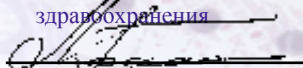


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра
здравоохранения _____

 Л.А. Постоялко

9 апреля 2002 г.
Регистрационный № 123-1001

**Сорбционное выделение
и хроматографическое определение бемитила и томерзола
в биологических жидкостях**

(инструкция по применению)

Учреждение-разработчик: Витебский государственный медицинский университет

Авторы: д-р фарм. наук, проф. А.И. Жебентяев, канд. фарм. наук Н.А. Алексеев, д-р мед. наук
Э.С. Питкевич

[Перейти к оглавлению](#)

ОГЛАВЛЕНИЕ

Нормы погрешности измерений.....	3
Перечень необходимого оборудования, реактивов, лекарственных средств и инструментария	4
Оборудование	4
Реактивы	5
Описание метода измерений	6
Описание технологии использования метода с указанием этапов	6
1. Порядок включения и подготовки к работе газового или жидкостного хроматографа	6
2. Приготовление реактивов	7
3. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ.....	8
4. Построение градуировочных графиков	9
5. Подготовка сорбционной колонки	10
6. Изолирование бемитила и томерзола из биологических жидкостей	11
7. Определение бемитила и томерзола	11
8. Обработка результатов измерений	12
Требования безопасности	13
Требования к квалификации оператора	13
Условия выполнения измерений	13

Настоящая методика предназначена для определения бемитила (2-этилтиобензимидазола гидробромид) и томерзола (2-этилтио-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид) при фармакокинетических и химико-токсикологических исследованиях биологических жидкостей (кровь, плазма крови, моча). Бемитил применяется в медицинской практике в качестве антигипоксанта, томерзол является перспективным антигипоксантом (в настоящее время проходит клинические испытания). Фармакокинетика данных препаратов при различных состояниях организма изучена недостаточно, поэтому требуется разработка воспроизводимых и чувствительных методик определения данных веществ в биологических жидкостях.

НОРМЫ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Предлагаемая методика позволяет определять терапевтические и токсические концентрации бемитила и томерзола в биологических жидкостях. Предел обнаружения бемитила и томерзола в плазме крови методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) составляет 0,2 и 0,3 мкг/см³ соответственно, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) — 0,05 и 0,07 мкг/см³ соответственно. Линейность градуировочного графика при определении бемитила и томерзола в плазме крови методом ГЖХ достигается в диапазоне концентраций 0,4–10 мкг/см³, методом ВЭЖХ — 0,1–10 мкг/см³. Воспроизводимость результатов анализа (относительное стандартное отклонение — S_r) составляет для бемитила (при концентрации в крови 1,0 мкг/см³) 0,10 и 0,15 методами ГЖХ и ВЭЖХ соответственно, для томерзола (при концентрации в крови 1,0 мкг/см³) — 0,06 и 0,04 методами ГЖХ и ВЭЖХ соответственно. Степени извлечения бемитила и томерзола из плазмы крови составляют 78–92% и 89–111% соответственно.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

Оборудование

Барометр анероид М-67

ТУ 2504-1797-75

Весы аналитические ВЛА-200
или аналогичные

ГОСТ 34104-80Е

Газовый хроматограф с термоионным детектором
(«Цвет» или аналогичный)

Хроматограф жидкостный микроколоночный
«Милихром-4» со спектрофотометрическим детектором
или аналогичный

ТУ 25-7405.0009-89

Иономер универсальный ЭВ-74

ГОСТ 22261-76

Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 см³

ГОСТ 1770-74

Пипетки мерные на 0,1; 1,0; 5,0; 10; 25 см³

ГОСТ 20292-74

Стаканы стеклянные на 100, 250 см³

ГОСТ 6236-72

Цилиндры мерные вместимостью 10, 100 см³

ГОСТ 1770-74Е

Микрошприц МШ-10М

ТУ 2-833-106

Баня водяная

ТУ 46-22-603-75

Водоструйный насос

ГОСТ 10696-75

Встряхиватель механический

ТУ 64-1-1081-73

Пробирки химические типа ПХ

ГОСТ 10515-75

Пробирки центрифужные типа ПЦ

ГОСТ 10515-75

Могут быть использованы другие средства измерений и вспомогательные устройства, по точности не уступающие рекомендуемым в методике.

Реактивы

Азот особой чистоты

Ацетонитрил для ВЭЖХ

Бемитил

Вода бидистиллированная

Воздух

Гелий

Насадки для хроматографической колонки

«Хроматон N-AW DMCS» с 5% OV-17 (0,16–0,20 мм)

(«Хемапол», Чехия)

Колонка для жидкостной хроматографии,

заполненная сорбентом Nucleosil 100–5 C₁₈

(зернение 5 мкм) или Сепарон C₁₈, длина 62–80 мм,

диаметр 2 мм

Спирт этиловый 95%

Калия дигидрофосфат, х.ч

Кислота ортофосфорная, х.ч

Сорбент «Диасорб C₁₆» (зернение 0,10–0,16 мм)

(«Биохиммак», Россия) или аналогичный зарубежный

(кремнезем с привитыми гексадецильными

или октадецильными группами)

Томерзол (содержание действующего вещества не менее 98%)

Дибазол

ГОСТ 9293-74

ТУ 6-09-3534-87

ФС 42-2525-88

ГОСТ 11882-73

ГФ X, статья 631

ГОСТ 4198-75

ГОСТ 6552-80

ГФ X, статья 212

ОПИСАНИЕ МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЙ

Метод измерения — газовая или жидкостная хроматография. Количественное газохроматографическое определение бемитила и томерзола проводится методом внутреннего стандарта, в качестве которого используется дибазол. Разделение веществ проводится на насадочной колонке с силиконовой фазой OV-17. Определение бемитила и томерзола методом обращенно-фазовой ВЭЖХ проводится методом внешнего стандарта по градуировочному графику. Для повышения точности результатов при определении бемитила можно использовать в качестве внутреннего стандарта томерзол, при определении томерзола — бемитил. Выделение производных бензимидазола из плазмы крови проводится методом сорбции на химически модифицированных кремнеземах с привитыми алкильными (гексадецильными или октадецильными) группами. Данный вариант пробоподготовки обеспечивает высокую степень извлечения определяемых веществ и низкую загрязненность пробы эндогенными веществами (липидами, белками и др.).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

1. Порядок включения и подготовки к работе газового или жидкостного хроматографа

Осуществляется согласно инструкции на этот прибор.

1.1. Подготовка и кондиционирование колонки для газовой хроматографии

Готовую насадку (5% OV-17 на «Хроматон N-AW DMCS» зернением 0,16–0,20 мм) засыпают в стеклянную хроматографическую колонку, уплотняют под вакуумом, колонку устанавливают в термостате хроматографа, не присоединяя к детектору, и стабилизируют в токе азота, постепенно повышая температуру термостата колонок от 50 до 280° С (скорость нагрева 5° С/мин). Температура испарителя 300° С, кондиционирование проводят в течение 8–10 ч.

1.2. Подготовка колонки для жидкостной хроматографии

Готовую стальную колонку длиной 64–80 мм и внутренним диаметром 2 мм, заполненную сорбентом Nucleosil-100- C_{18} или Сепарон C_{18} (5 мкм), устанавливают в жидкостный хроматограф и пропускают через колонку не менее 20 «мертвых» объемов подвижной фазы со скоростью 100–120 мм³/мин (для стандартной колонки, указанной в данной инструкции, объем подвижной фазы для кондиционирования колонки составляет не менее 4 см³).

2. Приготовление реактивов

2.1. Приготовление стандартного раствора бемитила (концентрация 1,00 мг/см³)

Навеску бемитила 0,1000 г (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³ и прибавляют 50–60 см³ этилового спирта, перемешивают до растворения и доводят этиловым спиртом объем до метки. Срок хранения раствора — 6 мес. при 0–4° С.

2.2. Приготовление стандартного раствора томерзола (концентрация 1,00 мг/см³)

Навеску томерзола 0,1000 г (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³ и прибавляют 50–60 мл этилового спирта, перемешивают до растворения и доводят этиловым спиртом объем до метки. Срок хранения раствора — 6 мес. при 0–4° С.

2.3. Приготовление раствора внутреннего стандарта (раствор дибазола, концентрация 0,50 мг/см³)

Навеску дибазола 0,0500 г (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, прибавляют 50–60 см³ этилового спирта и после растворения доводят этиловым спиртом объем до метки. Срок хранения раствора — 6 мес. при 0–4° С.

2.4. Приготовление рабочего раствора бемитила (концентрация 50,0 мкг/см³)

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 5,00 см³ стандартного раствора бемитила концентрации 1,00 мг/см³ и доводят бидистиллированной водой до метки, перемешивают. Срок хранения раствора — 10 сут при комнатной температуре.

2.5. Приготовление рабочего раствора томерзола (концентрация 50,0 мкг/см³)

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 5,00 см³ стандартного раствора томерзола концентрации 1,00 мг/см³ и доводят бидистиллированной водой до метки, перемешивают. Срок хранения раствора — 10 сут при комнатной температуре.

2.6. Приготовление рабочего раствора внутреннего стандарта (дибазола) (концентрации 40,0 мкг/см³)

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 4,00 см³ раствора внутреннего стандарта (дибазол) концентрации 0,50 мг/см³ и доводят бидистиллированной водой до метки. Срок хранения раствора — 2 сут при комнатной температуре.

3. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

3.1. Приготовление раствора дигидрофосфата калия (концентрации 5×10^{-2} моль/дм³)

Навеску дигидрофосфата калия 0,6804 г помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в 40–60 м³ бидистиллированной воды и доводят водой объем до метки. Срок хранения раствора — 7 сут при комнатной температуре.

3.2. Приготовление подвижной фазы

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 20,0 см³ раствора дигидрофосфата калия концентрации 5×10^{-2} моль/дм³, прибавляют 50 см³ бидистиллированной воды и доводят ацетонитрилом до метки. Перемешивают, переносят в стакан вместимостью 200 см³ и доводят рН подвижной фазы до 3,3–3,5 при помощи ортофосфорной кислоты. Подвижную фазу фильтруют через стеклянный фильтр под вакуумом водоструйного насоса, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, если необходимо, доводят объем до метки ацетонитрилом, перемешивают и пропускают ток гелия (расход 50–70 см³/мин) в течение 5 мин. Хранят подвижную фазу в мерной колбу с притертой пробкой в течение не более 2 сут при комнатной температуре.

4. Построение градуировочных графиков

4.1. Построение градуировочного графика для определения бемитила и томерзола методом ГЖХ с внутренним стандартом

Методом последовательного разбавления готовят градуировочные растворы бемитила и томерзола в этиловом спирте с концентрацией 50, 20, 10, 5 и 2 мкг/см³. Для этого по 5,00–2,00–1,00–0,50–0,20 см³ стандартных растворов бемитила и томерзола с концентрацией 1,00 мг/см³ помещают в мерные колбы вместимостью 100 см³, прибавляют 4,00 см³ раствора дибазола с концентрацией 1 мг/см³, доводят объем до метки этиловым спиртом и перемешивают. Последовательно вводят в испаритель хроматографа по 1–3 мм³ градуировочных растворов, отмечают высоту или площадь пиков бемитила, томерзола и дибазола. Градуировочные графики строят в координатах «концентрация бемитила и томерзола в спиртовом растворе (мкг/см³)/отношение высот или площадей пиков бемитила, томерзола к пику дибазола».

4.2. Построение градуировочного графика для определения бемитила и томерзола методом ВЭЖХ

Методом последовательного разбавления готовят градуировочные растворы бемитила и томерзола в бидистиллированной воде с концентрацией 20, 10, 4, 2, 1, 0,5 мкг/см³. Для этого по 10,0–5,0–2,0–1,0–0,50–0,25 см³ рабочих растворов бемитила и томерзола концентрации 50,0 мкг/см³ помещают в мерные колбы вместимостью 25 см³ и доводят объем до метки бидистиллированной водой. Последовательно вводят в жидкостный хроматограф по 10 мм³ каждого раствора и отмечают площади соответствующих пиков бемитила и томерзола на хроматограмме. Градуировочные графики строят в координатах «концентрация бемитила и томерзола (мкг/см³)/площадь пика бемитила и томерзола».

4.3. Построение градуировочного графика для определения бемитила методом ВЭЖХ с внутренним стандартом томерзолом

Методом последовательного разбавления готовят градуировочные растворы бемитила в бидистиллированной воде с концентрацией 20, 10, 4, 2, 1, 0,5 мкг/см³. Для этого по 10,0–5,0–2,0–1,0–0,50–0,25 см³ рабочего раствора бемитила концентрации 50,0 мкг/см³ помещают в мерные колбы вместимостью 25 см³, в каждую колбу прибавляют по 2,0 см³ рабочего раствора томерзола концентрации 50,0 мкг/см³ и доводят объем до метки бидистиллированной водой. Последовательно вводят в жидкостный хроматограф по 10 мм³ каждого раствора и отмечают площади соответствующих пиков бемитила и томерзола на хроматограмме. Градуировочные графики строят в координатах «концентрация бемитила (мкг/см³)/отношение площади пика бемитила к площади пика внутреннего стандарта (томерзола)».

4.4. Построение градуировочного графика для определения томерзола методом ВЭЖХ с внутренним стандартом бемитилом

Методом последовательного разбавления готовят градуировочные растворы томерзола в бидистиллированной воде с концентрацией 20, 10, 4, 2, 1, 0,5 мкг/см³. Для этого по 10,0–5,0–2,0–1,0–0,50–0,25 см³ рабочего раствора томерзола концентрации 50,0 мкг/см³ помещают в мерные колбы вместимостью 25 см³, в каждую колбу прибавляют по 2,0 см³ рабочего раствора бемитила концентрации 50,0 мкг/см³ и доводят объем до метки бидистиллированной водой. Последовательно вводят в жидкостный хроматограф по 10 мм³ каждого раствора и отмечают площади соответствующих пиков бемитила и томерзола на хроматограмме. Градуировочные графики строят в координатах «концентрация томерзола (мкг/см³)/отношение площади пика томерзола к площади пика внутреннего стандарта (бемитила)».

5. Подготовка сорбционной колонки

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 5–10 мм и длиной 70–100 мм с оттянутым концом, в который помещен кусочек стекловолокна, помещают 0,2 г «Диасорба-130-С₁₆» с зернением 0,10–0,16 мм, суспендированного в 3–5 мл этилового спирта, уплотняют под вакуумом водоструйного насоса. После этого патрон промывают 5 см³ очищенной воды (скорость пропускания (2–3 см³/мин) регулируют вакуумом водоструйного насоса).

6. Изолирование бемитила и томерзола из биологических жидкостей

Образец мочи, плазмы крови объемом $1,0 \text{ см}^3$ (рН мочи должно быть не менее 4,0 и не более 8,0) помещают в сорбционный патрон, прибавляют $0,1 \text{ см}^3$ раствора внутреннего стандарта (дибазол) концентрации 40 мкг/см^3 , пропускают через сорбционный патрон со скоростью около $1\text{--}2 \text{ см}^3/\text{мин}$. Для ускорения пропускания анализируемого объекта используется вакуум, создаваемый при помощи водоструйного насоса. Затем патрон промывают 5 см^3 воды очищенной и сушат под вакуумом водоструйного насоса в течение $7\text{--}10$ мин. Бемитил и томерзол элюируют $1,5 \text{ см}^3$ этанола, собирают элюат в пробирку центрифужную вместимостью $5\text{--}10 \text{ см}^3$ и упаривают досуха на водяной бане при температуре $60\text{--}65^\circ \text{C}$ в токе воздуха. Остаток после упаривания растворяют в $0,2 \text{ см}^3$ этанола (если проводится газохроматографическое определение) или в $0,2 \text{ см}^3$ подвижной фазы для ВЭЖХ. Аликвоту $1\text{--}3 \text{ мм}^3$ полученного этанольного раствора микрошприцем вводят в испаритель газового хроматографа. Аликвоту 10 мм^3 раствора на подвижной фазе вводят в колонку жидкостного хроматографа.

7. Определение бемитила и томерзола

7.1. Качественное и количественное определение бемитила и томерзола методом ГЖХ

Хроматограф газовый «Цвет-106» или «Цвет-550» с термоионным детектором или аналогичный (температура детектора 320°C , если определение проводится на хроматографе «Цвет-550», или нагрев детектора в положении «меньше», если определение проводится на хроматографе «Цвет-106»). Колонка стеклянная спиральная длиной 1000 мм и внутренним диаметром 3 мм , заполненная насадкой «Хроматон N-AW-DMCS» зернением $0,16\text{--}0,20 \text{ мм}$, пропитанная 5% фазой OV-17. Температура испарителя — 280°C , температура термостата колонок — 200°C . Газовый режим: газ-носитель — азот $34 \text{ см}^3/\text{мин}$, водород $16,0\text{--}17,0 \text{ см}^3/\text{мин}$, воздух $200\text{--}250 \text{ см}^3/\text{мин}$. Рабочая шкала электрометра составляет $(5\text{--}10) \times 10^{-10}$ (при работе на хроматографе «Цвет-106») или $(64\text{--}128) \times 10^9$ (при работе на хроматографе «Цвет-550»). Относительное время удерживания бемитила и томерзола по внутреннему стандарту (дибазолу) составляет $0,25\text{--}0,26$ и $0,83\text{--}0,86$ соответственно.

Каждую анализируемую пробу вводят в хроматограф три раза и вычисляют средний результат. При помощи интегратора измеряют высоту или площадь соответствующих пиков на хроматограмме, рассчитывают отношение высот или площадей пиков бемитила и томерзола к высоте или площади пика дибазола, и по соответствующим градуировочным графикам находят содержание бемитила и томерзола в конечном этанольном растворе.

7.2. Качественное и количественное определение бемитила и томерзола методом ВЭЖХ

Определение выполняют на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-4» со спектрофотометрическим детектором. Разделение проводят в изократическом режиме на колонке с Nucleosil-100-C₁₈ (зернение 5 мкм) или Сепарон С₁₈ (длина 64–80 мм, внутренний диаметр 2 мм). Подвижная фаза — 10⁻² моль/л дигидрофосфат калия ацетонитрил в соотношении 70:30 по объему (рН подвижной фазы устанавливают 3,3–3,5 при помощи ортофосфорной кислоты), расход элюента 100–120 мм³/мин. Длина волны детекции 290 нм, масштаб регистрации 0,2–0,4, сканирование оптической плотности 1,0 с⁻¹. Удерживаемые объемы бемитила и томерзола составляют 300–320 и 420–450 мкл соответственно.

Каждую анализируемую пробу вводят в хроматограф три раза и вычисляют средний результат. Отмечают площади соответствующих пиков бемитила или томерзола на хроматограмме и по соответствующим градуировочным графикам рассчитывают содержание бемитила и томерзола в анализируемом образце.

8. Обработка результатов измерений

Концентрацию бемитила и томерзола (C_x, мкг/см³) в биологических жидкостях находят по формуле:

$$C_x = \frac{C \times V_1}{V_2}$$

где C (мкг/см³) — концентрация бемитила или томерзола, найденная по соответствующему градуировочному графику;

V₁ (см³) — объем конечного хроматографируемого раствора (0,2 см³);

V₂ (см³) — объем крови или мочи, взятой для анализа.

ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

При выполнении методики необходимо соблюдать меры безопасности при работе со сжатыми газами, и меры безопасности, описанные в основных правилах безопасной работы в лаборатории.

ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРА

Анализ выполняется химиком-аналитиком, врачом-лаборантом или химиком-экспертом.

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- атмосферное давление 95 ± 10 кПа;
- температура воздуха $20 \pm 5^\circ \text{C}$;
- влажность воздуха не более 80% при температуре 25°C ;
- напряжение питания сети 220 ± 22 В;
- частота тока 50 ± 1 Гц.