

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д. Л. Пиневич

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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
27.12.2013  
Регистрационный № 103-0913

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ КОЛИСТИНА В КРОВИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: канд. хим. наук П.В. Курман, канд. биол. наук 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. Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, а также других врачей-специалистов, оказывающих квалифицированную медицинскую помощь пациентам, получающим лекарственные средства, содержащие колестиметат натрия или колистин.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, 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 см<sup>3</sup>.

Цилиндр мерный вместимостью 1000 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74.

Колба мерная вместимостью 10 см<sup>3</sup> 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 деионизированная.

Контрольная сыворотка (лиофилизированная) с параметрами, близкими к биохимическим параметрам крови здорового человека в норме.

Серная кислота.

Цинка сульфат.

Натрия гидроксид.

Колестиметат натрия.

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

### **Объект исследования:**

Сыворотка крови.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

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

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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 мин при ускорении 2000g. Надосадочный слой сыворотки крови в количестве 1000 мкл используют для исследований.

### **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 см<sup>3</sup> муравьиной кислоты смешивают с 995,0 см<sup>3</sup> деионизированной воды.

2. Элюент В: Ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ.

3. Раствор серной кислоты 1 М.

4. Раствор сульфата цинка 20 %.

5. Раствор натрия гидроксида 1 М.

6. Сток-растворы колистиметата натрия: 190000 МЕ (15,3 мг) колистиметата натрия растворяют в воде и разбавляют до 100 см<sup>3</sup> тем же растворителем (сток-1); 0,1 см<sup>3</sup> полученного раствора разбавляют водой до 1 см<sup>3</sup> (сток-2). Полученные сток-растворы используют сразу после приготовления.

7. Растворы сравнения: в пластиковые пробирки вместимостью 1,5 см<sup>3</sup> вносят указанные в таблице количества контрольной сыворотки и растворов колистиметата натрия. Туда же добавляют по 0,05 см<sup>3</sup> деионизированной воды и по 0,05 см<sup>3</sup> 1 М раствора серной кислоты. Смесь гомогенизируют 3–5 с путем перемешивания на микрошейкере и выдерживают 1 ч при комнатной температуре (не более 25°C). Затем добавляют 0,125 см<sup>3</sup> раствора сульфата цинка, гомогенизируют 3–5 с, добавляют 0,125 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия и 0,150 см<sup>3</sup> ацетонитрила. Снова гомогенизируют и центрифугируют при 6500g в течение 10 мин. Супернатант фильтруют через шприцевый мембранный фильтр (0,45 мкм) в 2-мл виалку и анализируют не позднее 2 ч.

Таблица — Приготовление растворов сравнения

Номер раствора	1	2	3	4	5	6
	Объем добавляемого раствора, см <sup>3</sup>					
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 деионизированная	-	0,060	0,090	0,060	0,090	0,098
	Концентрация колистиметата натрия, МЕ/см <sup>3</sup>					
	190	76	19	7,6	1,9	0,38
	Концентрация колистиметата натрия, мкг/см <sup>3</sup>					
	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/см<sup>3</sup> или мкг/см<sup>3</sup>, устанавливают методом абсолютной калибровки по 6 растворам сравнения, приготовленным согласно таблице. 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 относительно линейности, точности и соотношения сигнал/шум. Должны выполняться установленные изготовителем средства измерения критерия 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 мс;
- 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	Подтверждение
Колистин А	84	6	293,2 → 123,1	Подтверждение

### Определение содержания колистина

Испытуемый раствор 1 (определение количества колестиметата натрия, гидролизованного до колистина): 0,500 см<sup>3</sup> испытуемой сыворотки помещают в пластиковую пробирку вместимостью 1,5 см<sup>3</sup>. Туда же помещают 0,05 см<sup>3</sup> деионизированной воды. Затем добавляют 0,125 см<sup>3</sup> раствора сульфата цинка, гомогенизируют 3–5 с на микрошейкере, добавляют 0,125 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия, 0,150 см<sup>3</sup> ацетонитрила, снова гомогенизируют и затем центрифугируют при 6500g в течение 10 мин. Супернатант фильтруют через шприцевый мембранный фильтр (0,45 мкм) в 2-миллиметровую виалку и анализируют не позднее 2 ч.

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

Состав лекарственных средств, содержащих колестиметат натрия, включает колестиметат натрия, который в водных средах гидролизует с образованием сульфметилированных производных и самого колистина. Поэтому для оценки фармакокинетики и расчета фармакодинамических показателей необходимо определение содержания в крови колестиметата натрия и колистина. Разница между содержанием колестиметата 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, предложенное изготовителем средства измерения и предусматривающее валидацию калибровки относительно линейности, точности

и соотношения 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/см<sup>3</sup> или мкг/см<sup>3</sup>, рассчитывают по формуле:

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

где  $C_{\text{ир}}$  — значение концентрации колестиметата натрия в испытуемом растворе, определенное по калибровочной кривой, МЕ/см<sup>3</sup> или мкг/см<sup>3</sup>;

$V_{\text{н}}$  — номинальный объем раствора испытуемого образца, см<sup>3</sup>.

$V_{\text{но}}$  — объем сыворотки испытуемого образца, см<sup>3</sup>.

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