

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель министра

Р.А. Часнойть

20 10 г.

Регистрационный № 123-1108

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕОФИЛЛИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ

(инструкция по применению)

Учреждение разработчик: Витебский государственный медицинский университет.

Авторы: доктор фармацевтических наук, профессор А.И. Жебентяев;
аспирант М.Л. Пивовар

Витебск 2009г.

Теofilлин является алкалоидом пуринового ряда и относится к группе спазмолитиков миотропного действия. Он оказывает гипотензивное, спазмолитическое действие, стимулирует деятельность миокарда, расширяет мускулатуру бронхов. В медицинской практике широко применяется для профилактики бронхоспазмов. Терапевтическая концентрация теofilлина в плазме крови составляет 10-15 мкг/мл, токсическая 25-30 мкг/мл, летальная – свыше 50 мкг/мл. При отравлениях группой неизвестных лекарственных препаратов может возникать необходимость качественного обнаружения и количественного определения теofilлина в плазме крови. Одним из наиболее точных и достоверных методов качественного обнаружения и количественного определения соединений различной химической структуры является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Настоящая методика предназначена для количественного определения теofilлина при анализе плазмы крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным или спектрофотометрическим детектированием. В качестве внутреннего стандарта использован близкий к анализируемому соединению по структуре пентоксифиллин.

НОРМЫ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Методика предназначена для контроля содержания теofilлина в плазме крови. Градуировочный график для количественного определения теofilлина линеен в пределах 1,0 – 100,0 мкг/см³ в инъецируемом объеме. Относительное стандартное отклонение, рассчитанное для каждой точки градуировочного графика, не превышает 10 %, а для точек, с концентрацией 1,0 и 5,0 мкг/см³ – 15 %.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

Оборудование

Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 34104-80Е
Иономер универсальный И-130 или аналогичный	ГОСТ 15150
Хроматограф жидкостный Agilent HP 1100 в комплекте с системой подачи растворителя, диодно-матричным или спектрофотометрическим детектором, термостатом колонок, устройством для автоматического ввода образцов или аналогичный	
Колбы мерные вместимостью 25,0; 50,0; 100,0; 1000,0 см ³	ГОСТ 1770-91
Пипетка мерная на 5,00 см ³	ГОСТ 29227-91
Цилиндр мерный вместимостью 100 см ³	ГОСТ 1770-74
Бюретка стеклянная вместимостью 25,0 см ³	ГОСТ 20292-74
Стаканы стеклянные вместимостью 100 см ³	ГОСТ 6236-72
Флаконы стеклянные для пробоподготовки Supelco с закручивающимися крышками, вместимостью 7 см ³ , или аналогичные	
Вортекс-шейкер ELMi Sky Line или аналогичный	
Шейкер	

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

Реактивы

Вода деионизированная (Millipore)	
Ацетонитрил для ВЭЖХ	ТУ 6-09-5497-91
Калия дигидрофосфат, х.ч.	ГОСТ 4198-75
Натрия гидрофосфат двуводный, х.ч.	ГОСТ 6552-80
Серная кислота концентрированная, х.ч.	ГОСТ 4204-77
Калия карбонат, х.ч.	ГОСТ 10690-73
Вода очищенная	ФС 42-2619-97
Теofilлин (Theophylline CRS)	BPCRS
Пентоксифиллин (Pentoxifylline CRS)	BPCRS
Колонка хроматографическая Zorbax StableBond С-18, 5 мкм, 4,6×250 мм или аналогичная	
Хлороформ, х.ч.	ГОСТ 20015-88
Изобутиловый спирт, ч.д.а.	ГОСТ 9536-79
Донорская плазма крови	

ОПИСАНИЕ МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЯ

Метод измерения – жидкостная хроматография. Выделение теofilлина из плазмы крови проводится методом жидкость-жидкостной экстракции. Данный вариант пробоподготовки обеспечивает высокую степень извлечения определяемого вещества и низкую загрязненность пробы сопутствующими веществами. Количественное определение содержания теofilлина проводится методом градуировочного графика по отношению площади пика к площади пика внутреннего стандарта.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

1. Порядок включения и подготовки к работе жидкостного хроматографа осуществляется в соответствии с инструкцией на данный прибор.

1.1. Перед проведением анализа хроматографическую колонку Zorbax StableBond C-18, 5 мкм, 4,6×250 мм или аналогичную промывают в течение 1-1,5 часов подвижной фазой со скоростью 1 см³/мин.

2. Приготовление реактивов.

2.1. Приготовление раствора внутреннего стандарта.

0,0100 г (точная навеска) пентоксифиллина (Pentoxifylline CRS) помещают в мерную колбу вместимостью 100,0 см³, прибавляют 50 см³ воды очищенной, встряхивают до полного растворения, доводят водой до метки и перемешивают.

1 см³ полученного раствора содержит 0,100 мг пентоксифиллина. Срок годности 1 месяц при температуре хранения 2-8 °С.

2.2. Приготовление буферного раствора.

9,073 г дигидрофосфата калия (ГОСТ 4198-75) помещают в мерную колбу вместимостью 1000,0 см³, прибавляют 500 см³ воды очищенной, встряхивают до полного растворения, доводят водой до метки и перемешивают.

11,866 г гидрофосфата натрия двуводного (ГОСТ 6552-80) помещают в мерную колбу вместимостью 1000,0 см³, прибавляют 500 см³ воды очищенной, встряхивают до полного растворения, доводят водой до метки и перемешивают.

99,0 см³ раствора дигидрофосфата калия и 1,0 см³ раствора натрия гидрофосфата смешивают в стеклянном стакане объемом 100 см³.

Полученный буферный раствор имеет $pH=5,0\pm 0,1$. Значение pH проверяется на иономере универсальном И-130. При необходимости pH корректируется добавлением растворов дигидрофосфата калия или гидрофосфата натрия. Срок годности 1 месяц при температуре хранения 20 ± 5 °С.

2.3. Приготовление экстракционной смеси.

2.3.1. Очистка хлороформа.

Необходимое количество хлороформа (ГОСТ 20015-88) встряхивают в делительной воронке с концентрированной серной кислотой (ГОСТ 4204-77), промывают водой, сушат над карбонатом калия (ГОСТ 10690-73) и перегоняют.

Полученный хлороформ хранится в прохладном темном месте в стеклянной таре из темного стекла. Срок годности 1 месяц при температуре хранения 2-8 °С.

2.3.2. Приготовление экстракционной смеси.

Для приготовления экстракционной смеси берут хлороформ (очищенный от стабилизирующей добавки спирта по методике, описанной в п. 2.3.1) и изобутиловый спирт (ГОСТ 9536-79). В стеклянном стакане, объемом 100 см^3 , смешивают $67,0\text{ см}^3$ хлороформа и $33,0\text{ см}^3$ изобутилового спирта.

Полученная экстракционная смесь содержит 33,0 % изобутилового спирта в хлороформе. Хранится в стеклянной таре из темного стекла. Срок годности 1 месяц при температуре хранения 20 ± 5 °С.

2.4. Приготовление растворов градуировочного графика.

0,0500 г (точная навеска) теофиллина (Theophylline CRS) помещают в мерную колбу вместимостью $50,0\text{ см}^3$, прибавляют 25 см^3 воды очищенной, встряхивают до полного растворения, доводят водой до метки и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу объемом $25,0 \text{ см}^3$ помещают $2,50 \text{ см}^3$ раствора А, 10 см^3 плазмы крови, тщательно перемешивают, доводят плазмой до метки и перемешивают (раствор Б).

В мерную колбу объемом $25,0 \text{ см}^3$ помещают $2,50 \text{ см}^3$ раствора Б, 10 см^3 плазмы крови, тщательно перемешивают, доводят плазмой до метки и перемешивают (раствор В).

В мерные колбы объемом $25,0 \text{ см}^3$ помещают указанные в ниже приведенной таблице объемы растворов Б и В, доводят плазмой до метки и перемешивают.

С (теофиллина), мкг/ см^3	1,0	5,0	10,0	30,0	50,0	70,0	100,0
V (раствора В), см^3	2,5	12,5	25,0	-	-	-	-
V (раствора Б), см^3	-	-	-	7,5	12,5	17,5	25,0

Полученные пробы плазмы содержат $1,0-100,0 \text{ мкг}/\text{см}^3$ теофиллина. Срок годности 1 месяц при температуре хранения $-20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.5. Приготовление подвижной фазы.

Вода деионизированная (Millipore) и ацетонитрил для ВЭЖХ (ТУ 6-09-5497-91) в дополнительной подготовке не нуждаются. После загрузки в емкости для подачи подвижной фазы в хроматограф, используются в течение суток.

3. Проверка пригодности хроматографической системы.

3.1. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику теофиллина должна быть не менее 5000 теоретических тарелок;
- степень разрешения пиков теофиллина и пентоксифиллина на хроматограмме должна быть не менее 1,5;

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для пика теофиллина на хроматограмме не должно превышать 10 %;
- коэффициент асимметрии, рассчитанный для определяемых веществ на хроматограмме на 5 % высоты пика должен находиться в пределах 0,7 – 1,5.

4. Пробоподготовка.

4.1. Подготовка проб плазмы крови градуировочного графика и анализируемых проб плазмы с неизвестным содержанием теофиллина.

Во флаконы для пробоподготовки помещают по 1,0 см³ плазмы, прибавляют 1,0 см³ фосфатного буферного раствора (pH=5,0), 100 мкл 0,01 % раствора пентоксифиллина в воде очищенной и перемешивают на вортекс-шейкере в течение 15 секунд. Прибавляют 2,0 см³ экстракционной смеси и перемешивают на шейкере 5 минут. После проведения экстракции экстракционные пробирки центрифугируют 5 минут при 3000 об/мин. Органическую фазу отделяют, упаривают досуха в токе воздуха при температуре 40 °С. Сухой остаток растворяют в 500 мкл 10 % водного раствора ацетонитрила и подвергают хроматографированию.

5. Процесс хроматографирования.

5.1. Разделение проводится в градиентном режиме. Подвижная фаза Г – вода деионизированная (Millipore); подвижная фаза Д – ацетонитрил для ВЭЖХ (ТУ 6-09-5497-91). Режим элюирования представлен в таблице.

Расход элюента составляет 1,0 см³/мин. Детектирование осуществляют при длине волны $\lambda = 273$ нм, объем инжектируемой пробы 50 мкл.

Время, мин	Подвижная фаза Г	Подвижная фаза Д	Режим
0-15,0	95 → 70	5 → 30	градиентный
15,0-17,0	70	30	изократический
17,0-17,1	70 → 95	30 → 5	градиентный
17,1–20,0	95	5	изократический

6. Обработка результатов измерений.

6.1. Расчет количественного содержания теофиллина.

Количественное содержание теофиллина в пробах плазмы крови определяют по методу градуировочного графика. Строят зависимость отношения площади пика теофиллина к площади пика внутреннего стандарта от концентрации. По методу наименьших квадратов получают уравнение, описывающее градуировочный график:

$$C = b \cdot \frac{S_{\text{ТФ}}}{S_{\text{ВС}}} + a$$

где:

C – концентрация теофиллина в плазме крови, мкг/см³;

$S_{\text{ТФ}}$ – площадь пика теофиллина на хроматограмме;

$S_{\text{ВС}}$ – площадь пика внутреннего стандарта (пентоксифиллина) на хроматограмме;

a и b – коэффициенты, полученные по методу наименьших квадратов при обработке данных градуировочного графика.

6.2. Оценка пригодности градуировочного графика.

Градуировочный график считается пригодным для определения концентрации теофиллина в плазме крови, если выполняются следующие условия:

- открываемость (R), рассчитываемая как отношение средней концентрации, определенной по градуировочному графику, и номинальной концентрации (введено), умноженная на 100 %,

должна быть в пределах 90 – 110 %, а для точек, с концентрацией 1,0 и 5,0 мкг/см³ не выходить за пределы 85 - 115 %.;

- коэффициент аппроксимации прямой должен быть не менее 0,999.

ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

При выполнении методики необходимо соблюдать меры безопасности при работе с концентрированными растворами кислот, щелочей и ядовитыми веществами, 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 ± 5 °С);
- влажность воздуха не более 80 %;
- напряжение питания сети (220 ± 22 В);
- частота тока (50 ± 1 Гц).

УТВЕРЖДАЮ

(руководитель учреждения, в котором внедрен способ)

« ____ » _____ 200 г.

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Наименование предложения для внедрения _____

2. Кем предложено (наименование учреждения-разработчика, авторы) _____

3. Источник информации _____

4. Где и кем начато внедрение _____

5. Общее количество наблюдений _____

6. Результаты применения метода за период с _____ по _____

положительные (кол-во наблюдений) _____

отрицательные (кол-во наблюдений) _____

7. Эффективность внедрения _____

8. Замечания, предложения _____

Дата _____

Ответственные за внедрение

ОБОСНОВАНИЕ ПРЕИМУЩЕСТВ ПРЕДЛАГАЕМОГО СПОСОБА АНАЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ НА СОДЕРЖАНИЕ ТЕОФИЛЛИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ

Теofilлин является алкалоидом пуринового ряда и относится к группе спазмолитиков миотропного действия. Одним из наиболее точных и достоверных методов качественного обнаружения и количественного определения соединений различной химической структуры является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В известных методиках при пробоподготовке, в качестве экстрагента, используются смеси хлороформа с изопропанолом, характеризующиеся низкими коэффициентами распределения теofilлина. В качестве подвижной фазы используются смеси буферных растворов с токсичным метанолом или ацетонитрилом.

Настоящая методика лишена перечисленных недостатков, характеризуется хорошей воспроизводимостью результатов анализа и предназначена для количественного определения теofilлина при анализе плазмы крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Авторы:

Заведующий кафедрой токсикологической
и аналитической химии Витебского госу-
дарственного медицинского университета,
профессор, доктор фармацевтических наук  А.И. Жебентяев

Аспирант кафедры токсикологической
и аналитической химии Витебского госу-
дарственного медицинского университета  М.Л. Пивовар

УТВЕРЖДАЮ

Проректор



по научно-исследовательской
работе, доцент

С.А. Сушков

2009г.

ОТЧЕТ

ОБ АПРОБАЦИИ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ НА СОДЕРЖАНИЕ ТЕОФИЛЛИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ

Разработанная методика была испытана при анализе проб плазмы крови на содержание теофиллина в Лаборатории стандартизации и контроля качества лекарственных средств УО «Витебский государственный медицинский университет».

Предлагаемая методика характеризуется хорошими метрологическими характеристиками. В таблице 1 приведены результаты количественного определения теофиллина в плазме крови по методу «введено-найдено» (в разные дни). Градуировочный график при количественном определении теофиллина линеен в пределах 1 – 100 мкг/мл в инъецируемом объеме. Относительное стандартное отклонение не превышает 10 %.

Общее время, необходимое для проведения одного анализа пробы плазмы крови, не превышает 60 минут, из которых хроматографический анализ составляет 20 минут.

Таблица 1 – Результаты количественного определения теофиллина в плазме крови ($P=0,95$; $n=5$).

Введено теофиллина, мкг/мл	Найдено теофиллина, мкг/мл $\bar{X} \pm \Delta X$	S_R
1,0	1,0 \pm 0,1	0,087
5,0	5,2 \pm 0,3	0,050
10,0	10,2 \pm 0,2	0,017
30,0	28,1 \pm 1,9	0,059
50,0	50,4 \pm 0,4	0,007
70,0	67,2 \pm 2,8	0,036
100,0	102,3 \pm 2,3	0,020

где: S_R – относительное стандартное отклонение.

Использование смеси хлороформ: изобутанол (33,0% изобутанола), характеризующейся высоким значением коэффициента распределения теофиллина, позволяет использовать малые количества экстрагента при пробоподготовке. Применение в качестве подвижной фазы смеси воды деионизированной (вместо буферных растворов) с ацетонитрилом уменьшает износ хроматографической системы и сокращает время подготовки хроматографа к анализу.

Все выше перечисленное позволяет сократить как время проведения анализа, так и расходы аналитической лаборатории на его проведение.

Заведующий Лабораторией стандартизации
и контроля качества лекарственных средств
УО «ВГМУ», кандидат фармацевтических наук



В.И. Фадеев