

INTRODUCCION AL ESTUDIO FARMACOTECNICO DE LA
INSULINA: BASES TEORICAS PARA SU UTILIZACION EN
MEZCLAS PARENTERALES ENDOVENOSAS

M. S. SOCÍAS, M. C. BEDMAR y A. PARERA

RESUMEN

Se realiza un estudio bibliográfico de las propiedades farmacoterapéuticas de la insulina, incidiendo especialmente en la forma insulina cristalina zinc que es la habitualmente utilizada en soluciones para perfusión intravenosa. Asimismo, se realiza una revisión de los métodos de valoración de inyectables de insulina comparándolos con los clásicos métodos biológicos de valoración de la hormona.

RÉSUMÉ

On réalise un étude bibliographique des propriétés pharmacotherapeutiques de l'insuline, spécialement sur la forme d'insuline zinc cristallisée, habituellement employée dans des solutions pour perfusion intraveineuse. On fait aussi une révision des différents formes de valoración de les inyectables d'insuline par rapport aux clasiques metodes de valoración biologique de l'hormone.

SUMMARY

A bibliographic study of pharmacotherapeutic properties of insulin was carried out, paying special attention to the crystalline zinc insulin form, which is most commonly used in solutions for intervenous perfusion. In the same way the methods of evaluating insulin injections were reviewed, comparing them with the classical biological methods of evaluating this hormone.

I.—INTRODUCCION

El sistema endocrino, junto con el nervioso, tienen la misión de ajustar y correlacionar los demás sistemas orgánicos,

a los que capacitan para hacer frente a las demandas de los medios interno y externo; esta integración por parte del sistema endocrino se realiza mediante la segregación de hormonas, agentes químicos producidos por las glándulas de secreción interna que se vierten a la circulación para regular los procesos metabólicos. Dentro de él y como órgano regulador tiene gran importancia el páncreas cuya función es controlar el metabolismo de los glúcidos, papel que lleva a cabo por secreción de dos hormonas: *glucagón* e *insulina*. La primera, de naturaleza polipeptídica, desempeña un papel importante en el mantenimiento de la glucemia durante la inanición, ya que eleva la cifra de glucosa sanguínea, estimulando la glucogenolisis hepática (1); la segunda, es decir la insulina, de estructura protéica, tiene especial importancia en relación con el metabolismo de la glucosa y su defecto o exceso originan sendos síndromes clínicos perfectamente caracterizados.

El presente trabajo está especialmente dirigido al estudio de la insulina cristalina cinc por ser ésta la única que puede ser utilizada en perfusión endovenosa continua. Se revisan métodos de valoración, sentándose una serie de bases teóricas que servirán de apoyo a un posterior trabajo experimental.

1.—*Insulina endógena.*

La insulina, también llamada hormona hipoglucemiante, fue descubierta por BANTING y BEST en 1922; ya en 1921 estos autores habían conseguido obtener extractos de páncreas que contenían insulina. El nombre de la hormona se debe a DE MEYER (2).

Su naturaleza química fue totalmente esclarecida por SANGER y col. que demostraron claramente que la insulina es una proteína compleja constituida por dos cadenas polipeptídicas cuya secuencia de aminoácidos se conoce perfectamente. Estas cadenas polipeptídicas, denominadas A y B, son algo distintas: la primera, también llamada fenilalanínica consta de 30 aminoácidos y termina con un resto de fenilalanina libre; la segunda, cadena B o cadena glicilica contiene 21 aminoácidos y termina en un resto de glicina. Estas dos estructuras forman el sostén fundamental de la molécula pero existen tres puentes disulfuro, dos de ellos intercatenarios y el restante situado en la ca-

dena B. Las uniones disulfuro son esenciales para la actividad hormonal y su ruptura supone una inactivación de la insulina (3); el peso molecular de la estructura completa es de 6.000.

Las insulinas procedentes de distintas especies animales poseen estructuras algo diferentes, presentando variaciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas A y B y en la localización de los puentes disulfuro. GANONG (4) sugiere que, si bien las diferencias estructurales señaladas no afectan a la actividad biológica de la hormona, si son capaces de afectar a su actividad antigénica.

La misión fundamental de la hormona va dirigida a hacer accesible la glucosa a todos los tejidos, tanto en lo que se refiere a su conversión en energía, como en lo que respecta a los procesos de almacenamiento de la misma, convertida en glucógeno o en sustancias lipídicas.

Como la actuación metabólica de la insulina es amplia y compleja, con objeto de proporcionar una visión de conjunto de la misma señalamos en los apartados siguientes, de forma esquemática, sus funciones en distintas fases metabólicas.

1.1.—Acción sobre el metabolismo hidrocarbonado

La insulina regula la velocidad de metabolización de los hidratos de carbono actuando preferentemente en 4 niveles:

- a.—Aumentando el consumo de glucosa.
- b.—Incrementando la transformación de glucosa en lípidos (acción lipogénica).
- c.—Favoreciendo el almacenamiento de glucógeno celular.
- d.—Inhibiendo la gluconeogénesis.

Además de las misiones fundamentales sobre el metabolismo hidrocarbonado antes citadas, la insulina desempeña también un papel importante en la *regulación de la función hepática* en cuanto a sus efectos amortiguadores de la glucosa (5).

1.2.—Acción sobre el metabolismo lipídico

Deriva de su actuación sobre los hidratos de carbono y además, parecen existir otros mecanismos de acción directa de la hormona sobre los lípidos. En síntesis esta misión se traduce en un aumento del almacenamiento de grasa (6).

1.3.—*Acción sobre el metabolismo protéico.*

Asimismo, es conocida la influencia positiva de la insulina sobre el crecimiento, función que está relacionada con sus efectos sobre el *metabolismo protéico*. La insulina estimula la síntesis protéica por contribución al ahorro de proteínas derivado del aporte adecuado de glucosa intracelular que regula, por lo tanto, sólo favorecerá el crecimiento si existe un aporte adecuado de carbohidratos en la dieta, aporte que permite un ahorro celular de proteínas (7).

1.4.—*Actuación de la insulina en otros procesos orgánicos.*

Además de las actuaciones metabólicas citadas la hormona también actúa sobre los procesos orgánicos que se enumeran a continuación:

- Facilita la penetración celular de potasio con la consiguiente caída del mismo en el líquido extracelular.
- Provoca estimulación cardíaca cuando alcanza determinados niveles.
- Aumenta la secreción gástrica.
- Produce estímulo del tono y de las contracciones del estómago.

Todas estas misiones deben tenerse en cuenta cuando se administra la hormona como aporte exógeno ya que pueden traducirse en alteraciones metabólicas; por ejemplo, en caso de acidosis diabética una dosis elevada de la misma puede inducir hipopotasemia (8).

1.5.—*Mecanismo de acción.*

De la multiplicidad de efectos de la insulina se deduce que su actuación se lleva a cabo por diferentes mecanismos. En primer lugar para que pueda ejercer sus acciones se necesita una liberación de la misma a partir de las células que la sintetizan, liberación que se ve facilitada en los estados hiperglucémicos por un mecanismo de pinocitosis inversa o emecitosis. Una vez liberada la insulina se fija a los tejidos, probablemente a nivel de las membranas celulares, formando uniones entre los puentes disulfuro de la molécula y los radicales sulfhidrilos de los receptores (9).

Actualmente se cree que el mecanismo de acción de la insulina en lo que respecta a su papel sobre los *hidratos de carbono* tiene lugar por doble vía:

- Favoreciendo la penetración celular de glucosa.
- Facilitando la actuación de la hexoquinasa (10).

Como las acciones de la insulina a nivel hepático son algo distintas de las que desempeña en los demás órganos, los mecanismos de acción serán también algo diferentes y en este caso, parecen estar implicados al menos dos:

- Liberación inmediata de la glucosa hacia la sangre con la correspondiente disminución de las reservas hepáticas de glucógeno.
- Leve aceleración del metabolismo hepático de la glucosa.

El mecanismo de acción insulínico en el metabolismo lipídico consiste en bloquear la movilización de grasas, facilitando su almacenamiento a tres niveles:

- Por activación de la lipoproteína-lipasa (con disminución de los triglicéridos circulantes).
- Inhibición de la lipasa intracelular (que inhibe la lipólisis).
- Por aumento del nivel de glicerofosfato (con aumento en la síntesis de triglicéridos).

Su actuación sobre el *metabolismo protéico* se efectúa de la siguiente forma:

- Disminuyendo el catabolismo y aumentando la síntesis protéica (mecanismo indirecto a través de su actuación sobre los hidratos de carbono).
- Favoreciendo la incorporación de aminoácidos a las proteínas (mecanismo que se postula independiente del efecto insulínico sobre el metabolismo de la glucosa).
- Facilitando el transporte de aminoácidos hacia las células.

2.—*Alteraciones principales de la secreción de insulina: Diabetes.*

Es obvio que la secreción de insulina por el páncreas debe estar controlada de forma muy precisa para que su concentración sanguínea se mantenga en un valor constante y normal,

ya que la secreción pancreática de insulina constituye el principal mecanismo de regulación de la glucemia. Por lo tanto, una secreción anormal de la misma conduciría a trastornos metabólicos diversos.

De todas las alteraciones de esta secreción la que tiene mayor importancia por su frecuencia y por la gravedad de sus efectos es la debida a una falta de secreción pancreática o a una secreción insuficiente de la misma; esta alteración se conoce con el nombre de "diabetes mellitus" y se caracteriza principalmente por una imposibilidad de mantener la glucosa dentro de los niveles normales y por una incapacidad de utilización de la misma.

La enfermedad se conoce desde antiguo, ya los médicos griegos y romanos denominaban así al trastorno en el que la manifestación más representativa era la aparición de poliúria, distinguiendo además dos tipos: *diabetes "mellitus"* y *diabetes "insipidus"* según el sabor de la orina de los enfermos que la padecían (11). Actualmente el término diabetes sin calificativos, se emplea como sinónimo de diabetes "mellitus".

La enfermedad se manifiesta fundamentalmente por tres síntomas: polidipsia, poliúria y polifagia, encontrándose además como síntomas detectables hiperglucemia, glucosúria y en casos extremos, acidosis y coma diabético. Uno de los problemas más graves que se presentan en la diabetes es la aparición de numerosos trastornos del metabolismo de los principios inmediatos que, a veces, dan lugar a otras enfermedades concomitantes.

La aparición de la enfermedad puede deberse a factores hereditarios o a la presencia de otros estados cuyo papel no está muy claro; si no se instaura un tratamiento adecuado, la evolución de la enfermedad suele ser fatal.

La diabetes puede compensarse con la administración de las cantidades necesarias de insulina para que el metabolismo de los carbohidratos se normalice o por administración de hipoglucemiantes orales. La utilidad de estos últimos es muy limitada ya que poseen menor actividad y mayores contraindicaciones que la administración de insulina, por lo tanto, el tratamiento principal de la diabetes será la administración de la hormona hipoglucemiante o insulina.

II.—INSULINA COMO PREPARADO GALENICO: APLICACION

La insulina exógena, es decir, la que se utiliza como medicamento es la misma hormona de origen natural que se extrae del páncreas de distintas especies de animales.

Su campo de aplicación no queda restringido al control de la diabetes, aunque en la actualidad sea este su fin casi exclusivo, sino que puede ser empleada con otros fines; en efecto, puede administrarse como estimulante del apetito y, en pacientes con insuficiencia renal, es capaz de corregir temporalmente la hiperpotasemia por favorecer el transporte de potasio hacia el interior de las células (12). Recordemos finalmente que hace años, cuando el "electroshock" no se utilizaba en psiquiatría, algunos enfermos psicóticos eran tratados con insulina con el fin de provocarles un estado hipoglucémico conocido como "shock insulínico", de características muy similares a las que origina el "electroshock".

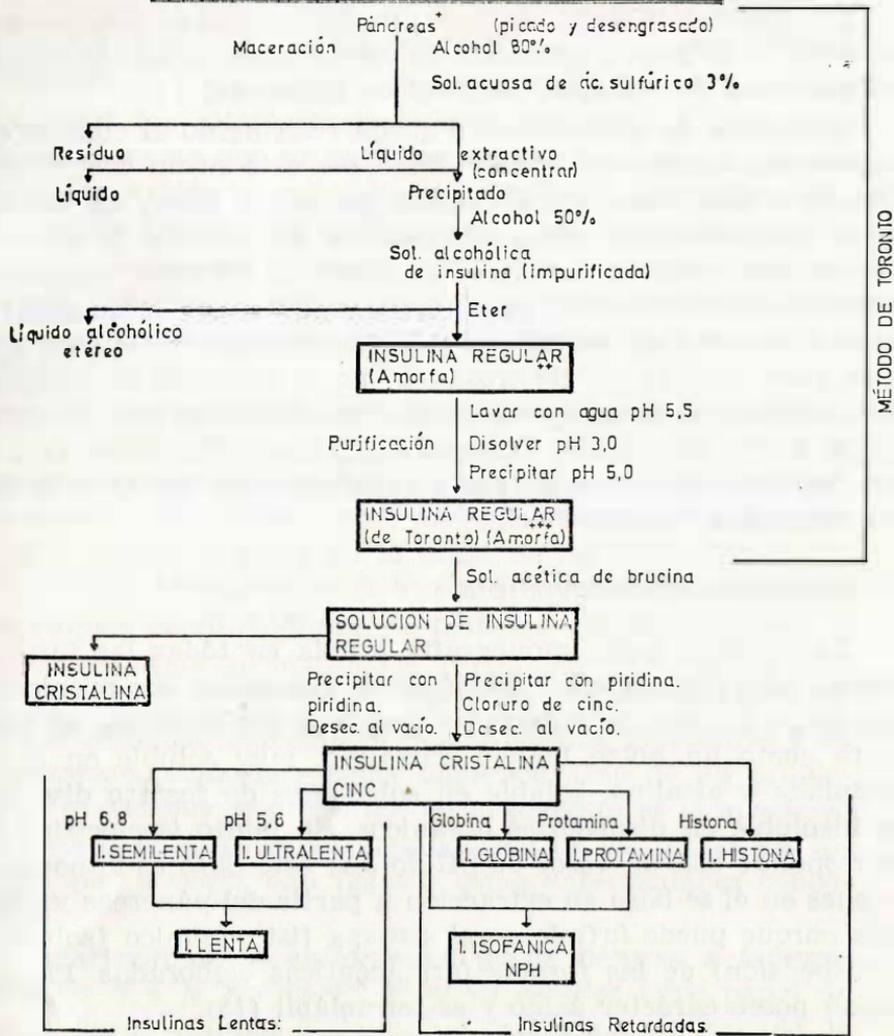
1.—*Propiedades fisicoquímicas*

La insulina posee monografía propia en todas las farmacopeas que, lógicamente, coinciden al consignar sus propiedades, entre las que cabe destacar que, una vez obtenida, se presenta como un polvo blanco cristalino, muy soluble en agua acidulada o alcalina, soluble en soluciones de fosfato disódico en insoluble en disolventes orgánicos. Su punto isoeléctrico se corresponde con un valor de pH de 5,4; este dato es importante pues en él se basa su extracción a partir del páncreas y además porque puede influir en el sistema fisicoquímico (solución o suspensión) de las formas farmacéuticas elaboradas. En solución posee carácter ácido y es termolábil (13).

2.—*Obtención y clases de insulina*

La hormona se obtiene por proceso extractivo a partir de páncreas de distintas especies animales. El fundamento general de la técnica extractiva es siempre el mismo, aunque existan numerosas modificaciones al método original. En la Fig. 1 se resume el procedimiento usual de obtención de las diferentes clases de insulina (de acción normal y de acción prolongada).

OBTENCION Y CLASES DE INSULINA



- + Bovino, porcino o humano.
- ** Gran contenido de impurezas.
- *** Menor contenido de impurezas.

Fig.1

3.—*Criterios de selección de los preparados insulínicos.*

La estructura polipeptídica de la insulina no permite su administración por vía oral, la vía rectal tampoco es recomendable y consecuentemente la vía de administración exclusiva será la parenteral, especialmente por *administración subcutánea* que permite la consecución de un efecto hipoglucemiante muy similar al determinado por la insulina fisiológica, sobre todo si se utilizan insulinas de acción intermedia.

Su administración por *vía intravenosa* (acción instantánea), sólo está justificada en casos de emergencia tales como: coma diabético, debido a que el enfermo en estas circunstancias tiene la circulación periférica tan alterada que la absorción se verifica muy lentamente y también en todos los casos en que se desee una perfecta correlación entre las dosis administradas y las necesidades insulínicas, así como en complicaciones que requieran un control preciso e instantáneo de la glucemia.

Todas las insulinas (normales o prolongadas) tienen efectividad en el tratamiento de la diabetes. La diferencia más significativa desde el punto de vista de su aplicación radica en la distinta solubilidad de ellas, por cuanto a esta propiedad va íntimamente ligada su absorción que es, en definitiva, la que determina una mayor o menor rapidez y duración de la acción hipoglucemiante.

En efecto, las más solubles son de acción rápida y corta duración, en tanto que las insolubles manifiestan su acción más tardíamente, si bien el efecto se mantiene durante mayor tiempo.

La selección adecuada del tipo de insulina se hace siempre atendiendo a las características de la enfermedad y de acuerdo con las ventajas y los inconvenientes que pueden ofrecer los distintos preparados.

Resumiendo podemos decir que las *insulinas de acción corta* pueden ocasionar fluctuaciones bruscas de la glucemia que se evitan administrándola fraccionadamente a determinados períodos de tiempo. Estas insulinas son de elección en situaciones de emergencia que requieran un descenso de la glucemia muy rápido y siempre que sea necesario complementar los efectos de las insulinas de acción media, al no obtenerse con estas últimas resultados plenamente satisfactorios.

Las insulinas de acción prolongada tienen el inconveniente de presentar un comienzo de la acción hipoglucemiante muy lento y una duración de la misma muy prolongada con posibilidad de aparición de hipoglucemia nocturna si la administración se hace por la mañana (14). Este tipo de preparados son los más ventajosos en el tratamiento habitual de la diabetes.

Hay que tener en cuenta que las insulinas en solución pueden administrarse tanto por vía intramuscular como por vía intravenosa o subcutánea mientras que las insulinas en suspensión no pueden administrarse nada más que por vía intramuscular o subcutánea; por tanto, estimamos de capital importancia considerar las modificaciones que puede experimentar la insulina como consecuencia de un cambio de disolvente o de adición a éste de otros medicamentos, ya que tales manipulaciones pueden alterar el valor del pH dentro de unos límites capaces de determinar un cambio de sistema, de tal manera que la insulina pase, de un sistema solución a otro suspensión, con el consiguiente riesgo de accidentes si se administrase por vía parenteral endovenosa.

4.—*Dosis*

Es lógico deducir que las dosis han de ajustarse individualmente de acuerdo con los resultados de las determinaciones previas de la glucemia y con los grados de alteración metabólica. Para determinar la dosis adecuada también hay que tener en cuenta la existencia de factores exógenos que pueden modificar las necesidades de insulina; entre estos factores se encuentran los procesos infecciosos y la administración conjunta del medicamento y de anestésicos generales.

Las dosis se expresan en Unidades Internacionales (U. I.) según norma establecida por el Consejo de Medicamentos de la Asociación Médica Americana, que indica que se requiere una U. I. para metabolizar 1,5 gramos de glucosa, lo que equivale a 0,04167 mg de insulina cristalina cinc, patrón internacional, que se conserva en el Laboratorio Internacional de Patrones Biológicos del "National Institute for Medical Research".

5.—Absorción, transporte y distribución

Dado que la insulina se inactiva por los sistemas enzimáticos del tubo digestivo cuando se administra por vía oral y la pequeña fracción que se escapa a este proceso no se absorbe, no deberá utilizarse esta vía para la administración del medicamento, como hemos citado en párrafos anteriores.

La hormona sólo es activa administrada por vía parenteral y sus efectos hipoglucemiantes son mayores si esta administración se efectúa antes de la ingesta puesto que en este caso la reserva de glucógeno hepático es menor. Por esta vía, la insulina se absorbe perfectamente, dependiendo su velocidad de absorción de la solubilidad del preparado insulínico utilizado; si la administración es subcutánea el medicamento queda localizado en el lugar de administración antes de pasar al torrente circulatorio y, una vez absorbido, sigue la misma ruta que la hormona de origen endógeno, siendo transportada a los lugares de acción en forma libre, o combinada a las proteínas plasmáticas, concretamente a las fracciones globulínicas Beta y Gamma (15). De la sangre pasa a los tejidos donde se fija, especialmente en músculo, hígado, riñón y tejido adiposo. La finalidad de esta fijación es la de impedir que se destruya la hormona antes de actuar sobre el metabolismo hidrocarbonado.

Para que actúe a nivel de un tejido determinado, se necesita que éste sea capaz de captar a la hormona, captación que puede llevarse a cabo en todo el organismo, excepto en los eritrocitos en el encéfalo (16).

La duración del efecto insulínico, en caso de aporte exógeno, es relativamente pequeña y no es proporcional a la dosis administrada sino que resulta ser una función simple del logaritmo de la dosis. Esto quiere decir que la insulina se inactiva en el organismo a una velocidad proporcional a la cantidad de hormona circulante. Por ejemplo, si una unidad de la misma ejerce su acción durante 4 horas, diez unidades lo harán durante 8 horas. Con ello se demuestra que el metabolismo de la insulina en el organismo sigue un modelo cinético de primer orden.

6.—*Problemas que pueden derivarse de su utilización*

La administración de un preparado insulínico puede provocar hipoglucemia, tanto en diabéticos como en individuos sanos, a consecuencia de una dosis excesiva de la hormona; según la magnitud pueden o no aparecer una serie de alteraciones con el nombre de "shock hipoglicémico"; los síndromes de éste se deben a la hipoglucemia y a la descarga de adrenalina compensadora que se produce y se manifiestan por alteraciones nerviosas y gastrointestinales y trastornos cardiovasculares (17).

Con menos frecuencia, pueden aparecer manifestaciones alérgicas (por la naturaleza protéica del principio activo y por su posible origen heterólogo), irritación en el lugar de la inyección, edemas, etc.

Es conocido que los diabéticos compensados por régimen insulínico terminan desarrollando *fenómenos de tolerancia* al preparado que se les administra. Esta tolerancia tiene su origen en la formación de anticuerpos antiinsulínicos que se localizan en los gránulos de las células Beta de los islotes pancreáticos y en la aparición de antagonistas de insulina en el plasma, unidos a las distintas fracciones protéicas. De estos últimos se conocen tres tipos, localizados en distintas fracciones del plasma. Los antagonistas aparecen espontáneamente y no son consecuencia de la administración de insulina como ocurre con los anticuerpos insulínicos, que son una respuesta del organismo a las propiedades antigénicas de la hormona.

M. LITTER (18) señala como relativamente frecuente la aparición de fenómenos de tolerancia a la insulina, si bien añade que sólo en raras ocasiones se manifiestan de forma tan acusada que hagan necesaria una elevación considerable de la dosis. Las causas son, hasta el momento, desconocidas.

7.—*Inyectables de Insulina Cristalina*

Casi todas las especialidades farmacéuticas preparadas con este tipo de insulina se preparan de acuerdo con las normas dictadas por la U. S. P. XIX en la monografía correspondiente a "Inyección de Insulina Cristalina Cinc" (19). Estas normas coinciden, en su mayor parte, con las que incluyen las demás

farmacopeas que poseen monografías para ella (20, 21, 22, 23, 24, 25).

7.1.—*Elaboración.*

Para elaborar la inyección de insulina normal se parte de agua bidestilada, estéril y apirógena, a la que se incorpora glicerina estéril, con lo que se consigue el vehículo disolvente; la proporción de glicerina puede variar entre el 0,4 y el 1,8 por ciento. A continuación, se adiciona la insulina y se ajustan adecuadamente los valores de pH para conseguir un sistema fisicoquímico solución; el ajuste se efectúa con cantidades suficientes de una sustancia ácida tampón. Es frecuente incorporar también conservadores tales como fenol, cresol, o mezcla de ambos, en una proporción que varía entre el 0,1 y el 0,25 por ciento.

La esterilización se realiza, una vez terminada la preparación del inyectable, por filtración esterilizante y nunca por calor porque se destruiría el principio activo. Como la temperatura influye mucho en la degradación de la hormona será fundamental que los inyectables se conserven en frigorífico a temperatura comprendida entre 2 y 4°C para que pueda mantener su actividad durante 2 años. Se ha demostrado que las temperaturas extremas (menores de 2°C y mayores de 15°C) aceleran mucho la inactivación.

Según los criterios de las distintas farmacopeas en las que estos inyectables poseen monografía, el frasco que los contenga debe consignar en etiqueta el contenido en insulina expresado en Unidades Internacionales (U. I.) por ml y las características de conservación.

7.2.—*Ensayos*

Todas las farmacopeas exigen la realización de ensayos de identidad, contenido en nitrógeno y cinc, residuo por calcinación y valoración de la actividad insulínica para los inyectables de insulina cristalina cinc. Las técnicas de realización de las pruebas citadas varían algo de unas farmacopeas a otras aunque los márgenes de variación de los resultados sean muy similares.

De todos los ensayos el que nos interesa especialmente es el que valora la actividad y por ello, vamos a tratarlo con más detenimiento.

7.2.1.—Pruebas de valoración de la actividad de los inyectables de insulina cristalina cinc.

Existen numerosas pruebas que valoran la actividad de los preparados insulínicos, la mayoría de *tipo biológico*, ya que por las características estructurales de la hormona es difícil efectuar una valoración química. Casi todos los métodos biológicos utilizan conejos para efectuar la valoración. Algunas farmacopeas emplean ratas entre ellas la británica (26); el fundamento es el mismo en todos los casos y está basado en una valoración del poder hipoglucemiante de un preparado de insulina de actividad desconocida respecto al que presenta un preparado patrón de actividad conocida y contrastada con el patrón internacional de insulina propuesto por la O. M. S.

El estandar internacional es de *insulina cristalina cinc* de origen bovino o porcino, correspondiendo una U. I. a la actividad hipoglucemiante de 0,04167 mg de este preparado (27). De acuerdo con esta cifra, se obtendrá, por cálculos más o menos complicados que dependerán del ensayo utilizado, la actividad de la insulina problema.

Las valoraciones biológicas son siempre muy complejas y han de realizarse cuidadosamente pues un error mínimo en la potencia de los preparados pueden ocasionar consecuencias muy graves al administrarlos; a pesar de ello, este tipo de valoraciones son las que aportan resultados más exactos y es imprescindible efectuarlas una vez que se ha obtenido el preparado insulínico.

Existen otras valoraciones biológicas con distinto fundamento. Algunos autores (28) proponen un ensayo que determina la actividad insulínica del plasma por comparación de los efectos que produce sobre algunos parámetros fisiológicos, utilizando como patrón cantidades conocidas de insulina de actividad previamente determinada.

También puede determinarse la actividad insulínica del plasma por técnicas inmunológicas en las que se emplean anticuerpos antiinsulínicos (29).

Debido a la complejidad de estos ensayos biológicos se han intentado efectuar otro tipo de pruebas de la misma naturaleza que sean de ejecución más sencilla. Los resultados de estos métodos son menos exactos que los ensayos biológicos pero pueden servir para determinaciones de pérdida de actividad de la hormona y para comparación de los distintos inyectables de insulina. Así, existen algunas *valoraciones de tipo químico*, pero por ahora, ninguna de ellas se ha podido reemplazar a los ensayos biológicos y los resultados que se obtienen de estas pruebas sólo son indicativos de pérdidas de actividad, nunca son válidos para determinaciones exactas de actividad hipoglucemiante. Entre las pruebas químicas que pueden realizarse cabe destacar un método gravimétrico útil para las soluciones simples de insulina cristalina cinc que se basa en la precipitación del principio activo a un pH de 5,4 (punto isoeléctrico) y que es inaplicable cuando exista otro material protéico en el preparado.

De estos métodos de valoración de la insulina merecen mención especial los que utilizan *cromatografía en papel*, ya que son los que dan mejores resultados (30).

Las primeras experiencias en las que se utilizó una técnica de valoración de la insulina por cromatografía en papel se deben a ROBINSON y FEHR (31) que obtuvieron unos resultados poco exactos aplicando métodos cromatográficos generales de proteínas.

Posteriormente FENTON (32) modificó estas técnicas adecuándolas a la insulina y llegó a establecer un proceso en el que los resultados que obtuvo parecen poseer una estrecha correlación con los proporcionados por el método biológico usual. Como la puesta a punto de este método para su aplicación a inyectables y mezclas de insulina con otros medicamentos será objeto de posterior trabajo, será en este en el que expondremos detenidamente la técnica y las modificaciones que hubieran de efectuarse al procedimiento de Fenton si se estima procedente.

BIBLIOGRAFIA

- (1) GUYTON ARTHUR C.: Tratado de Fisiología Médica. Edit. Interamericana S. A., 5.ª Ed., Madrid 1976, pág. 1030.
- (2) LITTER M.: Farmacología. Edit. El Ateneo., 5.ª Ed., Buenos Aires 1975, pág. 974.

- (3) MEYER, IAWETZ y GOLDFIEN: *Farmacología Clínica*, Edit. El Manual Moderno, S. A., Ed. 2.^a México 1975, pág. 408.
- (4) GANONG WILLIAN F.: *Manual de Fisiología Médica*, Edit. El Manual Moderno, S. A. Ed. 3.^a, México 1971, pág. 279.
- (5) Loc. cit. (4) pág. 281.
- (6) Loc. cit. (2) pág. 979.
- (7) Loc. cit. (1) pág. 1036.
- (8) Loc. cit. (2) pág. 978.
- (9) Loc. cit. (1) pág. 1033.
- (10) CUTTING WINDSOR C.: *Manual de Farmacología*. Edit. Montaner y Simón, S. A., Barcelona, pág. 419.
- (11) Loc. cit. (4) pág. 282.
- (12) Loc. cit. (2) pág. 939.
- (13) OSOL S., DENO R. A.: *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Edit. Mack Publishing Co., Ed. 15.^a, Easton 1975, pág. 1360.
- (14) HOOVER, J. E.: *Dispensing of Medication*. Edit. Mack Publishing Co, Ed. 8.^a, Pennsylvania 1976, pág. 542.
- (15) Loc. cit. (3) pág. 935.
- (16) Loc. cit. (1) pág. 1022.
- (17) Loc. cit. (3) pág. 412.
- (18) Loc. cit. (2) pág. 978.
- (19) U. S. P. XIX: *The United States Pharmacopoeia*, Edit. Mack Publishing Co, Easton 1975, pág. 253.
- (20) F. E. IX: *Farmacopea Oficial Española*, Ed. 9.^a, Madrid 1954, pág. 426.
- (21) *The British Pharmacopoeia 1973*, Stationery Office University Printing House, Cambridge 1973, pág. 243.
- (22) *Pharmacopea Helvetica*. Ed. 6.^a, Tomo III, pág. 303.
- (23) *Ama Drug Evaluations*, Ed. 3.^a, Publishing Sciences Group, Littleton, Massachusetts, 1977, pág. 589.
- (24) MARTINDALE: *The Extra Pharmacopoeia*, Edit. Ainleywade, Ed. 27.^a, Londres 1977, pág. 799.
- (25) *Pharmacopée Française (Códex)*, pág. 602.
- (26) Loc. cit. (21) pág. 243.
- (27) *Pharmacopoeia Internationalis*. Edit. Organisation Mondiale de la Santé, Ginebra 1957, pág. 280.
- (28) Loc. cit. (2) pág. 978.
- (29) Loc. cit. (4) pág. 278.
- (30) GARRAT D. C.: *The Quantitative Analysis of Drugs*. Edit. Chapman and Hall, Ed. 3.^a, Londres 1964, pág. 336.
- (31) Loc. cit. (30) pág. 336.
Ref: Robinson, F. A., und V. L. Fehr, *Biochem. J.* 51, 293, (1952).
- (32) Loc. cit. (30) pág. 336.
Ref.: Fenton E. L., *Biochem. J.* 71, 507, (1961).