

MODELAREA MATEMATICĂ A DETERMINĂRII POTENȚEI BENZIL PENICILINEI POTASICE SI STREPTOMICINEI SULFAT DIN ASCOMICIN

MATHEMATICAL MODELING FOR BENZYL PENICILLIN POTASSIUM AND STREPTOMYCIN SULPHATE POTENCY DETERMINATION OF ASCOMICIN

Viviana Ciuca¹, Victorita Burghelea¹,

V. V. Safta², Despina Nita¹, Luciana Paraschiv¹

¹ NS Pasteur Institute SA, ² Polytechnic University of Bucharest

Cuvinte cheie: Benzilpenicilina potasica, streptomlcina sulfat, metoda microbiologica, Soft Combistats , potenta estimata.

Key words: Benzylpenicillin potassium, streptomycin sulphate, microbiological method, Combistats Soft, estimated potency.

Rezumat

Ascomicin este un unguent antibacterian pentru tratamentul infecțiilor locale ale pielii, ochilor și urechii externe, la taurine, ovine, porci, câini și pisici. Produsul conține două substanțe active: Benzilpenicilina potasică (Benzylpenicillin potassium/ Penicillin G potassium) și streptomicina sulfat (Streptomycin sulphate).

Caracteristica principală a produsului comercial este valoarea biologică a celor două substanțe active: benzilpenicilina potasică și streptomicina sulfat. Potența lor este estimată prin compararea inhibării creșterii microorganismelor sensibile produse de concentrații cunoscute ale antibioticului de examinat și o substanță de referință. Studiul de validare își propune să demonstreze că determinarea potenței benzilpenicilinei potasice și streptomicinei sulfat, este o metodă analitică adecvată, reproductibilă și îndeplinește cerințele de calitate ale produsului Ascomicin. Diametrele zonelor de inhibiție, direct proporționale cu logaritmul concentrației de antibiotic utilizat pentru testare, se măsoară și se calculează folosind metode statistice (Combistats Soft). Testul este conceput în așa fel încât modelul matematic pe care se bazează ecuația potenței poate fi dovedit a fi valid. S-a ales metoda liniilor paralele. În cazul în care un model paralel-line este ales, cele două linii de răspuns, ale preparatului în curs de examinare și preparatului standard, trebuie să fie paralele; acestea ar trebui să fie rectilinii. Aceste condiții sunt verificate prin teste de valabilitate pentru o anumită probabilitate ($P = 0,05$). Testul este valid dacă limitele de încredere ($p = 0,95$) sunt între 50% - 200% din potența estimată și potența estimată este între 95% - 105% din potența declarată. Potența declarată trebuie să fie de minim 19400 unități internaționale/g benzilpenicilina potasica și 13960 unități internaționale/g streptomycin sulphate. Procedura de validare include detalii privind protocolul de lucru al determinării potenței eritromicinei, criteriile de validare, rezultate experimentale, date statistice, comparații interlaboratoare.

Abstract

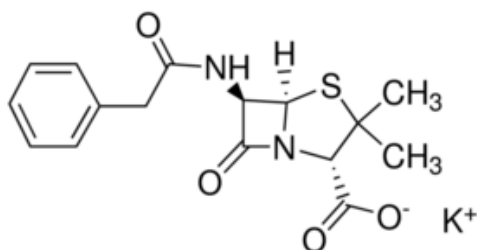
Ascomicin is an antibacterial unguent for treatment of local infections of skin, eyes, outer ear, in cattle, sheep, pig, dog and cat. The product contains two active substances: benzylpenicillin potassium (Penicillin G potassium) and streptomycin sulphate. The main characteristic of commercial product is benzylpenicillin potassium and streptomycin sulphate potency. The potency is estimated by comparing the inhibition of growth of sensitive micro-organisms produced by known concentrations of the antibiotic to be examined and a reference substance. The validation study aims to demonstrate the determination of the potency of benzylpenicillin potassium and streptomycin sulphate, it is an appropriate analytical method, reproducible and meets the quality requirements of Ascomicin product. The paper establishes the performance characteristics of the method considered and identify the factors that influence these characteristics. The diameters of inhibition zones, directly proportional to the logarithm of the concentration of the antibiotic used for the assay, measured and calculated using statistical methods (Combistats Soft). The assay is designed in such a way that the mathematical model on which the potency equation is based can be proved to be valid. A parallel-line model is chosen. The two log dose response lines of the preparation under examination and the standard preparation are parallel; they are rectilinear over the range of doses used in the calculation. These conditions are verified by validity tests for a given probability ($P = 0.05$). The test is not valid unless the confidence limits ($P=0.95$) are not less than 50 per cent and not more than 200 per cent of the estimated

potency. The estimated potency is not less than 95 per cent and not more than 105 per cent of the stated potency. The stated potency is not less than 19400 international units/g benzylpenicillin potassium and 13960 international units/g streptomycin sulphate. The validation procedure includes details on protocol working to determine the potency of benzylpenicillin potassium and streptomycin sulphate, validation criteria, experimental results, mathematical modeling for determining the potency, inter-laboratory comparisons.

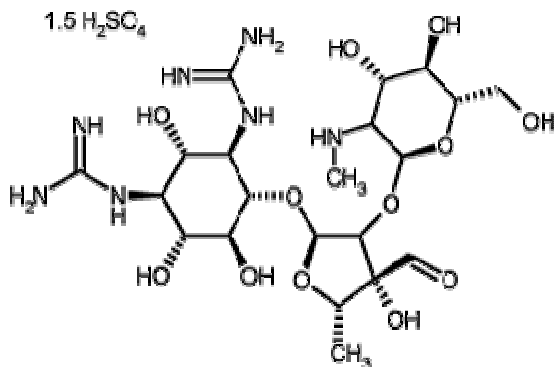
Introducere

Ascomicina este un unguent antibacterian pentru tratamentul infecțiilor locale ale pielii, ochilor și urechii externe, la taurine, ovine, porci, câini și pisici.

- Produsul conține două substanțe active: benzilpenicilina potasică (benzylpenicillin potassium / penicillin G potassium) și streptomicina sulfat (Streptomycin sulphate).



Benzilpenicilina potasică



Streptomicin sulfatul

Penicilina G este un antibiotic din grupa beta-lactamelor și are efect în special contra germenilor Gram-pozitivi: coci Gram-pozitivi (streptococi beta-haemolitic, staphylococi beta-lactamase negativi, bacili aerobi/anaerobi Gram-pozitivi (cu excepția bacteroizilor producători de beta-lactamaze), actinomicete, spirochete și leptospire. Unele bacterii Gram-negative precum *Neisseria gonorrhoeae* and *N. meningitidis* sunt, de asemenea, sensibile la Penicilina G.

Aționează prin inhibarea formării structurilor de peptidoglican în peretele bacterian provocând moartea rapidă a celulei (1, 3, 5, 11).

Concentrația minimă în produs este de **19400 U.I./g** (8).

Streptomicina sulfat este un antibiotic bactericid din grupa aminoglicozidelor și este activ împotriva aerobilor Gram-negativi cum sunt *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Enterobacter* și contra unor bacili anaerobi care nu au devenit încă rezistenți, dar nu și contra bacteriilor Gram-pozitive și anaerobe Gram-negative (1, 3, 5, 11).

Unele micobacterii incluzând *M. tuberculosis*, sunt, de asemenea, sensibile la aminoglicozide. Aționează prin inhibarea sintezei de proteine vitale în micro-organismele țintă (1, 3, 5, 11).

Concentrația minimă în produs este de **13960 U.I./g** (6).

Formula din Ascomicin cumulează spectrele anti-bacteriene și exploatează efectelor sinergice ale celor două antibiotice în special în infecțiile streptococice.

Cercetarea și dozarea corectă a antibioticelor este o etapă decisivă a controlului final, critică pentru asigurarea calității produsului (4, 7, 8, 10, 12).

În cazul nostru, estimarea eficacității benzilpenicilinei potasice / streptomicinei sulfat se face prin comparația directă între Ascomicin probă și benzilpenicilina potasica/streptomicina sulfat standard, calibrate și folosite ca referință.

Dozarea corectă a antibioticelor este o etapă decisivă a controlului final, critică pentru asigurarea calității produsului (2, 9, 10).

Studiul de validare își propune să demonstreze că determinarea potenței celor două antibiotice, benzilpenicilina potasica și streptomicina sulfat este o metodă de analiză adecvată, reproductibilă și îndeplinește cerințele de calitate ale produsului Ascomicin (7, 8, 10, 12).

1. Materiale și Metodă

Testul microbiologic de determinare a puterii benzilpenicilinei potasice și streptomicinei sulfat se bazează pe o comparație a inhibării creșterii microorganismului sensibil produsă de concentrații cunoscute ale antibioticului de examinat cu cele produse de concentrații cunoscute ale unui preparat standard cu activitate cunoscută (7, 8, 12).

Metoda cilindru-placă (difuzie în agar) depinde de difuzia antibioticului dintr-un cilindru vertical printr-un strat de agar solidificat într-o placă Petri, astfel încât creșterea microorganismului adăugat este inhibată în zona din jurul cilindrului care conține soluția de antibiotic (7, 8, 12).

Au fost utilizate plăci Petri, 20 x 100 mm și cilindru din oțel inoxidabil cu diametrul de: 8mm exterior, interior 6 mm, 10 mm înălțime.

Mediile de cultura folosite au fost:

- Antibiotic Medium No. IV (Himedia),
- Antibiotic Medium No. V (Himedia) pentru benzilpenicilina potasica și
- Antibiotic Medium No. IV (Himedia),
- Antibiotic Medium No. VII (Himedia) pentru streptomicina sulfat.

Microorganismul test utilizat pentru benzilpenicilina potasica a fost:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

și pentru streptomicina sulfat:

- *Bacillus subtilis* ATCC 6633,

suspensii bacteriene preparate așa cum este descris în instrucțiunile de laborator.

Antibioticele standard au fost furnizate de Sigma.

Potența benzilpenicilinei potasice standard este de **1530 UI** pe mg activitate microbiologică raportată la substanța uscată, așa cum se menționează în Farmacopeea Europeană, și a fost verificată față de substanța de referință, benzilpenicilin potassium CRS (8).

Potența streptomicinei sulfat standard este de **720 UI** pe mg activitate microbiologică raportată la substanța uscată, așa cum se menționează în Farmacopeea Europeană, și a

fost verificată față de substanța de referință streptomicina sulfat, CRS (8).

Potența benzilpenicilinei potasice, materie primă pentru Ascomicin, furnizată de Sino-Kemmed, este de **1560 UI** pe mg, activitate microbiologică raportată la substanța uscată iar potența streptomicinei sulfat, materie primă pentru Ascomicin, furnizată de Sino-Kemmed, este de **749 UI** pe mg, activitate microbiologică raportată la substanța uscată.

- Solventul utilizat în extracția benzilpenicilinei potasice a fost dietyl ether și soluție tampon pH 8;
- pentru prepararea soluției stoc și diluțiilor s-a folosit soluție tampon pH 8.
- Solventul utilizat în extracția streptomicinei sulfat a fost dietyl ether și soluție tampon pH 7;
- pentru prepararea soluției stoc și diluțiilor s-a folosit soluție tampon pH 7.

Prepararea soluției benzilpenicilina potasica standard:

- predilutie 13mg/50ml,
- diluții de lucru: 1IU/ml, 2IU/ml, 4IU/ml.

Prepararea soluției benzilpenicilina potasica

- proba: 2g Ascomicin /100ml extract,
- predilutie 13mg/50ml,

- diluții de lucru: 1IU/ml, 2IU/ml, 4IU/ml.

Prepararea soluției streptomicina sulfat standard:

- predilutie 20 mg / 50 ml,
- diluții de lucru: 5IU / ml, 10IU/ml, 20IU/ml.

Prepararea soluției streptomicina sulfat proba:

- 2g Ascomicin /100ml extract,
- predilutie 19,2mg / 50ml,
- diluții de lucru: 5IU/ml, 10IU/ml, 20IU/ml.
- Temperatura de incubare a fost 30-37°C.
- Variația temperaturii la termostatare a fost de ± 0,5°C.

S-a observat creșterea microorganismului după incubare. În testul de difuzie în agar, parametrul utilizat este diametrul zonei de inhibiție formată în jurul discului, după incubare.

Au fost măsurate diametrele zonelor de inhibiție circulare formate, cu o precizie corespunzătoare (cel puțin de 0,1 mm) și s-a determinat potența benzilpenicilinei potasice și streptomycinei sulfat, folosind metode statistice (3, 9).

Cele trei diluții de probă și standard au fost aplicate conform schemei de randomizare. Diametrele zonelor de inhibiție, direct proporționale cu logaritmul concentrației de antibiotic, au fost calculate folosind metode statistice cu Softul CombiStats, versiunea 5.0/11 martie 2013, Direcția Europeană pentru calitatea produselor medicamentoase, Consiliul European (3).

CombiStats Soft este în conformitate cu monografia Microbiological assay of antibiotics și monografia Statistical analysis of results of biological assays, Ediția a-9-a (3, 9).

Datele noastre experimentale au fost analizate cu metoda liniilor paralele, și calculate cu 95 % limita de încredere ($P = 0,95$).

Relația dintre logaritmul concentrației de antibiotic și diametrul zonelor de inhibiție a fost reprezentat grafic printr-o linie dreaptă ce corespunde intervalului de concentrații utilizate.

Testul s-a efectuat cu opțiunea "Randomised blocked" deoarece fiecare placă poate fi identificată ca o sursă de variație (3).

A fost utilizat, în mod constant, un pas de diluare cu un factor = 2, în creștere.

În testele cu răspunsuri cantitative, reziduurile observate sunt în mod normal utilizate pentru a estima variația reziduală (3).

Testul este valid dacă limitele de încredere ($P = 0,95$) sunt între 50-200% din potența estimată, iar potența estimată este între 95-105% din potența declarată (8, 12).

Potența declarată trebuie să fie de minim 19400 unități internaționale/g benzilpenicilina potasica și 13960 unități internaționale / g streptomycin sulphate (8, 12).

Procedura de validare include detalii privind protocolul de lucru pentru determinarea potenței benzilpenicilinei potasice și streptomycinei sulfat, criteriile de validare, rezultate experimentale, modelarea matematică pentru determinarea potenței și comparații interlaboratoare.

2. Rezultate și Discuții

2.1. Validarea Potassium benzylpenicillin, Ascomicin, Seria Nr. 15, Combistats version 5.0

ambistats Version 5.0. Friday, 11 November 2016, 15:05:37 [+02:00]. Page 1 of 2


Substance	Potassium benzyl penicillin	Remarks: Ascomicin, batch no.15
Method	agar diffusion	
Assay number	2	
Technician	Viviana Ciuca	
Date of assay	11.11.2016	

Standard			
Id.	Potassium benzyl penicillin		
Ass. pot.	1530 IU/mg		
Pre-dil. 1	13mg/50 ml		
Doses	S1	S2	S3
(1)	230	241	270
(2)	225	258	268
(3)	239	255	275
(4)	235	254	273
(5)	229	248	282
(6)	238	242	284

Sample 1			
Id.	Ascomicin		
Ass. pot.	1560 IU/mg		
Pre-dil. 1	13mg/50ml		
Doses	T1	T2	T3
(1)	224	250	278
(2)	235	251	280
(3)	230	248	266
(4)	226	242	265
(5)	235	255	283
(6)	227	254	279

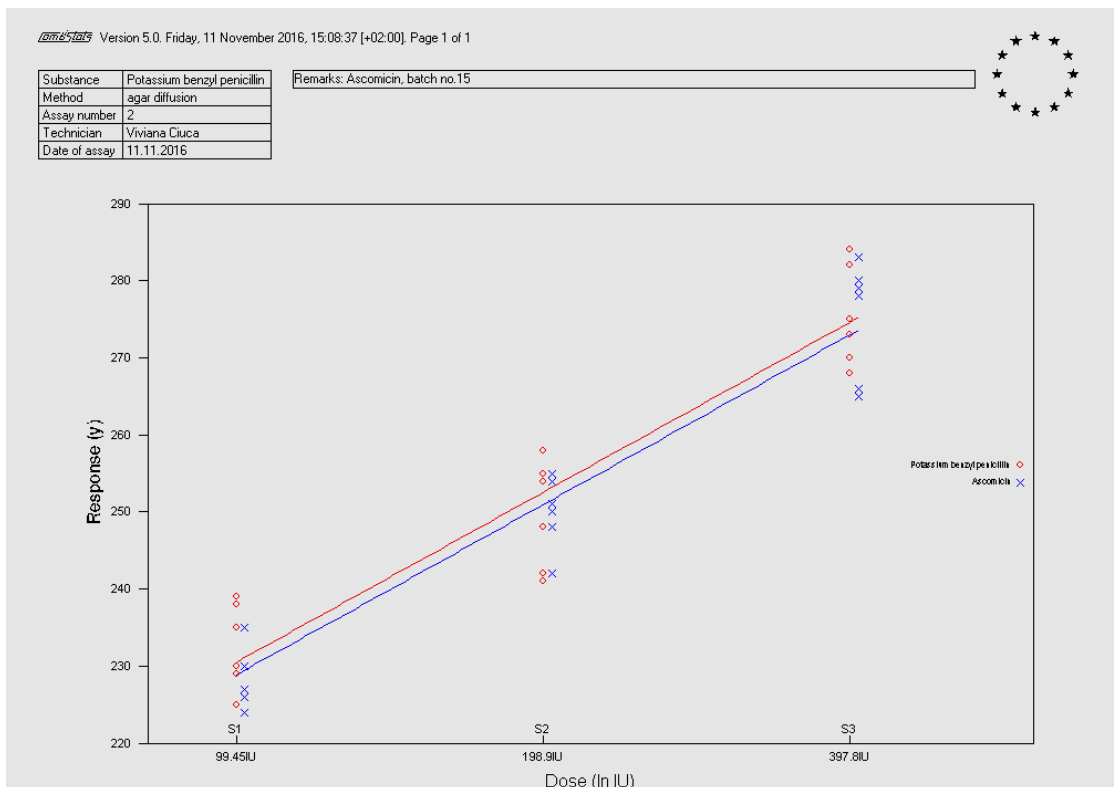
Model: Parallel lines
 Design: Randomised block
 Transformation: $y' = y$
 Variance: Observed residuals
 Dilution step (Increasing): 2

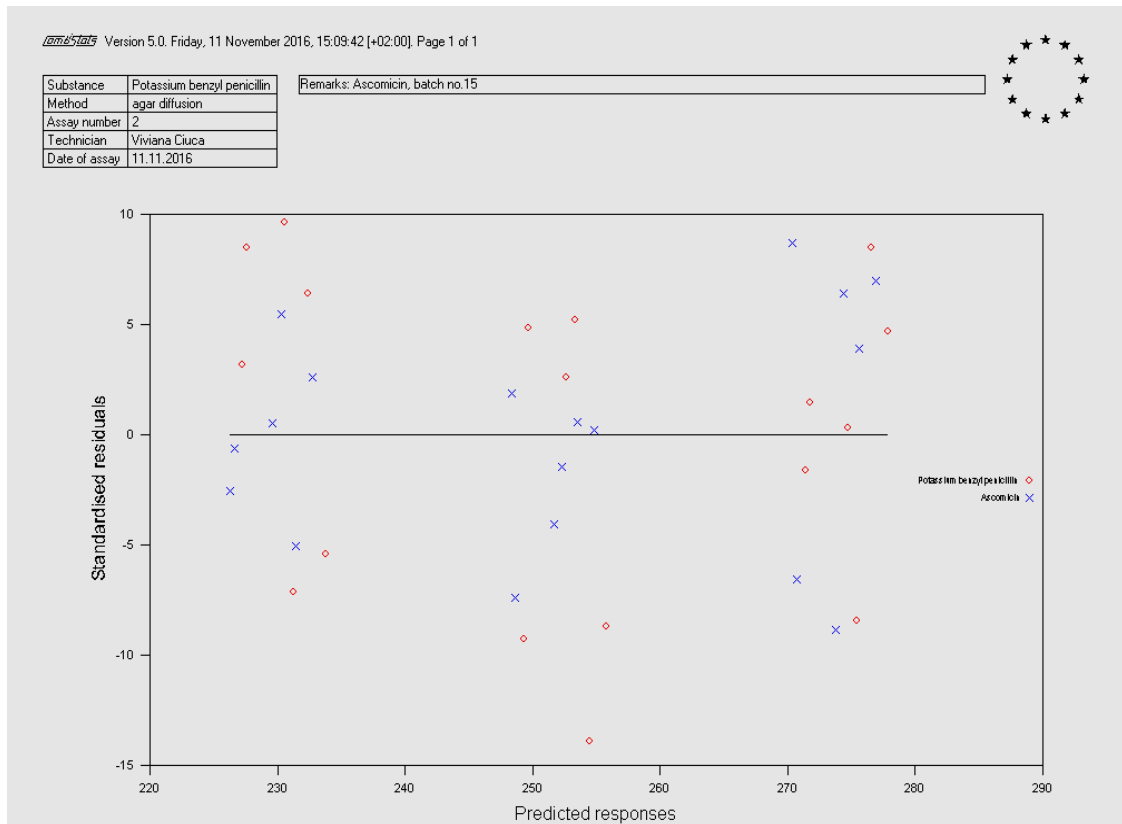
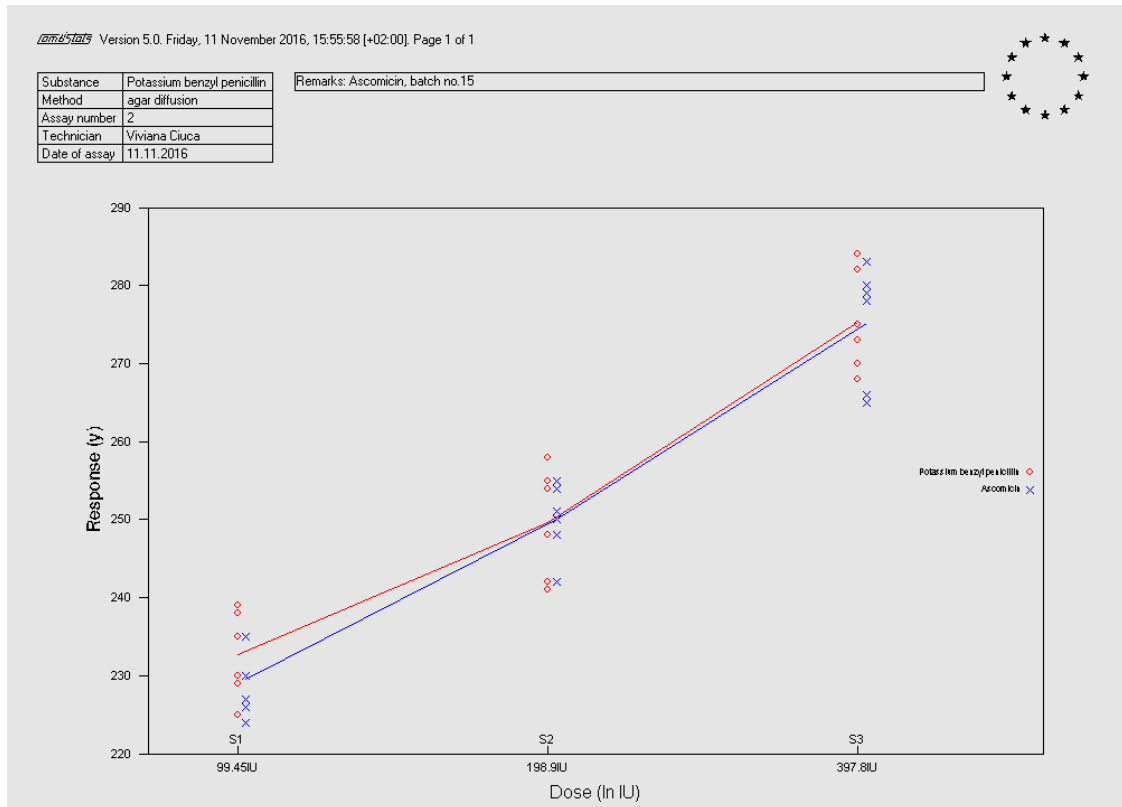
Common slope(factor) = 31.8595 (28.7995 to 34.9195)
 Correlation |r|: 0.959193

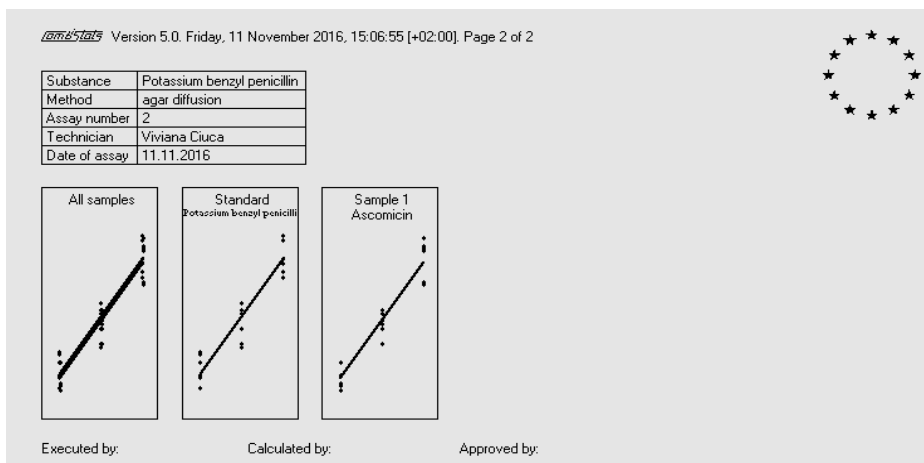


Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	9.00000	9.00000	0.243	0.626
Regression	1	11704.2	11704.2	316.291	0.000 (****)
Non-parallelism	1	13.5000	13.5000	0.365	0.551
Non-linearity	2	96.8889	48.4444	1.309	0.288
Standard	1	75.1111	75.1111	2.030	0.167
Sample 1	1	21.7778	21.7778	0.589	0.450
Quadratic curvature	1	88.8889	88.8889	2.402	0.134
Lack of quadratic fit	1	8.00000	8.00000	0.216	0.646
Treatments	5	11823.6	2364.71	63.903	0.000 (****)
Blocks	5	203.222	40.6444	1.098	0.386
Residual error	25	925.111	37.0044		
Total	35	12951.9	370.054		

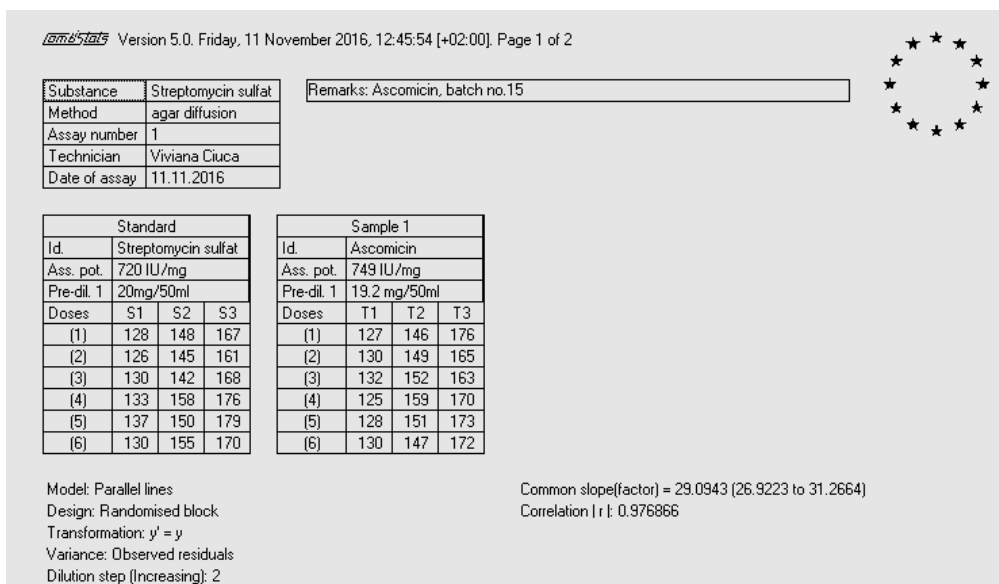
Sample 1			
Id.	Ascomicin		
(IU/mg)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	1298.79	1482.72	1691.26
Rel. to Ass.	83.3%	95.0%	108.4%
Rel. to Est.	87.6%	100.0%	114.1%





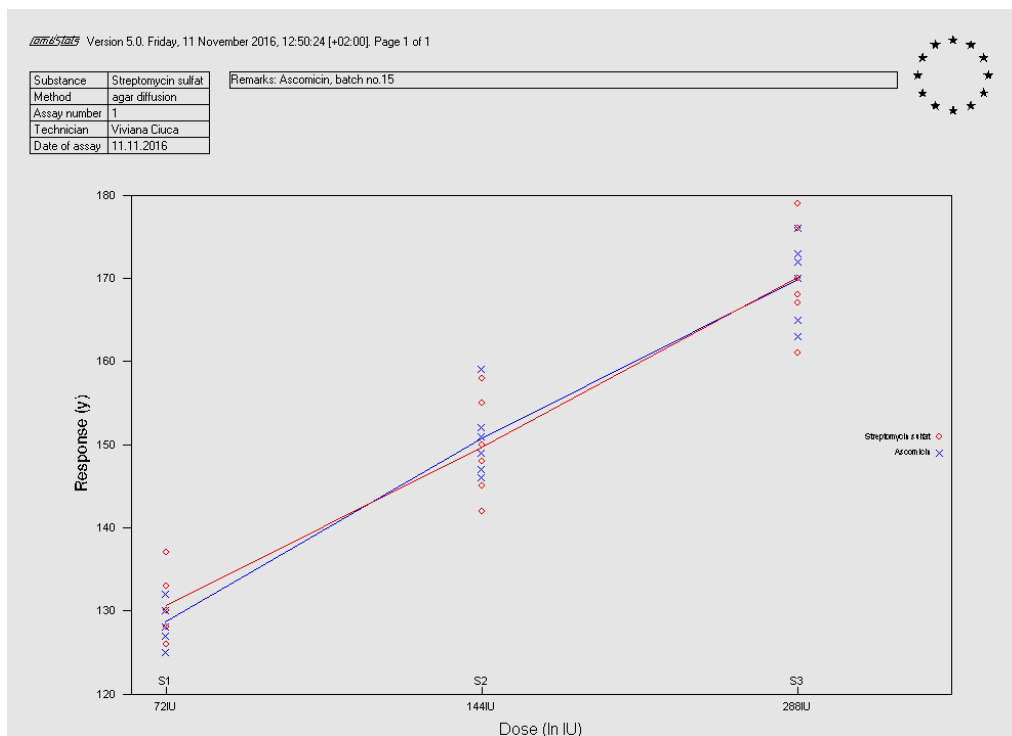
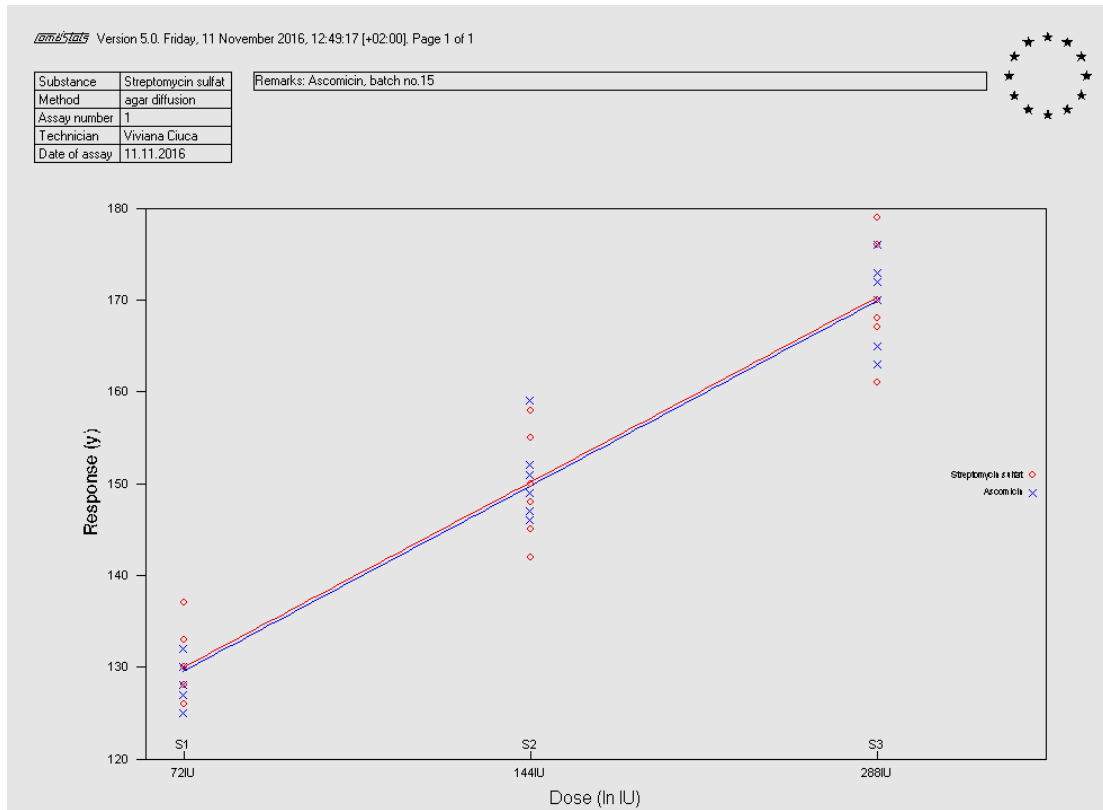


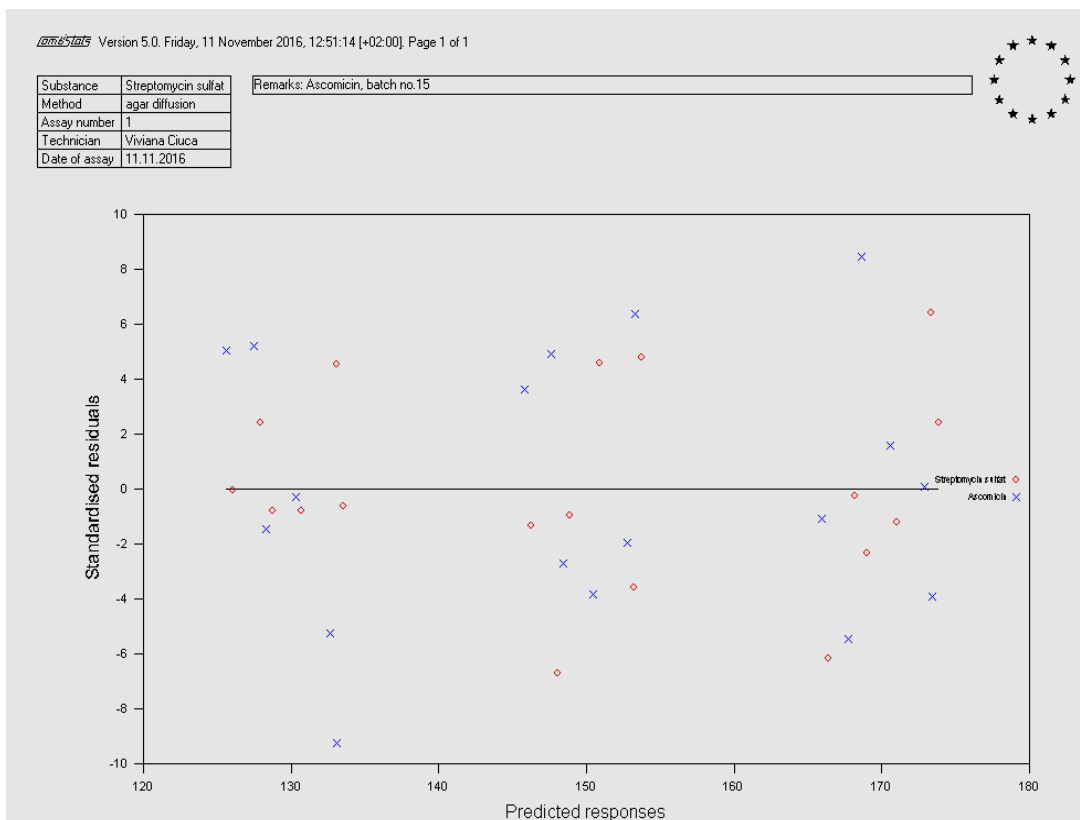
2.2. Validarea Streptomycin sulphate, Ascomicin, Seria Nr. 15 Combistats version 5.0



Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	1.77778	1.77778	0.095	0.760
Regression	1	9760.67	9760.67	523.516	0.000 (***)
Non-parallelism	1	4.16667	4.16667	0.223	0.641
Non-linearity	2	10.2778	5.13889	0.276	0.761
Standard	1	2.25000	2.25000	0.121	0.731
Sample 1	1	8.02778	8.02778	0.431	0.518
Quadratic curvature	1	0.888889	0.888889	0.048	0.829
Lack of quadratic fit	1	9.38889	9.38889	0.504	0.484
Treatments	5	9776.89	1955.38	104.877	0.000 (***)
Blocks	5	264.889	52.9778	2.841	0.036 (*)
Residual error	25	466.111	18.6444		
Total	35	10507.9	300.225		

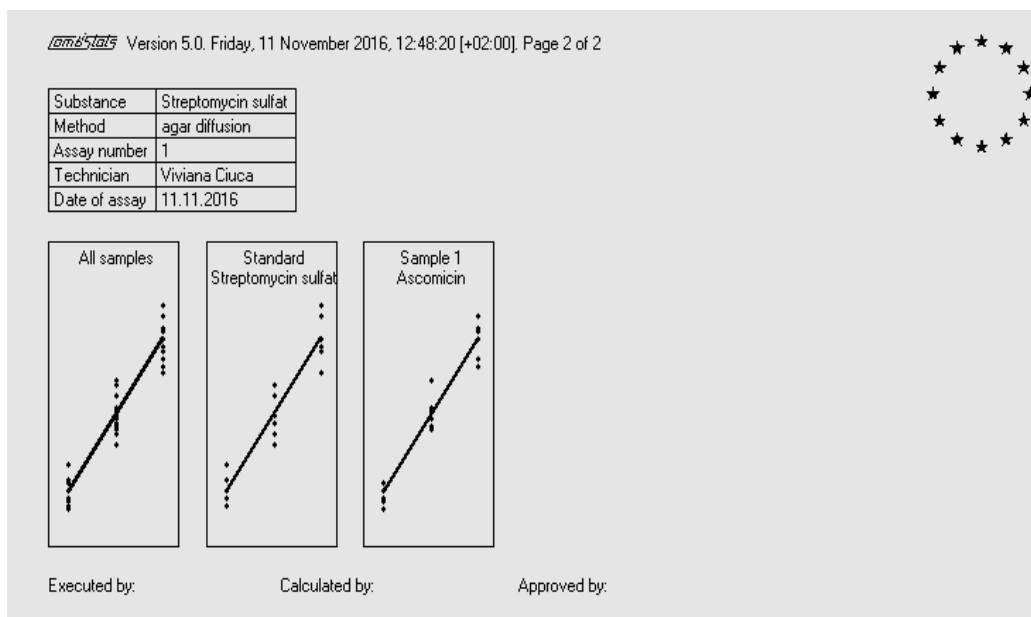
Sample 1			
Id.	Ascomicin		
(IU/mg)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	666.714	738.630	818.099
Rel. to Ass.	89.0%	98.6%	109.2%
Rel. to Est.	90.3%	100.0%	110.8%





Tabelul 1 include rezultatele metodei de determinare a potenței benzilpenicilinei potasice și streptomicinei sulfat pentru trei serii consecutive de Ascomicin.

Testul este valid dacă limitele de încredere ($P = 0,95$) sunt între 50-200% din potența estimată, iar potența estimată este între 99-105% din potența declarată (8, 12).



Tabelul 1

Validarea metodei pe trei serii consecutive

POS	Produs	Seria	LIMITE	REZULTATE	
				Control Laborator- Pasteur Bucuresti	Control Laborator- Pasteur Filipesti
986 987	Ascomicin	13	50%≤LC≤200% 95%≤EP≤105%	Potassium benzyl penicillin LC = 89.9 – 118.3% EP = 97.8% Streptomycin sulfat LC = 89.8 – 114.3% EP = 98.1%	Potassium benzyl penicillin LC = 80.7 – 118.1% EP = 98.2% Streptomycin sulfat LC = 88.9 – 111.3% EP = 98.5%
986 987	Ascomicin	14	50%≤LC≤200% 95%≤EP≤105%	Potassium benzyl penicillin LC = 83.9 – 118.1% EP = 96.8% Streptomycin sulfat LC = 86.3 – 109.5% EP = 97.1%	Potassium benzyl penicillin LC = 80.9 – 116.3% EP = 97.4% Streptomycin sulfat LC = 79.9 – 121.1% EP = 98.7%
986 987	Ascomicin	15	50%≤LC≤200% 95%≤EP≤105%	Potassium benzyl penicillin LC = 83,3 – 108.4% EP = 95% Streptomycin sulfat LC = 89.0 – 109.2% EP = 98.6%	Potassium benzyl penicillin LC = 8919 – 109.3% EP = 96.4% Streptomycin sulfat LC = 84.7 – 110.2% EP = 98.5%

LC = limita de confidență,
EP = potența estimată

Potența declarată trebuie să fie de minim 19400 unități internaționale / g benzilpenicilina potasica si 13960 unități internaționale / g streptomycină sulfat (8, 12).

3. Concluzii

Determinarea potenței benzilpenicilinei potasice si streptomicinei sulfat din Ascomicin, prin compararea diametrelor zonelor circulare de inhibiție produse de o serie de diluții ale produsului, Ascomicin cu cele produse de un standard de referință calibrat în unități internaționale, este o metodă analitică adecvată, reproductibilă și îndeplinește cerințele de calitate ale produsului.

Precizia testului este de așa natură încât limitele erorii de reper al potenței estimate ($P=0,95$) nu este mai mic de 95% și nu mai mult de 105% din potența estimată. Testul este considerat valid, rezultatele obținute pentru fiecare parametru de validare se încadrează în criteriile de admisibilitate (6, 7, 10)

Bibliografie

1. **Anghelescu M** (1998). Terapia cu antibiotice. Ed. Medicală, București 70-73.
2. **Daas A** (2013). The Combistats User Manual, EDQM – Council of Europe.
3. **Cristina RT** (2006). Introducere în farmacologia și terapia veterinară, Editura Solness, Timișoara, pp. 385-425
4. **Cristina RT, Teușdea V** (2008). Ghid de farmacie și terapeutică veterinară Brumar Timisoara, pp. 23-30.
5. **Crivineanu M** (2005). Farmacologie veterinară. Ed. Fundis, București, pp. 116-117.
6. **Drug Bank**, Streptomycin. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01082>
7. **Glick D, Kersey RC, Fink FC** (2006). Microbiological assay of antibiotics. In: Methods of Biochemical Analysis, Volume 1 (Ed. D Glick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470110171.ch3
8. **European Pharmacopoeia** Monographs 9th Edition – Microbiological assay of antibiotics.
9. **European Pharmacopoeia** Monographs 9th Edition – Statistical analysis of results of biological assays and tests.
10. **Sovasia N, Arshad H** (2016). Microbial Assay of Antibiotics. PharmaTutor Magazine (ISSN 2347-7881). On line Article, Reference Id: PHARMATUTOR-ART-1560. Available at: <http://www.pharmatutor.org/articles/microbial-assay-antibiotics>
11. **Stroescu V** (1998). Bazele farmacologice ale practicii medicale. Ed. Medicală, București pp: 1288-1291
12. **The International Pharmacopoeia** (2015). Fifth Edition, Microbiological assay of antibiotics.