

# ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛЬПРОАТА НАТРИЯ В ПРЕПАРАТАХ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ

Д.А. Кардонский, А.А. Еганов, Е.В. Москалева

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;  
Российская Федерация. 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

**Введение.** Вальпроевая кислота (ВПК) – антиконвульсант широкого спектра действия с высокой токсичностью. Перспективно создание новых лекарственных форм препарата – наночастиц (НЧ), сохраняющих противосудорожную функцию и уменьшающих общую концентрацию ВПК в организме.

**Цель работы.** Разработка методики газохроматографического определения вальпроата натрия в готовых лекарственных формах препаратов, полученных на основе полибутилцианоакрилатных наночастиц.

**Материал и методы.** Вальпроат натрия в готовых лекарственных формах препаратов, полученных на основе полибутилцианоакрилатных наночастиц, анализировали методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (GC/FID) после дериватизации смесью пентафторпропионового ангидрида и 2,2,3,3,3-пентафтор-1-пропанола. Количественное определение содержания вальпроата натрия осуществляется по методу внутреннего стандарта, в качестве которого был выбран 3-п-пентилфосфат (ППФ).

**Результаты.** Разработан газохроматографический метод определения содержания вальпроата натрия в препаратах, полученных на основе полибутилцианоакрилатных наночастиц. Проведена валидация методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения.

**Заключение.** Разработан и валидирован быстрый и надежный газохроматографический метод определения содержания вальпроата натрия в готовых лекарственных формах препаратов.

**Ключевые слова:** газовая хроматография, вальпроат натрия, полибутилцианоакрилатные наночастицы.

E-mail: hal6890@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Расстройство спектра аутизма – мультифакторное заболевание, обусловленное генетическими, эпигенетическими и внешними причинами. Использование фармакологической терапии во время беременности тоже может влиять на развитие и функцию коры головного мозга, а также на процессы взросления потомства. Согласно мнению Р. Бромли и соавт. [1], при внутриутробном влиянии вальпроевой кислоты (ВПК) – антиконвульсанта широкого спектра

действия – проявления аутизма наблюдаются у детей в 7 раз чаще. Помимо использования ВПК при эпилепсии, ВПК включают также в терапию психических нарушений. Однако отношение концентраций мозг/сыворотка крови может варьировать у пациентов до 4 раз [2], с этим и связывают различную чувствительность больных к лекарству. ВПК проникает в организм беременной женщины через плацентарный барьер. К сожалению, многие пациентки не могут отказаться от приема ВПК для купирования судорог или заменить лекарство на другое: некоторые типы эпилепсии контролируются исключительно вальпроатом, а

смена лечения может негативно отразиться и на матери, и на плоде. Однако для нормального умственного и поведенческого развития ребенка беременной необходимо по возможности снижать дозировку ВПК [3]. Ученые подчеркивают, что именно это влияет на дальнейшую жизнь младенца. В связи с этим особое клиническое значение приобретают методы снижения дозы ВПК. Но сведения об исследованиях новых лекарственных форм препарата довольно скудны. Перспективным является создание новых лекарственных форм препарата – наночастиц (НЧ), сохраняющих противосудорожную функцию и снижающих общую концентрацию ВПК в организме матери.

Цель работы – разработка методики газохроматографического определения вальпроата натрия в готовых лекарственных формах препаратов, полученных на основе полибутилцианоакрилатных наночастиц.



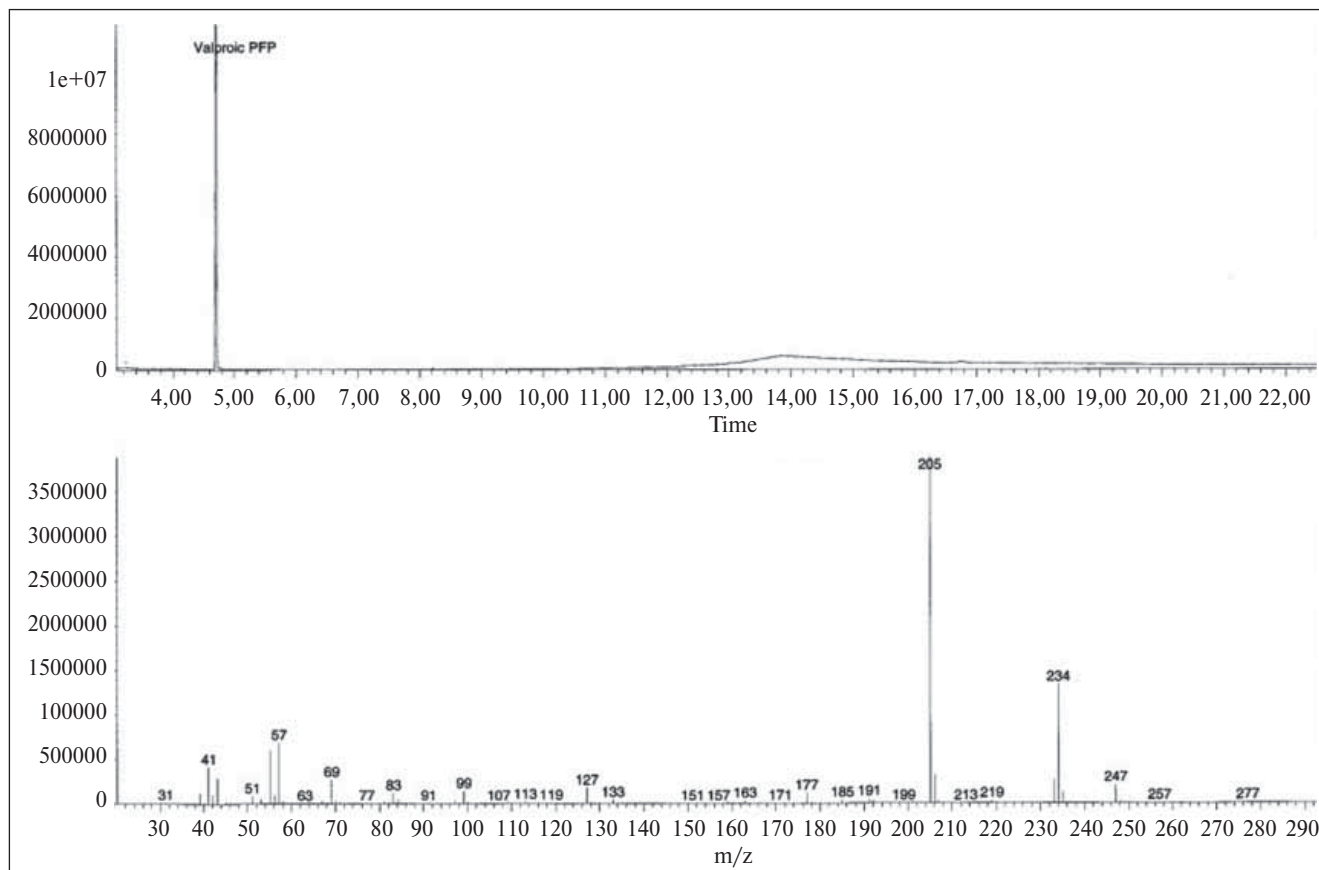
## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

На 1-м этапе исследования был осуществлен подбор реагентов для получения производного (derivатизации) с целью улучшения хроматографических характеристик анализируемого вещества [4]. Оптимальной оказалась смесь пентафторпропионового ангидрида и 2,2,3,3,3-пентафтор-1-пропанола (рис. 1). Структура полученного производного подтверждено методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (рис. 2).

В качестве внутреннего стандарта был выбран 3-п-пентилфосфат. Раствор внутреннего стандарта готовили по следующей методике: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 500 мг ТПФ, растворяли в метиловом спирте и доводили до метки тем же растворителем. Полученная концентрация стандарта для калибровки составляла 10 мг/мл.

Для приготовления раствора вальпроата натрия в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 100 мг вальпроата натрия, растворяли в воде и доводили до метки тем же растворителем. Полученная концентрация составляет 1 мг/мл.

Калибровочные растворы готовили следующим образом: в хроматографическую вials помещали 1 мл раствора вальпроата натрия концентрации 1000 мкг/мл. Упаривали досуха в токе сухого воздуха при на-



**Рис. 2.** Хроматограмма и масс-спектр пентафторпропилового эфира вальпроевой кислоты

гревании до температуры 50°C. К сухому остатку в вале добавляли 40 мкл пентафторпропионового ангидрида, перемешивали на вортексе, добавляли 20 мкл пентафторпропанола, перемешивали, герметически закрывали навинчивающейся крышкой и помещали в термостат, нагретый до 80°C на 2 ч. После этого к смеси добавляли 940 мкл этилацетата.

Готовили растворы пентафторпропилового эфира ВПК объемом 1 мл с концентрациями 1000, 500, 250, 125 мкг/мл путем последовательного разведения. В каждый раствор с помощью шприца для газовой хроматографии добавляли 20 мкл раствора внутреннего стандарта (3-п-пентилфосфата) концентрации 10 мг/мл.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенный подход при газохроматографическом определении вальпроата натрия, связанного с наночастицами, позволяет полностью разрушить комплекс «вещество–наночастица» и провести точное количественное измерение вальпроата. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектором не позволяет анализировать данное вещество, так как оно слабо поглощает в этой области спектра, а при применении ВЭЖХ-МС без предварительной пробоподготовки невозможно определить содержание вальпроата из-за его связи с наночастицами.

Газохроматографическое определение осуществляли на газовом хроматографе Agilent Technologies 6890N с пламенно-ионизационным детектором при следующих условиях: колонка – HP-5, 0,32 мм,

0,25 мкм, газ-носитель – азот, температура инжектора – 250°C, температура детектора – 280°C, термостат – 70°C, 5 мин, 20°C/мин до 280°C, 5 мин. Режим работы инжектора Splitless, скорость потока – 1,7 мл/мин.

Валидацию методики определения вальпроата натрия выполняли на основании руководств по валидации биоаналитических методик FDA [5] и ЕМА [6] по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения.

Таблица 1

#### ОТКЛОНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ КАЛИБРОВОЧНЫХ РАСТВОРОВ ОТ ФАКТИЧЕСКИХ ЗНАЧЕНИЙ

Образец	Количество, мкг/мл	Отклонение, %
1	125	-13,50
2	250	-8,27
3	500	7,72
4	1000	-1,21

Таблица 2

#### ВЕЛИЧИНЫ СТАНДАРТНОГО ОТКЛОНЕНИЯ (S.D), ОТНОСИТЕЛЬНОГО СТАНДАРТНОГО ОТКЛОНЕНИЯ (RSD, %) И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ПОГРЕШНОСТИ (ε, %)

Введено мкг/мл	Найдено мкг/мл	Найдено мкг/мл, среднее значение (n=3)	S.D. (n=3)	RSD, % (n=3)	ε, %
125	122 130 127	126,33	2,80	2,22	1,06
250	255 244 256	251,67	6,66	2,65	0,67
500	505 503 494	500,67	5,86	1,17	0,13

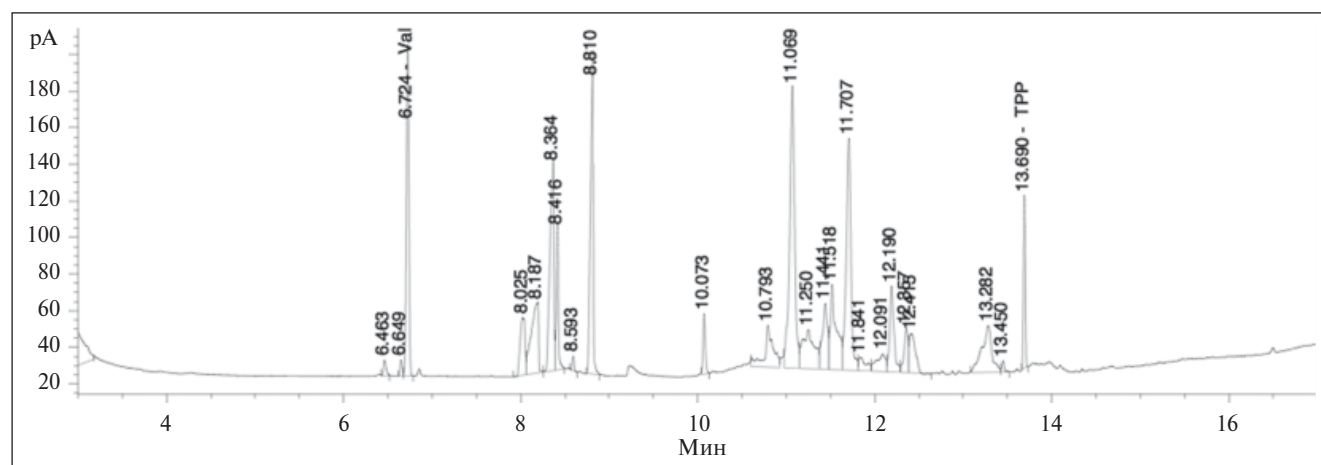


Рис.3. Пример хроматограммы препарата на основе наночастиц с содержанием вальпроата натрия

Полученные хроматограммы показали, что сопутствующие вещества не мешают определению вальпроата натрия. Для установления линейности анализировали 4 образца стандартных растворов вальпроата натрия после дериватизации в следующих концентрациях: 125, 250, 500, 1000 мкг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график ( $R^2=0,99816$ ). Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в табл. 1. Полученные значения соответствовали нормам FDA и EMA (не более 20% для нижнего диапазона линейности, не более 15% – для остальных точек).

При проверке правильности и прецизионности методики проводили анализ 3 растворов вальпроата натрия с концентрациями 125, 250, 500 мкг/мл после дериватизации. Каждый раствор хроматографировали 3 раза. Полученные величины стандартного отклонения (S.D) относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности ( $\epsilon$ , %) также соответствовали нормам FDA и EMA: не более 20% минимальной концентрации, не более 15% – для остальных 2 концентраций (табл. 2). Предел количественного определения (LOQ) методики рассчитывали на основании данных линейности, правильности и прецизионности. LOQ составил 125 мкг/мл.

Образцы для анализа готовили следующим образом: в хроматографическую виалу помещали 20–40 мг наночастиц с вальпроатом натрия. Добавляли 80 мкл пентафторпропионового ангидрида, перемешивали на вортексе, добавляли 40 мкл пентафторпропанола, снова перемешивали, герметически закрывали завинчивающейся крышкой и помещали на 2 ч в термостат при температуре 80°C. После этого к смеси добавляли 880 мкл этилацетата и с помощью шприца для газовой хроматографии добавляли 20 мкл раствора внутреннего стандарта (3-*n*-пентилфосфат)

концентрации 10 мг/мл. Перемешивали и анализировали при вышеуказанных условиях.

Хроматограмма препарата на основе наночастиц с содержанием вальпроата натрия XX мкг (время удерживания – 6,724 мин) и с содержанием внутреннего стандарта ТПФ 200 мкг/мл (время удерживания – 13,690 мин) приведена на рис. 3.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан и валидирован газохроматографический метод определения содержания вальпроата натрия в готовых лекарственных формах препаратов, полученных на основе полибутилцианоакрилатных наночастиц. Технические преимущества этой технологии – быстрота и надежность. Использование комплекса наночастиц с вальпроатом натрия должно снизить дозу антиконвульсанта для купирования судорог при введении внутривенно.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Shallcross R., Bromley R.L., Cheyne C.P., Garcia-Finana M. Irwin B., Morrow J., Baker G.A.; for the Liverpool and Manchester Neurodevelopment Group; UK Epilepsy and Pregnancy Register. In utero exposure to levetiracetam valproate: development and language at 3 years of age. *Neurology*, 2014; 82: 213–21.
2. Shen D.D., Ojemann G.A., Rappaport R.L., Dills R.L., Friel P.N., Levy R.H. Low and variable presence of valproic acid in human brain. *Neurology*, 1992; 42 (3 Pt 1): 582–5.
3. Epigenetic Mechanisms in Autism Spectrum Disorder Adrian Zhubi et al. *International Review of Neurobiology*, Vol. 115; 2014.
4. Коваленко А.Е., Кардонский Д.А., Еганов А.А., Гришин Д.А. Современные подходы к анализу наркотических веществ в биологических объектах. Судебно-медицинская экспертиза, 2007; 50 (2): 28. (Kovalenko A.E., Kardonsky D.A., Eganov A.A., Grishin D.A. Modern approaches to the analysis of drugs in biological objects. *Sudebno – meditsinskaja ekspertiza*, 2007; 50 (2): 28 (in Russian)).
5. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.
6. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.

Поступила 31 марта 2016 г.

## GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SODIUM VALPROATE IN NANOPARTICLE-BASED PREPARATIONS

D.A. Kardonsky, A.A. Eganov, E.V. Moskaleva

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991, Russian Federation

### SUMMARY

**Introduction.** Valproic acid (VPA) is a broad-spectrum anticonvulsant having a high toxicity. The design of its novel formulation – nanoparticles (NPs) that preserve anticonvulsant function and reduce the total concentration of VPA in the body is promising.

**Objective.** To develop a procedure for the gas chromatographic determination of sodium valproate as its ready-made formulations based on polybutylcyanoacrylate nanoparticles.

**Material and methods.** Sodium valproate as ready-made formulations based on polybutylcyanoacrylate nanoparticles was analyzed by gas chromatography with a flame ionization detector after derivation with a mixture of pentafluoropropionic anhydride and 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol. The levels of sodium valproate were quantified using the method of the internal standard that was 3-*n*-pentylphosphate (TPP).

**Results.** A gas chromatographic procedure was developed to determine the levels of sodium valproate in the preparations based on polybutylcyanoacrylate nanoparticles. The procedure was validated using the following characteristics: specificity, linearity, accuracy, precision, and quantification limit.

**Conclusion.** The developed and validated gas chromatographic assay is rapid and reliable in determining the level of sodium valproate in its ready-made formulations.

**Key words:** gas chromatography, sodium valproate, polybutylcyanoacrylate nanoparticles.