



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

242 808

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 22 12 84
(21) PV 10293-84

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 30/26
C 07 K 7/40

(40) Zveřejněno 31 08 85
(45) Vydáno 01 04 88

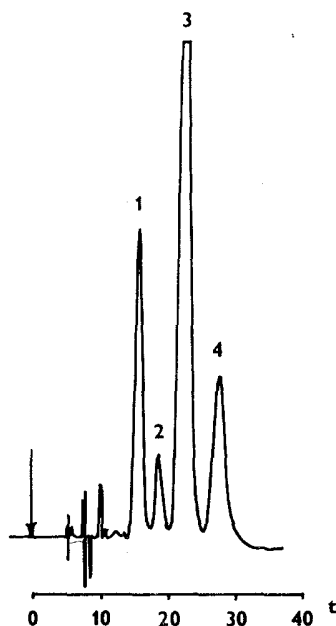
(75)
Autor vynálezu

MILLER VLADIMÍR RNDr. CSc.;
KRAUS EDUARD, PRAHA

(54)

Způsob stanovení složení a aktivity insulinu

Analyzovaný vzorek se za vhodných chromatografických podmínek rozdělí na hovězí a vepřový insulin a jejich mono-desamidoderiváty a z příslušných elučních křivek se vypočítá jejich procentuální zastoupení. Porovnáním s vhodným standardem se zjistí biologická aktivita analyzovaného vzorku insulinu. Způsob je rovněž vhodný pro operativní stanovení insulinu během výroby, počínaje prvním zahuštěním alkoholického extraktu.



Vynález se týká způsobu stanovení složení a aktivity insulínu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií.

Jedním z dosud používaných technologických postupů při výrobě insulínu je jeho izolace ze zvířecího pankreasu, nejčastěji hovězího nebo vepřového původu. Podle toho, jaký biologický materiál je brán do výroby, je možno získat buď monokomponentní např. hovězí nebo vepřový insulin, nebo směsný insulin, obsahující oba druhy insulínu. Procentuální zjištění obsahu hovězího nebo vepřového insulínu a odpovídajících monodesamidodérivátů, vznikajících při výrobě jako rozkladné produkty, má velký význam při sledování efektivnosti výroby z různě kvalitního biologického materiálu i při hodnocení kvalitativního složení a účinnosti získaných substancí insulínu a z nich vyráběných lékových forem.

Současný způsob stanovení insulínu, především v substancích a lékových formách, je založen na biologických testech na živých králících nebo myších. Tento způsob hodnocení insulínových přípravků je materiálně a časově náročný (jedno stanovení vyžaduje pokusy na nejméně 40 králících a trvá 7 dní; pro zkoušky na myších je nutno pro jedno stanovení 96 myší), je pracný, málo přesný (získaný výsledek má povolenou odchylku $\pm 10\%$), neposkytuje žádné informace o kvalitativním složení vzorků a není ho možno použít pro operativní zjišťování kvality právě vyráběného insulínu.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob stanovení složení a aktivity insulínu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií za použití mobilní fáze tvořené směsí rozpouštědel typu acetonitrilu a vodného pufru při teplotě kolony 35° až 45°C a průtoku mobilní fáze 0,3 až 0,5 ml/min, podle vynálezu, který se vyznačuje tím, že se do mobilní fáze přidá pufr, připravený z modifikátoru typu primárního aminu o 6 až 12 atomech uhlíku v množství 0,15 až 2 ml/1000 ml vody, přičemž vzniklá vodná suspenze se rozpustí

úpravou pH na hodnotu 2,0 až 3,0 přidavkem kyseliny fosforečné a stanovení se provede porovnáním změřených ploch elučních křivek rozdělených složek insulinu zkoumaného vzorku a standardu.

Způsob podle vynálezu se dále vyznačuje tím, že se vodný pufr, připravený z 1,6 ml 2-ethylhexylaminu v 1000 ml vody, po úpravě kyselinou fosforečnou na hodnotu pH 2,2, přidá do mobilní fáze v poměru 72,8% obj. : 27,2% obj. acetonitrilu a stanovení se provede ultrafialovou detekcí při vlnové délce 280 nm.

Způsobem podle vynálezu je zkoumaný insulinový vzorek chromatograficky rozdělen na jednotlivé složky. Toto rozdělení je možné přítomností 2-ethylhexylaminového pufru o pH 2,2 v mobilní fázi. Plochy elučních křivek rozdělených složek insulinu odpovídají jejich hmotnostnímu zastoupení v analyzovaném vzorku a je možno z nich vypočítat i jejich procentuální obsah. Porovnáním součtu ploch elučních křivek všech oddělených složek zkoumaného insulinu s plochou změřenou u vzorku insulinu o známé biologické aktivitě (např. u národního standardu) je možno stanovit biologickou aktivitu měřeného insulinového preparátu.

Největší výhoda způsobu podle vynálezu je v tom, že stanovení složení a aktivity insulinu není závislé na biologickém faktoru. Tím přináší způsob podle vynálezu velkou časovou úsporu a umožňuje operativní stanovení insulinu do 1 hodiny, nemluvě o ušetřených nákladech při jinak nutném chovu králíků a myší pro biologické testy. Neméně důležitá je skutečnost, že způsobem podle vynálezu se jednoduchou metodou dosáhne přesných výsledků (průměrná odchylka stanovení byla ±3%), a tím se umožní přesná a rychlá mezioperační kontrola aktivity substance před výrobou insulinových injekčních forem, poskytující tak možnost přesného nastavení obsahu insulinu na požadovaných 40 m.j. v 1 ml injekčního roztoku. Možnost zjišťovat složení insulinových substancí včetně rozkladných produktů, má rovněž velký význam při nákupu či prodeji insulinu. Způsob podle vynálezu byl též s úspěchem použit pro kontrolu zahuštěného extraktu z biologického materiálu a dalších technologických stupňů při výrobě insulinu; tak lze sledovat ztráty vznikající během výroby a optimalizovat technologické postupy dosud používané při výrobě insulinu.

Způsob podle vynálezu je názorněji vysvětlen na přiložených výkresech.

Na obr.1 je znázorněna separace

standardního roztoku insulinu připraveného podle bodu B/ za podmínek uvedených v bodě E/ v závislosti na časové ose t (v minutách). Na obr.2 je uveden příklad chromatografické separace vzorku injekčního roztoku insulinu připraveného postupem uvedeným v příkladu 2 v závislosti na časové ose t (v minutách) a na obr.3 je příklad separace vzorku alkoholického extraktu z výroby insulinu připraveného postupem uvedeným v příkladu 3 opět v závislosti na časové ose t (v minutách).

Na těchto obrázcích znamenají vrcholy elučních křivek toto:

- 1 - hovězí insulin
- 2 - desamidohovězí insulin
- 3 - vepřový insulin
- 4 - desamidovepřový insulin
- 5 - konzervační činidlo

Následující příklady provedení způsob podle vynálezu pouze dokládají, ale nijak neomezují.

Příklad 1

A/ Příprava 2-ethylhexylaminového pufru

Do 1000 ml kádinky odměříme asi 950 ml destilované vody, z dělené pipety přidávujeme 1,6 ml 2-ethylhexylaminu a za míchání a kontroly pH přidáváme zředěný roztok kyseliny fosforečné až do výsledné hodnoty pH 2,2. Destilovanou vodou pak doplníme roztok na 1000 ml objemu.

B/ Příprava standardního roztoku insulinu (například z národního standardu)

Na mikrováhách navážíme do malé uzavíratelné lékovky několik mg standardu insulinu a z přesné mikrobyrety přidáme takový objem 20% roztoku okyseleného acetonitrilu, aby konečná koncentrace byla 1 mg standardu v 1 ml roztoku. Po dokonalém rozpuštění dávkujeme 25 μ l roztoku na chromatografickou kolonu.

C/ Příprava vzorku zkoumaného insulinu (substance)

Vzorek připravíme podle předchozího postupu B a na chromatografickou kolonu dávkujeme též 25 μ l roztoku.

D/ Příprava 20% roztoku acetonitrilu

Do 20 ml acetonitrilu ve 100 ml odměrné baňce doplníme ke

značce 0,1% roztok kyseliny fosforečné v destilované vodě.

E/ Chromatografie

Kapalinový chromatograf s kolonou o rozměrech 25 x 0,3 cm nebo 30 x 0,4 cm plněnou silikagelem o velikosti částic 5 nebo 10 μ m modifikovaným oktadecylovými zbytky a teplotou kolony 40°C. Jako mobilní fáze byl použit roztok 27,2% obj. acetonitrilu a 72,8% obj. vodného 2-ethylhexylaminového pufru. UV fotometrická detekce byla provedena při vlnové délce 280 nm a citlivosti 0,01 absorbanční jednotky. Vyhodnocení chromatografického záznamu bylo provedeno integrátorem i ruční triangulací. Na kolonu bylo dávkováno 25 μ l roztoku insulínu (viz obr.1).

Výpočet aktivity vzorku substance (m.j./mg):

$$\text{aktivita vzorku} = \frac{\text{aktivita standardu} \times \text{suma ploch vzorku}}{\text{suma ploch standardu}}$$

Příklad 2

Příprava vzorku zkoumaného insulínu (injekce)

Celý obsah ampule kvantitativně přeneseme do uzavíratelné skleněné nádoby, přidáme 10,0 ml okyseleného roztoku 20% acetonitrilu (připraveného podle Příkladu 1) a dobře protřepeme. Na kolonu dávkujeme 25 μ l, podmínky chromatografie jako v příkladu 1, graf viz obr.2.

Výpočet aktivity injekčního roztoku (m.j./ml):

$$\text{aktivita inj. roztoku} = \frac{\text{aktivita standardu} \times \text{suma ploch vzorku}}{\text{suma ploch standardu}} \times 2$$

Příklad 3

Příprava vzorku alkoholického extraktu z výroby insulínu

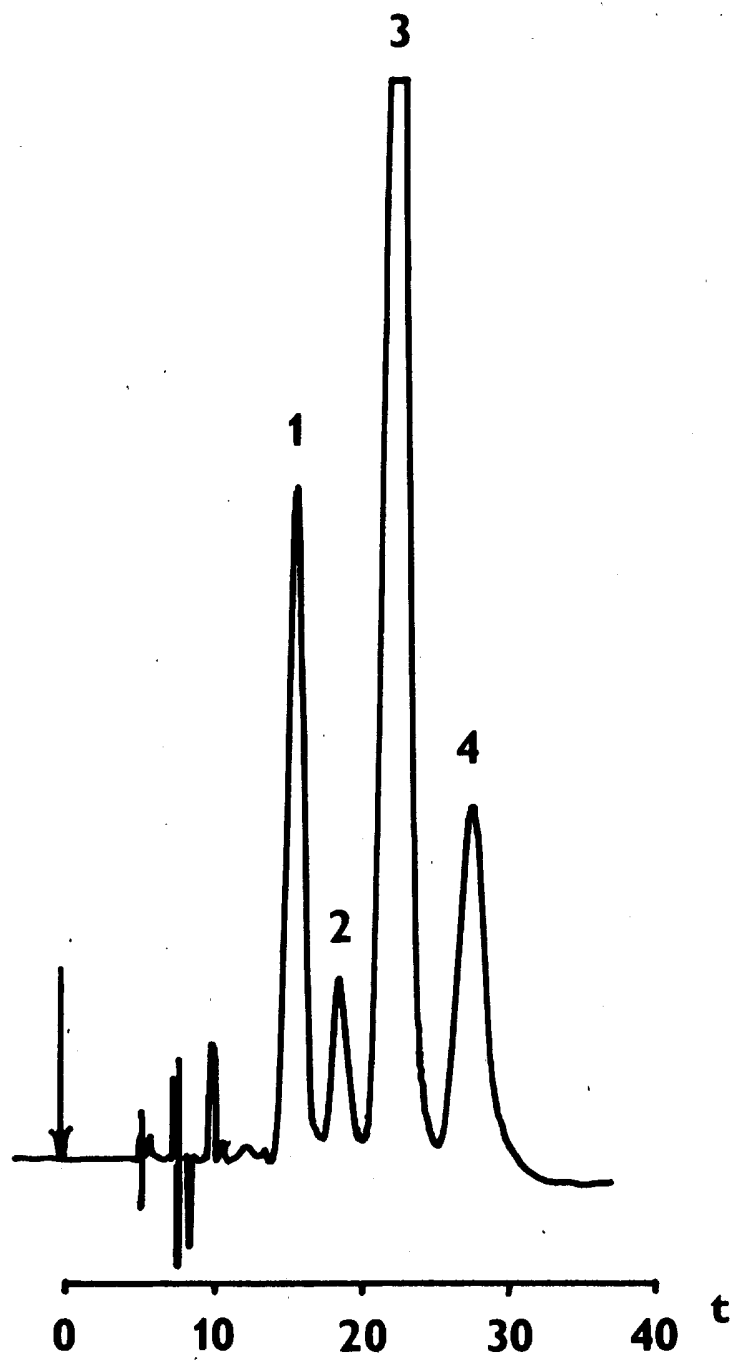
Vzorek zahuštěného alkoholického extraktu pankreasu zfiltrujeme přes skleněnou fritu G2 a 25 μ l filtrátu dávkujeme na kolonu. Aktivitu vzorku v m.j./ml tohoto roztoku změříme metodou vnějšího standardu. Podmínky chromatografie jako v příkladu 1, graf viz obr.3.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

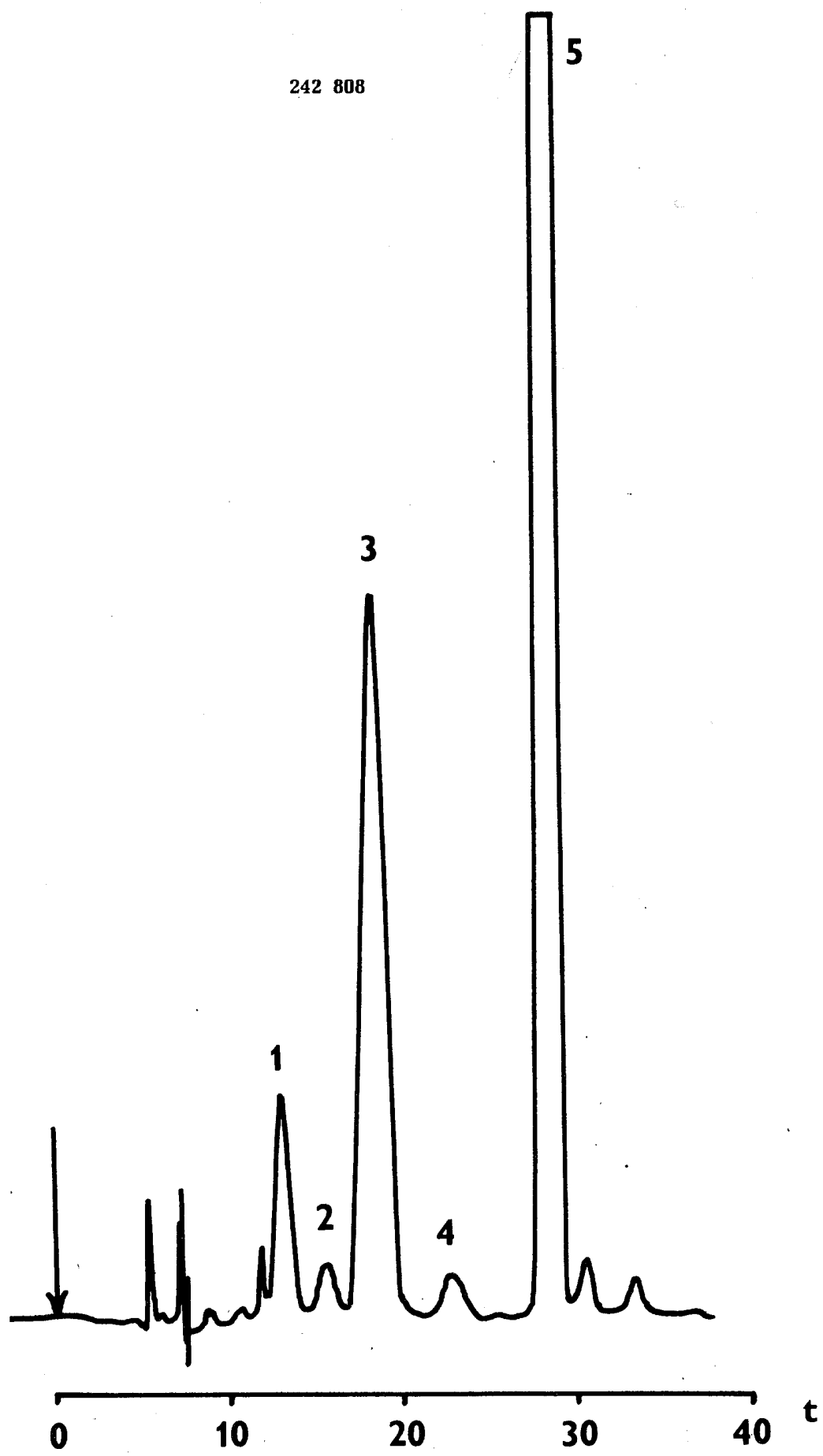
242 808

1. Způsob stanovení složení a aktivity insulinu kapalinovou chromatografií za použití mobilní fáze tvořené směsí rozpouštědel typu acetonitrilu a vodného pufru při teplotě kolony 35° až 45°C a průtoku mobilní fáze 0,3 až 0,5 ml/min, vyznačující se tím, že se do mobilní fáze přidá vodný pufr, připravený z modifikátoru typu primárního aminu o 6 až 12 atomech uhlíku, v množství 0,15 až 2 ml/1000 ml vody, přičemž vzniklá vodná suspenze se rozpustí úpravou pH na hodnotu 2,0 až 3,0 přidávkem kyseliny fosforečné a stanovení se provede porovná-
ním změřených ploch elučních křivek rozdělených složek insulínu zkoumaného vzorku a standardu.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vodný pufr, připravený z 1,6 ml 2-ethylhexylaminu v 1000 ml vody, po úpravě kyselinou fosforečnou na hodnotu pH 2,2, přidá do mobilní fáze v poměru 72,8% obj. : 27,2% obj. acetonitrilu a stanovení se provede ultrafialovou fotometrickou detekcí při vlnové délce 280 nm.

3 výkresy

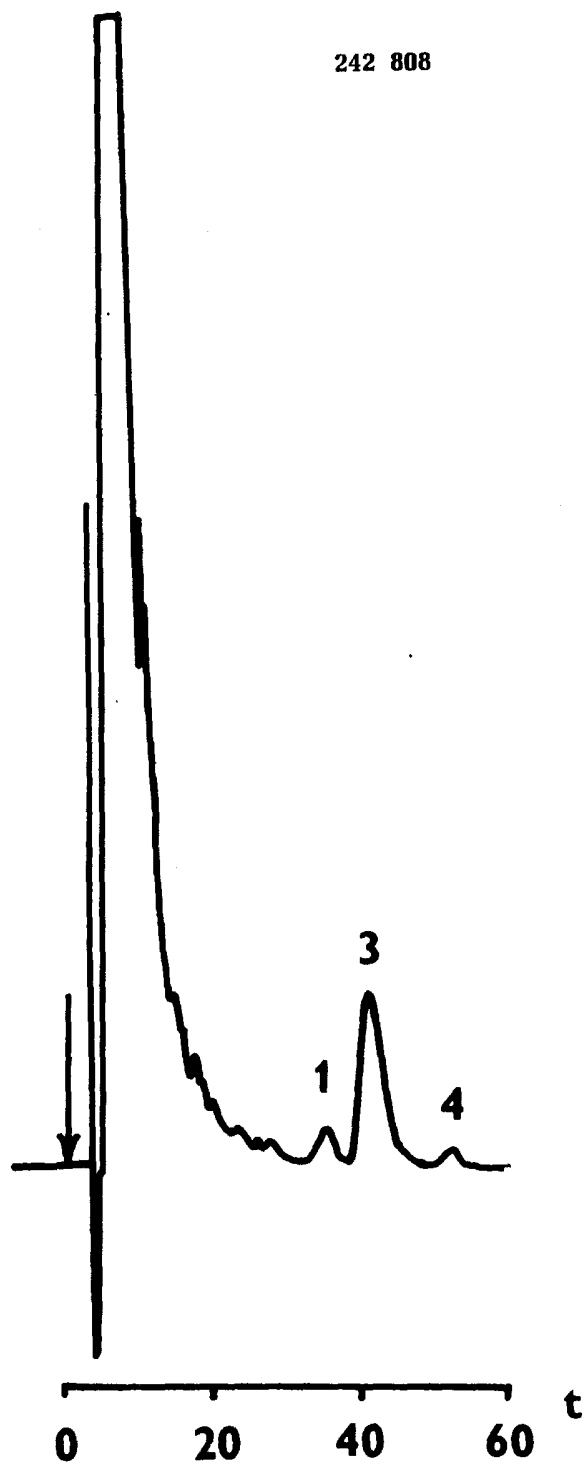


Obr. 1



Obr. 2

242 808



Obr. 3