

UTILIZAREA GEL-FILTRĂRII LA SEPARAREA ȘI DETERMINAREA STABILITĂȚII UNOR PREPARATE HORMONALE RETROHIPOFIZARE

dr. V. Bota, I. Máthé

Filtrarea pe gel de Sephadex este o metodă modernă de lucru care, încă de la început, a fost asociată cu izolarea hormonilor peptidici din glanda pituitară (1). Între aplicațiile gel-filtrării se cunoaște purificarea ocitocinei naturale (2) și utilizarea în scopul separării preparative a unor substanțe cu masă moleculară scăzută (3).

Am utilizat gel-filtrarea la determinarea purității unor preparate farmaceutice de ocitocină sintetică și la determinarea stabilității lor, folosind coloane de Sephadex G₁₅ și G₂₅. Prin această metodă am studiat comparativ comportarea unui produs de ocitocină sintetică expirată și neexpirată. De asemenea am supus filtrării pe gel G₁₅ și G₂₅ un produs farmaceutic preparat din glande de bovine sau porcine.

Material și metodă

Preparatele farmaceutice cercetate au fost soluțiile apoase de ocitocină „Richter“ (Budapesta), fiole de 1 ml, conținând 3 U.I./ml cu data de

expirare 1 decembrie 1974; ocitocină „Galenika“ (Belgrad), fiole de 1 ml, conținând 5 U.I. pe ml cu data de expirare mai 1971 și preparatul posthipofizar „Biofarm“ (București), flacoane de 1 g pulbere, cu activitate vasopresoare de 1000 U.I./g.

S-a folosit gel de dextran G₁₅ și G₂₅ (Pharmacia Uppsala). Prepararea coloanelor de gel s-a făcut după procedeul descris de Flodin (4), după ce dextranul a fost lăsat să se umfle peste noapte. În tabelul nr. 1 sînt date caracteristicile coloanelor folosite.

Tabelul nr. 1

Tipul de Sephadex	Lungimea coloanei cm	Ø cm	V _i ml	V _o ml	Viteza de eluție
G ₁₅	35	1,1	33,24	16	
G ₂₅	30	0,9	19,07	10	15ml/h
G ₂₅	54	1,1	51,29	24	

Substanțele s-au aplicat pe coloane după dizolvare în apă. Concentrațiile soluțiilor apoase supuse filtrării au fost:

Ocitocina „Richter“ 0,6 ug/ml și 1,2 ug/ml

Ocitocina „Galenika“ 0,55 ug/ml.

Preparatul de retrohipofiză „Biofarm“ s-a tratat cu H₂SO₄ pentru dizolvare (0,2 g + 5 ml H₂SO₄ 0,01 N apă ad 100 ml) și după filtrare s-au introdus în coloană 2ml. S-a încercat de asemenea dizolvarea în acid acetic 0,2 M (0,1 g preparat + 100 ml acid acetic 0,2 M) și după filtrare s-au introdus în coloană 3 ml. Eluarea s-a făcut cu apă și în cazul preparatului de retrohipofiză și cu acid acetic 0,2 M. Deoarece reacția de culoare cu reactivul Folin-Ciocalteu este atribuită resturilor tirozinice din molecula proteinelor pentru comparare s-a supus filtrării pe gel și o soluție apoasă de tirozină (0,1 ug/ml) cantitatea introdusă fiind de 1 ml.

S-au selectat fracțiuni de 2 ml care au fost tratate cu reactivul Folin-Ciocalteu (5). Extincțiile s-au citit în abanda de adsorbție de 570 nm. Reprezentînd în funcție de extincție volumul de eluție (V_e) s-au obținut diagramele de eluție.

Rezultate și discuții

Utilizînd o coloană umplută cu dextran G₁₅ pentru cele trei produse — ocitocina „Richter“, ocitocina „Galenika“, retrohipofiza „Biofarm“ — și pentru tirozină s-au obținut curbe de eluție prezentînd un singur maxim la un V_e bine definit, ceea ce arată că substanțele studiate ar fi produși unitari. Rezultatele obținute sînt redată în tabelul nr. 2.

În cazul folosirii unei coloane de dextran G₂₅ cu V_i = 19,07 se obțin curbe de eluție care prezintă un maxim pronunțat și alt maxim mai aplătizat.

Din valorile diferite ale volumului de eluție maxim V_e se poate constata că cele două produse de ocitocină sintetică sînt diferite iar V_e maxim al retrohipofizei nu corespunde nici uneia dintre ele.

Tabelul nr. 2

Tipul de Sephadex	Produsul	Cantitatea aplicată	V_t	V_e ml
G ₁₅	Ocitocina „Richter“	1,2 ug/2ml	33,24	79,5
	Ocitocina „Galenika“	1,1 ug/2ml	33,24	79,0
	Retrohipofiza „Biofarm“	2,0 ml (*)	33,24	14,0
	Tirozina	0,1 mg/ml	33,24	28,0

(*) concentrația este indicată la metodă.

Tabelul nr. 3

Tipul de Sephadex	Produsul	Cantit. aplicată	V_t	* V_e
G ₂₅	Ocitocina „Richter“	1,2 ug/2ml	19,07	16; 26—27
	Ocitocina „Galenika“	1,1 ug/2ml	19,07	26,5; 38—39
	Retrohipofiza „Biofarm“	2 ml	19,07	12; 27
	Tirozina	0,1 mg/ml		24

Utilizînd coloane mai mari cu Sephadex G₂₅ avînd $V_t = 51,29$ ml s-au obținut curbele de eluție reprezentate în figurile nr. 1 și 2.

Din studiul acestor curbe de eluție se poate trage concluzia că ocitocina „Richter“ este un produs unitar pe cînd ocitocina „Galenika“, cu termenul de valabilitate expirat este un produs neunitar. Cele două ocitocine

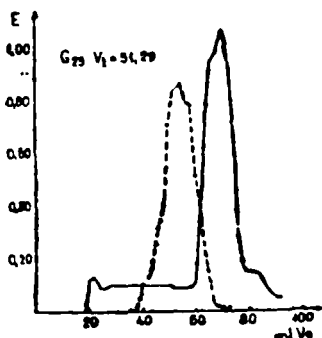


Fig. nr. 1: Curba de eluție a preparatului de ocitocină „Richter“ (—) și curba de eluție a preparatului de ocitocină „Galenika“ (---).

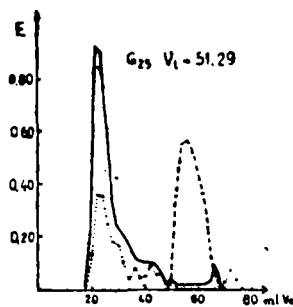


Fig. nr. 2: Curba de eluție a preparatului de retrohipofiză „Biofarm“, eluant apa (—) și acid acetic 0,2 n (....). Curba de eluție a tirozinei, eluant apa (-----).

au volumul de eluție maxim diferit, prezentându-se deci ca două produse diferite. În cazul ocitocinei „Galenika“ se observă și existența altor fracțiuni eluate înaintea produsului principal cât și după aceea. Aceste fracțiuni ar putea fi peptide sau aminoacizi. Peptidele eluate ar trebui să aibă o masă moleculară mai mare, căci părăsesc coloana înaintea produsului principal, ceea ce nu ar fi în concordanță cu presupunerea unei hidrolize a ocitocinei în substanțe cu o masă moleculară mai mică. În cazul unor substanțe cu masă moleculară mică au fost semnalate fenomene care nu pot fi explicate numai pe baza principiului separării prin excluziune. Retardarea eluării unor substanțe în timpul cromatografierii prin gel a fost denumită „adsorbție reversibilă“ (6). Efectul observat este dependent și de compoziția eluantului (7). În asemenea cazuri K_{av} este adesea mai mare decât 1. Existența acestui proces și în cazul produselor studiate de noi rezultă din curbele de eluție obținute și din valorile K_{av} calculate din tabelul nr. 4.

Tabelul nr. 4

Produsul	V_e ml	K_{av}
Ocitocina „Richter“	44	1,09
Ocitocina „Galenika“	69	1,64
Retrohipofiza „Biofarm“	67	1,58

Pentru produsul de retrohipofiză „Biofarm“ curbele de eluție obținute, folosind ca eluent apă (fig. nr. 2) și acid acetic 0,2 M (fig. nr. 2), arată mai multe maxime, evidențiate mai bine în cazul eluării cu acid acetic. Maximul prim mai pronunțat ar putea să corespundă vasopresinei sau unui asociat proteic al acesteia iar cel de-al doilea maxim, care are $V_e = 67$ ar corespunde ocitocinei prezente în cantitate mică avînd o valoare apropiată de cea a maximumului observat pe curba de eluție a produsului „Galenika“ cu $V_e = 69$.

Studiul efectuat asupra acestor hormoni peptidici a arătat că folosirea Sephadex-ului G₂₅ poate evidenția omogenitatea sau neomogenitatea produselor cercetate precum și existența unor procese de degradare.

Sosit la redacție: 15 ianuarie 1974.

Bibliografie

1. Porath J., Schally A. V.: Endocrinology (1962), 70, 738; 2. Yamashiro D.: Nature (1964), 201, 76; 3. Lindner E. B.; Elmqvist E. B., Porath J.: Nature (1965), 184, 1565; 4. Flodin P.: J. Chromatog. (1960), 3, 339; 5. Graser H.: Biochemisches Praktikum, Ed. VEB Deutscher Verlag Wissensch. Berlin, 1971, 62; 6. Determann H.: Gel Chromatography, Ed. Springer Verlag Berlin, Heidelberg New York, 1969, 81; 7. Gelotte B.: J. Chromatog. (1960), 3, 330.