

INSULINA LISPRO**BIFÁSICA****SUSPENSIÓN INYECTABLE****Definición** – La Suspensión Inyectable de

Insulina LisPro Bifásica es una suspensión amortiguada y estéril de *Insulina Lispro* complejada con *Sulfato de Protamina* en una solución de *Insulina Lispro*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ (determinada como el contenido total de insulina lispro soluble e insulina lispro complejada con sulfato de protamina).

Debe contener Insulina Lispro soluble $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$.

Cantidad declarada de Insulina soluble Lispro (%)	Cantidad de Protamina complejada con Insulina Lispro (%)	Especificación (%)
25	75	15 a 30
50	50	40 a 55

La Suspensión Inyectable de Insulina LisPro Bifásica debe cumplir los requisitos para *Inyectables en 1050. Formas farmacéuticas y con las siguientes especificaciones*. [NOTA: 100 unidades equivalen a 3,47 mg de insulina Lispro.]

Caracteres generales – Suspensión blanca o casi blanca que deposita un sedimento blanco o casi blanco y deja un líquido sobrenadante incoloro o casi incoloro; el sedimento se resuspende fácilmente mediante agitación suave. Al examinarlo con un microscopio, las partículas se observan como cristales en forma de bastoncillos, la mayoría con una dimensión superior a 1 μm , pero rara vez superior a 60 μm , libres de agregados grandes.

Sustancia de referencia - Insulina Lispro 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 para Insulina LisPro*, el tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Preparación muestra* se debe corresponder con el de la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,9 y 7,8.

Impurezas con peso molecular mayor al de la insulina Lispro

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 $\times$ 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 8°C y utilizar dentro de los 7 días a partir de su preparación. Si se emplea un inyector automático mantener la temperatura en ese rango].

Solución de resolución - Emplear una solución de insulina Lispro 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 Lispro Bifásica que ha sido aclarada con una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 M, para que contenga el porcentaje indicado de proteínas de alto peso molecular; o se puede utilizar una solución preparada a partir de insulina Lispro disuelta en ácido clorhídrico 0,01 M. También puede obtenerse, dejando reposar insulina en polvo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 días.

Preparación muestra - Agitar a la Suspensión Inyectable de Insulina Lispro Bifásica hasta obtener una suspensión 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

99 ácido clorhídrico 6 M en alícuotas menores a 4
100 µL por mL hasta la solubilización.

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

106 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*)
107 - Antes de emplear una columna nueva,
108 equilibrar la columna mediante al menos tres
109 inyecciones repetidas de *Solución de resolución*.
110 La columna está equilibrada cuando se obtienen
111 resultados repetitivos en dos inyecciones
112 consecutivas. [NOTA: si se analizan muestras
113 que contienen protamina, el equilibrado de la
114 columna se realiza empleando una solución que
115 contenga protamina.]

116 Cromatografiar la *Solución de Resolución* y
117 registrar las respuestas de los picos según se
118 indica en *Procedimiento*: los tiempos de
119 retención deben ser aproximadamente entre 13 y
120 17 minutos para los complejos de insulina
121 poliméricos o complejos covalentes de insulina-
122 protamina; 17,5 minutos para los dímeros de
123 insulina covalentes; 20 minutos para los
124 monómeros de insulina y 22 minutos para las
125 sales. [NOTA: Si la *Solución de resolución*
126 hubiera sido preparada a partir de una solución
127 de insulina que contiene conservantes, como por
128 ejemplo metilparabeno, *m*-cresol o fenol, estos
129 compuestos deben eluir más tarde.]. La relación
130 pico/valle *p/v* determinada por la relación entre
131 la altura del pico del dímero *H_p* y la altura del
132 valle de separación entre los picos del monómero
133 y del dímero *H_v* debe ser mayor o igual a 2,0.

134 *Procedimiento* – Inyectar en el cromatógrafo
135 100 µL de la *Solución muestra*, registrar el
136 cromatograma durante al menos 35 minutos y
137 medir las respuestas de los picos. Ignorar
138 cualquier pico con un tiempo de retención mayor
139 que el del pico debido al monómero de insulina
140 lispro. La suma de las áreas de los picos en el
141 cromatograma obtenido con la *Solución muestra*
142 no debe ser mayor al 1,5 % de la respuesta total
143 de los picos.

144 **Proteínas relacionadas**

145 *Sistema cromatográfico* – Emplear un
146 equipo para cromatografía de líquidos con un
147 detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una
148 columna de 25 cm × 4,6 mm, tamaño de poro de
149 30 nm, con fase estacionaria constituida por
150 octadecilsilano químicamente unido a partículas
151 porosas de sílice de 5 µm de diámetro. Mantener
152 la columna a 40 °C. El caudal debe ser
153 aproximadamente 1,0 mL por minuto.
154 Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0-60	81	19	Isocrático
60-83	81→51	19→49	Gradiente Lineal
83-84	51→81	49→19	Gradiente Lineal
84-94	81	19	Re-equilibrio

155

156 *Solución de sulfato sodio pH 2,3* - Disolver
157 2,84 g de sulfato de sodio anhidro en 100 mL de
158 agua. Ajustar a pH 2,3 con ácido fosfórico.

159 *Solución A - Solución de sulfato sodio pH*
160 2,3 y acetonitrilo (82:18).

161 *Solución B - Solución de sulfato sodio pH*
162 2,3 y acetonitrilo (50:50).

163 *Fase móvil* - Emplear mezclas de la *Solución*
164 *A* y la *Solución B* según se indica en *Sistema*
165 *cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios
166 (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

167 *Solución muestra* - Diluir, si fuera necesario,
168 la *Suspensión Inyectable de Insulina Lispro*
169 *Bifásica* con 0,01 M de ácido clorhídrico para
170 obtener una solución que contenga
171 aproximadamente 3,5 mg de insulina lispro por
172 mL. Agregar 4 µL de ácido clorhídrico 6 M por
173 mL de la solución anterior. [NOTA: Mantener la
174 solución a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.
175 Usar dentro de las 56 horas de su preparación].

176 *Solución de resolución* - Preparar una
177 solución que contenga 3,5 mg de insulina lispro
178 en ácido clorhídrico 0,01 M. Agregar 4 µL de
179 ácido clorhídrico 6 M por cada mL de la solución
180 anterior. Dejar reposar a temperatura ambiente
181 para obtener una solución que contenga entre 0,8
182 % y 11 % de A-21 desamido insulina lispro.

183 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*)
184 -

185 Cromatografiar la *Solución de resolución* y
186 registrar las respuestas de los picos según se
187 indica en *Procedimiento*: ajustar la composición
188 de la fase móvil para que el tiempo de retención
189 de insulina lispro sea aproximadamente 41
190 minutos [NOTA: la desamido insulina lispro
191 A21 eluye cerca del inicio del gradiente de
192 elución]; la resolución *R* entre el pico
193 correspondiente a insulina lispro y el pico
194 correspondiente a desamido insulina lispro A21
195 debe ser mayor o igual de 1,5 entre el primer pico
196 (insulina lispro) y el segundo pico (A21
197 desamido insulina lispro); el factor de asimetría
198 para el pico correspondiente a insulina lispro
199 debe ser menor o igual a 2,0.

200 *Procedimiento* - Inyectar en el cromatógrafo
201 20 µL de la *Solución muestra* y registrar los
202 cromatogramas. Ignorar el pico debido a la

203 protamina y cualquier pico con una respuesta
204 menor o igual a 0,1 %. Calcular el porcentaje de
205 cada proteína relacionada con relación al pico
206 principal: la respuesta del pico correspondiente a
207 desamido insulina lispro A21 no debe ser mayor
208 al 1,5 %; la suma de todas las respuestas de los
209 picos secundarios, a excepción del pico
210 correspondiente a desamido insulina lispro A21,
211 no debe ser mayor a 4,0 %.

212 **Cinc total**

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

216 *Soluciones estándar - Preparar soluciones*
217 *que contengan 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 y 1,6 µg de cinc*
218 *por mL mediante la dilución de la Solución*
219 *madre del estándar de Cinc con ácido clorhídrico*
220 *0,01 M [NOTA: preparar estas soluciones en el*
221 *momento de su uso].*

222 *Solución muestra - Agitar suavemente la*
223 *Suspensión Inyectable de Insulina LisPro*
224 *Bifásica, transferir un volumen que contenga 200*
225 *unidades de insulina lispro en un matraz aforado*
226 *de 25,0 mL y completar a volumen con ácido*
227 *clorhídrico 0,01 M. Si fuera necesario, diluir con*
228 *ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una*
229 *solución que contenga entre 0,4 y 1,6 µg de cinc*
230 *por mL.*

231 *Procedimiento - Determinar las absorbancias*
232 *de las Soluciones estándar y la Solución muestra*
233 *en la línea de emisión del cinc a 213,9 nm, con*
234 *un espectrofotómetro de absorción atómica*
235 *equipado con una lámpara de cinc de cátodo*
236 *hueco y una llama de acetileno-aire*
237 *(aproximadamente 2 litros de acetileno y 11*
238 *litros de aire por minuto). Graficar las*
239 *absorbancias de las Soluciones estándar en*
240 *función de la concentración en µg por mL de cinc*
241 *y determinar la cantidad de cinc en la Solución*
242 *muestra: debe contener entre 14 µg y 35 µg cada*
243 *100 unidades de insulina lispro.*

244 **Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>**

245 Debe contener menos de 80 Unidades de
246 Endotoxina por 100 UI de insulina lispro.

247 **Ensayos de esterilidad <370>**

248 Debe cumplir con los requisitos.

249 **VALORACIÓN**

250 **Para Insulina LisPro**

251 *Sistema cromatográfico - Emplear un equipo*
252 *para cromatografía de líquidos con un detector*
253 *ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de*
254 *10 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida*
255 *por octadecilsilano químicamente unido a*
256 *partículas porosas de sílice de 3 µm de diámetro.*
257 *Mantener la temperatura de la columna a 40°C.*
258 *El caudal debe ser de 0,8 mL por minuto.*

259 *Solución de sulfato sodio pH 2,3 - Disolver*
260 *2,84 g de sulfato de sodio anhidro en 100 mL de*
261 *agua. Ajustar a pH 2,3 con ácido fosfórico.*

262 *Fase móvil - Solución de sulfato sodio pH 2,3*
263 *y acetonitrilo (745:255). Hacer los ajustes*
264 *necesarios (ver Aptitud del sistema en 100.*
265 *Cromatografía).*

266 [NOTA: Mantener las soluciones preparadas
267 a continuación a una temperatura entre 2 °C y 8
268 °C. Usar dentro de las 48 horas de su
269 preparación].

270 *Preparación estándar - Disolver el contenido*
271 *de un vial de Insulina Lispro SR-FA en ácido*
272 *clorhídrico 0,01 M para obtener una solución de*
273 *aproximadamente 0,8 mg de insulina lispro por*
274 *mL.*

275 *Preparación muestra - Diluir la Suspensión*
276 *Inyectable de Insulina LisPro Bifásica, si fuera*
277 *necesario, con ácido clorhídrico 0,01 M para*
278 *obtener una solución que contenga 0,8 mg por*
279 *mL de insulina lispro. Agregar 4 µL de ácido*
280 *clorhídrico 6 M por cada mL de la solución*
281 *anterior.*

282 *Solución de Resolución - Preparar una*
283 *solución al 0,1 % de la Suspensión Inyectable de*
284 *Insulina LisPro Bifásica en ácido clorhídrico*
285 *0,01 M. Agregar 4 µL de ácido clorhídrico 6 M*
286 *por cada mL de la solución anterior. Dejar*
287 *reposar a temperatura ambiente para obtener una*
288 *solución que contenga desamido insulina lispro*
289 *A21.*

290 *Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía)*
291 *- Cromatografiar la Preparación estándar según*
292 *se indica en Procedimiento: el tiempo de*
293 *retención del pico correspondiente a insulina*
294 *lispro debe ser aproximadamente 24 minutos; la*
295 *desviación estándar relativa para tres inyecciones*
296 *repetidas debe ser menor o igual a 1,1 %.*
297 *Cromatografiar la Solución de resolución según*
298 *se indica en Procedimiento: la resolución R el*
299 *pico correspondiente a insulina lispro y el pico*
300 *correspondiente a desamido insulina lispro A21*
301 *debe ser mayor a 1,8.*

302 *Procedimiento - Inyectar por separado en el*
303 *cromatógrafo volúmenes iguales*
304 *(aproximadamente 20 µL) de la Preparación*
305 *muestra y la Preparación estándar y registrar las*
306 *respuestas de los picos principales. Calcular la*
307 *cantidad de C₂₅₇H₃₃₁N₆₅O₇₇S₆ en la Suspensión*
308 *Inyectable de Insulina LisPro Bifásica, de*
309 *acuerdo a la cantidad declarada.*

310 **Para Insulina Lispro soluble**

311 *Sistema cromatográfico, Solución de*
312 *sulfato sodio pH 2,3, Fase móvil, Solución de*
313 *resolución y Aptitud del sistema - Proceder*
314 *según se indica en Valoración para Insulina*
315 *LisPro.*

316 *Solución A - Preparar una solución que*
317 *contenga 0,708 % de clorhidrato de*

318 tris(hidroximetil) aminometilo y 0,668 % de
319 tris(hidroximetil) aminometilo en agua. El pH de
320 la solución final debe encontrarse entre 8,15 y
321 8,35.

322 *Preparación muestra* – Diluir 1 volumen de
323 Suspensión Inyectable de Insulina LisPro
324 Bifásica con 1 volumen de *Solución A* y sumergir
325 en un baño de agua a 25 °C durante 30 minutos.
326 Filtrar la solución con un filtro de baja unión a
327 proteínas de 0,2 µm. Diluir 2 volúmenes del
328 filtrado con 1 volumen de ácido clorhídrico 0,2
329 M y 2 volúmenes de ácido clorhídrico 0,01 M.

330 [NOTA: Mantener las soluciones preparadas
331 a continuación a una temperatura entre 2 °C y 8
332 °C. Usar dentro de las 48 horas de su
333 preparación].

334 *Preparación estándar* - Disolver el contenido
335 de un vial de Insulina Lispro SR-FA en ácido
336 clorhídrico 0,01 M para obtener una solución de
337 aproximadamente 0,8 mg por mL. [NOTA:
338 Mantener esta solución a una temperatura entre 2
339 °C y 8 °C. Usar dentro de las 48 horas de su
340 preparación].

341 *Procedimiento* - Inyectar por separado en el
342 cromatógrafo volúmenes iguales
343 (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación*
344 *muestra* y la *Preparación estándar* y registrar las
345 respuestas de los picos principales. Calcular la
346 cantidad de $C_{257}H_{331}N_{65}O_{77}S_6$ en solución en la
347 Suspensión Inyectable de Insulina LisPro
348 Bifásica, de acuerdo a la cantidad declarada.

349 **ROTULADO**

350 Indicar en el rótulo la proporción de insulina
351 lispro bifásica y la suspensión de insulina lispro
352 protamina empleada en el proceso de fabricación
353 de la Suspensión Inyectable de Insulina LisPro
354 Bifásica y la potencia en unidades por de insulina
355 lispro por mL.