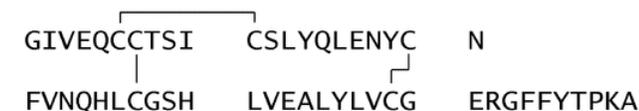
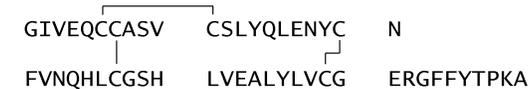


## Insulina



$C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$  5777,54  
Insulina (porcina) [12584-58-6].



$C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$  5733,49  
Insulina (bovina) [11070-73-8].

### DEFINICIÓN

#### Cambio en la redacción:

▲ La Insulina es una hormona peptídica bicatenaria que consiste de 51 aminoácidos, cuya estructura corresponde a la de la insulina nativa producida in vivo por las células beta del páncreas. La cadena A está compuesta por 21 aminoácidos y la cadena B está compuesta por 30 aminoácidos. ▲ USP 1-may-2019 Se obtiene a partir del páncreas de animales sanos, bovinos, porcinos o ambos, usados como alimento por los seres humanos. Su potencia es no menos de 26,5 Unidades USP de Insulina/mg, calculada con respecto a la sustancia seca. La Insulina que se etiqueta como purificada contiene no menos de 27,0 Unidades USP de Insulina/mg, calculadas con respecto a la sustancia seca. ▲ USP 1-may-2019

[NOTA—1 Unidad USP de Insulina equivale a 0,0342 mg de Insulina bovina pura o 0,0345 mg de Insulina porcina pura.]

### IDENTIFICACIÓN

- **A.** El tiempo de retención del pico principal de la *Solución muestra* corresponde al de la especie apropiada de la *Solución de identificación*, según se obtienen en la *Valoración*.  
[NOTA—Puede ser necesario inyectar una mezcla de *Solución muestra* y *Solución de identificación*.]

#### Eliminar lo siguiente:

#### ▲ B. MAPEO DE PÉPTIDOS

**Solución amortiguadora de sulfato:** Sulfato de amonio 2,0 M y ácido sulfúrico 0,5 M (1:1)

**Solución enzimática:** Proteasa V-8 de *Staphylococcus aureus* en agua con una actividad de 500 unidades/mL

**Solución amortiguadora de HEPES:** HEPES 0,1 M (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico). Ajustar con hidróxido de sodio 5 M a un pH de 7,5 antes de diluir con agua a volumen final.

**Solución A:** Acetonitrilo, agua y *Solución amortiguadora de sulfato* (100:700:200)

**Solución B:** Acetonitrilo, agua y *Solución amortiguadora de sulfato* (400:400:200)

**Fase móvil:** Ver la *Tabla 1*.

**Tabla 1**

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	90	10

**Tabla 1** (continuación)

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
60	30	70
65	0	100
70	0	100
71	90	10
86	90	10

**Solución de digestión estándar:** 2 mg/mL de ER Insulina USP de la especie apropiada en ácido clorhídrico 0,01 N. Transferir 500 µL de la solución resultante a un vial limpio. Agregar 2,0 mL de *Solución amortiguadora de HEPES* y 400 µL de *Solución enzimática*, e incubar a 25° durante 6 horas. Detener la digestión, agregando 2,9 mL de *Solución amortiguadora de sulfato*.

**Solución de digestión muestra:** 2 mg/mL de Insulina en ácido clorhídrico 0,01 N, mezclar hasta disolver. Transferir 500 µL de la solución resultante a un vial limpio. Agregar 2,0 mL de *Solución amortiguadora de HEPES* y 400 µL de *Solución enzimática*, e incubar a 25° durante 6 horas. Detener la digestión, agregando 2,9 mL de *Solución amortiguadora de sulfato*.

#### Sistema cromatográfico

(Ver *Cromatografía* (621), *Aptitud del Sistema*.)

**Modo:** HPLC

**Detector:** UV 214 nm

**Columna:** 4,6 mm × 10 cm; relleno L1

**Temperatura de la columna:** 40°

**Velocidad de flujo:** 1 mL/min

#### Aptitud del sistema

**Muestra:** *Solución de digestión estándar*

#### Requisitos de aptitud

**Comparabilidad de los cromatogramas:** El cromatograma de la *Solución de digestión estándar* corresponde al cromatograma de referencia provisto con el ER Insulina USP de la especie apropiada.

**Resolución:** No menos de 1,9 entre los fragmentos de digestión II y III

[NOTA—El Fragmento I tiene el mismo tiempo de elución en insulina porcina e Insulina Humana; el Fragmento II tiene el mismo tiempo de elución en Insulina Humana e insulina bovina y porcina; y el Fragmento III tiene el mismo tiempo de elución en insulina bovina y porcina.]

**Factor de asimetría:** No más de 1,5

#### Análisis

**Muestras:** *Solución de digestión estándar* y *Solución de digestión muestra*

Usando el programa de gradientes, realizar una determinación con un blanco. Inyectar, por separado, volúmenes iguales de la *Solución de digestión estándar* y la *Solución de digestión muestra*, y registrar las respuestas de cada pico.

**Criterios de aceptación:** El perfil cromatográfico de la *Solución de digestión muestra* corresponde al de la *Solución de digestión estándar*. ▲ USP 1-may-2019

#### Agregar lo siguiente:

- ▲ **B. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS FÍSICOQUÍMICOS PARA INSULINAS** (121.1), *Mapeo de Péptidos:* Proceder según se indica en el capítulo, excepto que se deben usar la *Fase móvil* y *Aptitud del sistema* siguientes.

**Fase móvil:** Ver la *Tabla 1*.

Tabla 1

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	90	10
60	30	70
65	0	100
70	0	100
71	90	10
86	90	10

**Aptitud del sistema**

**Muestra:** Solución estándar

**Requisitos de aptitud**

**Resolución:** No menos de 1,9 entre los fragmentos de digestión II y III

[NOTA—El Fragmento I tiene el mismo tiempo de elución en insulina porcina e Insulina Humana; el Fragmento II tiene el mismo tiempo de elución en Insulina Humana e insulina bovina y porcina; y el Fragmento III tiene el mismo tiempo de elución en insulina bovina y porcina.]

**Factor de asimetría:** No más de 1,5 para los fragmentos de digestión II y III

**Similitud de los cromatogramas:** El cromatograma de la Solución estándar corresponde al cromatograma de referencia provisto con la insulina de la especie apropiada.

**Criterios de aceptación:** Cumple con los requisitos. ▲ USP 1-may-2019

**Agregar lo siguiente:**

- ▲ **C. VALORACIÓN DE INSULINA** <121>, Valoración, Prueba de Biodiversidad: Cumple con los requisitos. ▲ USP 1-may-2019

**VALORACIÓN****• PROCEDIMIENTO**

**Solución A:** Disolver 28,4 g de sulfato de sodio anhidro en 1000 mL de agua. Pipetear y transferir 2,7 mL de ácido fosfórico a la solución y ajustar con etanolamina a un pH de 2,3, si fuera necesario.

**Fase móvil:** Acetonitrilo y Solución A (26:74).

[NOTA—Entibiar el acetonitrilo a una temperatura de no menos de 20° para evitar precipitación.]

**Solución de aptitud del sistema:** 1,5 mg/mL de Insulina en ácido clorhídrico 0,01 N. Dejar en reposo a temperatura ambiente durante no menos de 3 días para obtener una solución que contenga no menos de 5% de desamido insulina A-21.

[NOTA—La Solución de identificación, Solución estándar y Solución muestra se pueden almacenar durante un máximo de 12 horas a temperatura ambiente o durante un máximo de 48 horas en un refrigerador.]

**Solución de identificación:** 0,6 mg/mL de ER Insulina Porcina USP y de ER Insulina Bovina USP en ácido clorhídrico 0,01 N

**Solución estándar:** 1,5 mg/mL de insulina de la especie apropiada, ya sea ER Insulina Porcina USP o ER Insulina Bovina USP en ácido clorhídrico 0,01 N. Para insulina de especies mezcladas, preparar una solución que contenga 1,3 mg/mL de ER Insulina Porcina USP y 0,25 mg/mL de ER Insulina Bovina USP en ácido clorhídrico 0,01 N.

**Solución muestra:** 1,5 mg/mL de Insulina en ácido clorhídrico 0,01 N

**Sistema cromatográfico**

(Ver Cromatografía <621>, Aptitud del Sistema.)

**Modo:** HPLC

**Detector:** UV 214 nm

**Columna:** 4,6 mm × 15 cm; relleno L1

**Temperatura de la columna:** 40°

**Velocidad de flujo:** 1 mL/min

**Volumen de inyección:** 20 µL

**Aptitud del sistema**

**Muestras:** Solución de aptitud del sistema y Solución estándar

**Requisitos de aptitud**

**Resolución:** No menos de 2,0 entre insulina y desamido insulina A-21, Solución de aptitud del sistema

**Factor de asimetría:** No más de 1,8 para el pico de insulina, Solución de aptitud del sistema

**Desviación estándar relativa:** No más de 1,6%, Solución estándar

**Análisis**

**Muestras:** Solución de identificación, Solución estándar y Solución muestra

Medir las respuestas de los picos de insulina y desamido insulina A-21, usando el cromatograma de la Solución de identificación para identificar los picos de insulina.

Para la Insulina derivada de una sola especie, calcular la potencia con respecto a la sustancia sin secar, en Unidades USP de Insulina/mg, de la Insulina en la Solución muestra:

$$\text{Resultado} = (\sum r_U / \sum r_S) \times (C_S / C_U)$$

$r_U$  = suma de las respuestas de los picos de insulina y desamido insulina A-21 de la Solución muestra

$r_S$  = suma de las respuestas de los picos de insulina y desamido insulina A-21 de la Solución estándar

$C_S$  = concentración de insulina de la especie apropiada, ya sea ER Insulina Bovina USP o ER Insulina Porcina USP en la Solución estándar (Unidades USP de Insulina/mL)

$C_U$  = concentración de Insulina en la Solución muestra (mg/mL)

Para la Insulina derivada de una mezcla de insulina bovina e insulina porcina, calcular la potencia total como la suma de las potencias de la insulina bovina y la insulina porcina determinadas por separado.

**Criterios de aceptación:** No menos de 26,5 Unidades USP de Insulina/mg con respecto a la sustancia seca; la Insulina que se etiqueta como purificada contiene no menos de 27,0 Unidades USP de Insulina/mg con respecto a la sustancia seca.

**OTROS COMPONENTES****Cambio en la redacción:**

- ▲ **▲ DETERMINACIÓN DE CINC** <591> ▲ (IRA 1-ene-2019)

**Criterios de aceptación:** No más de 1,0% con respecto a la sustancia seca ▲ USP 1-may-2019

**IMPUREZAS Y SUSTANCIAS RELACIONADAS CON EL PRODUCTO****Cambio en la redacción:**

- ▲ **SUSTANCIAS RELACIONADAS CON EL PRODUCTO** ▲ USP 1-may-2019

**Solución A:** Disolver 28,4 g de sulfato de sodio anhidro en 1000 mL de agua. Pipetear y transferir 2,7 mL de ácido fosfórico a la solución y ajustar con etanolamina a un pH de 2,3, si fuera necesario.

**Solución B:** Acetonitrilo y *Solución A* (18:82)

**Solución C:** Acetonitrilo y *Solución A* (50:50)

**Fase móvil:** Ver la *Tabla 2*.

**Tabla 2**

Tiempo (min)	Solución B (%)	Solución C (%)
0	81	19
60	81	19
85	36	64
91	36	64
92	81	19

**Solución de aptitud del sistema:** 1,5 mg/mL de Insulina en ácido clorhídrico 0,01 N. Dejar en reposo a temperatura ambiente durante no menos de 3 días para obtener una solución que contenga no menos de 5% de desamido insulina A-21.

[NOTA—Las *Soluciones estándar A–C* se pueden almacenar durante un máximo de 12 horas a temperatura ambiente o durante un máximo de 48 horas en un refrigerador.]

**Solución estándar A:** 3,75 mg/mL de insulina de la especie apropiada, ya sea ER Insulina Porcina USP o ER Insulina Bovina USP en ácido clorhídrico 0,01 N. Para insulina de especies mezcladas, preparar una solución que contenga 3,2 mg/mL de ER Insulina Porcina USP y 0,6 mg/mL de ER Insulina Bovina USP en ácido clorhídrico 0,01 N.

**Solución estándar B:** 0,375 mg/mL de insulina de la especie apropiada, ya sea ER Insulina Bovina USP o ER Insulina Porcina USP en ácido clorhídrico 0,01 N, que se prepara según se indica a continuación. Pipetear y transferir 1 mL de *Solución estándar A* a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir con ácido clorhídrico 0,01 N a volumen y mezclar.

**Solución estándar C:** 0,0375 mg/mL de insulina de la especie apropiada, ya sea ER Insulina Bovina USP o ER Insulina Porcina USP en ácido clorhídrico 0,01 N, que se prepara según se indica a continuación. Pipetear y transferir 1 mL de *Solución estándar B* a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir con ácido clorhídrico 0,01 N a volumen y mezclar.

**Solución muestra:** 3,75 mg/mL de Insulina en ácido clorhídrico 0,01 N. Preparar la solución en un vial con tapón, tapar el vial y agitar suavemente hasta disolver. Almacenar la solución durante no más de 2 horas a temperatura ambiente o durante no más de 12 horas en un refrigerador.

#### Sistema cromatográfico

(Ver *Cromatografía* (621), *Aptitud del Sistema*.)

**Modo:** HPLC

**Detector:** UV 214 nm

**Columna:** 4,6 mm × 25 cm; relleno L1

**Temperatura de la columna:** 40°

**Velocidad de flujo:** 1 mL/min

**Volumen de inyección:** 20 µL

#### Aptitud del sistema

**Muestras:** *Solución de aptitud del sistema*, *Solución estándar A*, *Solución estándar B* y *Solución estándar C*  
[NOTA—Ajustar la composición de la *Fase móvil* y la duración de la elución isocrática para obtener un tiempo de retención de aproximadamente 31 minutos para la insulina, con la desamido insulina A-21 eluyendo justo antes del inicio de la fase de elución por gradiente.]

#### Requisitos de aptitud para la *Solución de aptitud del sistema*

**Resolución:** No menos de 2,0 entre insulina y desamido insulina A-21

**Factor de asimetría:** No más de 1,8 para el pico de insulina

#### Requisitos de aptitud para las *Soluciones estándar*

Calcular el factor  $X_1$ :

$$X_1 = (r_B/r_A) \times D$$

$r_B$  = respuesta del pico de la *Solución estándar B*

$r_A$  = respuesta del pico de la *Solución estándar A*

$D$  = factor de dilución, 10

**Resultado:** Entre 0,91 y 1,09

Calcular el factor  $X_2$ :

$$X_2 = (r_C/r_A) \times D$$

$r_C$  = respuesta del pico de la *Solución estándar C*

$r_A$  = respuesta del pico de la *Solución estándar A*

$D$  = factor de dilución, 100

**Resultado:** Entre 0,7 y 1,3

#### Análisis

**Muestra:** *Solución muestra*

Calcular el porcentaje de insulina, desamido insulina A-21 y otras  $\blacktriangle$ sustancias relacionadas de insulina  $\blacktriangle$  USP 1-may-2019 en la porción de Insulina tomada:

Calcular el porcentaje de Insulina (%I):

$$\text{Resultado} = (r_i/r_T) \times 100$$

$r_i$  = respuesta del pico de insulina de la *Solución muestra*

$r_T$  = suma de las respuestas de todos los picos de la *Solución muestra*

Calcular el porcentaje de desamido insulina A-21 (%D):

$$\text{Resultado} = (r_D/r_T) \times 100$$

$r_D$  = respuesta del pico de desamido insulina A-21 de la *Solución muestra*

$r_T$  = suma de las respuestas de todos los picos de la *Solución muestra*

Calcular el porcentaje de otras  $\blacktriangle$ sustancias relacionadas de insulina:  $\blacktriangle$  USP 1-may-2019

$$\text{Resultado} = 100 - (\%I + \%D)$$

**Criterios de aceptación:** No más de 10,0% de desamido insulina A-21 y no más de 5,0% de otras  $\blacktriangle$ sustancias relacionadas de insulina  $\blacktriangle$  USP 1-may-2019

Para la Insulina derivada de una sola especie, medir la respuesta de cualquier pico correspondiente a insulina bovina o porcina y calcular su concentración como porcentaje de  $r_T$ . La cantidad de contaminación cruzada es no más de 1,0%.

#### Cambio en la redacción:

$\blacktriangle$  **PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS FÍSICOQUÍMICOS PARA INSULINAS** (121.1), *Límite de Proteínas de Alto Peso Molecular*: Cumple con los requisitos.  $\blacktriangle$  USP 1-may-2019

**Criterios de aceptación:** No más de 1,0%

**IMPUREZAS RELACIONADAS CON EL PROCESO****Agregar lo siguiente:**

- ▲ • **CONTENIDO DE PROINSULINA:** No más de 10 ng/mg, determinado mediante un método validado. ▲ USP 1-may-2019

**PRUEBAS ESPECÍFICAS****Eliminar lo siguiente:**

- ▲ • **VALORACIÓN DE INSULINA** (121), *Valoración, Prueba de Bioidentidad:* Cumple con los requisitos. ▲ USP 1-may-2019
- **PÉRDIDA POR SECADO** (731)  
Muestra: 200 mg  
Análisis: Secar la Muestra a 105° durante 16 horas.  
Criterios de aceptación: No más de 10,0%

**Eliminar lo siguiente:**

- ▲ • **DETERMINACIÓN DE CINC** (591), *Procedimiento, Método de Ditizona*  
Muestra: 10 mg

Criterios de aceptación: No más de 1,0% con respecto a la sustancia seca ▲ USP 1-may-2019

- **PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS** (85): No más de 10 Unidades USP de Endotoxina/mg de insulina
- **PRUEBAS DE RECuento MICROBIANO** (61) y **PRUEBAS DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS** (62): El recuento total bacteriano no excede de  $3 \times 10^2$  ufc/g, realizando la prueba sobre una porción de aproximadamente 0,2 g pesados con exactitud.

**REQUISITOS ADICIONALES**

- **ENVASADO Y ALMACENAMIENTO:** Conservar en envases impermeables. Almacenar en un congelador. Proteger de la luz.
- **ETIQUETADO:** Etiquetar indicando la especie o especies animales con las que está relacionada, como porcina, bovina o como una mezcla de porcina y bovina. Si la Insulina es purificada, etiquetarla como tal.
- **ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP** (11)  
ER Insulina Bovina USP  
ER Insulina Porcina USP