

DOZAREA CONCOMITENTĂ A M-CREZOLULUI ȘI A INSULINEI ÎN PRODUSUL FARMACEUTIC HUMULIN R

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF M-CRESOL AND INSULIN IN HUMULIN R

²Anastasia Babileva, ¹Vladimir Valica, ³Nela Bibire, ²Livia Uncu

¹Centrul Științific al Medicamentului, IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova

²Catedra Chimie farmaceutică și toxicologică, IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova

³Universitatea de medicină și Farmacie ”Grigore T. Popa”, Iași, România

Rezumat. A fost modificată și testată metoda HPLC de determinare concomitentă a m-crezolului și a insulinei în produsul farmaceutic Humulin R. Modificările efectuate în tehnica de lucru nu au influențat asupra exactității metodei, iar rezultatele dozării arată, că conținutul de insulină și m-crezol în preparatul Humulin R se încadrează în limitele stabilite de către Farmacopeea Europeană ed. 8.0 și specificațiile de calitate. Ca rezultat, s-a realizat un avantaj plauzibil pentru analizele de rutină a preparatelor insulinice – micșorarea timpului analizei de două ori. Tehnica de lucru modificată și testată poate fi utilizată pentru evaluarea calității preparatelor insulinice prezente pe piața farmaceutică a Republicii Moldova.

Cuvinte cheie: m-crezol, insulină, metoda HPLC.

Abstract. It was modified and tested the HPLC method for simultaneous determination of m-cresol and insulin in Humulin R. The changes, that were made in working technique, did not interfere on the accuracy of the method, and the results show that insulin content and m-cresol in Humulin R preparation is within the limits set by the European Pharmacopoeia ed. 8.0 and quality specifications. As a result, an advantage has been achieved for routine analysis of preparations of insulin – shortening twice the time of analysis. Modified and tested technique can be used to assess the quality of preparations of insulin in the pharmaceutical market of Moldova.

Keywords: m-cresol, insulin, HPLC method.

Introducere

Diabetul zaharat este o boală socială, care ocupă a treia poziție în lume după maladiile cardio-vasculare și oncologice conform datelor privind mortalitatea. Aceiași legitate se respectă și în Republica Moldova, unde această maladie se situează pe al treilea loc după maladiile aparatului circulator și respirator [1]. Diabetul zaharat este periculos nu doar prin manifestările grave, dar și prin faptul, că cauzează o gamă largă de boli concomitente, care se soldează cu invaliditate, iar și cu cazuri letale, crescute de 2-3 ori în rândurile populației generale [2].

OMS menționează că “Diabetul este o epidemie neinfecțioasă a veacului 21”. Pronosticul este foarte drastic nu doar pentru sistemul ocrotirii sănătății, dar și pentru întreaga populație. În ultimii 20 de ani a avut loc creșterea cu 58% a incidenței maladii. În conformitate cu datele Federației Internaționale de Diabet, în anul 2000 a fost înregistrat un număr total al diabeticilor de 171 mln. pacienți, în anul 2003 – 194 mln., anul 2006 – 240 mln., 2011 – 366 mln., iar pentru anul 2030 se estimează că numărul total de diabetici va crește la 552 mln. [3].

Conform Rezoluției pentru diabet ONU din 2006, definiția caracterizează: “Diabetul este o boală cronică, devastatoare și costisitoare, asociată cu complicații severe, ce implică riscuri pentru pacient, familia acestuia, stat și întreagă lume”. Conform datelor Federației Internaționale de Diabet:

- în fiecare 10 secunde 2 persoane dezvoltă diabet;
- în fiecare 10 secunde o persoană decedează de diabet;

– în fiecare 30 secunde este efectuată o amputare din cauza diabetului zaharat [4].

Ultimile cercetări arată, că introducerea la timp a tratamentului cu insulină are un impact pozitiv în ceia ce privește obținerea unor valori glicemice satisfăcătoare și mai ales asupra prevenirii apariției complicațiilor diabetului. Actualmente există o gamă variată de preparate insulinice, dar un lucru este cert: pacienții cu diabet zaharat trebuie să fie asigurați pe parcursul tratamentului cu medicamente calitative și inofensive.. Acest imperativ impune respectarea tuturor cerințelor farmacopeice privind calitatea, dar și perfectarea metodelor de analiză și control, ce ar poseda o repetabilitate apreciabilă și un grad înalt de exactitate. Pentru evaluarea calității insulinei sunt folosite metode sensibile, specifice și exacte: cromatografice, spectroscopice și imunologice așa ca: cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC), electroforeză capilară, mass-spectroscopie, cromatografia ionică (de schimb ionic), cromatografia de exclusiune sterică, radioimunoanaliză, ELISA-test, PCR (reacție de polimerizare în lanț). Metoda HPLC este utilizată cel mai des în analiza insulinei. În acest studiu s-a urmărit aplicarea cromatografiei de lichide de înaltă performanță în dozarea insulinei și a conservantului m-crezol prin modificarea tehnicii de lucru în vederea micșorării duratei analizei și asigurarea accesibilității utilajului.

Material și metode

Analizele au fost efectuate la cromatograful Dionex Ultimate 3000 (TermoScientific) cu coloană Zor-

bax Eclipse XDB-C18 (AgilentTechnologies), 250*4,6 mm, mărimea particulelor 5 μm, cu numărul de serie 478663, detector UV-VIS; temperatura coloanei – 50°C; debit – 2 ml/min; coraportul fazelor mobile A:B ajustat 74:26%. pH-ul soluției a fost ajustat până la 2,333 cu ajutorul soluției tampon fosfat; concentrația acetonitrilului – 26,3%.

Tehnica de lucru: Prepararea fazelor A și B:

Faza A: S-au cântărit exact 28,4032 g sulfat de sodiu anhidru (Na₂SO₄) (în monografie este specificat 28,4 g), care au fost plasate în balon cotat de 1000 ml și s-au solubilizat în apă deionizată cu ajutorul ultrasunetului (baia cu ultrasunet). A fost adăugat 2,7 ml acid fosforic până la un pH măsurat =2,333 cu ajutorul ionometrului de laborator II-160M – pH=2,333 la temperatura 24,3°C (în monografie este specificat pH = 2,3), apoi s-a adus până la cotă cu apă deionizată. Etanolamină nu s-a adăugat, nu era cazul, pentru că nu a fost necesar de modificat pH-ul. Soluția dată a fost filtrată și degazată conform Farmacopeiei Europene ed. 8.0.

Faza B: La 750 ml faza A s-au adăugat 250 ml de acetonitril de calitate HPLC. Amestecarea s-a realizat la temperatură mai mare decât 20°C, pentru a exclude precipitarea și ținând cont de faptul, că procesul este unul endotermic. Faza B a fost filtrată și degazată, ca și faza A, conform Farmacopeiei Europene ed. 8.0.

Pentru obținerea fazei mobile pentru lucru au fost amestecate 74 volume de faza A cu 26 volume de faza B; se obține o soluție cu conținut de acetonitrilului 26,3% (după monografia faza mobilă A: f.m. B – 75%:25%). Toate soluțiile a fost preparate la temperaturi cuprinse între 20°C și 25°C.

M-crezolul este un derivat al fenolului, metilat în poziția meta. Se utilizează în calitate de conservant la prepararea soluției de insulina. Pentru determinarea acestuia a fost pregătită soluția standardă de m-crezol.

Conform specificației de calitate a producătorului, soluția standard de m-crezol trebuie să fie cu concentrația c=3mg/ml. Se cântărește pe balanța echilibrată 0,0733 g (după calcule 0,075g); se dizolvă în balon cotat de 25 ml cu acid clorhidric 0,01M și se aduce până la cotă cu aceeași solvent.

Rezultate obținute și discuții

Modificarea metodei constă în schimbarea lungimii de undă a detectorului de la λ=270 nm la λ=214 nm în decursul analizei (λ=270 nm – pentru dozarea m-crezolului și λ=214 nm – pentru dozarea insulinei). Primele 3 injecții a câte 20 μl se face soluția cu soluția de 3mg/ml a m-crezolului. După cum se observă din cromatogramă (figura 1), picul m-crezolului se observă după a 15 minută, deci pentru dozarea insulinei, după minutul 15 se schimbă lungimea de undă manual în programa cromatografului

(Chromleon (c) Dionex, version 7.1.2.1478) de la 270 nm la 214 nm, obținându-se picurile pentru insulină. Următoarele 3 injecții a câte 20 μl se fac cu soluție de referință A (soluție standard) (figura 2).

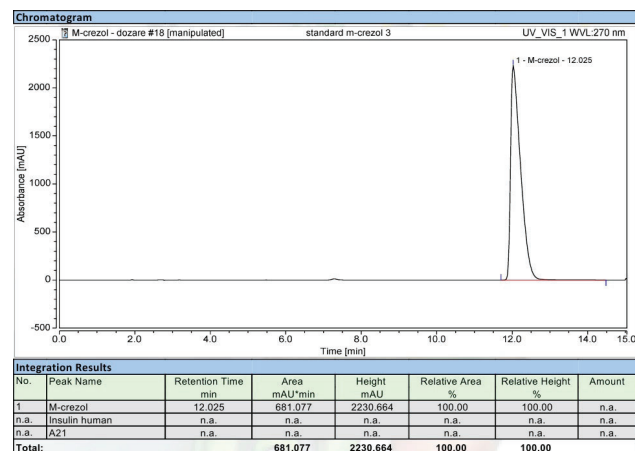


Figura 1. Cromatograma soluției standard de m-crezol pentru determinarea acestuia în produsul Humulin R

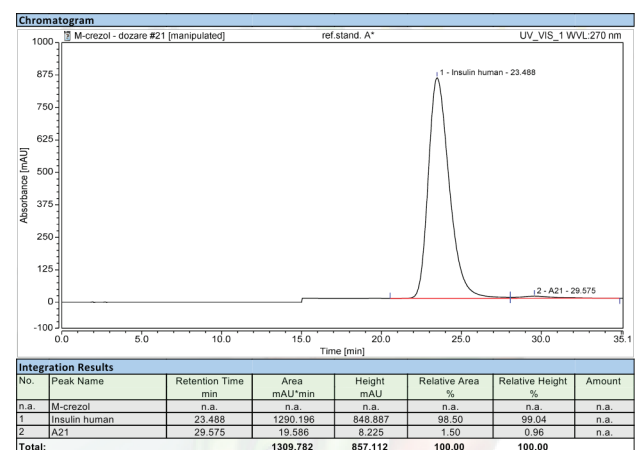


Figura 2. Cromatograma soluției standard de insulină pentru dozarea produsului Humulin R

Imediat după schimbarea lungimii de undă după minutul 15 în cromatograf se injectează câte 20 μl soluție test: 2 ml de Humulin R soluție injectabilă 100 UI/ml și 5μl HCl (conc) Cromatograma respectivă este redată în figura 3.

Din figură 3 se observă, că picul maximal corespunzător insulinei se evidențiază la un timp de retenție 22,615 min, aria acestuia fiind 1337,016 mAU*min pentru insulină din preparatul Humulin R.

La evaluarea conținutului de insulină în soluția injectabilă a fost utilizată relația:

$$UI/ml = \frac{S_{pr}}{S_{st}} \times \frac{18,3}{4,6} \times 25,64 USP = \frac{1340,526}{1309,629} \times 102 = 104,41 UI/ml$$

$$\frac{S_{pr}}{S_{st}} \times \frac{18,3}{4,6} \times 25,64 USP = \frac{1340,526}{1309,629} \times 102 = 104,41 UI/ml, \text{ în care}$$

S_{pr} – aria picului cromatografic a soluției probă,

S_{st} – aria picului cromatografic a soluției standard.

În tabelul 1 sunt redată rezultatele dozării insulinei în preparatul Humulin R.

Tabelul 1. Aria picurilor standardului și preparatului Humulin R

	standard		Humulin s.c303040a			UI/ml
	insulin	A21	sumar	insulin	A21	
1290,196	19,586	1309,782	1337,016	5,773	1342,788	104,57
1290,228	19,038	1309,266	1332,716	5,772	1338,488	104,28
1290,218	19,261	1309,839	1334,534	5,770	1340,304	104,37
		1309,629			1340,526	104,41

Conținutul impurităților de A21-dezamidoinsulină – conform metodei de normalizare – în preparatul Humulin R s-a obținut de **0,430%** (max 2%).

Toate rezultatele obținute au fost prelucrate statistic. Analiza datelor este reprezentată în tabelul 2.

S-a obținut CV egal cu 0,142, mărime acceptabilă pentru metoda HPLC de dozare, care denotă o exactitate bună a metodei (mai puțin de 3%).

Pentru calcularea conținutului m-crezolului în Humulin R, cromatograma, care este reprezentată în figura 3 se liniază altfel, în coordonate mai largi, obținându-se o cromatogramă nouă (figura 4). După care se calculează conținutul m-crezolului în insulina Humulin R.

Din figură se observă, că picul maximal corespunzător m-crezolului se evidențiază la un timp de retenție 12,116 min, aria acestuia fiind 590,720 mAU*min pentru m-crezol din preparatul Humulin R.

Tabelul 2. Prelucrarea statistica primară a datelor experimentale obținute la dozarea insulinei în preparatul Humulin R

Nr.	Mărime	Valoare, unitate de măsură
1.	Media $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$	104,41 UI /ml
2.	Domeniul R = $x_{\max} - x_{\min}$	0,29
3.	Domeniul relativ $R_r \% = \frac{R}{\bar{x}} \cdot 100$	0,277
4.	Abaterea medie $\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i - \bar{x} }{N}$	0,11
5.	Abaterea medie relativă $\bar{d}_r \% = \frac{\bar{d}}{\bar{x}} \cdot 100$	0,105
6.	Abaterea standard $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$	0,148
7.	Abaterea standard relativă (coeficient de variație) $s_r \% = CV \% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$	0,142
8.	Eroarea mediei $E = x - \mu$	0,59
9.	Eroarea relativă a mediei $E_r \% = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \cdot 100$	0,56
10.	Abaterea standard a mediei $s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N}}$	0,085

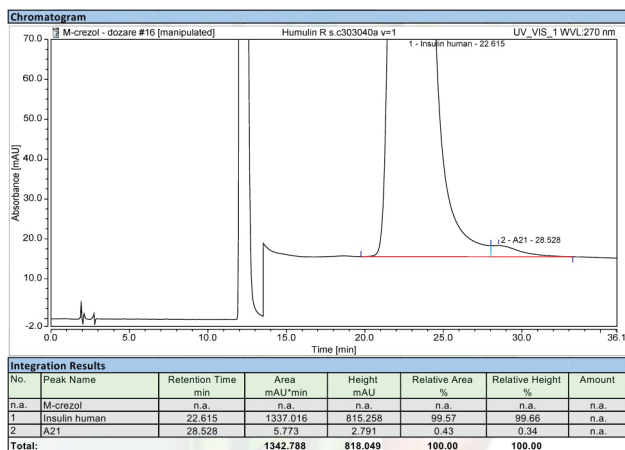


Figura 3. Cromatogramasoluției test de insulină (Humulin R) cu picul m-crezolului

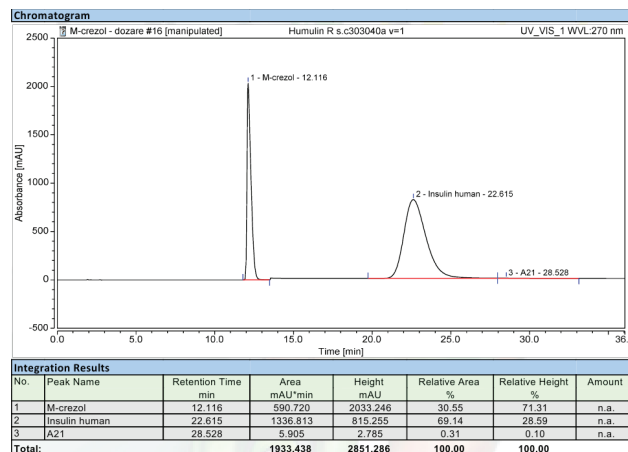


Figura 4. Cromatograma prelucrată a soluției test de insulină (Humulin R) cu picul m-crezolului

La evaluarea conținutului de m-crezol în soluția injectabilă a fost utilizată relația:

$$M\text{-crezol (Humulin R)} = \frac{Spr}{Sst} \times \frac{0,0733g}{25 ml} \times 1000 = \frac{590,896}{680,781} \times 2,932 = 2,545 \text{ mg/ml}, \text{ în care}$$

Spr – aria picului cromatografic a soluției test,

Sst – aria picului cromatografic a soluției standard de m-crezol.

În tabelul 3 sunt redată rezultatele dozării m-crezolului din preparatul Humulin R.

Tabelul 3. Aria picurilor standardului de m-crezol și a preparatului Humulin R

standard			M-Crezol s.c303040a			Conținutul m-crezol, mg/ml
R.t.	S	dev.	R.t.	S	dev	
12,025	681,077	0,0652	12,044	590,985	0,0224	2,544
12,025	681,077	0,0652	12,044	590,985	0,0224	2,544
12,033	680,189	-0,0652	12,116	590,720	-0,0224	2,546
	680,781			590,896		2,545

Concluzii

Putem afirma, că modificările efectuate în tehnica de lucru nu au interferat asupra exactității metodei, iar rezultatele dozării ne arată, că conținutul de insulină în preparatul Humulin R se încadrează în limitele stabilite de DAN (95 – 105 UI/ml). Rezultatul obținut la dozarea m-crezolului se încadrează în limitele admise de către Farmacopeia Europeană ed. 8.0 și specificații (2,25 –

2,75). Deci, s-a stabilit posibilitatea dozării insulinei concomitent cu dozarea conservantului m-crezol. Ca rezultat s-a realizat un avantaj plauzibil pentru analizele de rutină a preparatelor insulinice – scurtarea timpului analizei de două ori. Tehnica de lucru modificată și testată poate fi utilizată pentru evaluarea calității preparatelor insulinice prezente pe piața farmaceutică a Republicii Moldova.

Referințe

1. European Pharmacopoeia 8.0
2. USP 38
3. Method of Analysis: Identification and Assay of Phenol and Metacresol, A2461a. Version No.6. Draft.
4. Centrul Național de Management în Sănătate (www.cnms.md)
5. Ordinul MS al RM nr.507 din 29.12.2008 – Protocol clinic național "Diabetul zaharat necomplicat"
6. World Health Organization: WHO (www.who.int)
7. United Nations Resolution 61/225, 20.12.2006 (www.idf.org) – International Diabetes Federation
8. Specifications (insulin human).