

*О. А. Громова*

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

*Научный руководитель: канд. фарм. наук, доц. Н. Д. Яранцева*

*Кафедра фармацевтической химии,*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*O. A. Gromova*

## DETERMINATION OF VALPROIC ACID BY USING GAS CHROMATOGRAPHY WITH MASS SPECTROMETRIC DETECTION

*Tutor: assistant professor N. D. Yarantseva*

*Department of Pharmaceutical chemistry,*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме.** Данная работа посвящена разработке эффективной методики количественного определения вальпроевой кислоты в сыворотке крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. В ней представлены различные методы пробоподготовки, хроматографические и спектральные характеристики вальпроевой кислоты, а также последовательность действий при проведении количественного анализа.

**Ключевые слова:** вальпроевая кислота, газовая хроматография, масс-спектрометрическое детектирование, пробоподготовка.

**Resume.** This work is devoted to the development of effective method of determination of valproic acid in serum by gas chromatography with mass spectrometric detection. It presents various methods of sample preparation, chromatographic and spectral characteristics of valproic acid, as well as a sequence of actions for conducting an assay.

**Keywords:** valproic acid, gas chromatography, mass spectrometric detection, sample preparation.

**Актуальность.** На сегодняшний день вальпроевая кислота (ВК) является одним из основных препаратов, используемых в области неврологии при терапии парциальных и генерализованных эпилептических приступов и синдрома Леннокса-Гасто, а также в психиатрической области для лечения маниакальных приступов биполярного аффективного расстройства в виде монотерапии и в комбинации с другими лекарственными средствами для лечения шизофрении. Терапия данных заболеваний с использованием вальпроевой кислоты имеет ряд сложностей. Существует необходимость подбора эффективной и хорошо переносимой дозы путем титрования, что требует простого и доступного метода анализа. Также пациенты, вынужденные принимать данный препарат, находятся в «хрупком» психическом состоянии, при котором высок риск отравлений с целью суицида и летального исхода вследствие передозировки [1, 2, 3, 4].

**Цель:** разработать высокочувствительную методику количественного определения ВК в биологических жидкостях методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием без предварительной дериватизации, а также определить наиболее оптимальные условия пробоподготовки.

**Задачи:**

1. Определить условия для проведения пробоподготовки различными методами (твердофазная, твердо-жидкостная и жидкость-жидкостная экстракция), а также выявить наиболее оптимальный способ пробоподготовки.

2. Построить калибровочный график для проведения дальнейшего анализа.

3. Установить условия хроматографирования для вальпроевой кислоты и проработать методику количественного определения.

**Материал и методы.** Были использованы следующие реактивы и органические растворители: вода очищенная, хлористоводородная кислота концентрированная, фосфатный буферный раствор (рН 7), в качестве образца ВК – Энкорат Хроно (таблетки, п.о., 500 мг); для твердофазной экстракции использовали патроны EVIDEX-BOX 50% 3 ml, 200 mg (Agilent, USA), для твердо-жидкостной – колонки Extrelut NT3, для жидкость-жидкостной – смесь хлороформа (10 ч.) и этилацетата (2 ч.). Анализ проб проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N Network GC System с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975C VL MSD.

Модельные пробы с ВК в количестве 15 и 30 мг/л, готовили на сыворотке крови пациентов, не принимающих антиконвульсанты, и использовали их при построении градуировочного графика, разработке методик выделения из биологического материала, а также определения вальпроевой кислоты методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

*Жидкость-жидкостная экстракция.* 4,0 мл анализируемой сыворотки помещали в делительную воронку, добавляли 50 мкл 6М HCl и 4,0 мл смеси хлороформ : этилацетат (10:2). Проводили 30 инверсий в течение 5 мин. После экстракции отбирали 3,0 мл органической фазы, центрифугировали (1500 об/мин, 5 мин), фильтровали через бумажный фильтр в выпарительную чашку, затем испаряли растворитель в токе воздуха.

*Твердофазная экстракция.* Кондиционирование сорбента осуществляли последовательным пропусканием через картридж 4 мл 95% этанола и 4 мл дистиллированной воды. Далее загружали 4,0 мл модельной сыворотки крови со скоростью 1 мл/мин, после чего сорбент промывали 2,0 мл 10% раствора этанола со скоростью 3 мл/мин. Сушку патрона проводили под вакуумом в течение 20 минут. Элюировали ВК двукратным пропусканием через патрон смеси растворителей: хлороформ: этилацетат (10:2) по 2 мл; затем испаряли в токе воздуха, предварительно добавив к элюату 100 мкл 1% раствора уксусной кислоты в этаноле.

*Твердо-жидкостная экстракция.* 4,0 мл модельной сыворотки крови наносили на диатомовый сорбент со скоростью 1 мл/мин, после чего проводили сушку патрона под вакуумом в течение 20 минут. Элюировали ВК смесью хлороформ: этилацетат (10:2) по 4,0 мл; затем испаряли в токе воздуха, предварительно добавив к элюату 100 мкл 1% раствора уксусной кислоты в этаноле. Сухие остатки реэкстрагировали в 500 мкл хлороформа и последовательно вводили в испаритель хромато-масс-спектрометра.

**Табл. 1.** Газохроматографические и масс-спектральные характеристики ВК

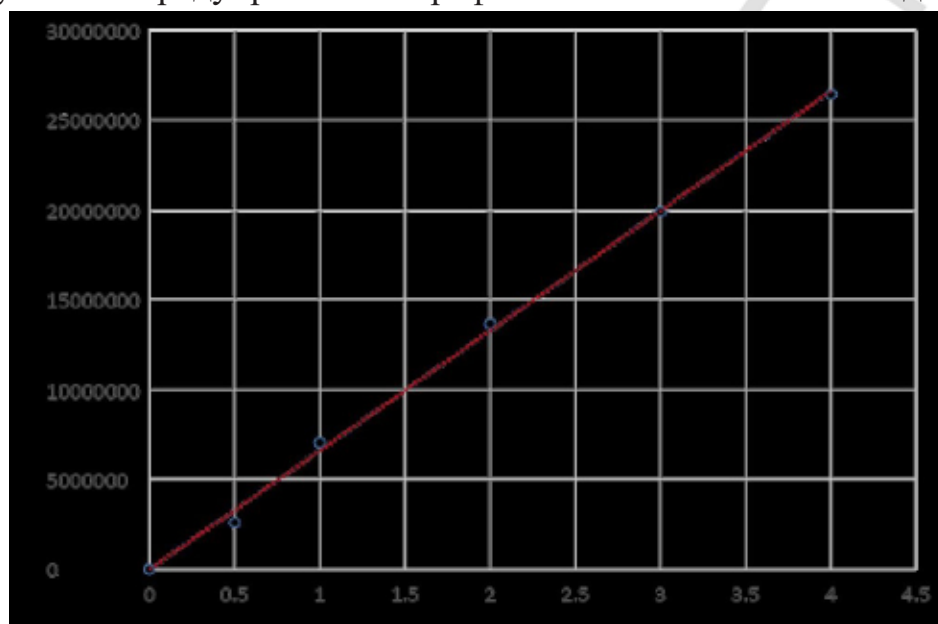
Соединение	m/z и интенсивности основных ионов, %	Время удерживания, мин	Интервал регистрации ионов, мин
------------	---------------------------------------	------------------------	---------------------------------

Вальпроевая кислота	73,00; 102,00; 57,10; 54,95	8,522	8,30 – 8,70
---------------------	-----------------------------	-------	-------------

Калибровочный график строили методом интегрированной линейной зависимости (количественное определение проводили с использованием ПЭВМ и программного обеспечения G1701DA MSD ChemStation.).

**Рис. 1** – Калибровочный график зависимости отклика прибора от концентрации ВК

Полученный градуировочный график является линейными в диапазоне концен-



траций 0,05 – 4,0 мкг/л. Коэффициент корреляции графика составил  $r^2 = 0,992$ .

**Результаты и их обсуждение.** Предел обнаружения (LOD) вальпроевой кислоты составил 0,001 мкг/л; предел количественного определения (LOQ) – 0,01-4,0 мкг/л. Максимальные внутрисерийные погрешности определения анализируемых веществ не превышают 12,9% для концентраций выше 0,10 мкг/л.

После проведения ГХ/МС анализа вальпроевой кислоты различной концентрации с тремя методами пробоподготовки были получены данные относительно концентрации ВК в элюате. Наглядно они представлены в сводной таблице и выражены в процентном соотношении.

**Табл. 2.** Концентрация ВК в элюате

Метод пробоподготовки	Количество ВК, мг/л	Процент извлечения из сорбента, %
-----------------------	---------------------	-----------------------------------

Жидкость-жидкостная экстракция	15	0
	30	0,023
Твердофазная экстракция	15	60,0
	30	73,0
Твердо-жидкостная экстракция	15	98,0
	30	97,6

### **Выводы:**

1 Вальпроевая кислота является сложным объектом для количественного определения в биологических жидкостях. Перспективным является усовершенствование существующей методики, а также поиск новых направлений в данной области анализа.

2 Использование твердофазной EVIDEX – Box (Agilent, USA) и твердожидкостной экстракции EXtrelut® NT (Merck, Germany) наиболее приемлемо для изолирования вальпроевой кислоты из биологического материала для количественной оценки в ходе лекарственного мониторинга.

3 Разработана методика количественного определения вальпроевой кислоты методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

### **Литература**

1. Катцунг, Б. Г. Базисная и клиническая фармакология / Б. Г. Катцунг. – Санкт-Петербург, 2008. – Т. 1. – 609 с.
2. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2012. – 2012 с.
3. Харкевич, Д.А. Фармакология / Д.А. Харкевич. – М.: ГЭОТАР-Мед, 2001. – 664 с.
4. Valproic Acid Toxicity: Overview and Management / Matthew D. Sztajnkrzyer // Journal of Toxicology. – 2002. – № 6 (40). – P. 789-801.