**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

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

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат инсулин аспарт, 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 95,0 % и не более 105,0 % от заявленного суммарного количества инсулина аспарта C256H381N65O79S6, A21-дезамидоинсулина аспарта, B3-дезамидоинсулина аспарта, B28-β-инсулина аспарта и B3-β-инсулина аспарта.

Содержит от 1,55 до 1,89 мг/мл *м*-крезола.

Содержит от 1,35 до 1,65 мг/мл фенола.

За 1 единицу действия (ЕД) инсулина аспарта принимают биологическую активность 0,0350 мг инсулина аспарта.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Бесцветная прозрачная жидкость.

**Подлинность**

*1.**ВЭЖХ.* Время удерживания пика инсулина аспарта на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика инсулина аспарта на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина аспарта (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»).

**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 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 аспарта 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 аспарта. Готовят раствор полученного образца, содержащего не менее 0,4 % высокомолекулярных белков, в растворителе с концентрацией инсулина аспарта 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 аспарт – около 20  мин; полимеры инсулина аспарта – 13-17 мин; димер инсулина аспарта – около 17,5 мин. Общий пик фенола и *м*-крезола и пики неорганических солей – после пика инсулина аспарта.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

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

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

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика инсулина аспарта 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 аспарта.

**Родственные соединения и примеси.** 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.

*Буферный раствор.* Растворяют 28,4 г натрия сульфата безводного в 900 мл воды, прибавляют 2,7 мл фосфорной кислоты концентрированной, доводят pH полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 3,60±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 100:900.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Вода—ацетонитрил 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 стандартного образца инсулина аспарта (А).* Готовят раствор стандартного образца инсулина аспарта в растворителе с концентрацией инсулина аспарта около 4,0 мг/мл.

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

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

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

*Раствор для идентификации пиков.* Раствор стандартного образца инсулина аспарта (А) выдерживают при комнатной температуре в течение 1-3 дней. Эта процедура позволяет получить раствор с суммарным содержанием A21-дезамидоинсулина аспарта и B3-дезамидоинсулина аспарта не менее 1,0 %.

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

Примечание.

A21-Дезамидоинсулин аспарт: [A21-аспарагиновая кислота,B28-аспарагиновая кислота]инсулин (человеческий);

B3-Дезамидоинсулин аспарт: [B3-аспарагиновая кислота,B28-аспарагиновая кислота]инсулин (человеческий);

B28-β-Инсулин аспарт: [B28-β-аспарагиновая кислота]инсулин (человеческий);

B3-β-инсулин аспарт: [B3-β-Аспарагиновая кислота]инсулин (человеческий).

*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 | 10 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА | ПФБ |
| 0-35 | 58 | 42 |
| 35-40 | 58 → 20 | 42 → 80 |
| 40-45 | 20 | 80 |
| 45-46 | 20 → 58 | 80 → 42 |
| 46-60 | 58 | 42 |

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

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина аспарта было в интервале 20-25 мин.

*Относительное время удерживания соединений.* Инсулин аспарт – 1 (около 20 мин); B28-β-инсулин аспарт – около 0,9; A21-дезамидоинсулин аспарт и B3-дезамидоинсулин аспарт (суммарно) – 1,3; B3-дезамидоинсулин аспарт – 1,5.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками инсулина аспарта и инсулина человеческого должно быть не менее 2,0.

На хроматограмме раствора для идентификации пиков *разрешение (RS)* между пиком инсулина аспарта и суммарным пиком A21-дезамидоинсулина аспарта и B3-дезамидоинсулина аспарта должно быть не менее 2,0.

На хроматограмме раствора стандартного образца инсулина аспарта (А):

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина аспарта должен быть не более 1,5;

– *относительное стандартное отклонение* суммы площадей пиков инсулина аспарта, A21-дезамидоинсулина аспарта и B3-дезамидоинсулина аспарта должно быть не более 2,5 % (6 определений).

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

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

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

*Допустимое содержание примесей:*

– B28-β-инсулин аспарт не более 2,5 %;

– сумма B3-β-инсулина аспарта, A21-дезамидоинсулина аспарта и B3-дезамидоинсулина аспарта – не более 5,0 %;

– сумма других примесей не более 3,5 %.

Не учитывают пики менее 0,05 %.

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

**Цинк.** От 10 до 40 мкг на 100 МЕ инсулина (ОФС «Определение цинка в препаратах инсулина»).

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 80 ЕЭ на 100 ЕД инсулина аспарта (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 аспарта в соответствии с ОФС «Биологические испытания инсулина».

***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 75 мг (точная навеска) стандартного образца фенола и около 85 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 аспарт – около 20 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 условиях испытания «Родственные примеси» со следующими изменениями.

Хроматографируют раствор стандартного образца инсулина аспарта (А) и испытуемый раствор.

Суммарное содержание инсулина аспарта C256H381N65O79S6, B3-β-инсулина аспарта, B28-β-инсулина аспарта, A21-дезамидоинсулин аспарта и B3-дезамидоинсулин аспарта в препаратев ЕД/мл (*А*) вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | суммарная площадь пиков инсулина аспарта, B3-β-инсулина аспарта, B28-β-инсулина аспарта, A21-дезамидоинсулин аспарта и B3-дезамидоинсулин аспарта на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | – | суммарная площадь пиков инсулина аспарта, B3-β-инсулина аспарта, B28-β-инсулина аспарта, A21-дезамидоинсулин аспарта и B3-дезамидоинсулин аспарта на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина аспарта (А); |
|  | *a0* | – | навеска стандартного образца инсулина аспарта, мг; |
|  | *V0* | – | объём растворителя, взятый для приготовления раствора стандартного образца инсулина аспарта (А), мл; |
|  | 0,0350 | – | количество инсулина аспарта, эквивалентное активности стандартного образца инсулина аспарта, мг/МЕ. |

Суммарное содержание инсулина аспарта C256H381N65O79S6, B3-β-инсулина аспарта, B28-β-инсулина аспарта, A21-дезамидоинсулина аспарта и B3-дезамидоинсулина аспарта в препарате в процентах (*Х*) от заявленного количества вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *A* | – | найденное суммарное содержание инсулина аспарта, B3-β-инсулина аспарта, B28-β-инсулина аспарта, A21-дезамидоинсулина аспарта и B3-дезамидоинсулина аспарта, ЕД/мл; |
|  | *L* | – | заявленное суммарное количество инсулина аспарта, B3-β-инсулина аспарта, B28-β-инсулина аспарта, A21-дезамидоинсулина аспарта и B3-дезамидоинсулина аспарта, ЕД/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.