|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Инсулин двухфазный [человеческий генно-инженерный], суспензия для подкожного введения** |  | **ФС** |
| **Инсулин двухфазный [человеческий генно-инженерный], суспензия для подкожного введения** |  |  |
| **Insulini biphasic suspensio pro injection subcutanea** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат инсулин двухфазный [человеческий генно-инженерный], суспензия для подкожного введения. Представляет собой стерильную суспензию кристаллов, состоящих из инсулина человека, протамина и ионов цинка в забуференной воде для инъекций, с добавлением глицерина.

Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Суспензии», 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 A21-дезамидоинсулина (человеческого).

Содержит от 1,2 до 1,92 мг/мл *м*-крезола.

Содержит от 0,48 до 0,78 мг/мл фенола.

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

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Суспензия белого цвета. При стоянии суспензия расслаивается на прозрачную бесцветную или почти бесцветную надосадочную жидкость и белый или почти белый осадок, легко ресуспендируемый при встряхивании.

**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 стандартного раствора (раздел «*м*-Крезол и фенол»).

*3.**ВЭЖХ.* Время удерживания пика фенола на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика фенола на хроматограмме стандартного раствора (раздел «*м*-Крезол и фенол»).

**рН.** От 6,9 до 7,8 (ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Размер и форма кристаллов.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии». В поле зрения должны наблюдаться палочкообразные кристаллы с размером частиц более 1 мкм, но редко превышающим 60 мкм, свободные от крупных агрегатов. Не менее 90 % от общего числа кристаллов в поле зрения должны составлять кристаллы с размером от 1 до 20 мкм.

**Седиментационная устойчивость.** Не менее 2 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Суспензии».

**Механические включения.** К содержимому флаконов или картриджей прибавляют хлористоводородной кислоты раствор 6 М из расчёта 4 мкл на 1 мл препарата.

*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 содержимому флаконов или картриджей прибавляют хлористоводородной кислоты раствор 6 М из расчёта 4 мкл на 1 мл препарата.

*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 трехкратным введением раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Колонка считается уравновешенной, если получены воспроизводимые 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. Общий пик фенола и *м*-крезола и пики неорганических солей – после пика инсулина человеческого.

*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 не более 2,0.

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 3,0 %.

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 в ПФ, чтобы обеспечить элюирование антимикробных консервантов, присутствующих в испытуемом растворе, отдельно 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 и пики менее 0,05 %.

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

**Общий цинк.** От 20 до 40 мкг на 100 МЕ инсулина (ОФС «Определение цинка в препаратах инсулина»).

**Цинк в надосадочной жидкости.** Не более 7,5 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 в соответствии с ОФС «Биологические испытания инсулина».

**Пролонгированное действие.** За контрольную временную точку принимают момент времени, в котором через 4,5-6 часов после инъекции средняя концентрация глюкозы в крови животных получивших основной раствор СО приблизится к 100± 15% от исходного уровня. Препарат считают прошедшим испытания, если в контрольной временной точке у животных, получивших испытуемый препарат, средняя относительная концентрация глюкозы в крови, рассчитанная из индивидуальных концентраций, достоверно ниже, чем у животных, получивших основной раствор стандартного образца инсулина человеческого. Достоверность различия проверяют с помощью критерия Стьюдента при доверительной вероятности Р=0,95. Препарат должен выдерживать требования ОФС «Биологические испытания инсулина».

**Инсулин в надосадочной жидкости.** Не менее 25 % и не более 35 % от общего содержания инсулина в препарате. Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Количественное определение» со следующими изменениями.

*Испытуемый раствор А.* Препарат термостатируют при температуре 25 °С не менее 15 мин и ресуспендируют при встряхивании. В пробирку для центрифугирования переносят 5,0 мл суспензии, прибавляют 20 мкл 1 М раствора натрия гидроксида, доводят значение рН раствора (потенциометрически, с постоянным термостатированием пробы) до 8,20±0,02 (если содержание цинка общего около 20 мкг на 100 МЕ инсулина) или до 8,35±0,02 (если содержание цинка общего около 30 мкг на 100 МЕ инсулина) 0,05 М раствором хлористоводородной кислоты или 0,05 М раствором натрия гидроксида, оставляют на 1 ч и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отбирают 3,0 мл надосадочной жидкости, прибавляют 12 мкл хлористоводородной кислоты раствора 6 М и перемешивают. Срок годности раствора 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

*Испытуемый раствор Б.* К 3,0 мл препарата прибавляют 12 мкл хлористоводородной кислоты раствор 6 М и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 3,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

Хроматографируют испытуемый раствор А и испытуемый раствор Б.

Суммарное содержание инсулина человеческого C257H383N65O77S6 и А21-дезамидоинсулина (человеческого) в надосадочной жидкости в процентах от общего суммарного содержания инсулина человеческого C257H383N65O77S6 и А21-дезамидоинсулина (человеческого) в препарате (*X*) вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | сумма площадей пиков инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) на хроматограмме испытуемого раствора А; |
|  | *S0* | – | сумма площадей пиков инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) на хроматограмме испытуемого раствора Б; |
|  | *V1* | – | суммарный объём препарата (5,0 мл), 1 М раствора натрия гидроксида (0,02 мл) и 0,05 М раствора хлористоводородной кислоты или 0,05 М раствором натрия гидроксида, затраченные для доведения до необходимого значения рН, мл. |

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

*Стандартный раствор*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 30 мг (точная навеска) стандартного образца фенола и около 80 мг (точная навеска) стандартного образца *м-*крезола, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Хроматографические условия*

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

Хроматографируют стандартный и испытуемый растворы.

*Времена удерживания соединений.* Фенол – около 8 мин; *м*-крезол – около 12 мин, инсулин человеческий – 17-25 мин.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартного раствора:

– *разрешение (RS)* между пиками фенола и *м*-крезола должно быть не менее 2,0;

– *фактор асимметрии пиков* (*AS*) фенола и *м-*крезола должен быть не более 1,5;

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

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

;

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика фенола (*м-*крезола) на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика фенола (*м-*крезола) на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца фенола (*м-*крезола), мг; |
|  | *P* | − | содержание фенола (*м-*крезола) в стандартном образце фенола (*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).* Растворяют 28,4 г натрия сульфата безводного в воде, прибавляют 2,7 мл фосфорной кислоты концентрированной, при необходимости доводят значение рН раствора до 2,30±0,05этаноламином 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. Повышают температуру раствора до 20 °С, фильтруют и дегазируют.

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

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

*Испытуемый раствор.* К содержимому флаконов или картриджей прибавляют хлористоводородной кислоты раствор 6 М из расчёта 4 мкл на 1 мл препарата.

*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; |
| Время хроматографирования | 35 мин. |

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.

*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. Находящийся в употреблении препарат хранят при температуре не выше 25 ° в защищенном от света месте не более 28 дней.