

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2012

Д. А. Абаимов, А. К. Сариев, И. А. Тюрин, Д. И. Прохоров, Т. Ю. Носкова, В. В. Шведков, Р. Д. Сейфулла

## ПРИМЕНЕНИЕ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ

Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр неврологии РАМН, Москва, Россия; e-mail: tempmed@yandex.ru

Разработана методика количественного определения антиконвульсанта вальпроевой кислоты на основе газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием по 3 характеристическим ионизированным фрагментам материнской молекулы с  $m/z$  73, 102 и 115. Данная методика применена для решения задач терапевтического лекарственного мониторинга антиконвульсантов. Определены индивидуальные фармакокинетические характеристики ряда пациентов Научного центра неврологии РАМН в отношении вальпроевой кислоты.

**Ключевые слова:** терапевтический лекарственный мониторинг; вальпроевая кислота; газовая хроматография; масс-спектрометрия; эпилепсия.

Вальпроевая кислота (2-пропилвалериановая кислота) — противоэпилептическое средство, обладающее широким спектром терапевтической активности, эффективное в отношении различных типов приступов в рамках идиопатической генерализованной и фокальной эпилепсии (рис. 1). Вальпроевая кислота оказывает противосудорожное (антиэпилептическое), центральное миорелаксирующее и седативное действие. На сегодняшний день это один из базовых антиконвульсантов — противоэпилептический препарат первой очереди выбора, так называемый “золотой стандарт” в лечении эпилепсии. Вальпроевая кислота и её соли применяются как в монотерапии эпилепсии, так и в комбинации с другими препаратами. В процессе лечения путем титрования происходит индивидуальный подбор эффективной и хорошо переносимой дозы препарата, непрерывный прием которого продолжается несколько лет. Фармакокинетика вальпроевой кислоты имеет ряд специфических особенностей. Так, объем распределения вальпроевой кислоты довольно низок и составляет в среднем от 0,1 до 0,5 л/кг, препарат элиминируется из плазмы крови преимущественно посредством печеночного метаболизма (> 95 %) с участием различных механизмов, включающих бета-окисление, омега-гидроксилирование и глюкуронирование. Основным метаболитом является 4-эпивальпроевая кислота (предположительно, обладающая гепатотоксическим действием) [1]. Период полувыведения вальпроевой кислоты относительно короток и составляет 6–16 ч. Отличительной особенностью данного препарата является также высокая лабильность его фармакокинетических параметров, с чем связана его исключительно широкая межиндивидуальная фармакокинетическая вариабельность. В этой связи

до настоящего времени не определены минимальная эффективная и максимальная переносимая концентрации. Рекомендуемые терапевтические концентрации находятся в пределах 50–100 мг/л. Иногда фармакотерапия вальпроатами вызывает ожирение, дерматологические изменения, гипераммониемию, поражение печени и гематологические побочные эффекты [2]. Указанные особенности вальпроатов свидетельствуют о важности фармакотерапевтической индивидуализации при их применении, для чего необходимо осуществлять регулярный терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ). К сожалению, арсенал аналитических методов определения вальпроевой кислоты не велик. Ввиду относительной дешевизны и доступности в настоящее время наиболее широко применяется методика ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. Поскольку вальпроевая кислота неактивна в УФ-спектре, для ее количественного ВЭЖХ-УФ определения применяется метод предколонной дериватизации с помощью 4-бромфенацилбромида и дициклогексан-18-краун-6 [3]. Данный метод весьма непрост в использовании, поскольку применяемый в нем процесс дериватизации весьма сложен, носит выраженный рН-зависимый характер, то есть полноценно проходит в очень узком диапазоне рН (от 7,0 до 7,5), а реакционная смесь эстерифицирующих агентов при хранении довольно быстро самопроизвольно закисляется. Все перечисленное в совокупности влияет и на прецизионность анализа. Кроме того, дериватизация требует дополнительной закупки твердотельного термостата и дорогостоящих химических реактивов. Таким образом, в настоящее время существует насущная необходимость разработки простого и надежного метода количественного определения вальпроатов без

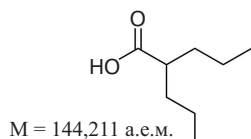


Рис. 1. Структурная формула вальпроевой кислоты.

предварительной дериватизации, который вместе с тем имел бы высокую селективность в отношении данного препарата. Указанным характеристикам соответствует аналитический метод хроматомасс-спектрометрии. Поэтому задачей настоящего исследования стала разработка селективного и высокочувствительного хроматомасс-спектрометрического метода количественного определения вальпроевой кислоты в плазме крови пациентов без предварительной дериватизации.

### Экспериментальная часть

Использовали следующие реактивы и органические растворители: соляную кислоту (о.с.ч.), деионизированную воду с сопротивлением 18 МОм, этилацетат (о.с.ч.), хроматографический стандарт — вальпроевую кислоту (Sigma-Aldrich). В качестве газа-носителя использовался гелий (о.с.ч.).

Анализ проб проводили на газовом хроматомасс-спектрометре Agilent 5975/6850 (США) в следующей комплектации: автосамплер Agilent 7683B Injector; газовый хроматограф Agilent 6850 Series II Network GC System с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975B inert XL MSD; программное обеспечение MSD Chem Station D.03.00.552.

Для хроматографирования применяли капиллярную колонку HP-1 фирмы Agilent Technologies (США) с неполярной привитой неподвижной фазой (100 % диметилполисилоксан), диаметр — 0,32 мм, длина — 30 м, толщина привитой фазы — 0,25 мкм. В качестве вспомогательного оборудования при пробоподготовке использовали вибромиксер “Vortex”, встряхиватель для пробирок Elmi S-3L, центрифужный концентратор Eppendorf Concentrator 5301 и др. Образцы крови для подбора условий хроматографирования вальпроевой кислоты отбирались в объеме 5 – 7 мл, пробы центрифугировались для отделения плазмы при 3000 об/мин в течение 10 мин и хранились до анализа при температуре – 20 °С.

Расчет фармакокинетических характеристик проводили с помощью программы MM-USC Pack V. 15.2.

### Результаты и их обсуждение

На сегодняшний день в научной литературе существует лишь 1 публикация, в которой описано применение метода газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС) для определения вальпроевой кислоты без дериватизации [4], где приводится универсальная многостадийная методика пробоподготовки для всех *post-mortem* тканей организма, включающая многоступенчатую переэкстракцию в различных экстракционных смесях с варьирующими

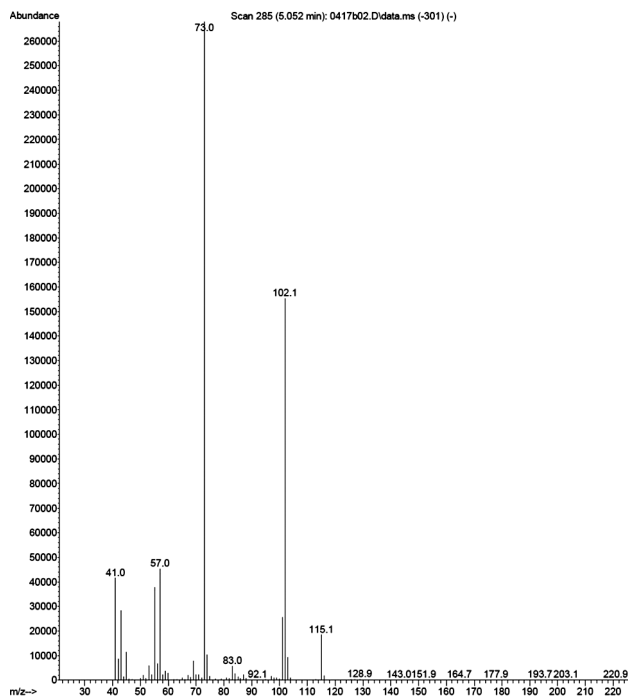
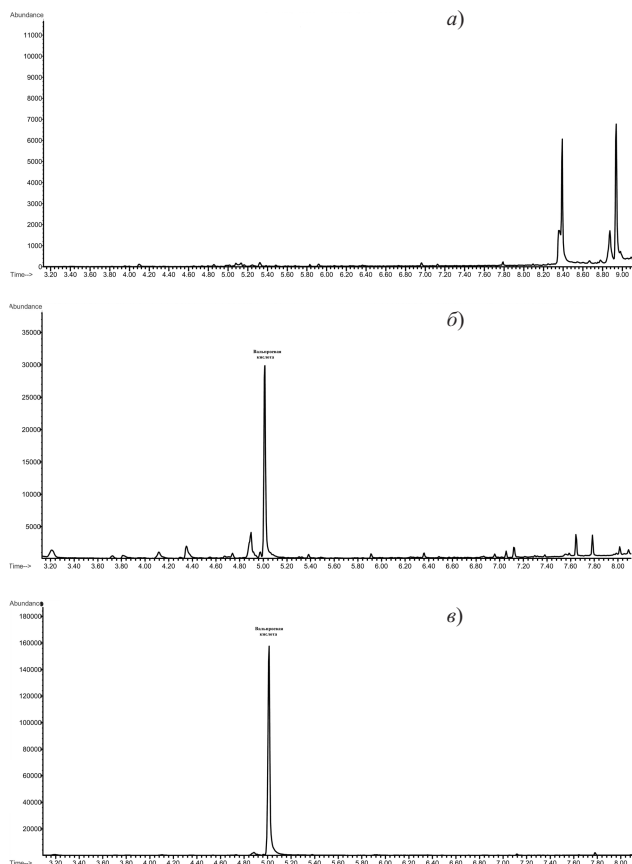


Рис. 2. Масс-спектр вальпроевой кислоты. По оси абсцисс — отношение молекулярной массы ионизированного фрагмента к его заряду —  $m/z$ , по оси ординат — интенсивность отклика в относительных единицах.

значениями pH. Данная методика представляется избыточно трудоемкой, времязатратной и недостаточно точной. В случае работы с плазмой крови пациентов в применении такой сложной методики экстракции нет необходимости. Также к недостаткам вышеуказанной методики относится применение режима полного сканирования ионов для количественного определения вальпроевой кислоты (отсутствие удобного SIM-метода), что ухудшает чувствительность методики. Таким образом, основной задачей нашего исследования стало создание простой и надежной методики пробоподготовки для вальпроевой кислоты в плазме крови, а также разработка высокочувствительного метода определения вальпроевой кислоты с применением режима мониторинга выбранных ионов (SIM-метод). На основании анализа литературных данных был проведен пилотный эксперимент по определению наиболее эффективных условий экстракции для вальпроевой кислоты [5 – 8]. Для закисления плазмы крови, согласно литературным данным, нами была выбрана соляная кислота — 2 М HCl. В эксперименте сравнивалась экстракционная способность диэтилового эфира, гексана, пентана, этилацетата и смеси этилацетат — диэтиловый эфир (50:50). Показано, что наиболее эффективным экстрагентом вальпроевой кислоты является чистый этилацетат (процент экстракции —  $97 \pm 2\%$ ), наименее эффективным — пентан (процент экстракции —  $35 \pm 8\%$ ). В окончательном виде условия экстракции выглядят следующим образом.

К 0,5 мл плазмы крови прибавляют 0,5 мл 2 М соляной кислоты и перемешивают на вибромиксере “Vortex”. Далее к полученной смеси прибавляют 5 мл этилацетата и экстракционную пробирку помещают



**Рис. 3.** Демонстрационные хроматограммы вальпроевой кислоты. По оси абсцисс — время  $t_{\text{мин}}$ , мин, по оси ординат — отклик прибора в относительных единицах интегрирования. Время выхода вальпроата — 5,01 мин. *а* — хроматограмма экстракта интактной плазмы, *б* — хроматограмма экстракта плазмы крови с концентрацией вальпроевой кислоты 6 мкг/мл, *в* — хроматограмма экстракта плазмы пациента, принимавшего вальпроевую кислоту в дозе 200 мг (3 ч после приема препарата).

на орбитальный встряхиватель на 300 об/мин на 10 мин. После этого полученную смесь центрифугируют при 3000 об/мин, органический слой аккуратно декантируют и переносят в пробирку концентратора, где упаривают под вакуумом при температуре 60 °С. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл метанола, полученный раствор переносят в виалу автосамплера для дальнейшего хроматографического анализа. Аликвоту полученного раствора в объеме 1 мкл инжигируют в хроматомасс-спектрометр.

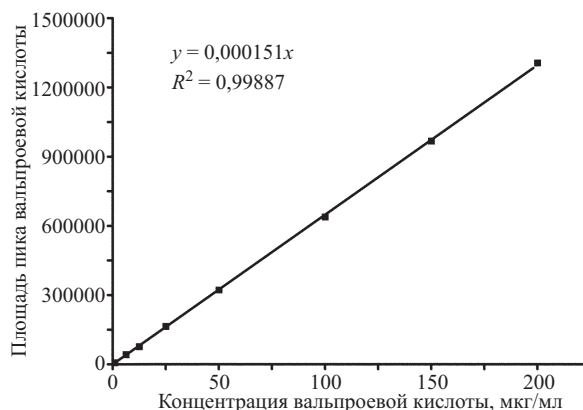
#### Условия ГХ-МС анализа

Для разработки SIM-метода предварительно был снят полный масс-спектр вальпроевой кислоты в режиме полного сканирования фрагментарных ионов в диапазоне отношений масс к заряду от 40 до 600  $m/z$  (рис. 2).

На основании полученных данных для SIM-метода были выбраны 3 ионизированных фрагмента молекулы вальпроевой кислоты с отношениями массы к заряду  $m/z = 73, 102$  и  $115$  соответственно.

Окончательный вариант хроматомасс-спектрометрического анализа выглядит следующим образом.

Начальная температура печи-термостата была 70 °С (продолжительность термостагирования — 3 мин), за-



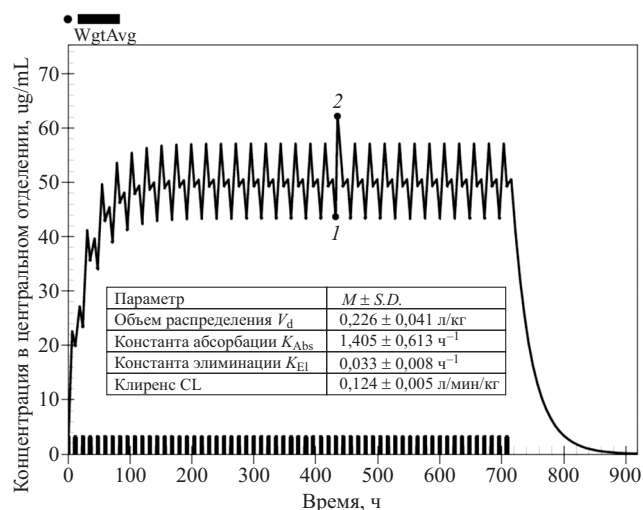
**Рис. 4.** Градуировочный график вальпроевой кислоты. По оси абсцисс — концентрация вальпроевой кислоты, мкг/мл, по оси ординат — отклик прибора в относительных единицах интегрирования.

тем она увеличивалась с градиентом 35 °С в 1 мин до 180 °С (3 – 6 мин), с 6 по 8-ю минуту температура поднималась с градиентом 50 °С в 1 мин до 280 °С и удерживалась на данной температуре в течение 4 мин. Общее время хроматографирования составляло, таким образом, 12 мин. Градиент температур комбинировали с градиентным увеличением потока газа-носителя с целью сокращения времени анализа: первые 7 мин скорость потока составляла 1,5 мл/мин, на 6 мин поднималась до 2,5 мл/мин и удерживалась на этой скорости до окончания хроматографирования. Объем вносимой в инжектор пробы составлял 1 мкл. Ввод пробы осуществляли с делением потока (Split Ratio = 5:1). Сочетанием температурного градиента и градиента скорости потока гелия достигалось сокращение общего времени анализа. Время окончания анализа было выбрано при хроматографировании в режиме full-scan по времени выхода компонентов естественного фона плазмы (на 1 мин позже времени выхода пика холестерина). Данный подход необходим для увеличения срока работы капиллярной колонки и применяется для достижения наиболее полного схождения с колонки тяжелых биологических загрязнителей. Давление на инжекторе было 23,5 psi, температура источника ионизации составляла 230 °С, температура трансферлайна – 280 °С, температура квадруполя – 150 °С. Масс-спектрометр работал в режиме ионизации типа “электронный удар” (EI) с энергией ионизирующих электронов 70 эВ, в режиме мониторинга заданных ионов (SIM,  $m/z = 73$  ( $C_3H_5O_2$ ),  $102$  ( $C_5H_{10}O_2$ ) и  $115$  ( $C_6H_{11}O_2$ ) для вальпроевой кислоты). В указанных условиях время удерживания вальпроевой кислоты составляет 5,01 мин.

На рис. 3 представлены хроматограммы (*а*) интактной плазмы, (*б*) плазмы крови с концентрацией вальпроевой кислоты 6 мкг/мл, (*в*) плазмы пациента, принимавшего вальпроевую кислоту в дозе 200 мг (3 ч после приема препарата).

#### Количественный анализ и валидационные характеристики методики

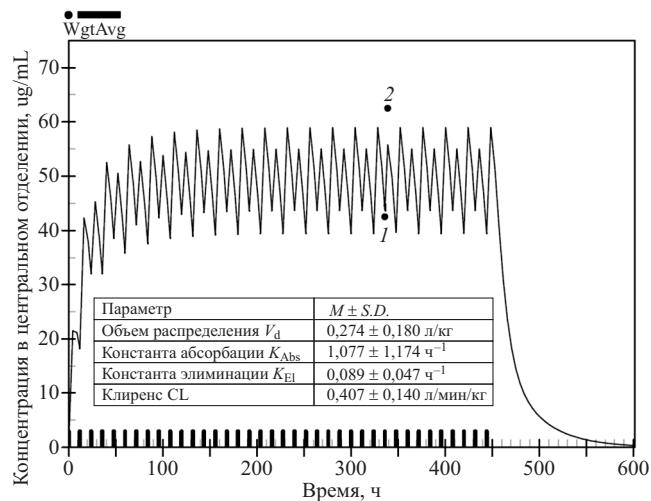
Количественный анализ проводили методом абсолютной калибровки с использованием программного



**Рис. 5.** График изменения концентрации вальпроевой кислоты в плазме крови пациента В. Пациент В., дозовый режим — 750 мг вальпроевой кислоты в 1 сут (10 мг/кг), интервал дозирования — 12 ч. График создан с помощью программы MM-USCPACK; по оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — концентрация вальпроата в плазме крови, мкг/мл. Кривая на графике характеризует рассчитанные значения концентрации препарата на данном отрезке времени, точки 1 и 2 — реальные измеренные значения концентрации вальпроевой кислоты.

обеспечения “MSD Chem Station D.03.00.552” компании “Agilent Technologies”, США. Калибровочную кривую получали в результате анализа проб плазмы с добавками известных количеств стандарта определяемого соединения. Расчет концентрации вальпроевой кислоты в плазме крови осуществляли по площади хроматографического пика. С целью количественного определения по методу абсолютной калибровки были составлены контрольные смеси вальпроевой кислоты в интактной плазме крови с конечной концентрацией вальпроевой кислоты 1; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 150; 200 мкг/мл и построен калибровочный график зависимости площади пика вальпроевой кислоты от её концентрации в крови (рис. 4).

При регрессионном анализе выявляется линейная зависимость между концентрацией вальпроевой кислоты и отношением площадей хроматографических пиков в интервале от 1 до 200 мкг/мл. Калибровочный график, составленный по результатам анализа контрольных смесей, представляет собой прямую линию во всем указанном диапазоне концентраций. Вследствие этого концентрацию вальпроевой кислоты в пробах определяли по калибровочной кривой, описываемой уравнением:  $C = 0,000151S$ , где  $C$  — концентрация вальпроевой кислоты (мкг/мл),  $S$  — площадь пика вальпроевой кислоты (условные единицы интегрирования). Коэффициент корреляции составил 0,999, что



**Рис. 6.** График изменения концентрации вальпроевой кислоты в плазме крови пациентки Ф. Пациентка Ф., дозовый режим — 1750 мг вальпроевой кислоты в 1 сут (22 мг/кг), интервал дозирования — 12 ч. График создан с помощью программы MM-USCPACK, по оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — концентрация вальпроата в плазме крови, мкг/мл. Кривая на графике характеризует рассчитанные значения концентрации препарата на данном отрезке времени, точки 1 и 2 — реальные измеренные значения концентрации вальпроевой кислоты.

соответствует отличной аппроксимации [9]. Предел количественного обнаружения вальпроевой кислоты в плазме составил 1 мкг/мл.

Для количественной оценки достоверности полученных результатов определены показатели правильности и прецизионности методики. Правильность и прецизионность методики оценивали по 3 концентрационным уровням рабочих стандартных растворов вальпроевой кислоты после 6 определений каждого уровня. Полученные данные представлены в таблице. В таблице приведены следующие значения:  $\bar{x}$  — среднее значение по выборке,  $SD$  — среднее квадратическое отклонение,  $S_{\bar{x}}$  — стандартное отклонение среднего результата,  $\Delta\bar{x}$  — полуширина доверительного интервала,  $\epsilon\%$  — ошибка среднего результата и  $\%C.V.$  — коэффициент вариации. Как видно из таблицы, значения коэффициента вариации и ошибки среднего результата не превышают 10 % для всех концентраций, что свидетельствует о допустимой правильности и прецизионности метода [10].

#### Практическое применение метода

В настоящее время разработанная методика применяется в Научном центре неврологии РАМН для терапевтического лекарственного мониторинга вальпроевой кислоты. Поскольку большинство пациентов, проходящих мониторинг, находятся в состоянии стационарной фармакокинетики (steady-state pharmacokinetics)

#### Метрологические характеристики методики определения вальпроевой кислоты в плазме крови добровольцев

Взято, мкг/мл	Найдено, мкг/мл		$\bar{x}$	$SD$	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$\epsilon\%$	$\%C.V.$				
6,25	7,01	6,30	6,01	5,98	6,31	6,22	6,30	0,37	0,24	0,60	9,64	5,92
50	51,20	52,50	48,90	46,3	51,01	50,50	50,06	2,18	1,64	4,22	8,44	4,36
150	151,3	150,5	154,4	148,92	153,31	149,51	151,31	2,16	1,69	4,34	2,86	1,43



tic), для правильной интерпретации данных лекарственного мониторинга применяется фармакокинетическая компьютерная программа MM-USCPACK. Особенностью указанной программы является применение Байесовского принципа статистического моделирования, что позволяет на основании совокупности данных популяционной фармакокинетики вальпроевой кислоты, персональных демографических данных пациента и результатов 1–2 замеров концентрации препарата в плазме крови рассчитывать индивидуальные фармакокинетические характеристики по вальпроевой кислоте для отдельного пациента [2]. Получение этих характеристик позволяет выявить метаболический статус больного и соответственно провести коррекцию фармакотерапии. С использованием разработанной нами методики был проведён ТЛМ вальпроевой кислоты у 20 больных. Ниже в качестве примера приводятся реальные данные 2 пациентов, один из которых обладает низкой, а другой, напротив, высокой скоростью катаболизма вальпроатов.

Пациент В. 24 лет наблюдается по поводу юношеской миоклонической эпилепсии, принимает вальпроат 750 мг (10 мг/кг массы тела) в сутки, на фоне лечения приступов нет, побочных эффектов нет. Измеренные уровни вальпроевой кислоты в плазме составили 43,6 и 69,6 мг/л ( $C_{ss}$  минимальная и  $C_{ss}$  максимальная соответственно). У пациента В. (рис. 5) константа элиминации вальпроевой кислоты  $K_{EL} = 0,033 \pm 0,008 \text{ ч}^{-1}$ , что существенно ниже среднего популяционного значения —  $0,061 \pm 0,059 \text{ ч}^{-1}$ . Это позволяет отнести пациента В. к категории медленных метаболизаторов вальпроатов, что, с одной стороны, объясняет достижение ремиссии на низких дозах вальпроата, а, с другой, относит больного, в случае необходимости увеличения дозы, к группе риска по развитию дозозависимых побочных эффектов.

Пациентка Ф., 19 лет, страдающая юношеской миоклонической эпилепсией, обратилась в НИЦ РАМН для коррекции лечения, принимает вальпроат 1750 мг (22 мг/кг) в сутки, приступы сохраняются. Измеренные уровни вальпроата в плазме составляли 42,5 и 62,5 мг/л. Данная больная, напротив, обладает более высокой скоростью метаболизма в сравнении со средневзвешенным значением по популяции (рис. 6). Её константа элиминации вальпроевой кислоты существенно выше средней по популяции и равна

$0,089 \pm 0,046 \text{ ч}^{-1}$ , что позволяет скорректировать фармакотерапию в сторону увеличения дозы вальпроевой кислоты.

Таким образом, использование предложенной нами аналитической методики в сочетании с применением программы MM-USCPACK позволяет рассчитывать индивидуальные фармакокинетические данные пациентов по вальпроевой кислоте. Полученные фармакокинетические характеристики анализируются нами с применением программы MM-USCPACK, в результате чего формулируются рекомендации относительно коррекции дозового режима. Далее наши рекомендации предоставляются лечащему врачу и на их основании коллегиально принимается окончательное решение, о том, есть ли необходимость проводить коррекцию дозировки соответствующего препарата.

Коллектив авторов статьи благодарит доктора биологических наук И. Б. Бондареву и профессора Р. Джелиффа (University of Southern California, The USC Laboratory of Applied Pharmacokinetics, США) за любезно предоставленную на безвозмездной основе авторскую компьютерную программу MM-USCPACK версии 15.2.

## ЛИТЕРАТУРА

1. M. Hallworth, *Therapeutic Drug Monitoring and Laboratory Medicine*, ACB Venture Publications, London (2008).
2. В. И. Сергиенко, Р. Джелифф, И. Б. Бондарева, *Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение*, Издательство РАМН, Москва (2003).
3. F. A. van der Horst, G. G. Eikelboom, J. J. Holthuis, *J. Chromatogr.*, **456**(1), 191 – 199 (1988).
4. P. N. Friel, B. K. Logan, E. J. Formoso, *J. Epilepsy*, **10**, 283 – 286 (1997).
5. H. Cheng, Z. Liu, W. Blum, et al., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **850**(1–2), 206 – 212 (2007).
6. H. Amini, M. Javan, A. Ahmadiani, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **830**(2), 368 – 371 (2006).
7. M. C. Lin, H. S. Kou, C. C. Chen, et al., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **810**(1), 169 – 172 (2004).
8. A. B. Rege, J. J. Lertora, L. E. White, et al., *J. Chromatogr.*, **309**(2), 397 – 402 (1984).
9. К. С. Сычев, *Практическое руководство по жидкостной хроматографии*, Техносфера, Москва (2010).
10. И. И. Мирошниченко, *Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств*, ООО “Издательство “Медицинское информационное агентство”, Москва (2011).

Поступила 23.09.11

## APPLICATION OF GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY TO THERAPEUTIC MONITORING OF VALPROIC ACID

D. A. Abaimov, A. K. Sariev, I. A. Tyurin, D. I. Prokhorov, T. Yu. Noskova, V. V. Shvedkov, and R. D. Seifulla\*

Laboratory of Clinical Pharmacokinetics, Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125367 Russia;

\* e-mail: tempmed@yandex.ru

We have developed a new method for the quantitative determination of valproic acids based on gas chromatography with mass spectrometric detection of three ion fragments of a parent molecule with  $m/z = 73$ , 102, and 115. The proposed technique has been used to solve the tasks of anticonvulsant therapeutic drug monitoring and applied to determining individual pharmacokinetic characteristics of patients at the Research Center of Neurology of the Russian Academy of Medical Science with respect to valproic acid.

**Key words:** Therapeutic drug monitoring; gas chromatography; mass spectrometry; valproic acid; epilepsy