|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Инсулин лизпро, раствор для внутривенного и подкожного введения** |  | **ФС** |
| **Инсулин лизпро, раствор для внутривенного и подкожного введения** |  |  |
| **Insulini lispri solutio pro injectione intravenosa et subcutanea** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат инсулин лизпро, раствор для внутривенного и подкожного введения. 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 количества инсулина лизпро C257H383N65O77S6.

Содержит от 2,84 до 3,47 мг/мл *м*-крезола.

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

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Бесцветная прозрачная жидкость.

**Подлинность**

*1.**ВЭЖХ.* Время удерживания пика инсулина лизпро на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика инсулина лизпро на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина лизпро (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 7,0 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 48 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 лизпро 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 лизпро. Готовят раствор полученного образца, содержащего не менее 0,4 % высокомолекулярных белков, в растворителе с концентрацией инсулина лизпро 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 лизпро – около 20  мин; полимеры инсулина лизпро – 13-17 мин; димер инсулина лизпро – около 17,5 мин; *м*-крезол – около 25 мин; пики неорганических солей – после пика инсулина лизпро.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

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

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина лизпро должен быть не более 2,0.

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

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

*Допустимое содержание примесей:*

– сумма высокомолекулярных белков не более 1,5 %.

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

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Буферный раствор.* Растворяют 28,4 г натрия сульфата безводного в 900 мл воды, доводят pH полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,30±0,05, переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза A (ПФА).* Ацетонитрил—буферный раствор 180:820.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил—буферный раствор 500:500.

*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.* Готовят раствор стандартного образца инсулина лизпро в растворителе с концентрацией инсулина лизпро в растворе около 3,5 мг/мл. Полученный раствор выдерживают при комнатной температуре не менее часа. Эта процедура позволяет получить раствор с содержанием А21-дезамидоинсулина лизпро от 0,8 % до 11 %. Допускается готовить раствор из субстанции инсулина лизпро.

*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.

Примечание.

А21-дезамидоинсулин лизпро: [21A‑аспарагиновая кислота]инсулин лизпро.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18) с размером пор не менее 20 нм, 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА | ПФБ |
| 0-60 | 81 | 19 |
| 60-83 | 81 → 51 | 19 → 49 |
| 83-84 | 51 → 81 | 49 → 19 |
| 84-94 | 81 | 19 |

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

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина лизпро было около 41 мин.

*Относительное время удерживания соединений.* Инсулин аспарт – 1 (около 41 мин); А21-дезамидоинсулин лизпро – около 1,3.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *разрешение (RS)* между пиками инсулина лизпро и А21-дезамидоинсулина лизпро должно быть не менее 1,5;

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина лизпро должен быть не более 2,0.

Содержание любой примеси в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования.

*Допустимое содержание примесей:*

– А21-дезамидоинсулин лизпро не более 1,5 %;

– сумма любых других примесей не более 4,0 %.

Не учитывают пики менее 0,05 %.

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

**Цинк.** От 14 до 35 мкг на 100 МЕ инсулина лизпро (ОФС «Определение цинка в препаратах инсулина»).

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 80 ЕЭ на 100 МЕ инсулина лизпро (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 лизпро в соответствии с ОФС «Биологические испытания инсулина.

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

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл препарата, прибавляют хлористоводородной кислоты раствор 6 М из расчёта 4 мкл на 1 мл препарата и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца м-крезола*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 60 мг (точная навеска) стандартного образца *м-*крезола, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

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

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

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) *м-*крезола должен быть не более 1,8;

– *относительное стандартное отклонение* площади пика *м-*крезола должно быть не более 2,0 % (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; |
|  | *V*1 | − | объём препарата, взятый для приготовления испытуемого раствора, мл; |
|  | *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 48 ч.

*Буферный раствор.* Растворяют 28,4 г натрия сульфата безводного в 900 мл воды, доводят pH полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,30±0,05, переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ).* Ацетонитрил—буферный раствор 255:745.

*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. Полученный раствор разбавляют растворителем до получения раствора с концентрацией инсулина лизпро около 20 МЕ/мл.

*Раствор стандартного образца инсулина лизпро.* Готовят раствор стандартного образца инсулина лизпро в растворителе с концентрацией инсулина лизпро около 0,7 мг/мл.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* Готовят раствор стандартного образца инсулина лизпро в растворителе с концентрацией инсулина лизпро в растворе около 1,0 мг/мл. Полученный раствор выдерживают при комнатной температуре не менее часа. Эта процедура позволяет получить раствор с содержанием А21-дезамидоинсулина лизпро от 0,8 % до 11 %. Допускается готовить раствор из субстанции инсулина лизпро.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 100 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18) с размером пор 8 нм, 3 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 0,8 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 35 мин. |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца инсулина лизпро и испытуемый раствор.

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина лизпро было около 24 мин.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин лизпро – около 24 мин.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками инсулина лизпро и А21-дезамидоинсулина лизпро должно быть не менее 1,8.

На хроматограмме раствора стандартного образца инсулина лизпро:

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина лизпро должен быть не более 1,8;

– *относительное стандартное отклонение* площади пика инсулина лизпро должно быть не более 2,0 % (6 определений).

Содержание инсулина лизпро C257H383N65O77S6 в препаратев МЕ/мл (*А*) вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | площадь пика инсулина лизпро на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | – | площадь пика инсулина лизпро на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина лизпро; |
|  | *a0* | – | навеска стандартного образца инсулина лизпро, мг; |
|  | *V0* | – | объём растворителя, взятый для приготовления раствора стандартного образца инсулина лизпро, мл; |
|  | 0,0347 | – | количество инсулина лизпро, эквивалентное активности стандартного образца инсулина лизпро, мг/МЕ. |

Содержание инсулина лизпро C257H383N65O77S6 в препарате в процентах (*Х*) от заявленного количества вычисляют по формуле:



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | – | найденное содержание инсулина лизпро, МЕ/мл; |
|  | *L* | – | заявленное количество инсулина лизпро, МЕ/мл. |

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