

FABAD Farm. Bil. Der.
16, 203 - 207, 1991

FABAD J. Pharm. Sci.
16, 203 - 207, 1991

YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE İNSÜLİN PREPARATLARINDA FENOL VE KREZOL TAYİNİ

Pınar BULUT(*)
Mürüvvet NİĞDELİOĞLU(*)
Gönül ÜSTÜN(*)

Özet: Bu çalışmada insülin preparatlarında fenol ve krezol tayini için HPLC yöntemi uygulanmıştır. Yönteme göre mobil faz içinde yaklaşık 50 µg/ml fenol ve 120 µg/ml krezol içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Çalışmada RP-8 kolon kullanılmış, mobil faz (Su: M KH₂ PO₄ (3.2 g/L derişik fosforik asit içeren) : Asetonitril) (600:100:300) ile hazırlanmıştır. Dalga boyu 270 nm ve akış hızı 1 mL/dak olarak ayarlanmış ve 50 µl enjekte edilmiştir.

DETERMINATION OF PHENOL AND CRESOL IN INSULIN PREPARATIONS BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD

Summary: In this study, the HPLC method is carried out for the determination of phenol and cresol in insulin preparations. According to the method, the sample and reference solutions containing 50 µg/ml phenol and 120 µg/ml cresol are diluted with mobil phase. Mobil phase is prepared with water, molar KH₂ PO₄ containing 3.2 g/L concentrated phosphoric acid and acetonitrile (600:100:300). The absorbance wavelength is 270 nm, flow rate is 1 mL/min and injection volume is 50 µl. RP-8 column was used.

Key words : *Insulin, Phenol, Cresol, HPLC*

Başvuru Tarihi : 27.3.1991

Kabul Tarihi : 13.6.1991

(*) Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, İlaç ve Kozmetik Araştırma Müdürlüğü - Ankara, TÜRKİYE

GİRİŞ:

Enjektabl insülin preparatlarında koruyucu olarak fenol ve m-krezol kombine veya tek olarak kullanılmaktadır. Literatürde fenol miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi (1-4), gaz kromatografisi (5, 6) ve demir (III) klorür ile kolorimetrik yöntem (7) bildirilmiştir. Ayrıca aşılarda fenol tayini için 4-aminoantipirin ile kolorimetrik yöntem farmakopelerde yer almaktadır (8, 9).

GEREÇ VE YÖNTEM:**Gereçler:**

Sıvı Kromatografi: Shimadzu LC-6 A. Cihazın SPD-6 A Model UV Spektrofotometrik Dedektörü ve C-R3A Model integratörü vardır.

Referans Standart olarak fenol (Merck) distile edildikten sonra kullanılmıştır. m-Krezol (Kabi, Lot 48939) İltas firmasından sağlanmıştır. Kimyasal madde-ler ise analitik safliktadır.

Yöntem:

Yaklaşık 50 µg/ml fenol ve 120 µg/ml krezol içerecek şekilde mobil faz ile hazırlanan çözeltilerden 50 µl enjekte edilmiştir. İşlemden aşağıdaki HPLC koşulları uygulanmıştır:

Kolon : RP- 8 (Lichrospher 100 RP-8)

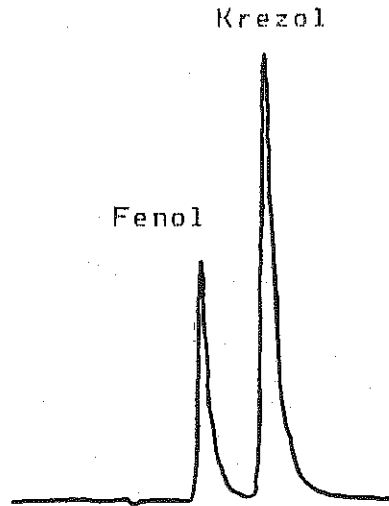
Mobil Faz : Su: Molar KH_2PO_4 (3.2 g/L derişik fosforik asit içeren): Asetonitril (600:100:300)

Dalga Boyu: 270 nm

Akış hızı : 1 mL/dakika

BULGULAR:

1 - HPLC Kromatogram: Referans çözeltilinin kromatogramı alınmış ve tutulma süreleri fenol için 4.9 dakika, krezol için 6.6 dakika bulunmuştur (Şekil 1). Resolusyon ise yaklaşık 0.8 olarak hesaplanmıştır.

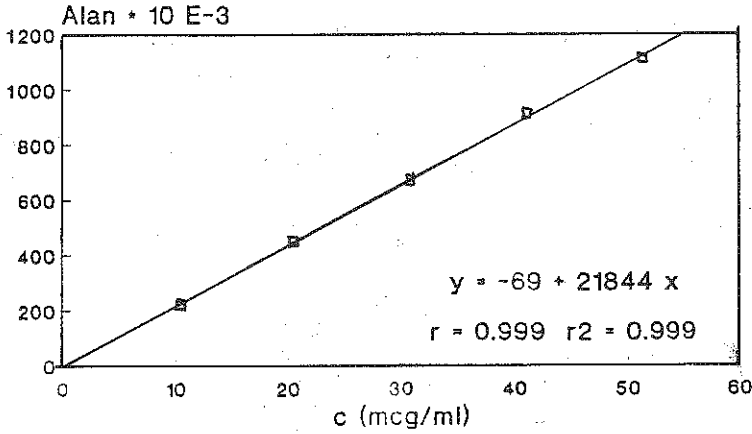


Şekil 1 - Fenol ve Krezol'ün HPLC Kromatogramı

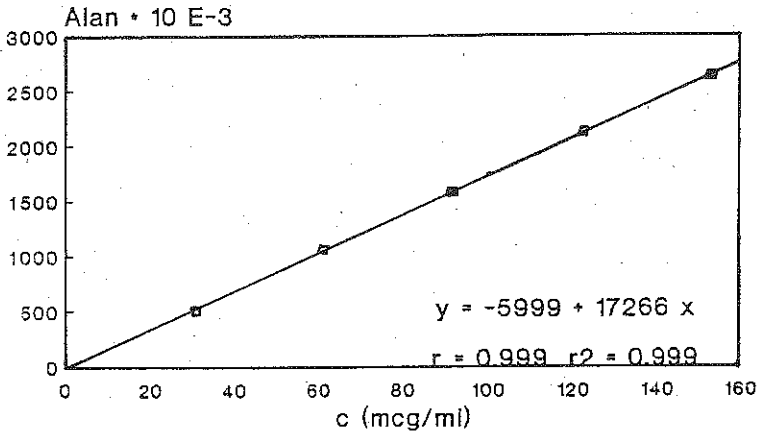
2 - Fenol ve Krezol Kalibrasyonu: Fenol için yaklaşık 10-50 µg/mL, krezol için yaklaşık 30-150 µg/mL konsantrasyonlar arasında hazırlanmış 5 ayrı çözeltinin HPLC kromatogramları alınmış ve integratörde hesaplanan alanın konsantrasyona göre doğrusal olarak

değiştiğini gösteren konsantrasyon-alan denklemleri bulunmuştur (Şekil 2 ve 3).

3 - Sentetik Karışımlarda Fenol ve Krezol Tayini: Hazırlanan sentetik karışımlarda yapılan fenol ve krezol tayinlerinin sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 2 - Fenol Konsantrasyon - Alan Grafiği



Şekil 3 - Krezol Konsantrasyon - Alan Grafiği

Tablo 1 - Sentetik Karışımlarda Fenol ve Krezol Tayinleri ($n = 2$)

Sentetik Karışım	İçerik $\mu\text{g/ml}$		Bulunan %	
	Fenol	Krezol	Fenol	Krezol
1 a	30.3	119.4	100.6	100.5
b	33.8	114.2	100.8	100.5
2 a	60.6	119.4	100.9	100.3
b	67.5	114.2	99.1	101.0
3 a	45.4	79.6	99.8	100.2
b	50.7	76.1	99.5	101.4
4 a	45.4	119.4	99.8	100.0
b	50.7	114.2	99.1	100.6
5 a	45.4	159.1	99.6	101.0
b	50.7	152.3	100.8	101.4
$\bar{X} \pm \text{SE}$			100.0 \pm 0.2	100.7 \pm 0.2
S			07	05

İnsülin Preparatlarında Fenol ve Krezol Tayini:

İnsülin preparatlarında belirtilen yöntem ile fenol ve/veya krezol miktarları tayin edilmiş ve formülünde belirtilen miktarlar ile karşılaştırılmıştır (Tablo 2).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yöntemin uygulanması sonucunda insülin preparatlarında koruyucu olarak kullanılan fenol ve krezol miktarları hassas olarak tayin edilmiştir. Süspansiyon tipi İnsülin preparatları mobil faz ile karıştırıldığında tamamen berrak bir çözelti elde edilmiştir. Yöntemde kullanılan mobil fazın bu avantajından başka sentetik karışımlar üzerinde yapılan tayinlerde geri kazanım fenol için % 100.0, krezol için % 100.7 bulunmuş, yöntemin standart sapması ve değişme katsayısı ise fenol için % 0.7, krezol için % 0.5 bulunmuştur. İnsülin preparatlarında yapılan

Tablo 2: Preparatlarda Fenol ve Krezol Tayinleri ($n = 3$)

Preparat	Formülasyon mg/mL		Bulunan $\% \pm \text{SE}$	
	Fenol	Krezol	Fenol	Krezol
A1 (1)	0.6	1.5	108.8 \pm 1.4	95.3 \pm 0.6
A2 (1)	—	3	—	91.9 \pm 0.2
A3 (1)	0.6	1.5	100.6 \pm 0.5	92.6 \pm 0.6
B1 (2)	—	2.5	—	95.9 \pm 0.3
B2 (2)	0.65	1.6	98.4 \pm 0.5	96.5 \pm 0.5
C1 (3)	0.6	1.5	99.9 \pm 0.2	95.9 \pm 0.1
C2 (3)	0.6	1.5	100.4 \pm 0.2	97.1 \pm 0.3
C3 (3)	2.7	—	95.7 \pm 0.2	—
D1 (4)	0.65	1.6	103.8 \pm 0.2	94.4 \pm 0.2

1: Nordisk 2: Lilly 3: Hoechst 4: Organon

fenol ve krezol tayinlerinin sonucunda ise standart hataların oldukça küçük oldukları görülmüştür. Deney sonuçları ve istatistik veriler gözönüne alındığında yöntemin çabuk ve pratik olması yanında doğru ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğu anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Musto, J.D., Sane, J.N., Warren, V.D., : "Quantitative Determinations of Phenol by HPLC"; *J. Pharm. Sci.* 66, 1201, 1977.
2. Das gupta, V. "Quantitative Determination of Phenol and Resorcinol in Pharmaceutical Dosage Forms by HPLC", *J. Pharm. Sci.*, 65, 1706, 1976.
3. Orazio, C.E., Kapila, S., Manahan, S.E., "High Performance Liquid Chromatographic Determination of Phenols as Phenolates in a Complex Mixture", *J. Chromatogr.* 262, 434, 1983.
4. Burtschen, E., Binden, H., "Separation of Phenols, Phenolic Aldehydes, Ketones and Acids by HPLC", *J. Chromatogr.* 252, 167, 1982.
5. Douglas, C.C., "Gas Chromatographic Determination of Phenolic Compounds in Drug Preparations", *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 55, 610, 1972.
6. United States Pharmacopeia XXII/ National Formulary XVII, "Antimicrobial Agents-Content", 1530, 1990.
7. Das gupta, V., Quantitative Determination of Phenol in Phenolated Calamine Lotion USP", *J. Pharm. Sci.* 64, 1199, 1975.
8. British Pharmacopoeia 1988, "Vaccines", 1045, 1988.
9. Europäische Pharmakopöe, Band II, "Phenol in sera und Impfstoffen", 38, 1974.

Küçük şeylere gereğinden çok önem verenler,
elinden büyük iş gelmeyenlerdir.