|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Инсулин растворимый [человеческий генно-инженерный], раствор для инъекций** |  | **ФС** |
| **Инсулин растворимый [человеческий генно-инженерный], раствор для инъекций** |  |  |
| **Insulini humani solutio pro injectionibus** |  | **Взамен ВФС 42-3181-98** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат инсулин растворимый [человеческий генно-инженерный], раствор для инъекций. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения», ОФС «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Генно-инженерные препараты инсулина человека» и нижеприведённым требованиям.

Содержит не менее 90,0 % и не более 110,0 % от заявленного суммарного количества инсулина человеческого C257H383N65O77S6 и А21-дезамидоинсулина (человеческого).

Содержит от 2,0 до 3,45 мг/мл *м*-крезола.

За 1 международную единицу (МЕ) инсулина принимают биологическую активность 0,0347 мг стандартного образца инсулина человека.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Бесцветная прозрачная жидкость.

**Подлинность**

*1.**ВЭЖХ.* Время удерживания пика инсулина человеческого на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика инсулина человеческого на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) (раздел «Количественное определение»).

*2.**ВЭЖХ.* Время удерживания пика *м*-крезола на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика *м*-крезола на хроматограмме раствора стандартного образца *м*-крезола (раздел «*м*-Крезол»).

**Прозрачность.** Препарат должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность.** Препарат должен быть бесцветным (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**pH.** От 6,9 до 7,8 (ОФС «Ионометрия»).

**Механические включения**

*Видимые*. В соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

*Невидимые*. В соответствии с ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

**Примеси с молекулярной массой, превышающей молекулярную массу инсулина.** Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии в соответствии с ОФС «Эксклюзионная хроматография».

Срок годности растворов 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

*Подвижная фаза (ПФ).* Растворяют 0,65 г L-аргинина в 650 мл воды, прибавляют 150 мл уксусной кислоты ледяной, 200 мл ацетонитрила, перемешивают и фильтруют.

*Растворитель.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,01 М.

*Испытуемый раствор.* К раствору препарата прибавляют хлористоводородной кислоты раствор 6 М из расчёта 4 мкл на 1 мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Стандартный образец инсулина человеческого хранят не менее 10 дней при комнатной температуре. Эта процедура позволяет получить образец, содержащий не менее 0,4 % высокомолекулярных белков. Допускается готовить образец из субстанции инсулина человеческого. Готовят раствор полученного образца, содержащего не менее 0,4 % высокомолекулярных белков, в растворителе с концентрацией инсулина человеческого в растворе около 4,0 мг/мл.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 0,1 мл раствора для проверки пригодности хроматографической системы и доводят объём раствора растворителем.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300 × 8,0 мм, силикагель гидрофильный для хроматографии (1) с размером пор 12 нм, пригодная для разделения белковых соединений с молекулярными массами от 5000 до 150000 Да, 5-10 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 0,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 276 нм; |
| Объём пробы | 100 мкл; |
| Время хроматографирования | 35 мин. |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор для проверки чувствительности хроматографической системы и испытуемый раствор.

Перед использованием новую хроматографическую колонку уравновешивают неоднократным введением раствора инсулина, содержащего высокомолекулярные белки. Для этого должно быть выполнено не менее трех введений раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Колонка считается уравновешенной, если получены повторяемые результаты для двух последовательных введений раствора.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин человеческий – около 20  мин; инсулин-полимерный комплекс – 13-17 мин; ковалентно связанный инсулин-димер – около 17,5 мин.

После пика инсулина человеческого могут наблюдаться пики солей.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *отношение максимум/минимум (p/v)* между пиками ковалентно связанного инсулина-димера и инсулина человеческого должно быть не менее 2,0;

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина человеческого должен быть от 0,6 до 1,2.

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика инсулина человеческого должно быть не менее 10.

Содержание высокомолекулярных белков в препарате в процентах вычисляют согласно методу нормирования.

*Допустимое содержание примесей:*

– сумма высокомолекулярных белков не более 2,0 %.

Не учитывают пики со временем удерживания, превышающим время удерживания пика инсулина человеческого.

**А21-Дезамидоинсулин (человеческий)** **и другие родственные примеси.**

Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Количественное определение» со следующими изменениями.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 0,1 мл раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА | ПФБ |
| 0-30 | 42 | 58 |
| 30-44 | 42 → 11 | 58 → 89 |
| 44-50 | 11 | 89 |

Хроматографируют раствор для идентификации пиков, раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор стандартного образца инсулина человеческого (А), раствор стандартного образца инсулина человеческого (Б) и испытуемый раствор.

При необходимости вносят изменения ПФ, чтобы обеспечить элюирование антимикробных консервантов, присутствующих в испытуемом растворе, отделено от инсулина человеческого. Небольшое снижение концентрации ацетонитрила увеличивает время удержания пика инсулина человеческого относительно пиков консервантов.

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина человеческого было в интервале 17-23 минут.

*Относительное время удерживания соединений.* Инсулин человеческий – 1; А21-дезамидоинсулин (человеческий) – около 1,3.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для идентификации пиков *разрешение (RS)* между пиками инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) должно быть не менее 2,0.

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика инсулина человеческого должно быть не менее 10.

На хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) площадь пика инсулина человеческого должна быть в 10±0,5 раз больше, чем площадь пика инсулина человеческого на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (Б).

Содержание А21-дезамидоинсулина (человеческого) и любой другой примеси в препарате в процентах вычисляют согласно методу нормирования.

*Допустимое содержание примесей:*

– А21-дезамидоинсулин (человеческий) не более 5,0 %;

– сумма других примесей не более 6,0 %.

Не учитывают пики консервантов.

**Извлекаемый объем.** Не менее номинального (ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения»).

**Цинк.** Не более 40 мкг на 100 МЕ инсулина (ОФС «Определение цинка в препаратах инсулина»).

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 80 ЕЭ на 100 МЕ инсулина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

**Стерильность.** Препарат должен быть стерильным (ОФС «Стерильность»).

**Биологическая активность.** Не менее 90,0 % и не более 110,0 % от заявленной активности. Определение проводят по гипогликемическому действию препарата в сравнении со стандартным образцом инсулина человеческого с указанной величиной биологической активности, в соответствии с ОФС «Биологические испытания инсулина».

***м-*Крезол.** Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Количественное определение» со следующими изменениями.

*Раствор стандартного образца м-крезола*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают около 30 мг (точная навеска) стандартного образца *м-*крезола, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Детектор | спектрофотометрический, 254 нм. |

Хроматографируют раствор стандартного образца *м-*крезола и испытуемый раствор.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин человеческий – 17-25 мин; *м*-крезол – около 12 мин.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца *м-*крезола:

- *фактор асимметрии* *пика* (*AS*) *м-*крезола должен быть не более 1,5;

- *относительное стандартное отклонение* площади пика *м-*крезола должно быть не более 2,5 % (6 определений).

Содержание *м-*крезола в мг/мл (Х) в препарате вычисляют по формуле:

;

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика *м-*крезола на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика *м-*крезола на хроматограмме раствора стандартного образца *м-*крезола; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца *м-*крезола, мг; |
|  | *P* | − | содержание *м-*крезола в стандартном образце *м-*крезола, %. |

**Количественное определение.** Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Все растворы хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 24 ч.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Растворяют28,4 г натрия сульфата безводного в воде, прибавляют 2,7 мл фосфорной кислоты концентрированной, при необходимости доводят значение рН раствора до 2,30±0,05 этаноламином или триэтиламином, полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил—ПФА 450:550. Нагревают до 20 °С, фильтруют и дегазируют.

*Подвижная фаза (ПФ).* ПФА—ПФБ 420:580.

*Растворитель.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,01 М.

*Испытуемый раствор.* К раствору препарата прибавляют хлористоводородной кислоты раствор 6 М из расчёта 4 мкл на 1 мл.

*Раствор стандартного образца инсулина человеческого (А).* Готовят раствор стандартного образца инсулина человеческого в растворителе с концентрацией инсулина человеческого в растворе около 4,0 мг/мл.

*Раствор стандартного образца инсулина человеческого (Б).* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Стандартный раствор.* Готовят раствор стандартного образца инсулина свиного для проверки пригодности хроматографической системы в растворителе с концентрацией инсулина свиного в растворе 4,0 мг/мл.

*Раствор для проверки разделительной способности*  *хроматографической системы.* Смешивают 1,0 мл раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) и 1,0 мл раствора стандартного образца инсулина свиного.

*Раствор для идентификации пиков.* Готовят раствор стандартного образца инсулина человеческого в растворителе с концентрацией инсулина человеческого в растворе около 4,0 мг/мл. Полученный раствор термостатируют при температуре 37 °С в течение 1 ч. При этом А21-дезамидоинсулина (человеческого) накапливается в количестве не менее 0,5 %. Допускается готовить раствор из субстанции инсулина человеческого.

Примечание.

A21-Дезамидоинсулин (человеческий): [A21‑аспарагиновая кислота]инсулин (человеческий).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл. |

Хроматографируют раствор для идентификации пиков, стандартный раствор, раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца инсулина человеческого (А), раствор стандартного образца инсулина человеческого (Б) и испытуемый раствор.

При необходимости вносят изменения в ПФ, чтобы обеспечить элюирование консервантов, присутствующих в испытуемом растворе, отделено от инсулина человеческого. Небольшое снижение концентрации ацетонитрила увеличивает время удержания пика инсулина относительно пиков консервантов.

При необходимости, после проведения испытания колонку промывают смесью ацетонитрил—вода 1:1, чтобы обеспечить элюирование любых посторонних веществ.

*Относительное время удерживания соединений.* Инсулин человеческий – 1; А21-дезамидоинсулин (человеческий) – около 1,3.

*Идентификация пиков.* Хроматограмма стандартного раствора используется для идентификации пика свиного инсулина. Относительное время удерживания и хроматограмма раствора для идентификации пиков используется для идентификации пика А21-дезамидоинсулина (человеческого).

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками инсулина свиного и инсулина человеческого должно быть не менее 1,2.

На хроматограмме раствора для идентификации пиков *разрешение (RS)* между пиками инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) должно быть не менее 2,0.

На хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (А):

– *относительное стандартное отклонение* суммы площадей пиков инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) должно составлять не более чем 2,0 % (6 определений);

– площадь пика инсулина человеческого должна быть в 10±0,5 раз больше, чем площадь пика инсулина человеческого на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (Б).

Суммарное содержание инсулина человеческого C257H383N65O77S6 и А21-дезамидоинсулина (человеческого) в препаратев МЕ/мл (*А*) вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | сумма площадей пиков инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | – | сумма площадей пиков инсулина человеческого и А21- дезамидоинсулина (человеческого) на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (А); |
|  | *V0* | – | объём растворителя, взятый для приготовления раствора стандартного образца инсулина человеческого (А), мл; |
|  | *a0* | – | навеска стандартного образца инсулина человеческого, мг; |
|  | 0,0347 | – | количество инсулина человеческого, эквивалентное активности стандартного образца инсулина человека, мг/МЕ.  |

Суммарное содержание инсулина человеческого C257H383N65O77S6 и А21-дезамидоинсулина (человеческого) в препарате в процентах (*Х*) от заявленного количества вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *A* | – | найденное суммарное содержание инсулина человеческогои А21-дезамидоинсулина (человеческого), МЕ/мл; |
|  | *L* | – | заявленное суммарное количество инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого), МЕ/мл. |

**Хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Не замораживать. Находящийся в употреблении препарат хранят при температуре не выше 25 °С в темном месте не более 28 дней.