"2023, Año de Francisco Villa, el revolucionario del pueblo"

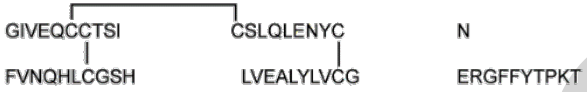
COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de noviembre y hasta el 31 de diciembre de 2023, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.
Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre:		**Cargo:**	
Institución o empresa:		**Dirección:**	
Teléfono:		**Correo electrónico:**	

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Dice	Debe decir	Justificación*
INSULINA HUMANA RECOMBINANTE		
Esta monografía aplica para el biofármaco denominado insulina humana recombinante, el cual es un péptido de dos cadenas cuya estructura es idéntica a la hormona antidiabética producida por el páncreas humano y presenta la siguiente secuencia de aminoácidos:		
 ***Nota:*** Las líneas representan puentes disulfuro. *Figura 1*. Secuencia de aminoácidos de la Insulina Humana Recombinante. $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ M_r 5807.58 [11061-68-0]		
Contiene no menos de 95.0 % y no más de 105.0 % de insulina humana más la correspondiente desamido A-21 insulina, la cual no		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
debe ser mayor al 2.0 % en relación al peso seco. Por convención, con el propósito de normalizar las preparaciones de insulina, se considera que 0.0347 mg de insulina humana son equivalentes a 1.0 UI de insulina. La insulina humana debe ser producida bajo condiciones diseñadas para minimizar el grado de contaminación microbiana. Para insulina humana producida por tecnología de ADN recombinante, antes de liberar el producto es necesario llevar a cabo las siguientes pruebas para cada lote del biofármaco.		
BIOFÁRMACO		
DESCRIPCIÓN. Polvo blanco o casi blanco de consistencia fina.		
SOLUBILIDAD. Soluble en ácidos minerales diluidos o con descomposición en soluciones alcalinas diluidas. Casi insoluble en agua y alcohol.		
ENSAYOS DE IDENTIDAD Deberán aplicarse las siguientes dos pruebas.		
A. *MGA 0241*, *CLAR*. Examinar los cromatogramas obtenidos en la prueba de *Contenido de Insulina*. El tiempo de retención del pico principal del cromatograma de la preparación de la muestra es similar al tiempo de retención obtenido para la preparación de referencia.		
B. Mapeo de péptidos. *MGA 0536. Mapeo peptídico*.		
Preparación de la muestra. Preparar una solución que contenga 2.0 mg/mL del compuesto a ser examinado en una solución de ácido clorhídrico 0.01 M y transferir 500 µL de esta solución en un		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
tubo limpio. Agregar 2.0 mL de la solución amortiguadora de HEPES pH 7.5 y 400 µL de solución que contenga 1.0 mg/mL (500 U/mL) de proteasa tipo XVII-B de *Staphylococcus aureus* cepa V8. Tapar el tubo e incubar a 25 °C durante 6 h. Detener la reacción agregando 2.9 mL de solución amortiguadora de sulfatos pH 2.0.		
Preparación de referencia. Preparar al mismo tiempo y de la misma manera que la preparación de la muestra pero usando SRef de insulina humana en lugar del compuesto a ser examinado.		
Solución amortiguadora de HEPES. Disolver 2.8 g de HEPES (ácido *N*-2-hidroxietilpiperazina *N*-2 etanosulfoico) en 90 mL de agua para cromatografía en un matraz volumétrico. Ajustar con hidróxido de sodio 5 M a pH 7.5, diluir con agua hasta ajustar el volumen de 100 mL y mezclar.		
Solución amortiguadora de sulfatos. Mezclar volúmenes iguales de 250 mL de las siguientes soluciones: sulfato de amonio 2.0 M y ácido sulfúrico 0.5 M y filtrar.		
Fase estacionaria. Octadecilsilil sílica gel para cromatografía (3 µm) con un tamaño de poro de 8 nm.		
Fase móvil A. Mezclar 100 mL de acetonitrilo grado cromatográfico, 200 mL de solución amortiguadora de sulfatos pH 2.0 (descrita en el apartado anterior) y 700 mL de agua para cromatografía, filtrar y desgasificar.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Fase móvil B. Mezclar 200 mL de la solución amortiguadora de sulfato, pH 2.0, 400 mL de acetonitrilo grado cromatográfico y 400 mL de agua, filtrar y desgasificar.		
Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 214 nm y columna de 4.6 mm × 10 cm, mantener la temperatura de la columna a 40 °C. Programar el cromatógrafo de acuerdo a la *Tabla 1* con velocidad de flujo de 1 mL/min.		
Acondicionamiento. En las condiciones iniciales durante 15 min. Realizar un ensayo en blanco con el gradiente indicado en la *Tabla 1*.		
Inyección. 50 µL.		
Aptitud del sistema. Los cromatogramas obtenidos con la preparación de la muestra y de referencia son similares cualitativamente al cromatograma de la SRef de insulina humana digerida proporcionado con la SRef. En el cromatograma obtenido con la preparación de referencia, identificar los picos correspondientes a los fragmentos digeridos I, II y III: empleando el cromatograma de la SRef de insulina humana digerida, proporcionado con la SRef.		
Factor de simetría. No mayor de 1.5 para los picos correspondientes a los fragmentos II y III.		
Resolución. No menor de 3.4 entre los picos correspondientes a los fragmentos II y III.		
Tabla 1. Gradiente para mapeo de péptidos. **Tiempo (min)** / **Fase móvil A (% v/v)** / **Fase móvil B (% v/v)**		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
0 – 60 90 → 30 10 → 70 60 – 65 30 → 0 70 → 100 65 – 70 0 100 70 – 71 0 → 90 100 → 10 71 – 86 90 10		
Resultados. El perfil del cromatograma obtenido con la preparación de la muestra corresponde al cromatograma obtenido con la preparación de referencia.		
CONTENIDO DE INSULINA. *MGA 0241*, *CLAR*.		
Preparación de la muestra. Disolver 40.0 mg del compuesto a ser examinado en una solución de ácido clorhídrico 0.01 M y ajustar el volumen a 10.0 mL con el mismo solvente. **Preparación de referencia A.** Disolver el contenido de un vial de SRef de insulina humana en una solución de ácido clorhídrico 0.01 M para obtener una concentración de 4.0 mg/mL. **Preparación de referencia B.** Disolver el contenido de un vial de SRef de insulina porcina en una solución de ácido clorhídrico 0.01 M para obtener una concentración de 4.0 mg/mL. **Preparación de referencia C.** Diluir 1.0 mL de la preparación de referencia B en 50.0 mL de una solución de ácido clorhídrico 0.01 M. A 1.0 mL de esta solución adicionar 1.0 mL de la preparación de referencia A. **Preparación de referencia D.** Diluir 1.0 mL de la		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
preparación de referencia A en 10.0 mL de una solución de ácido clorhídrico 0.01 M.		
Solución de resolución. Mezclar 1.0 mL de la preparación de referencia A con 1.0 mL de la preparación de referencia B. Mantener las soluciones entre 2 y 8 °C, usarlas dentro de las 48 h posteriores. Si se utiliza un inyector automático, mantener la temperatura del mismo entre 2 y 8 °C.		
Fase estacionaria. Octadecilsilil sílica gel para cromatografía (5 µm).		
Fase móvil. Mezclar 42 volúmenes de la fase móvil A con 58 volúmenes de la fase móvil B, ajustar la composición de la mezcla si es necesario. Preparar y mantener las siguientes soluciones a temperatura de 20 °C. **Fase móvil A.** Disolver 28.4 g de sulfato de sodio anhidro en agua y llevar a volumen de 1 000 mL con el mismo solvente; agregar 2.7 mL de ácido fosfórico, ajustar a pH 2.3 si es necesario con etanolamina, filtrar y desgasificar. **Fase móvil B.** Mezclar 550 mL de la fase móvil A con 450 mL de acetonitrilo grado cromatográfico. Calentar la solución a una temperatura de 20 °C para evitar la precipitación (la mezcla de la fase móvil A con acetonitrilo es endotérmica), filtrar y desgasificar.		
Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 214 nm columna de 4.6 mm × 25 cm, mantener la temperatura de la columna a 40 °C, con una velocidad de flujo de 1 mL/min.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Aptitud del sistema. Inyectar 20 µL de la solución de resolución y 20 µL de la preparación de referencia B. Registrar el cromatograma de la solución de resolución hasta que el pico correspondiente al pico principal del cromatograma obtenido de la preparación de referencia B sea claramente visible. Identificar los picos correspondientes a la insulina humana y a la insulina porcina en el cromatograma obtenido con la solución de resolución. La prueba no es válida a menos que la resolución entre picos de ambas insulinas no sea menor de 1.2. Ajustar la concentración de acetonitrilo en la fase móvil si es necesario hasta que se obtenga dicha resolución.		
Linealidad. Inyectar 20 µL de las preparaciones de referencia A y D. La prueba no es válida a menos que el área del pico principal del cromatograma de la preparación de referencia A sea 10 ± 0.5 veces el área del pico principal del cromatograma obtenido con la preparación de referencia D. Si el criterio no se cumple, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µL con la finalidad de que las respuestas estén dentro del intervalo de linealidad del detector. Inyectar 20 µL de la preparación de la muestra y de la preparación de referencia A. Calcular el contenido de la insulina humana $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ más la insulina humana desamido A-21 usando las áreas de los picos correspondientes en los cromatogramas obtenidos con la preparación de la muestra y la preparación de referencia A y el contenido reportado de insulina		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
humana y de insulina humana desamido A-21 en la SRef de insulina humana recombinante.		
PROTEÍNAS DERIVADAS DE LA CÉLULA HOSPEDERA. *Método de ELISA*. No más de 10 ppm. Este método se basa en el sistema de ELISA y determina el contenido de polipéptidos y proteínas derivados de la célula hospedera los cuales son considerados como impurezas en la obtención de insulinas.		
Soluciones utilizadas ***Nota:*** el agua que se emplea es grado reactivo a menos que se indique otra especificación.		
Solución amortiguadora de ácido fosfórico 1 M. Mezclar 68 mL de ácido fosfórico al 85 % en 932 mL de agua. Mantener la solución a temperatura ambiente máximo durante 6 meses.		
Solución amortiguadora de borato de sodio. Disolver en un matraz volumétrico 19.1 g de borato de sodio decahidratado en 900 mL de agua; ajustar si es necesario el pH entre 9.1 y 9.3 con hidróxido de sodio 1N y/o ácido clorhídrico 1 N. Llevar a volumen de 1 L con agua y mezclar. Filtrar la solución utilizando una membrana de 0.22 µm y mantener entre 2 y 8 °C máximo durante 6 meses.		
Solución de anticuerpos anti-proteínas de la célula hospedera. Diluir el anticuerpo anti-polipéptido en la solución amortiguadora de borato de sodio para obtener una concentración de 5 ppm.		
Solución salina amortiguadora de fosfato 10X (PBS 10X). Disolver en un matraz volumétrico 9.8		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
g de fosfato de potasio monobásico, 76.5 g de fosfato de potasio dibásico, 152 g de cloruro de sodio y 1.0 g de tiomersal en 1 800 mL de agua; si es necesario ajustar el pH entre 7.3 y 7.5 con hidróxido de sodio 5 N. Llevar a volumen de 2 L con agua y mezclar. Filtrar la solución utilizando una membrana de 0.22 µm y mantener a temperatura ambiente máximo durante 6 meses.		
Solución amortiguadora TAPS con edetato disódico. Disolver en matraz volumétrico 12.2 g de TAPS (50 mM), 7.4 g de edetato disódico (20 mM), 5 g de BSA (0.5 %), 5 mL de Tritón X-100 al 10 % (0.05 %) en aproximadamente 950 mL de agua. Ajustar el pH a 8.7 con hidróxido de sodio 5 N. Llevar volumen de 1 000 mL con agua y mezclar. Filtrar la solución utilizando una membrana de 0.22 µm y mantener entre 2 y 8 °C máximo durante 3 meses.		
Solución amortiguadora de lavado PBST. Mezclar 9 partes de volumen de agua y 1 parte por volumen de solución amortiguadora PBS 10X con 0.1 % (v/v) de polisorbato 20. Mantener la solución a temperatura ambiente máximo durante 6 meses. **Solución de tritón X-100 al 10 %.** Diluir 10 mL de Tritón X-100 en 100 mL de agua. Mezclar y filtrar la solución utilizando una membrana de 0.22 µm y mantener entre 2 y 8 °C máximo durante 6 meses.		
Solución amortiguadora TAPS. Disolver en matraz volumétrico 12.2 g de TAPS (50 mM), 5 g de BSA (0.5 %), 5 mL de Tritón X-100 al 10 %		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
(0.05 %) con 950 mL de agua. Ajustar el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 5 N. Llevar a volumen con agua a 1 000 mL y mezclar. Filtrar la solución utilizando una membrana de 0.22 µm y mantener entre 2 y 8 °C máximo por 3 meses. **Solución de bloqueo de BSA al 3 % en PBS.** Diluir 50 mL de la solución amortiguadora de PBS 10X con 450 mL de agua para obtener una solución de PBS 1X. Disolver en esta solución 15 g de BSA (3 %) y mezclar. Filtrar la solución utilizando una membrana de 0.22 µm y mantener entre 2 y 8 °C máximo durante un mes.		
Solución con el anticuerpo anti-polipéptido biotinilado. Preparar conforme a las instrucciones del fabricante, para obtener una concentración de 5 µg/mL. **Solución del conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante.** Preparar conforme a las instrucciones del fabricante para obtener una concentración de 100 ng/mL. **Solución del sustrato de peroxidasa TMB.** Utilizar conforme a las instrucciones del fabricante (de uno o dos componentes).		
Preparación del estándar de referencia. Diluir el estándar de referencia del polipéptido de la célula hospedera (SRef P) con un volumen apropiado de la solución amortiguadora TAPS con edetato disódico. Distribuir en alícuotas y mantener en congelación.		
Curva estándar. A partir de la SRef P realizar diluciones con la solución amortiguadora TAPS en		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
edetato disódico hasta obtener concentraciones de 2, 5, 10 y 20 ppm. Utilizar la solución amortiguadora TAPS en edetato disódico para la concentración de 0 ppm de la curva de estándar.		
Preparación de la muestra. Preparar una solución de 10 mg/mL del compuesto a ser examinado con la solución amortiguadora TAPS en edetato disódico.		
Preparación del control positivo. Preparar una solución para el control positivo de aceptabilidad de datos mezclando una solución de 10 mg/mL del material a granel (insulina humana) con la solución amortiguadora TAPS con edetato disódico con la SRef P a una concentración de 10 ppm. Distribuir la solución en alícuotas y mantener en congelación. Preparar una solución para el control positivo de desempeño del método al mezclar una solución de 10 mg/mL del material a granel (insulina humana), la solución amortiguadora TAPS con edetato disódico y con la SRef P a una concentración de 2 ppm. Distribuir la solución en alícuotas y mantener en congelación.		
Criterio de aceptación **Aptitud del sistema.** La concentración mínima detectable (CMD), no menor a 6 ppm. **Aceptabilidad del método.** La concentración del control positivo, calculada después de substraer la absorbancia de la preparación de la muestra, está entre el 90 y el 110 % de la concentración del control positivo.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Condiciones de operación **Análisis de las muestras.** Este análisis se debe realizar manualmente o en un sistema automatizado y validado por el fabricante.		
Etapas del método **Procedimiento.** Colocar 100 µL a cada pozo de la solución que contiene el anticuerpo anti-polipéptido, cubrir la placa con el adhesivo e incubar dentro de una cámara húmeda para evitar la evaporación durante la noche a una temperatura de entre 2 y 8 °C. La placa puede mantenerse máximo durante 7 días en estas condiciones.		
Lavado. Eliminar por inversión o aspirar con un lavador automático y enjuagar con solución amortiguadora de lavado PBST por 6 ocasiones con 250 µL como mínimo. Eliminar el exceso de solución de lavado invirtiendo la placa sobre un paño seco golpeando suavemente. Colocar en cada pozo 300 µL de solución BSA al 3 % en PBS, cubrir la placa con el adhesivo e incubar durante 60 a 90 min a temperatura ambiente. Realizar el lavado como se indicó anteriormente. Colocar en cada pozo 100 µL de la preparación del estándar, muestras y control positivo por cuadruplicado, cubrir la placa con el adhesivo e incubar durante 2 ó 3 h.		
Realizar el lavado como se indicó anteriormente. Colocar a cada pozo 100 µL de la solución con el anticuerpo anti-polipéptido biotinilado, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
ambiente durante 60 a 90 min. Realizar el lavado como se indicó anteriormente. Colocar a cada pozo 100 µL de la solución del conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 60 ± 10 min. Realizar el lavado como se indicó anteriormente. Colocar a cada pozo 100 µL de la solución de sustrato de peroxidasa TMB e incubar a temperatura ambiente durante el tiempo de desarrollo adecuado, es decir monitorear el desarrollo de la intensidad de la señal. Adicionar a cada pozo 100 µL de la solución de ácido fosfórico 1 M para detener la reacción y leer a una longitud de onda de 650 nm.		
Criterio de validez. El pozo de la preparación del estándar de 20 ppm deberá alcanzar una lectura entre 0.7 a 1.0 unidad de absorbancia. Si se utiliza un programa de análisis de datos, éste deberá determinar una curva estándar de forma sigmoidea, al utilizar un modelo de regresión no lineal de cuadrados mínimos o cualquier modelo justificado por el fabricante. La concentración de proteínas derivadas de la célula hospedera se calculará utilizando el modelo resultante de los datos de la curva estándar.		
PRECURSOR DE CADENA ÚNICA. *Método de ELISA*. No más de 10 ppm. Es aceptado el uso de otros métodos diferentes a *ELISA* siempre y cuando estos hayan sido validados por el fabricante.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Nota: el agua que se emplea es grado reactivo, a menos que se indique otra especificación.		
Solución amortiguadora de borato. Disolver 19.1 g de tetraborato de sodio decahidratado en 900 mL de agua en un matraz volumétrico; ajustar si es necesario a pH 9.1 y 9.3 con hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico. Diluir con agua hasta ajustar el volumen a 1 000 mL y mezclar. Filtrar la solución utilizando una membrana de 0.22 µm y mantener entre 2 y 8 °C máximo durante 6 meses.		
Solución de anticuerpo. Diluir el anticuerpo anti-péptido C y el anticuerpo anti-Proinsulina Humana (PIH) con la solución amortiguadora de borato de sodio para obtener una concentración de 5 µg/mL, a una proporción de 9:1:1.		
Solución salina amortiguadora de fosfato 10X (PBS 10X). Disolver 9.8 g de fosfato de potasio monobásico (cristal), 76.5 g de fosfato de potasio monobásico (anhidro), 152 g de cloruro de sodio y 1.0 g de timerosal en 1 900 mL de agua en un matraz volumétrico; si es necesario ajustar el pH entre 7.3 y 7.5 con hidróxido de sodio 5 N. Diluir con agua hasta ajustar el volumen a 2 L y mezclar. Filtrar la solución con una membrana de 0.22 µm y mantener a temperatura ambiente hasta por 6 meses.		
Solución amortiguadora de lavado PBS. Mezclar 400 mL de solución amortiguadora PBS 10X con 4 mL de polisorbato 20 (Polioxietileno sorbitano monopalmitato). Ajustar el volumen con agua en un matraz volumétrico de 4 L y mezclar. Mantener la		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
solución a temperatura ambiente máximo durante 6 meses.		
Solución amortiguadora Pipes/HEPES 0.1 M. Disolver 69.3 g de Pipes [sal disódica de piperazina-*N*,*N*´-bis(ácido 2-etansulfónico)], 47.7 g de HEPES (Ácido *N*-2-hidroxietilpiperazina *N*-2 etanosulfoico), 14.9 g de edetato disódico, 2.9 g de azida de sodio y 500 µL de polisorbato 20 en 1 900 mL de agua en un matraz volumétrico. Ajustar el pH si es necesario entre 6.8 a 7.0. Diluir con agua hasta ajustar el volumen a 2 L y mezclar. Filtrar la solución utilizando una membrana de 0.22 µm y mantener entre 2 y 8 °C hasta por 6 meses.		
Solución de bloqueo al 5 %. Disolver 2.5 g de leche en polvo sin grasa en 50 mL de solución amortiguadora Pipes/HEPES 0.1 M y mantener entre 2 y 8 °C máximo durante 10 días.		
Solución de bloqueo/20. Mezclar 5 mL de solución de bloqueo al 5 % y 95 mL de solución amortiguadora Pipes/HEPES 0.1 M.		
Solución con el anticuerpo anti-insulina biotinilado. Diluir el anticuerpo con solución de bloqueo/20 para obtener una concentración de 3 µg/mL.		
Solución de fosfatasa alcalina-estreptavidina 0.5 mg/vial. Reconstituir la fosfatasa alcalina-estreptavidina con una solución al 50 % de glicerol y 50 % de agua, para obtener una concentración de 0.5 mg/mL. Mantener la solución entre 2 y 8 °C o congelar durante un año.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Solución del conjugado. Diluir la fosfatasa alcalina-estreptavidina con solución amortiguadora de lavado PBS para obtener una concentración de 0.5 µg/mL. Solución salina amortiguadora con fosfato (solución de biotinilación IgG). Disolver 5.5 g de fosfato monosódico, 17.5 g de cloruro de sodio, 0.4 g de azida de sodio en 1 900 mL de agua en un matraz volumétrico. Ajustar si es necesario a pH 8.1 ± 1 con hidróxido de sodio 5 N. Diluir con agua hasta ajustar el volumen y mezclar. Filtrar la solución utilizando una membrana de 0.22 µm y mantener entre 2 y 8 °C máximo durante 2 meses.		
Solución del sustrato. Diluir 4 mL de la solución amortiguadora de dietanolamina concentrada 5X a 16.0 mL de agua para cromatografía, proporción 1:4. Disolver dos tabletas de 5 mg de sal de sodio de fosfato de p-nitrofenil (pNPP), usar inmediatamente.		
Preparación de estándar de referencia. Diluir el estándar de Proinsulina humana (SRef A) con solución amortiguadora de Pipes/HEPES 0.1 M para obtener 2 mg/mL, a partir de esta solución preparar lo siguiente:		
Preparación del estándar de referencia de proinsulina humana (SRef A). Diluir el contenido de un vial del estándar con la solución amortiguadora Pipes/HEPES 0.1 M para obtener una concentración de 2 mg/mL (SRef A), Distribuir en alícuotas y mantener en congelación.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Curva estándar. A partir de la preparación de referencia SRef A (2 mg/mL) realizar diluciones con la solución de bloqueo/20 hasta obtener concentraciones de 100 y 1 µg/mL, 150, 100, 50, 25, 10, 5 y 1 ng/mL. Utilizar la solución de bloqueo/20 para la concentración de 0 ng/mL de la curva de estándar.		
Preparación de la muestra. Preparar una solución de 10 mg/mL del compuesto a ser examinado en ácido clorhídrico 0.01 M. Mezclar volúmenes iguales de 10 mg/mL de la preparación de la muestra y de la solución de bloqueo/20 para obtener una concentración final de 5 mg/mL.		
Solución para la aptitud del sistema. Las muestras de control interno mayores y menores se preparan al adicionar una muestra de insulina humana con material del estándar de referencia (SRef) a aproximadamente 3 y 0.6 ppm, respectivamente. Éstas son preparadas de la siguiente manera:		
a) Reconstituir el estándar de referencia en ácido clorhídrico 0.01 N y diluir con la solución de bloqueo/20 para obtener una concentración de 1.0 µg/mL.		
b) Obtener una muestra de insulina a granel conteniendo niveles bajos de proinsulina. Disolver esta muestra a 10 mg/mL en ácido clorhídrico 0.01 N.		
Aptitud del sistema. Preparar una solución que contenga 3 ppm de proinsulina en insulina utilizando las soluciones preparadas en los incisos		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
a y b. Distribuir en alícuotas y congelar para el uso de un día.		
Control de desempeño del método. Preparar una solución que contenga 0.6 ppm de proinsulina en insulina utilizando las soluciones preparadas en los incisos a y b. Distribuir en alícuotas y congelar para el uso de un día. En el día del ensayo, descongelar una alícuota de cada concentración y mezclar volúmenes iguales de cada solución con la solución de bloqueo/20.		
Criterio de aceptación. La concentración mínima detectable (CMD) es de no más de 1 ng/mL. La concentración de las muestras es de no más de la concentración máxima estimable (CME) o del estándar más alto.		
Condiciones de operación. Para el análisis de las muestras, realizar manualmente o por un sistema automatizado y validado por el fabricante. Absorbancia: Densidad óptica a 405 nm.		
Procedimiento. Colocar en cada pozo 100 µL de la solución del anticuerpo, cubrir la placa con el adhesivo para evitar la evaporación e incubar dentro de una cámara húmeda durante la noche a una temperatura de entre 2 y 8 °C. La placa puede mantenerse hasta por 6 semanas en estas condiciones.		
Lavado. Eliminar por inversión o aspirar con un lavador automático y enjuagar con solución amortiguadora de lavado PBS por 4 ocasiones con 300 µL por pozo. Eliminar el exceso de solución de lavado invirtiendo la placa sobre un paño seco.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Colocar en cada pozo 300 µL de solución de bloqueo/20, cubrir la placa con el adhesivo e incubar durante 1 h ± 15 min a temperatura ambiente. Realizar el lavado como se indicó anteriormente.		
Colocar en cada pozo 50 µL de la preparación del estándar, muestras y controles internos por cuadruplicado, cubrir la placa con el adhesivo e incubar durante 2 o 3 h. Realizar el lavado como se indicó anteriormente.		
Colocar en cada pozo 100 µL de la solución con el anticuerpo anti-insulina biotinilado, cubrir la placa con el adhesivo e incubar durante 1 h ± 15 min, con agitación a temperatura ambiente. Realizar el lavado como se indicó anteriormente.		
Colocar en cada pozo 100 µL de la solución de fosfatasa alcalina-estreptavidina, cubrir la placa con el adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 30 a 45 min con agitación. Realizar el lavado como se indicó anteriormente.		
Colocar en cada pozo 100 µL de la solución de sustrato e incubar a temperatura ambiente durante 10 a 20 min. Adicionar a cada pozo 50 µL de la solución de hidróxido de sodio 2 N.		
El sistema determina una curva estándar sigmoidea, al utilizar un modelo de regresión no lineal de mínimos cuadrados o cualquier modelo justificado por el fabricante. La potencia del compuesto y del control interno es estimada como relativa a la curva de estándar.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Calcular la cantidad de Proinsulina humana como se indica:		
$ppm\ de\ PIH = \frac{Estimao\ de\ potencia\ PIH\ ng/mL}{5.0\ mg\ SRef}$		
Donde:		
PIH = Proinsulina Humana		
SRef = Sustancia de referencia de Proinsulina humana.		
IMPUREZAS DE COMPUESTOS CON MASA MOLECULAR SUPERIOR A LA DE LA INSULINA. *MGA 0241*, *CLAR*.		
Determinar por cromatografía de exclusión por tamaño. No más del 1.0 % en la suma de las áreas de cualquiera de los picos con un tiempo de retención menor al pico principal.		
Preparación de la muestra. Preparar una solución que contenga 4.0 mg/mL del compuesto a ser examinado en ácido clorhídrico 0.01 M.		
Solución de resolución. Usar una solución de insulina (4 mg/mL), que contenga más de 0.4 % de proteínas de alto peso molecular. Puede utilizarse una preparación de insulina inyectable en solución o suspensión que haya sido clarificada con una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 M y contenga el porcentaje indicado de proteínas de alto peso molecular o una solución preparada con insulina disuelta en ácido clorhídrico 0.01 M. Se puede preparar insulina que contenga la cantidad necesaria de proteínas de alto peso molecular, manteniendo la insulina en polvo a temperatura ambiente durante 10 días. Mantener las soluciones		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
entre 2 y 8 °C, usarlas dentro de los siete días posteriores. Si se usa un inyector automático, mantener la temperatura entre 2 y 8 °C.		
Fase móvil. Mezclar 15 volúmenes de ácido acético glacial, 20 volúmenes de acetonitrilo y 65 volúmenes de una solución de arginina a 1.0 g/L; filtrar y desgasificar.		
Fase estacionaria. Sílica gel hidrofílica para cromatografía (5 a 10 µm) con un tamaño de poro de 12 a 12.5 nm, de un grado adecuado para la separación del monómero de insulina de los dímeros y polímeros.		
Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 276 nm, columna de 7.5 mm × 30 cm, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.		
Nota: antes de utilizar una nueva columna para análisis cromatográfico, equilibrar con repetidas inyecciones de una solución de insulina que contenga proteínas de alto peso molecular. Esto puede realizarse con no menos de tres inyecciones de la solución de resolución. La columna se encontrará equilibrada cuando se obtengan resultados repetitivos en dos inyecciones subsecuentes.		
Inyección. 100 µL.		
Tiempo de retención. Complejos de insulina polimérica:		
de 13 a 17 min; dímeros covalentes de insulina: aproximadamente 17.5 min; monómero de insulina:		

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>aproximadamente 20 min; sales: aproximadamente 22 min.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Aptitud del sistema. Con la solución de resolución. Relación pico/valle: no menor de 2.0. Donde Hp = altura sobre la línea base del pico debido al dímero y Hv = altura sobre la línea base del punto más bajo de la curva que separa este pico del pico del monómero.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Tiempo de corrida. 35 min.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>PROTEÍNAS RELACIONADAS. MGA 0241, CLAR. De acuerdo a lo descrito en la prueba de Contenido de insulina siguiendo las condiciones de elusión que se describen a continuación:</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Tabla 2. Gradiente para proteínas relacionadas.
<table>
<tr><th>Tiempo (min)</th><th>Fase móvil A % (v/v)</th><th>Fase móvil B % (v/v)</th></tr>
<tr><td>0 – 30</td><td>42</td><td>58</td></tr>
<tr><td>30 – 44</td><td>42 → 11</td><td>58 → 89</td></tr>
<tr><td>44 - 50</td><td>11</td><td>89</td></tr>
<tr><td>50 - 60</td><td>11 - 42</td><td>89 - 58</td></tr>
</table>
Mantener las soluciones entre 2 y 8 °C, usarlas dentro de las 24 h posteriores a su preparación. Desarrollar una prueba de verificación del sistema (resolución y linealidad) de acuerdo a lo descrito en la prueba de Contenido de Insulina. Si es necesario, las proporciones relativas de las fases</td><td></td><td></td></tr>
</table>

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
móviles pueden ser ajustadas para asegurar la elusión completa de la insulina desamido A-21 antes de comenzar el gradiente. El perfil del gradiente también puede ser ajustado para asegurar la elusión completa de todas las impurezas relacionadas con la insulina.		
Inyectar 20 µL de la preparación de referencia A, 20 µL de la preparación de referencia B, 20 µL de la preparación de referencia C y 20 µL de la preparación de la muestra. Si es necesario, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µL de acuerdo a los resultados obtenidos con la prueba de linealidad de acuerdo a lo descrito la prueba de *Contenido de Insulina*. Registrar los cromatogramas por aproximadamente 50 min. En el cromatograma obtenido con la preparación de referencia A, la insulina humana desamido A-21 aparece como un pequeño pico después del pico principal y tiene un tiempo de retención cerca de 1.3 referido al pico principal. En el cromatograma obtenido con la preparación de la muestra, el área del pico de la insulina humana desamido A-21 no debe ser mayor al 2 % del área total de los picos; la suma de las áreas de todos los picos aparte de aquellos correspondientes al monómero de la insulina humana y al de la insulina humana desamido A-21, no debe ser mayor al 2.0 % del área total de todos los picos.		
ZINC. *MGA 0331*. No más de 1.0 % (con base a la sustancia seca).		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Preparación de la muestra. Disolver 50.0 mg del compuesto a ser examinado en 25.0 mL de una solución de ácido clorhídrico 0.01 M. Diluir si es necesario a una concentración adecuada (por ejemplo, 0.4 a 1.6 µg de Zn/mL) con ácido clorhídrico 0.01 M.		
Fuente. Lámpara de Zn de cátodo hueco.		
Longitud de onda. 213.9 nm.		
Instrumento de atomización. Flama de aire-acetileno de composición adecuada (por ejemplo, 11 L de aire y 2 L de acetileno por minuto).		
PÉRDIDA POR SECADO. *MGA 0671*. Máximo 10.0 %, determinado en 0.200 g de muestra. Secar en un horno a 105 °C durante 16 h.		
RESIDUO DE LA IGNICIÓN. *MGA 0751*, *Cenizas sulfatadas*. Máximo 2.5 %, determinado en 0.200 g (sustancia seca).		
LÍMITES MICROBIANOS. La cuenta total bacteriana no debe exceder 300 UFC/g. La prueba debe de desarrollarse con 0.2 g del compuesto, pesados de manera precisa.		
ENDOTOXINAS BACTERIANAS. Menos de 10 UI/mg, si su uso es para la fabricación de preparaciones parenterales sin un procedimiento de remoción de endotoxinas bacterianas posterior.		
CONSERVACIÓN. En un contenedor protegido de la luz a una temperatura de -18 °C o menor, hasta que se libere para fabricación. Cuando se descongela, la insulina se almacena a 5 ± 3 °C y se utiliza para la fabricación en un tiempo no mayor al establecido por los estudios de estabilidad del		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
fabricante. La insulina debe estar a temperatura ambiente durante el pesado para evitar la absorción de humedad.		
ETIQUETADO. La etiqueta debe indicar que es insulina obtenida por tecnología de ADN recombinante.		
MEDICAMENTO BIOTECNOLÓGICO (INYECTABLE) ***Nota*:** el principio activo debe cumplir con las especificaciones establecidas en la monografía de insulina humana recombinante apartado de biofármaco.		
Esta monografía aplica para todas las preparaciones de insulina, cuyo principio activo es la insulina humana recombinante. Las diferencias en el modo de acción (rápida, lenta e intermedia) dependen de la formulación establecida por el fabricante, por ejemplo contenido de zinc y protamina. Las preparaciones de insulina humana recombinante son soluciones o suspensiones estériles de insulina humana provenientes de la tecnología del ADN recombinante que contienen no menos del 90.0 % y no más del 111.0 % de la cantidad de insulina indicada en el marbete.		
FABRICACIÓN Los métodos de producción deben estar diseñados para que la preparación tenga las propiedades deseadas con respecto a la duración del efecto terapéutico. En la formulación del biomedicamento se deben		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
llevar a cabo una serie de pasos con secuencia apropiada, dependiendo del método de preparación, tales como:		
Adición de preservativos.		
Adición de una o más sustancias destinadas a hacer la preparación isotónica con la sangre.		
Adición de una o más sustancias destinadas a ajustar el pH al valor predeterminado.		
Determinación de la potencia de la insulina (principio activo), seguido en caso necesario, del ajuste para que la preparación final contenga el número de unidades internacionales por mililitro requerido.		
Esterilización por filtración de la preparación conteniendo la insulina. Una vez que este procedimiento se ha llevado a cabo, todas las etapas subsecuentes deben realizarse asépticamente.		
Cuando sea necesario se adicionarán sustancias para proporcionar la forma física requerida al preparado final mismo que deberá ser llenado de manera aséptica.		
pH. *MGA 0701*. Entre 6.9 y 7.8.		
INSULINA EN EL SOBRENADANTE. Para las preparaciones de insulina cuya forma farmacéutica es suspensión, no más del 2.5 % del contenido total de insulina. Centrifugar 10.0 mL de la suspensión a 1 500 × g durante 10 min y separar cuidadosamente el líquido sobrenadante. Determinar el contenido de insulina en el líquido sobrenadante (S) por medio		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
de un método adecuado, por ejemplo, usando las condiciones cromatográficas descritas para determinar el *Contenido de insulina*. Calcular el porcentaje de insulina en solución usando la siguiente fórmula:		
$\%\ de\ insulina\ en\ el\ sobrenadante = ($		
Donde: *S* = Contenido de insulina en el sobrenadante. *T* = Contenido total de insulina determinado como se describe en Contenido de insulina.		
IMPUREZAS CON PESOS MOLECULARES MAYORES QUE EL DE LA INSULINA. *MGA 0241*, *CLAR*. Determinar por cromatografía de exclusión por tamaño. No más del 3.0 % (para preparaciones conteniendo protamina) o no más del 2.0 % (para preparaciones sin protamina) de impurezas con pesos moleculares mayores que la insulina.		
Preparación de la muestra. Añadir 4 µL de ácido clorhídrico 6 M por cada mililitro de la preparación de la muestra, ya sea solución o suspensión, hasta obtener una solución clara de insulina. Cuando se realice la toma de muestra de la suspensión, homogeneizar el contenido del material. Si una suspensión no se aclara después de 5 min de la adición inicial de ácido clorhídrico, añadir pequeñas alícuotas de ácido (menos de 4 µL/mL) hasta obtener una solución. Los preparados con concentraciones mayores que 100 UI/mL necesitan ser diluidos con ácido clorhídrico 0.01 M para evitar		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
la sobrecarga de la columna con el monómero de insulina.		
Solución de resolución. Usar una solución de insulina (aproximadamente 4 mg/mL) que contenga no más del 0.4 % de proteínas de alto peso molecular. Se puede usar el preparado de insulina inyectable ya sea en solución o suspensión, que ha sido clarificada con cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 M, conteniendo el porcentaje indicado de proteínas de alto peso molecular, o una solución preparada a partir de insulina, disuelta en ácido clorhídrico 0.01 M. Se puede preparar insulina que contenga la cantidad necesaria de proteínas de alto peso molecular, manteniendo la insulina en polvo a temperatura entre 20 y 25 °C durante 10 días. Mantener las soluciones entre 2 y 10 °C y usarlas dentro de las siguientes 30 h (para insulina soluble para inyección) o siete días (para otros preparados de insulina). Si se usa un inyector automático, mantener la temperatura de éste entre 2 y 10 °C. El procedimiento cromatográfico que se deberá llevar a cabo es:		
Fase estacionaria. Sílice gel hidrofílica para cromatografía (de 5 a 10 µm), de un grado adecuado para la separación del monómero de insulina de sus dímeros y polímeros. **Fase móvil.** Mezcla de 15:20:65 volúmenes de ácido acético glacial: acetonitrilo: solución de 1.0 g/L de arginina; filtrar y desgasificar.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos con detector UV a 276 nm, columna de 7.5 mm × 30 cm. **Velocidad de flujo.** 0.5 mL/min.		
Acondicionamiento. Antes de usar una nueva columna para análisis cromatográfico, será necesario equilibrarla por medio de inyecciones consecutivas de una solución de insulina conteniendo proteínas de alto peso molecular. Esto puede lograrse con al menos tres inyecciones de la solución de resolución. Se considera equilibrada la columna cuando se obtienen resultados repetitivos en dos inyecciones consecutivas. Si se van a analizar preparaciones que contengan protamina, el equilibrio de la columna se debe hacer con una solución que contenga protamina.		
Aptitud del sistema. Inyectar 100 µL de la solución de resolución. Cuando se registren los cromatogramas bajo las condiciones descritas, los tiempos de retención deberán ser para complejos poliméricos de insulina o el complejo covalente de insulina-protamina: de 13 a 17 min; dímero covalente de la insulina: alrededor de 17 min 30 s; monómero de la insulina: alrededor de 20 min; sales: alrededor de 22 min. Si la preparación examinada contiene preservativos, por ejemplo metilparabeno, *m*-cresol o fenol, estos compuestos eluyen posteriormente. La prueba no se considera válida a menos que la resolución, definida como la relación entre la altura del pico del dímero respecto		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
de la altura de la línea base del valle que separa el monómero del dímero sea no menor de 2.0.		
Procedimiento. Inyectar 100 µL de la preparación de la muestra. Registrar el cromatograma durante aproximadamente 35 min. En el cromatograma obtenido, la suma de las áreas de cualquier pico con tiempo de retención menor al de la insulina no debe ser mayor al 3.0 % (para preparaciones conteniendo protamina) o 2.0 % (para preparaciones sin protamina) del área total de los picos. No considerar cualquier pico con tiempo de retención mayor al del pico de insulina.		
Calcular el porcentaje de impurezas con pesos moleculares mayores con la siguiente fórmula:		
$\%\ impurezas = \left(\frac{100 \sum rH}{\sum rH + \sum rM} \right)$		
Donde: Σ*rH* = Suma de la respuesta de todos los picos de mayor peso molecular que el monómero. Σ*rM* = Suma de la respuesta de todos los picos de menor peso molecular que el monómero.		
PROTEÍNAS RELACIONADAS. *MGA 0241*, *CLAR*. No más del 5.0 % de la insulina desamido A-21, no más del 6.0 % de otros compuestos relacionados. Examinar como se describe en la prueba *Contenido de insulina*, siguiendo las condiciones de elusión que se describen en la siguiente tabla:		

CONSULTA

"2023, Año de Francisco Villa, el revolucionario del pueblo"

Dice	Debe decir	Justificación*
<table><tr><th>Tiempo (min)</th><th>Fase móvil A (% v/v)</th><th>Fase móvil B (% v/v)</th></tr><tr><td>0 – 30</td><td>42</td><td>58</td></tr><tr><td>30 – 44</td><td>42 → 11</td><td>58 → 89</td></tr><tr><td>44 – 50</td><td>11</td><td>89</td></tr><tr><td>50 – 60</td><td>11 → 42</td><td>89 → 58</td></tr></table>		
Mantener las soluciones entre 2 y 10 °C y usarlas dentro de las siguientes 24 h. **Aptitud del sistema.** Realizar la verificación de los parámetros de resolución y linealidad como se describe bajo la prueba de *Contenido de insulina*. Si es necesario, las proporciones relativas de las fases móviles se deben ajustar para asegurar la elusión completa de la insulina desamido A-21 antes de iniciar el gradiente. El perfil del gradiente también se debe ajustar para asegurar la elusión completa de todas las impurezas relacionadas con la insulina.		
Procedimiento. Inyectar 20 µL de la preparación de la muestra, 20 µL de la preparación de referencia 1, para preparaciones de insulina que contengan 100 UI/mL, o preparación de referencia 2, para preparaciones de insulina que contengan 40 UI/mL. Si es necesario, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µL de acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de linealidad descrita en la prueba de *Contenido de insulina*. Correr los cromatogramas durante		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
aproximadamente 50 min. Si es necesario, efectuar los ajustes necesarios para que los preservativos presentes en la preparación de la muestra estén bien separados de la insulina y muestren un tiempo de retención más corto. Una pequeña reducción en la concentración del acetonitrilo incrementa el tiempo de retención de los picos de insulina, relativamente más que los tiempos de retención de los preservativos. En el cromatograma obtenido ya sea con la preparación de referencia 1 o con la preparación de referencia 2, la insulina desamido A-21 aparece como un pequeño pico después del pico principal y tiene un tiempo de retención relativo de 1.3 respecto del pico principal. En el cromatograma correspondiente a la preparación de la muestra, el área del pico de la insulina desamido A-21 no debe ser mayor que 5.0 % del área total de los picos; la suma de las áreas de todos los picos, excepto de aquella debida a la insulina humana y a la insulina desamido A-21, no debe ser mayor al 6.0 % del área total de todos los picos. No considerar los picos correspondientes a los preservativos ni a la protamina.		
Calcular el porcentaje de insulina con la siguiente fórmula:		
$\% I = 100\,(rI/\sum rs)$		
Donde: *rI* = Área del pico de la insulina. Σ*rs* = Suma de las áreas de todos los picos.		
Calcular el porcentaje de insulina desamido A-21 con la siguiente fórmula:		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
$\% D = 100 (rd / \sum rs)$		
Donde: *rd* = Área del pico de la insulina desamido A-21. Σ*rs* = Suma de las áreas de todos los picos.		
Calcular el porcentaje de otros compuestos relacionados con la siguiente fórmula:		
$\% CR = 100 - (\% I + \% D)$		
ZINC TOTAL. *MGA 0331*. Entre 0.010 y 0.040 mg por 100 UI. Usar este método a menos que se especifique otro en la monografía individual con la validación respectiva. **Preparación de la muestra.** Agitar suavemente la preparación y diluir el volumen que contenga 200 UI de insulina a 25.0 mL con ácido clorhídrico 0.01 M. Diluir si es necesario hasta ajustar la concentración de zinc entre 0.4 y 1.6 µg de zinc por mililitro con ácido clorhídrico 0.01 M. **Preparación de referencia.** Usar soluciones conteniendo 0.40, 0.80, 1.00, 1.20 y 1.60 µg de zinc por mililitro, recientemente preparadas diluyendo la solución estándar de zinc (5 mg/mL de Zn) con ácido clorhídrico 0.01 M. Medir la absorbancia de la preparación de la muestra a 213.9 nm usando una lámpara de cátodo de zinc como fuente de radiación en una flama de aire-acetileno (por ejemplo 11 L de aire y 2 L de acetileno por minuto).		
ENDOTOXINAS BACTERIANAS. *MGA 0316*. No mayor de 80 UI por 100 UI de insulina.		
CONTENIDO DE INSULINA. *MGA 0241*, *CLAR*. **Preparación de la muestra.** Añadir 4 µL de ácido		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
clorhídrico 6 M por mililitro de la preparación a ser examinada, ya sea solución o suspensión, hasta obtener una solución clara. Cuando se muestree una suspensión, agitar el material para obtener una alícuota homogénea. Si la suspensión no se aclara después de 5 min de haber agregado el ácido clorhídrico, añadir alícuotas de menos de 4 µL/mL de ácido clorhídrico hasta que se obtenga una solución clara. Para una preparación que contenga más de 100 UI/mL, es necesario hacer una dilución adicional con ácido clorhídrico 0.01 M para evitar sobrecargar la columna.		
Preparación de referencia 1. Para una preparación que contenga insulina, disolver en ácido clorhídrico 0.01 M el contenido de un frasco de SRef de insulina humana para obtener una concentración de 4.0 mg/mL. Esta preparación de referencia se usa para determinar el contenido de insulina en preparaciones que tienen 100 UI/mL. **Preparación de referencia 2.** Diluir 4.0 mL de la preparación de referencia 1 a 10.0 mL con ácido clorhídrico 0.01 M. Esta preparación de referencia se usa para determinar el contenido de insulina en preparaciones que tienen 40 UI/mL.		
Preparación de referencia 3. Diluir 1.0 mL de la preparación de referencia 1 a 10.0 mL con ácido clorhídrico 0.01 M. **Preparación de referencia 4.** Diluir 1.0 mL de la preparación de referencia 2 a 10.0 mL con ácido clorhídrico 0.01 M.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Fase estacionaria. Octadecilsilil sílica gel para cromatografía (5 µm). **Fase móvil.** Las siguientes soluciones de la fase móvil prepararlas y mantenerlas a temperatura de 20 °C.		
Fase móvil A. Disolver 28.4 g de sulfato de sodio anhidro en agua y diluir a 1 000 mL con el mismo disolvente; añadir 2.7 mL de ácido fosfórico; ajustar a pH 2.3 con etanolamina si es necesario; filtrar y desgasificar.		
Fase móvil B. Mezclar 550 mL de fase móvil A con 450 mL de acetonitrilo. Calentar la solución a una temperatura de 20 °C para evitar formación de precipitados (la mezcla de la fase móvil A con acetonitrilo es una reacción endotérmica); filtrar y desgasificar. Eluir con una mezcla de 42 volúmenes de fase móvil A y 58 volúmenes de Fase móvil B.		
Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 214 nm y columna de acero inoxidable de 4.6 mm × 25 cm, manteniendo la temperatura de la columna a 40 °C.		
Aptitud del sistema. La prueba no es válida si el área del pico principal en el cromatograma obtenido con la preparación de referencia 1 o preparación de referencia 2 es 10 ± 0.5 veces el área del pico principal obtenido en el cromatograma con la preparación de referencia 3 o preparación de referencia 4. Si no se cumple este criterio, ajustar el volumen de inyección entre 10 y		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
20 µL, a manera de estar en el intervalo de linealidad del detector.		
Velocidad del flujo. 1 mL/min.		
Procedimiento. Inyectar 20 µL de la preparación de la muestra y 20 µL ya sea de la preparación de referencia 1 o preparación de referencia 3 para productos de insulina conteniendo 100 UI/mL o 20 µL de la preparación de referencia 2 y preparación de referencia 4 para productos de insulina conteniendo 40 UI/mL. Si es necesario, ajustar nuevamente la fase móvil de manera que los preservativos antimicrobianos presentes en la preparación de la muestra se separen adecuadamente de la insulina y muestren tiempos de retención menores. Una pequeña reducción en la concentración de acetonitrilo, incrementa el tiempo de retención de la insulina relativa a los tiempos de retención de los preservativos. De ser necesario, después de correr el cromatograma de una solución, lavar la columna con una mezcla de volúmenes iguales de acetonitrilo y agua hasta asegurar la eliminación de sustancias que interfieran antes de inyectar la siguiente solución. Calcular el contenido de insulina más la insulina desamido A-21, a partir del área del pico debido a la insulina humana y el área de la insulina desamido A-21 y el contenido declarado de insulina más insulina desamido A-21 en la SRef de insulina humana, 1.00 UI es equivalente a 0.0347 mg de insulina humana.		
ESTERILIDAD. *MGA 0381*. Cumple los requisitos.		

CONSULTA

"2023, Año de Francisco Villa, el revolucionario del pueblo"

Dice	Debe decir	Justificación*
CONSERVACIÓN. Entre 2 y 8 °C. Evitar la congelación.		

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

CONSULTA