 aspártica y el pico correspondiente a insulina
246 aspártica A21Asp e insulina aspártica B3Asp debe
247 ser mayor o igual a 1,6; el factor de simetría para el
248 pico debido a insulina aspártica no debe ser mayor a
249 1,8.

250 *Procedimiento* - Inyectar por separado en el
251 cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente
252 10 µL) de la *Preparación muestra* y la *Preparación*
253 *estándar* y registrar las respuestas de los picos
254 principales. Calcular la cantidad de
255 C₂₅₆H₃₈₁N₆₅O₇₉S₆ más insulina aspártica B28isoAsp,
256 insulina aspártica A21Asp, B3Asp insulina aspártica
257 e insulina aspártica B3isoAsp, en la Solución
258 Inyectable de Insulina Aspártica, de acuerdo a la
259 cantidad declarada.

260 ROTULADO

261 Indicar en el rótulo la potencia en unidades por de
262 insulina aspártica por mL.