

INSULINA LISPRO

SOLUCIÓN INYECTABLE

Definición - La Solución Inyectable de Insulina Lispro es una solución estéril de *Insulina Lispro* en *Agua para inyectables*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de la cantidad declarada de $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$. La Solución Inyectable de Insulina Lispro 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 – Solución clara e incolora, libre de turbidez y materia extraña.

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*. El tiempo de retención del pico correspondiente a la insulina 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.

Impurezas con peso molecular mayor que 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 × 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 dentro de 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 solución inyectable de insulina Lispro 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.

Solución muestra - Agregar a la Solución Inyectable de Insulina Lispro 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 sobrecarga de la columna con el monómero de insulina.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) -. 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 Lispro poliméricos; 17,5 minutos para los dímeros de insulina; 20 minutos para los monómeros de insulina 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 aproximadamente durante 35 minutos y medir las respuestas de los picos: la suma de las respuestas de todos los picos en el cromatograma obtenido con la *Solución muestra* con un tiempo de retención inferior a la del pico principal, no debe ser mayor al 1,5 % del área total de los picos. Ignorar cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el del pico debido al monómero de insulina lispro.

Proteínas relacionadas

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm, con tamaño de poro de 30 nm, con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. Mantener la columna a 40 °C. El caudal debe ser 1 mL por minuto. 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

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

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

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

Fase móvil - Emplear mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*.

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

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

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: ajustar la composición de la fase móvil para que el tiempo de retención de insulina lispro sea aproximadamente 41 minutos [NOTA: la desamido insulina lispro A21 eluye cerca del inicio del gradiente de elución]; la resolución *R* entre el pico correspondiente a insulina lispro y el pico

correspondiente a desamido insulina lispro A21 debe ser mayor o igual de 1,5 entre el primer pico (insulina lispro) y el segundo pico (A21 desamido insulina lispro); el factor de asimetría para el pico correspondiente a insulina lispro debe ser menor o igual a 2,0.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo 20 µL de la *Solución muestra* y registrar los cromatogramas. Calcular el porcentaje de cada proteína relacionada con relación al pico principal: la respuesta del pico correspondiente a desamido insulina lispro A21 no debe ser mayor al 1,5 %; la suma de todas las respuestas de los picos secundarios, a excepción del pico correspondiente a desamido insulina lispro A21, no debe ser mayor a 4,0 %.

Cinc total

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 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 y 1,6 µg de cinc por mL mediante la dilución de la *Solución madre del estándar* con ácido clorhídrico 0,01 M [NOTA: preparar estas soluciones en el momento de su uso].

Solución muestra - Agitar suavemente la *Solución* Inyectable de Insulina LisPro, transferir un volumen que contenga 200 unidades de insulina lispro en un matraz aforado de 25,0 mL y completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 M. Si fuera necesario, diluir con ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una solución que contenga entre 0,4 y 1,6 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 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 minuto). Graficar las absorbancias de las *Soluciones estándar* en función de la concentración en µg por mL de cinc y determinar la cantidad de cinc en la *Solución muestra*: debe contener entre 14 µg y 35 µg cada 100 unidades de insulina lispro.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 80 Unidades de Endotoxina cada 100 unidades de insulina lispro.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de

217 10 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida
 218 por octadecilsilano químicamente unido a
 219 partículas porosas de sílice de 3 µm de diámetro.
 220 Mantener la temperatura de la columna a 40°C.
 221 El caudal debe ser aproximadamente 0,8 mL por
 222 minuto.

223 *Solución de sulfato sodio pH 2,3* - Disolver
 224 2,84 g de sulfato de sodio anhidro en 100 mL de
 225 agua. Ajustar a pH 2,3 con ácido fosfórico.

226 *Fase móvil - Solución de sulfato sodio pH 2,3*
 227 y acetonitrilo (745:255). Hacer los ajustes
 228 necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100.
 229 *Cromatografía*).

230 [NOTA: Mantener las soluciones preparadas
 231 a continuación a una temperatura entre 2 °C y 8
 232 °C. Usar dentro de las 48 horas de su
 233 preparación].

234 *Preparación estándar* - Disolver el contenido
 235 de un vial de Insulina Lispro SR-FA en ácido
 236 clorhídrico 0,01 M para obtener una solución de
 237 aproximadamente 0,8 mg de insulina lispro por
 238 mL.

239 *Preparación muestra* - Diluir la Solución
 240 Inyectable de Insulina Lispro, si fuera necesario,
 241 con ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una
 242 solución que contenga 0,8 mg por mL de insulina
 243 lispro. Agregar 4 µL de ácido clorhídrico 6 M por
 244 cada mL de la solución anterior.

245 *Solución de Resolución* - Preparar una
 246 solución al 0,1 % de la Solución Inyectable de
 247 Insulina Lispro en ácido clorhídrico 0,01 M.
 248 Agregar 4 µL de ácido clorhídrico 6 M por cada
 249 mL de la solución anterior. Dejar reposar a
 250 temperatura ambiente para obtener una solución
 251 que contenga entre 0,8 % y 11 % de desamido
 252 insulina lispro A21.

253 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*)

254 –
 255 Cromatografiar la *Preparación estándar*
 256 según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de
 257 retención del pico correspondiente a insulina
 258 lispro debe ser aproximadamente 24 minutos; la
 259 desviación estándar relativa para tres inyecciones
 260 repetidas debe ser menor o igual a 1,1 %.
 261 Cromatografiar la *Solución de resolución* según
 262 se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* el
 263 pico correspondiente a insulina lispro y el pico
 264 correspondiente a desamido insulina lispro A21
 265 debe ser mayor a 1,8.

266 *Procedimiento* - Inyectar por separado en el
 267 cromatógrafo volúmenes iguales
 268 (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación*
 269 *muestra* y la *Preparación estándar* y registrar las
 270 respuestas de los picos principales. Calcular la
 271 cantidad de C₂₅₇H₃₃₁N₆₅O₇₇S₆ en la Solución
 272 Inyectable de Insulina Lispro, de acuerdo a la
 273 cantidad declarada.

275 Indicar en el rótulo la potencia en Unidades
 276 de insulina lispro por mL.