

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д. Л. Пиневиц

2013 г.

Регистрационный № 103-0913

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ КОЛИСТИНА В КРОВИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»;

ГУ «Республиканский научно-практический центр
детской онкологии, гематологии и иммунологии»

Авторы: к.х.н. П.В. Курман, к.б.н. П.С. Шабуня, В.И. Захаревич,
С.А. Фатыхова, В.В. Дмитриев

Минск, 2013

В настоящей инструкции по применению (далее инструкция) изложен метод определения концентрации колистина в крови. Настоящая инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, а также других врачей-специалистов, оказывающих квалифицированную медицинскую помощь пациентам, получающим лекарственные средства, содержащие колестиметат натрия или колистин.

I. Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники.

Оборудование:

- Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный дегазатором, системой градиентного элюирования, устройством автоматического ввода проб, термостатом колонок, термостатом образцов, диодно-матричным детектором и соединенный с тандемным масс-спектрометром типа «тройной квадруполь».
- Весы лабораторные электронные с точностью взвешивания 0,1 мг.
- Дозаторы пипеточные с регулируемым объемом дозирования в диапазоне 0,002 – 1,0 см³.
- Цилиндр мерный вместимостью 1000 см³ по ГОСТ 1770-74.
- Колба мерная вместимостью 10 см³ по ГОСТ 1770-74.
- Колонка хроматографическая из нержавеющей стали длиной 30 мм, диаметром 2,1 мм, заполненная октадецилсилильным силикагелем с размером частиц 3,5 мкм.
- Микрошейкер.
- Микроцентрифуга.

- Пластиковые пробирки без консерванта, содержащие пластиковые шарики для лучшего осаждения сгустка.
- Шприцевые мембранные фильтры с размером пор не более 0,45 мкм.

Реактивы и материалы:

- Ацетонитрил для ВЭЖХ.
- Муравьиная кислота о.с.ч.
- Вода деионизованная.
- Контрольная сыворотка (лиофилизированная) с параметрами, близкими к биохимическим параметрам крови здорового человека в норме.
- Серная кислота.
- Цинка сульфат.
- Натрия гидроксид.
- Колистиметат натрия.

Все реактивы должны быть чистыми для анализа (ч.д.а.) или химически чистыми (х.ч.).

Объект исследования:

- Сыворотка крови.

II. Показания к применению.

Необходимость определения концентрации колистина в крови пациентов с целью коррекции суточной дозы лекарственных средств, содержащих колистиметат натрия или колистин.

III. Описание технологии использования.

Кровь для исследований набирают в пластиковую пробирку, содержащую пластиковые шарики для более полного осаждения

фибринового сгустка из крови в процессе центрифугирования. Пробирку с кровью центрифугируют в течение 5 минут при ускорении 2000g. Надосадочный слой сыворотки крови в количестве 1000 мкл используют для исследований.

1. Лабораторные исследования.

- Условия проведения исследований

При выполнении исследований в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:

- температура окружающей среды $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$.
- температура приготовления растворов $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$.
- атмосферное давление 84,0 - 106,7 кПа (630 - 800 мм рт. ст.).
- влажность воздуха (40 - 80) % при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$.

- Последовательность выполнения исследований

Перед началом исследований должны быть проведены следующие работы: приготовление растворов, подготовка измерительной аппаратуры, построение калибровочной зависимости, а также проверка пригодности системы.

- Приготовление растворов

1. Элюент А: 5,0 см³ муравьиной кислоты смешивают с 995,0 см³ деионизированной воды.
2. Элюент В: Ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ.
3. Раствор серной кислоты 1М.
4. Раствор сульфата цинка 20%.
5. Раствор натрия гидроксида 1М.

6. Сток-растворы колистиметата натрия: 190000 МЕ (15,3 мг) колистиметата натрия растворяют в воде и разбавляют до 100 см³ тем же растворителем - (сток-1). 0,1 см³ полученного раствора разбавляют водой до 1 см³ - (сток-2). Полученные сток-растворы используют сразу после приготовления.
7. Растворы сравнения: В пластиковые пробирки вместимостью 1,5 см³ вносят указанные в таблице 1 количества контрольной сыворотки и растворов колистиметата натрия. Туда же добавляют по 0,05 см³ деионизованной воды и по 0,05 см³ 1М раствора серной кислоты. Смесь гомогенизируют 3-5 секунд путем перемешивания на микрошейкере и выдерживают 1 час при комнатной температуре (не более + 25°C). Затем добавляют 0,125 см³ раствора сульфата цинка, гомогенизируют 3-5 секунд, добавляют 0,125 см³ раствора гидроксида натрия и 0,150 см³ ацетонитрила. Снова гомогенизируют и центрифугируют при 6500g в течение 10 минут. Супернатант фильтруют через шприцевой мембранный фильтр (0,45 мкм) в 2-мл виалку и анализируют не позднее двух часов.

Таблица 1 - Приготовление растворов сравнения.

Номер раствора	1	2	3	4	5	6
	Объем добавляемого раствора, см ³					
Сыворотка контрольная	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400	0,400
Раствор колистиметата натрия <i>сток-1</i>	0,100	0,040	0,010	-	-	-
Раствор колистиметата натрия <i>сток-2</i>	-	-	-	0,040	0,010	0,002
Вода деионизованная	-	0,060	0,090	0,060	0,090	0,098
	Концентрация колистиметата натрия, МЕ/см ³					
	190	76	19	7,6	1,9	0,38
	Концентрация колистиметата натрия, мкг/см ³					
	15,3	6,12	1,53	0,612	0,153	0,031

- Построение калибровочной зависимости

Калибровочную зависимость площади пика колистина от концентрации, выраженной в МЕ/см³ или мкг/см³, устанавливают методом абсолютной калибровки по шести растворам сравнения, приготовленным согласно таблице 1. В инжектор хроматографа вводят по 10 мкл растворов в порядке возрастания их концентрации и анализируют в условиях хроматографирования (см. ниже). Интегрирование площадей пиков колистина А на ионных хроматограммах и построение калибровочной зависимости проводят с использованием соответствующего программного обеспечения, прилагаемого изготовителем к средству измерения и предусматривающего валидацию калибровки в отношении линейности, точности и отношения сигнал/шум. Должны выполняться установленные изготовителем средства измерения критерии контроля качества калибровочной зависимости.

- Условия хроматографирования

По 10 мкл растворов попеременно анализируют на жидкостном хроматографе с масс-селективным детектором типа «тройной квадруполь» при следующих условиях:

- Аналитическая колонка: из нержавеющей стали длиной 30 мм, диаметром 2,1 мм, заполненная октадецилсилильным силикагелем с размером частиц 3,5 мкм.

- Мобильная фаза: А - деионизированная вода/муравьиная кислота (99,5:0,5 об./об.), В – ацетонитрил.

- Градиент:

Время, мин.	Элюент А, %	Элюент В, %
0	95	5
10	40	60

11	95	5
15	95	5

- Скорость потока элюента: 0,3 мл/мин.
- Температура колонки: +30°C.
- Температура термостата автосамплера: +10°C.

Параметры масс-селективного детектора:

- Источник ионизации: электроспрей.
- Температура осушающего газа: 300°C.
- Скорость подачи осушающего газа: 10 л/мин при 40 psi.
- Напряжение на капилляре: +4000 V.
- Время задержки регистрации MRM: 200 миллисекунд.
- Параметры регистрации положительно заряженных ионов:

Компонент	Фрагментор, V	Ячейка соударений, V	Переход, m/z	Назначение
Колистин А	84	42	293,2 → 44,1	колич. интегр.
Колистин А	84	42	293,2 → 56,1	подтвержд.
Колистин А	84	6	293,2 → 123,1	подтвержд.

- Определение содержания колистина

Испытуемый раствор 1 (определение количества колестиметата натрия, гидролизованного до колистина): 0,500 см³ испытуемой сыворотки помещают в пластиковую пробирку вместимостью 1,5 см³. Туда же помещают 0,05 см³ деионизованной воды. Затем добавляют 0,125 см³ раствора сульфата цинка, гомогенизируют 3-5 секунд на микрошейкере, добавляют 0,125 см³ раствора гидроксида натрия, 0,150 см³ ацетонитрила, снова гомогенизируют и затем центрифугируют при 6500g в течение 10 минут. Супернатант фильтруют через шприцевой мембранный фильтр (0,45 мкм) в 2-мл виалку и анализируют не позднее двух часов.

Испытуемый раствор 2 (определение суммарной концентрации колистиметата натрия - гидролизованного и связанного колистина): 0,500 см³ испытуемой сыворотки помещают в пластиковую пробирку вместимостью 1,5 см³. Туда же помещают 0,05 см³ деионизованной воды и 0,05 см³ 1М раствора серной кислоты. Смесь гомогенизируют 3-5 секунд на микрошейкере и выдерживают 1 час при комнатной температуре (не более +25°C). Затем добавляют 0,125 см³ раствора сульфата цинка, гомогенизируют 3-5 секунд, добавляют 0,125 см³ раствора гидроксида натрия, 0,150 см³ ацетонитрила, снова гомогенизируют и затем центрифугируют при скорости вращения 6500g в течение 10 минут. Супернатант фильтруют через шприцевой мембранный фильтр (0,45 мкм) в 2-мл виалку и анализируют не позднее двух часов.

Состав лекарственных средств, содержащих колистиметат натрия, включает колистиметат натрия, который в водных средах гидролизуеться с образованием сульфметилованных производных и самого колистина. Поэтому для оценки фармакокинетики и расчета фармакодинамических показателей необходимо определение содержания в крови колистиметата натрия и колистина. Разница между содержанием колистиметата натрия в сыворотке крови *после* (испытуемый раствор 2) и *до* гидролиза (испытуемый раствор 1) дает концентрацию связанного колистина.

- Обработка результатов количественного определения

Для обработки результатов количественного определения используют программное обеспечение, предусмотренное изготовителем средства измерения и предусматривающее валидацию калибровки в

отношении линейности, точности и отношения сигнал/шум. Расчет концентраций веществ в испытуемых растворах выполняют методом внешнего стандарта по калибровочным зависимостям для растворов сравнения.

Содержание колистина в образцах сыворотки крови человека (X), выраженное в МЕ/см³ или мкг/см³, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C_{\text{ир}} \times V_{\text{н}}}{V_{\text{ио}}},$$

где:

$C_{\text{ир}}$ – значение концентрации колестиметата натрия в испытуемом растворе, определенное по калибровочной кривой, МЕ/см³ или мкг/см³;

$V_{\text{н}}$ – номинальный объем раствора испытуемого образца, см³.

$V_{\text{ио}}$ – объем сыворотки испытуемого образца, см³.

Если полученные результаты по калибровкам и/или образцам не удовлетворяют критериям контроля качества, анализ повторяют, чтобы убедиться в отсутствии ошибок и подтвердить достоверность данных.