**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Инсулин гларгин, раствор для подкожного введения** |  | **ФС** |
| **Инсулин гларгин, раствор для подкожного введения** |  |  |
| **Insulini glargini solutio pro injectione subcutanea** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат инсулин гларгин, раствор для 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 гларгина C267H404N72O78S6.

Содержит от 2,4 до 3,0 мг/мл *м*-крезола.

За 1 единицу действия (ЕД) инсулина гларгина принимают биологическую активность 0,0364 мг инсулина гларгина.

**Описание.** Бесцветная прозрачная жидкость.

**Подлинность**

*1.**ВЭЖХ.* Время удерживания пика инсулина гларгина на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика инсулина гларгина на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина гларгина (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 или выдерживать сравнение с эталоном Y7 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**pH.** От 3,5 до 4,5 (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».

*Подвижная фаза (ПФ).* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают уксусной кислоты ледяной 200 мл, прибавляют 300 мл ацетонитрила, 400 мл воды, доводят pH полученного раствора аммиака раствором концентрированным до 3,00±0,05 и доводят объём раствора водой до метки.

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

*Испытуемый раствор.* Препарат разводят растворителем до получения раствора с концентрацией инсулина гларгина около 40 ЕД/мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Стандартный образец инсулина гларгина выдерживают при 100 °С в течение 1,5-3,0 ч. Эта процедура позволяет получить образец, содержащий не менее 0,4 % высокомолекулярных белков. Готовят раствор полученного образца, содержащего не менее 0,4 % высокомолекулярных белков, в растворителе с концентрацией инсулина человеческого в растворе около 1,5 мг/мл.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300 × 8,0 мм, силикагель модифицированный дигидроксипропильными группами, с размером пор 15 нм, пригодные для разделения белковых соединений с молекулярными массами от 2000 до 800000, 5 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.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин гларгин – около 17  мин. Пики высокомолекулярных белков наблюдаются до пика инсулина гларгина.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

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

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина гларгина должен быть не менее 0,6 и не более 2,0;

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

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

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

*Допустимое содержание примесей:*

– сумма высокомолекулярных белков не более 0,5 %.

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

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

*Буферный раствор.* Растворяют 28,4 г натрия сульфата в 1000 мл воды и доводят pH полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,30±0,04.

*Подвижная фаза A (ПФА).* Буферный раствор—ацетонитрил 820:180.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Буферный раствор—ацетонитрил 500:500. Растворы смешивают медленно, предотвращая выпадение осадка.

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

*Испытуемый раствор.* При необходимости препарат разводят растворителем до получения раствора с содержанием инсулина гларгина около 100 ЕД/мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Содержимое флакона стандартного образца инсулина гларгина для идентификации пиков, содержащий 0A-Arg-инсулина гларгина, растворяют в 1,0 мл растворителя.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* Готовят раствор стандартного образца инсулина гларгина в растворителе с концентрацией инсулина гларгина около 0,036 мг/мл.

Примечание.

0A-Arg-инсулин гларгина: *N*A1-аргинил-[A21-глицин]инсулин-B30-ил-L-аргинил-L-аргинин (человеческий).

B-цепь[Asu3]: B-цепь[аспартилсукцинимид3].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 3 мкм, с размером пор 30 нм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Температура образца | 2-8 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время регистрации хроматограммы | 84 мин. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА | ПФБ |
| 0-60 | 80 | 20 |
| 60-83 | 80 → 50 | 20 → 50 |
| 83-84 | 50→ 0 | 50→ 100 |
| 84-94 | 0 | 100 |
| 94,0-94,1 | 0→ 80 | 100→ 20 |
| 94,1-104 | 80 | 20 |

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

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ в начальных условиях градиентного элюирования таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина гларгина было в интервале 36,7- 45,0 мин.

*Относительное время удерживания соединений.* Инсулин гларгин – 1 (около 44  мин); B-цепь[Asu3] – около 0,92; 0A-Arg-инсулин гларгина – около 1,3.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *разрешение* (*RS*) между пиками инсулина гларгина и 0A-Arg-инсулина гларгина должно быть не менее 5,0.

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

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

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

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

Интегрирование площади пика любой примеси, пик которой не полностью разделяется, проводят путём проведения перпендикуляра из точки минимума между двумя неразделёнными пиками к основанию базовой линии.

*Допустимое содержание примесей:*

– B-цепь[Asu3] – не более 0,7 %;

– любая другая примесь – не более 0,5 %;

– сумма примесей – не более 2,7 %.

Не учитывают пики консервантов и пики менее 0,1 %.

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

**Цинк.** От 20 до 40 мкг на 100 ЕД инсулина гларгина (ОФС «Определение цинка в препаратах инсулина»).

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 80 ЕЭ на 100 ЕД инсулина гларгина (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 гларгина 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, в той же концентрации, что и испытуемый препарат. Достоверность различия проверяют с помощью критерия Стьюдента при доверительной вероятности Р=0,95. Препарат должен выдерживать требования ОФС «Биологические испытания инсулина».

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

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 5,0 мл препарата и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца м-крезола*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 16 мг (точная навеска) стандартного образца *м-*крезола, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Детектор | спектрофотометрический, 270 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 23 мин. |

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

*Времена удерживания соединений.* Инсулин гларгин – около 14 мин; *м*-крезол – около 6,5 мин.

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

– *фактор асимметрии* *пика* (*AS*) *м-*крезола должен быть не более 1,6;

– *относительное стандартное отклонение* площади пика *м-*крезола должно быть не более 2,0 % (6 определений);

– *относительное стандартное отклонение* времени удерживания 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; |
|  | *V* | – | объём препарата, взятый для приготовления испытуемого раствора, мл; |
|  | *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».

*Буферный раствор.* Растворяют 28,4 г натрия сульфата в 1000 мл воды и доводят pH полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,30±0,04.

*Подвижная фаза (ПФ).* Буферный раствор—ацетонитрил 750:250.

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

*Испытуемый раствор.* При необходимости препарат разводят растворителем до получения раствора с содержанием инсулина гларгина около 100 ЕД/мл.

*Раствор стандартного образца инсулина гларгина.* Готовят раствор стандартного образца инсулина гларгина в растворителе с концентрацией инсулина гларгина около 3,6 мг/мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Содержимое флакона стандартного образца инсулина гларгина для идентификации пиков, содержащий 0A-Arg-инсулина гларгина, растворяют в 1,0 мл растворителя.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 100 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 3 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Температура образца | 2-8 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл; |
| Время хроматографирования | 2-кратное от времени удерживания пика инсулина гларгина. |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор стандартного образца инсулина гларгина и испытуемый раствор.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин гларгин – от 10,0 до 17,0 мин.

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина гларгина было в интервале от 10,0 до 17,0 мин.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *разрешение* (*RS*) между пиками инсулина гларгина и 0A-Arg-инсулина гларгина должно быть не менее 1,2;

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

На хроматограмме раствора стандартного образца инсулина гларгина:

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

– *относительное стандартное отклонение* времени удерживания пика инсулина гларгина должно быть не более 3,0 % (6 определений).

Содержание инсулина гларгина C267H404N72O78S6 в препаратев ЕД/мл (*А*) вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | площадь пика инсулина гларгина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | – | площадь пика инсулина гларгина на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина гларгина; |
|  | *F* | – | фактор разведения испытуемого раствора; |
|  | *С0* | – | концентрация инсулина гларгина в растворе стандартного образца инсулина гларгина, мг/мл; |
|  | 0,0364 | – | количество инсулина гларгина, эквивалентное активности стандартного образца инсулина гларгина, мг/ЕД. |

Содержание инсулина гларгина C267H404N72O78S6 в препарате в процентах (*Х*) от заявленного количества вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *A* | – | найденное содержание инсулина гларгина, ЕД/мл; |
|  | *L* | – | заявленное количество инсулина гларгина, 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.

\*Приводится для информации.