(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 042811 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.28

(21) Номер заявки
202191628

(22) Дата подачи заявки
2021.05.31

(51) Int. Cl. ***G01N 30/02*** (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01)
G01N 30/32 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/30 (2006.01)
A61K 31/327 (2006.01)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА

(43) **2022.12.30**
(96) **2021000054 (RU) 2021.05.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ И РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА" (RU)

(72) Изобретатель:
Бельских Алексей Владимирович, Баирова Татьяна Алексеевна, Стародубцев Анатолий Васильевич, Рычкова Любовь Владимировна (RU)

(56) CN-A-108469488
CN-A-111812237
ДУТОВ А.А. и др. Определение вальпроевой кислоты в биологических жидкостях методом ВЭЖХ с УФ-детекцией и предколоночной дериватизацией фенацилбромидом. Клиническая фармакокинетика, 2005, № 1(2), с. 34-37
МАЛЫГИН А.С. и др. Определение вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Эпилепсия и пароксизмальные состояния, 2018, том 10, № 2, с. 35-42, DOI: 10.17749/2077-8333.2018.10.2.035-042
WEN Dingsheng et al. A rapid and simple HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification for valproic acid and its five metabolites in human plasma and application to study pharmacokinetic interaction in Chinese epilepsy patients. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, Vol. 149, p. 448-456, DOI: 10.1016/j.jpba.2017.11.042
RHODEN Liliane et al. Simple procedure for determination of valproic acid in dried blood spots by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, Vol. 96, p. 207-212, DOI: 10.1016/j.jpba.2014.03.044

(57) Изобретение относится к лабораторной диагностике и может быть использовано для определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях - в венозной крови, капиллярной крови, отобранной методом сухого пятна, в слюне. Сущность: к 100 мкл слюны, или к 50 мкл плазмы крови, или к диску диаметром 3,2 мм, выколотому из пятна капиллярной крови на бумаге Whatman903, добавляют 600 мкл ацетонитрила, перемешивают и центрифугируют. Затем 500 мкл органического экстракта используют для хроматографического исследования, которое проводят, используя колонку с обращенной фазой с сорбентом С18, длиной 70-100 мм, внутренним диаметром 2,1-2,5 мм. Подвижную фазу подают в изократическом режиме со скоростью 0,45 мл/мин, при температуре 40°С. Состав подвижной фазы: ацетонитрил:вода (60:40). Объем инжекции - 5 мкл. Регистрацию вальпроевой кислоты проводят в SIM-SIM режиме по иону с массозарядным числом 142,95. Расчет конечной концентрации вальпроевой кислоты выполняют по значению площади хроматографического пика на хроматограмме суммарного ионного тока в режиме SIM-SIM, методом абсолютной градуировки. Способ позволяет с высокой чувствительностью и точностью определять концентрацию вальпроевой кислоты в слюне, капиллярной крови, венозной крови.

042811 B1

042811 B1

Изобретение относится к лабораторной диагностике и может быть использовано для определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях, а именно в венозной крови, капиллярной крови отобранной методом "сухого пятна", а также в слюне.

Основой медикаментозного лечения эпилепсии является длительный (многолетний/пожизненный) регулярный прием противоэпилептических препаратов для предупреждения возникновения эпилептических приступов. Одним из наиболее часто применяемых противосудорожных препаратов являются препараты на основе вальпроевой кислоты (вальпроаты). Для вальпроатов, как и для прочих фармацевтически активных субстанций, существует определенный терапевтический диапазон содержания в крови (верхний и нижний пределы концентрации). Если содержание препарата в системном кровотоке ниже определенного значения, вещество не проникает в таргетные ткани, и не в состоянии обеспечить необходимого клинического эффекта, тогда как при превышении концентраций выше порогового значения создается риск передозировки и возникновения побочных эффектов.

Известно, что для вальпроевой кислоты эффективным терапевтическим диапазоном является диапазон концентраций в крови от 50 до 100 мкг/мл. Концентрация вальпроевой кислоты ниже 50 мкг/мл связана с недостижением противоэпилептического эффекта, концентрация свыше 100 мкг/мл вызывает побочные эффекты, в том числе, серьезные, снижающие качество жизни больного. С этой целью "Стандарт оказания медицинской помощи пациентам с эпилепсией" МЗ РФ (от 24 декабря 2012 г.№ 1541н) рекомендует систематический контроль (мониторинг) уровня лекарственных препаратов в крови (Код медицинской услуги А09.05.035): "Усредненный показатель частоты предоставления - 1", "Усредненный показатель кратности применения - 1".

Мониторинг проводится регулярно: каждые 2-3 недели для подбора эффективной дозировки при назначении препарата и изменении дозировки препарата, во время беременности - каждые 2-4 недели, при постоянном приёме препарата - каждые три месяца, обязательно при введении дополнительного противоэпилептического препарата, при подозрении на проявление побочных эффектов или недостаточной эффективности препарата. Мониторинг включает двукратный забор крови за день из вены - до приема и через 2-3 ч - после приема препарата. Указанный режим тяжело переносится пациентами с эпилепсией в силу травматичности, снижая комплаентность больных. Особая категория пациентов - это дети, распространенность эпилептических припадков среди которых выше, чем у взрослых, с одной стороны, с другой, дети крайне тяжело переносят двукратный забор крови из вены. Физическая и психоэмоциональная травматичность процедуры у детей с эпилепсией может служить дополнительным провоцирующим фактором в реализации эпилептического припадка.

В связи с этим разработка высокочувствительных, селективных, точных, доступных, экспрессных методов лекарственного мониторинга вальпроевой кислоты в биологических жидкостях, особенно забор которых не травматичен/мало травматичен для пациента, а именно в слюне и капиллярной крови остается актуальной задачей.

Известен способ флуоресцентного поляризационного иммуноанализа (ФПИА). Суть метода сводится к изменению поляризации флуоресценции специфичных молекул антигена, при взаимодействии их со специфичными антителами. Метод широко применяется для оценки количественного содержания различных фармацевтически активных соединений, в том числе вальпроевой кислоты, в плазме крови. Разработан ряд тест-систем для выполнения анализа в рамках этого метода. В качестве примера можно привести ARCHITECT iValproic Acid reagent kit (https://www.ilexmedical.com/files/PDF/Valproic Acid_ARC.pdf), широко используемый в лабораториях по всему миру. Заявленный рабочий концентрационный диапазон метода при определении вальпроевой кислоты в плазме крови составляет от 0 до 150 мкг/мл. При этом заявленный предел детектирования для набора составляет 0,51 мкг вальпроевой кислоты на 1 мл плазмы или сыворотки крови.

К недостаткам метода можно отнести невысокую чувствительность, достаточную для проведения терапевтического мониторинга с использованием плазмы крови, но неприемлемую для выполнения оценки концентрации в слюне. Также есть сведения о перекрёстной реактивности антител набора с рядом метаболитов вальпроевой кислоты и широким спектром органических соединений, часто входящих в состав препаратов для сопутствующей терапии (рифампицин, ибупрофен, апирин, парацетамол, аскорбиновая кислота, гепарин, допамин, метронидазол и пр.). Метод применим для рутинного лекарственного мониторинга, однако в виду сравнительно низкой чувствительности не пригоден для оценки малых концентраций вальпроевой кислоты в слюне, а также имеет ряд ограничений в виду перекрестной реактивности. Кроме того, способ травматичен из-за необходимости забора венозной крови методом флеботомии.

Также известен ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) метод определения вальпроевой кислоты в плазме крови. Для проведения анализа необходимо около от 140 до 160 мкл плазмы крови, которая впоследствии подвергается процедуре жидкостной экстракции с этилацетатом и последующем нагреве в течение 40 мин со смесью триэтиламина и дибромацетофенона в метаноле. После проведения экстракции полученный супернатант упаривается досуха в токе азота и перерастворяется в подвижной фазе, используемой для анализа.

Хроматографическое определение проводится с помощью спектрофотометрического детектора при

длине волны 254 нм. Разделение экстракта выполняется на колонке С18 в изократическом режиме элюирования со скоростью 1 мл/мин. Общее время хроматографического анализа 15 мин. (Z.-j. Chen et al., Simultaneous determination of valproic acid and 2-propyl-4-pentenoic acid for the prediction of clinical adverse effects in Chinese patients with epilepsy" Seizure 21 (2012) 110-117). Линейность метода подтверждена в диапазоне концентраций от 5 до 200 мкг/мл. Проведена валидация биоаналитического метода.

Недостатком указанного метода является его применимость к ограниченному кругу биологических жидкостей (показана применимость только к плазме крови). Методика подготовки проб к анализу в рамках предложенного метода продолжительна и достаточно сложна. Данный способ непригоден для определения вальпроатов в слюне из-за недостаточной чувствительности. Способ травматичен из-за необходимости забора венозной крови методом флеботомии.

Известен способ, предложенный D. Wen et al. (D. Wen et al., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 149 (2018) 448-456). Авторы предлагают использование метода ВЭЖХ сопряженного с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) для определения вальпроевой кислоты и ее основных метаболитов.

Для проведения исследования производится забор 100 мкл биологической жидкости (плазмы крови). Проведение подготовки проб к анализу включает в себя этап жидкостной экстракции этилацетатом, упаривание полученного экстракта в системе упаривания/концентрирования проб в токе инертного газа и последующее перерастворение сухого остатка в подвижной фазе.

Определение вальпроевой кислоты производится в режиме мониторинга выбранных реакций при регистрации специфичного перехода (SRM, Selected Reaction Monitoring).

Авторы сообщают об успешной валидации биоаналитического метода с концентрационным диапазоном для вальпроевой кислоты от 1 до 200 мкг/мл. Общее время выполнения хроматографического анализа составляет 2 мин.

Главным недостатком этого метода является то, что данный способ можно использовать для определения для вальпроевой кислоты только в плазме крови. Авторы не заявляют о применимости метода к выполнению определения из других биологических жидкостей. Также метод характеризуется сравнительно сложной методикой подготовки проб к анализу, а нижний предел количественного определения вальпроевой кислоты составляет 1 мкг/мл, чего недостаточно для выполнения определения из слюны.

Наиболее близким к предлагаемому является способ определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях методом высоко эффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием результата в ультрафиолетовой области спектра (ВЭЖХ-УФ) и предколоночной дериватизацией фенацил бромидом. В основе метода лежит определение вальпроевой кислоты в плазме крови и слюне после проведения твердофазной экстракции на картриджах С18 с последующей дериватизацией фенацил бромидом, разделением в режиме обращенно-фазовой хроматографии на колонках С16 и спектрофотометрическим детектированием. Для определения используют 0,5 мл биологической жидкости, а заявленная чувствительность метода составляет 10 нг/мл (предел детектирования). (Дутов А.А. Клиническая фармакокинетика, 1(2), 2005, 34-37.)

Способ имеет следующие недостатки: достаточно сложная методика пробоподготовки, с трудом реализуемая в клинической лаборатории при проведении рутинного определения, характеризующаяся проведением дериватизации и использованием не распространённых типов хроматографических колонок (С16). Также следует отметить сравнительно низкую чувствительность способа. Авторы предлагают использовать биологическую жидкость в количестве 0,5 мл. Биологическая жидкость концентрируется до объёма 100 мкл, предельно детектируемая концентрация вальпроевой кислоты составляет 10 нг/мл. Следует отметить, что для надежного выполнения количественного определения необходимо обеспечить соотношение сигнал/шум не менее 5 для самой низкой концентрации из всего используемого концентрационного диапазона, тогда как авторы заявляют о соотношении на уровне 3, что соответствует пределу детектирования, но не может считаться нижним пределом количественного определения.

Требуемый объём биологической жидкости (плазмы крови) для выполнения определения в рамках метода составляет 0,5 мл, что обуславливает необходимость отбора у пациента по меньшей мере 1 мл венозной крови. Таким образом, процедура является инвазивной и требует сбора большого количества венозной крови.

Задача изобретения - расширение арсенала способов определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях для лекарственного мониторинга, расширение перечня, используемых для определения вальпроевой кислоты, биологических жидкостей, упрощение способа, повышение чувствительности, уменьшение травматичности способа, сокращение времени определения, повышение доступности способа.

Технический результат достигается тем, что для определения вальпроевой кислоты берут биологическую жидкость - плазму крови (50 мкл), или слюну (100 мкл), или капиллярную кровь, отобранную методом "сухого пятна", аликвотой для которого является стандартный диск диаметром 3,2 мм, выколотый из пятна крови на стандартном бланке для отбора сухих пятен крови (Whatman903 или аналогичный, эквивалент объёмной аликвоты (1,6±0,4) мкл (по данным Erandi Hewawasam et al., "Estimation of the volume of blood in a small disc punched from a dried blood spot card", European Journal of Lipid Science and

Technology, 2017, 120(3): 1700362, doi: 10.1002/ejlt.201700362).

К исследуемой биологической жидкости добавляют 600 мкл ацетонитрила, перемешивают на пробирочном вортексе при 1500 об/мин в течение 60 с. Затем пробу центрифугируют при 6000 об/мин, в течение 60 с 500 мкл органического экстракта переносят в хроматографическую виалу для выполнения анализа.

Хроматографическое исследование проводят, используя колонку с обращенной фазой с сорбентом С18, длиной 70-100 мм, внутренним диаметром 2,1-2,5 мм при постоянной температуре 40°С. Подвижную фазу подают в изократическом режиме со скоростью 0,45 мл/мин, при постоянной температуре 40°С. Состав подвижной фазы: смесь с объемным соотношением компонентов (60:40) ацетонитрил:вода. Объем инжекции - 5 мкл. Регистрацию компонентов смеси проводят в SIM-SIM (SRM, "Selected Reaction Monitoring" или "Single Ion Monitoring" для первого и третьего квадруполей масс-спектрометрического детектора) режиме по иону с массозарядным числом (m/z) 142,95. Расчет конечной концентрации вальпроевой кислоты выполняют по значению площади хроматографического пика на хроматограмме суммарного ионного тока в режиме SIM-SIM, методом абсолютной градуировки.

Сопоставительный анализ с прототипом показал, что предлагаемый способ отличается от известного тем, что к исследуемой биологической жидкости (к 100 мкл слюны, или к 50 мкл плазмы крови, или к капиллярной крови, отобранной методом "сухого пятна" на бумаге Whatman 903 в виде диска диаметром 3,2 мм) добавляют 600 мкл ацетонитрила, перемешивают на вортексе при 1500 об/мин в течение 60 с, после чего пробу центрифугируют при 6000 об/мин в течение 60 с. Затем 500 мкл органического слоя (экстракта) переносят в виалу для выполнения хроматографического исследования. Хроматографическое разделение проводят используя колонки с сорбентом С18, длиной 70-100 мм, внутренним диаметром 2,1-2,5 мм при постоянной температуре 40°С. Подвижную фазу подают в изократическом режиме со скоростью 0,45 мл/мин. Состав подвижной фазы: смесь с объемным соотношением компонентов (60:40) ацетонитрил:вода. Объем инжекции - 5 мкл. Регистрацию компонентов смеси проводят в SIM-SIM режиме по иону 142,95. Выполнение расчета конечной концентрации вальпроевой кислоты выполняют по значению площади хромато-графического пика на хроматограмме суммарного ионного тока в режиме SIM-SIM, методом абсолютной градуировки.

Таким образом, предлагаемое техническое решение соответствует критерию изобретения "новизна".

Анализ патентной и научно-технической литературы показал, что предлагаемый способ отличается не только от прототипа, но и от других технических решений в данной и смежных областях. Так авторами не найден способ определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях для лекарственного мониторинга, который включал бы предлагаемые режимы. А именно предлагаемые режимы позволяю решить поставленную задачу - разработать точный, высокочувствительный, доступный, не требующий сложной пробоподготовки способ определения вальпроевой кислоты в плазме венозной крови, капиллярной крови, слюне. Предлагаемый способ позволяет определять вальпроевую кислоту в капиллярной крови. Ни для одного из известных методов такой возможности не заявлено. Использование капиллярной крови, отобранной методом "сухого пятна", позволяет упростить хранение проб и легко транспортировать их, что открывает возможность проведения удаленного лекарственного мониторинга.

В предлагаемом способе для определения вальпроевой кислоты в качестве биологической жидкости может использоваться капиллярная кровь, отобранная методом "сухого пятна", или слюна, что делает забор биологической жидкости малоинвазивным (в случае "сухого пятна" капиллярной крови) или неинвазивным (в случае использования слюны). Простая пробоподготовка сводит вероятность погрешностей к минимуму, что повышает точность определения. Способ характеризуется потребностью в меньшем количестве биологической жидкости, в том числе и венозной крови, что позволяет применять способ к группам пациентов различного возраста (дети, в том числе новорожденные).

Время анализа одной пробы сокращено до 4 мин (2,5 мин - выполнение пробоподготовки, и 1,5 мин - хроматографическое исследование).

Предлагаемое техническое решение может быть использовано в клинических лабораториях, укомплектованных соответствующим оборудованием.

Таким образом, предлагаемое техническое решение соответствует критериям "изобретательский уровень" и "промышленная применимость".

Способ осуществляется следующим образом.

Для определения вальпроевой кислоты использовали плазму венозной крови, капиллярную кровь из пальца, отобранную методом "сухого пятна" ("сухое пятно"), слюну.

Забор венозной крови осуществляли методом прямой венепункции из кубитальной вены с помощью вакуумных систем BD Vacutainer с K_3ЭДТА (3-замещенная калиевая соль этилендиаминтетраацетата) в количестве не менее 0,5 мл. Для получения плазмы образцы крови центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин с отделением плазмы крови, хранившейся при температуре -20°С до выполнения предлагаемого способа.

Забор крови методом "сухого пятна" осуществлялся по следующему протоколу: после прокола кожи пальца стерильным ланцетом, первую каплю крови вытирали стерильной марлей. Дождавшись фор-

мирования второй большой капли крови, слегка касались капли крови центром первого круга на фильтровальной бумаге Whatman 903 (или аналогичной) и заполняли его с одной стороны фильтровальной бумаги (карточки, бланка) с первого раза. После заполнения первого круга на бланке заполняли второй круг с первого раза. Фильтровальные карточки высушивали на воздухе в течение 1 ч без соприкосновения с другими карточками и без воздействия прямого солнечного света, карточки упаковывались в сухой герметичный контейнер, где хранились до анализа при температуре от +2 до +8°C.

Пробу слюны собирали в 1,5 мл полиэтиленовую пробирку в объеме не менее 0,5 мл без проведения дополнительных манипуляций или инициирования слюноотделения. Пробирку герметично закрывали стерильной крышкой, хранили при температуре -20°C до проведения анализа.

Исследуемую биологическую жидкость помещали в коническую пробирку типа эппендорф на 1,5 мл. При использовании для анализа плазмы крови, аликвота составляет 50 мкл плазмы. При использовании капиллярной крови, отобранной методом "сухого пятна", аликвотой является стандартный диск диаметром 3,2 мм, выколотый из пятна крови на бумаге Whatman903 или аналогичной (эквивалент объёмной аликвоты (1,6±0,4) мкл по данным Erandi Hewawasam et al., "Estimation of the volume of blood in a small disc punched from a dried blood spot card", European Journal of Lipid Science and Technology, 2017, 120(3):1700362, doi: 10.1002/ejlt.201700362).

При использовании слюны аликвота составляет 100 мкл слюны.

К аликвоте исследуемой биологической жидкости добавляют 600 мкл ацетонитрила, пробирку помещют в пробирочный вортекс и пробу перемешивают при 1500 об/мин, в течение 60 с (время экстракции должно строго выдерживаться для параллельных проб). Затем пробирку с пробой центрифугируют при 6000 об/мин, в течение 60 с. 500 мкл органического экстракта переносят в виалу для выполнения хроматографического исследования.

Для выполнения хроматографического исследования используют жидкостный хромато-масс-спектрометр с разрешением не менее 0,5 Да и рабочим диапазоном определяемых масс до 1500 Да с возможностью регистрации отрицательных ионов. Масс спектрометр был укомплектован высокоэффективной жидкостной хроматографической системой с рабочим давлением до 40 МПа, колоночным термостатом и возможностью автоматического ввода пробы (табл. 1).

Таблица 1

Базовые параметры оборудования, используемые при осуществлении предлагаемого способа

Parameter (параметры)	Value (величина)
ВЭЖХ система	
Колонка	Сорбент C18, длина 70-100 мм, внутренний диаметр 2,1-2,5 мм
Тип колонки по USP	L1
Подвижная фаза	60:40 ($MeCN:H_2O$)
Скорость потока	0.45 мл/мин
Температура колонки	40 °C
Объём вводимой пробы (Объем инжекции)	5 мкл
Масс-спектрометр	
Operating mode (полярность)	Negative (регистрация анионов)
Разрешение квадрупольной системы	Unit (юнит)
Целевая масса для фильтра Q1	142.95
Целевая масса для фильтра Q3	142.95
Энергия соударения	0 В
Способ градуировки	Абсолютная градуировка (внешний стандарт)
Расчет конечной концентрации	По площади хроматографического пика

Регистрацию вальпроевой кислоты проводили в SIM-SIM (SRM, "Selected Reaction Monitoring" или "Single Ion Monitoring" для первого и третьего квадруполей масс-спектрометрического детектора) режи-

ме по иону с массозарядным числом (m/z) 142,95.

Источник ионизации работал в режиме гибридной ионизации DUIS (гибридный тип ионного источника с использованием одновременной ионизации методом электроспрей и коронарным разрядом), напряжение ESI - 4000 В, напряжение DUIS Corona Needle - 4500 В режим Negative. Температура ионного источника 300°С. Поток нагревательного газа 10 л/мин, поток газа-распылителя 2 л/мин, поток газа-осушителя 10 л/мин, температура линии десольватации 250°С (табл. 2).

Таблица 2

Параметры детектора и квадрупольной системы

Parameter (параметры)	Channel (канал)	Value (величина)
Operating mode (полярность)	142,95 > 142,95	Negative (регистрация анионов)
Pause time (задержка между каналами)	142,95 > 142,95	5 мсек.
Dwell time (время регистрации канала)	142,95 > 142,95	50 мсек.
Mass resolution of Q1&Q3 (разрешение квадрупольной системы)	142,95 > 142,95	Unit (юнит)
Cone voltage (трансферный потенциал)	142,95 > 142,95	15.0 В
Collision energy (Энергия соударения)	142,95 > 142,95	0 В
Q3 voltage	142,95 > 142,95	27 В
Parameter (параметры)	Channel (канал)	Value (величина)
(Рабочий потенциал третьего квадруполя)		

Идентификацию вальпроевой кислоты производили по времени удерживания и спектрально, сопоставляя результаты, полученные для калибровочных стандартов и хроматограммы неизвестных образцов. Расчет конечной концентрации вальпроевой кислоты выполняли по значению площади хроматографического пика на хроматограмме суммарного ионного тока в режиме SIM-SIM (SRM), методом абсолютной градуировки. Градуировочная зависимость строилась для каждого аналитического цикла с использованием свежеприготовленных калибровочных образцов в биологическом материале, не содержащем вальпроевой кислоты.

Контроль точности анализа осуществляли по обратно рассчитанным концентрациям вальпроевой кислоты в калибровочных образцах.

При апробации метода при построении калибровочной зависимости для слюны получены следующие параметры обратного расчета концентрации вальпроевой кислоты и точности определения (табл. 3).

Таблица 3

Результаты обратного расчета калибровочных образцов проб слюны

Номер калибровочной точки	Измеренная концентрация в образце, нг/мл	Номинальная концентрация в образце, нг/мл	Точность, %	Примечание
CLB 1	1,000	1	100,0	-
CLB 2	3,059	10	30,6	Точка не использовалась для

				расчета
CLB 3	49,716	50	99,4	-
CLB 4	94,427	100	94,4	-
CLB 5	306,511	300	102,2	-
CLB 6	542,784	500	108,6	-
CLB 7	948,377	1000	94,8	-
CLB 8	3013,917	3000	100,5	-
Коэффициент корреляции r=0,999			Коэффициент детерминации r^2=0,997	

Как видно из данных табл. 3, точность определения (измерения) концентрации вальпроевой кислоты в калибровочных образцах при обратном расчете варьирует от 94,4 до 108,6 %. Коэффициент детерминации калибровочной зависимости превышает 0,98 и составляет 0,997.

При апробации метода при построении калибровочной зависимости для плазмы крови получены следующие параметры обратного расчета концентрации вальпроевой кислоты и точности определения (табл. 4).

Таблица 4

Результаты обратного расчета калибровочных образцов проб плазмы крови

Номер калибровочной точки	Измеренная концентрация в образце, мкг/мл	Номинальная концентрация в образце, мкг/мл	Точность, %	Примечание
CLB 1	0,311	0,3	103,6	-
CLB 2	0,465	0,5	93,0	-
CLB 3	1,015	1	101,5	-
CLB 4	10,617	10	106,2	-
CLB 5	28,835	30	96,1	-
CLB 6	47,235	50	94,5	-
CLB 7	107,946	100	107,9	-
CLB 8	198,567	200	99,3	-
Коэффициент корреляции r=0,998			Коэффициент детерминации r^2=0,992	

Как видно из данных табл. 4, точность определения (измерения) концентрации вальпроевой кислоты в калибровочных образцах при обратном расчете варьирует от 93,0 до 107,9 %. Коэффициент детерминации калибровочной зависимости превышает 0,98 и составляет 0,992.

При апробации метода при построении калибровочной зависимости для капиллярной крови, отобранной методом "сухого пятна", получены следующие параметры обратного расчета концентрации вальпроевой кислоты и точности определения (табл. 5).

Таблица 5

Результаты обратного расчета калибровочных образцов проб капиллярной крови, отобранной методом "сухого пятна"

Номер калибровочной точки	Измеренная концентрация в образце, мкг/мл	Номинальная концентрация в образце, мкг/мл	Точность, %	Примечание
CLB 3	1,000	1	100	-
CLB 4	10,042	10	100,4	-
CLB 5	29,643	30	98,8	-
CLB 6	50,488	50	101	-
CLB 7	99,832	100	99,8	-
CLB 8	200,001	200	100	-
Коэффициент корреляции r=0,999		Коэффициент детерминации r^2=0,999		

Как видно из данных табл. 5, точность определения (измерения) концентрации вальпроевой кислоты в калибровочных образцах при обратном расчете варьирует от 98,8 до 100,4 %. Коэффициент детерминации калибровочной зависимости превышает 0,98 и составляет 0,999.

При выполнении потокового анализа в каждом аналитическом цикле общее количество ненулевых калибровочных точек, для которых обратный расчет концентрации в пробе дает значение точности 100±15%, должно составлять не менее 6. Для нижнего предела количественного определения (НПКО) допускается отклонение точности до 100±20%.

Для контроля точности определения используются искусственно приготовленные контрольные образцы с точно известной концентрацией аналита для определения точности анализа внутри длительного аналитического цикла. Точность измеренных значений концентрации для контрольных образцов должна находиться в стандартных пределах 100±15% от номинальных значений.

Примеры:

Пример А. Контроль точности производимых измерений (определения вальпроевой кислоты по предлагаемому способу) выполнялся с использованием искусственно приготовленных контрольных образцов биологических жидкостей, содержащих известные количества вальпроевой кислоты. Для приготовления контрольных образцов использовались биологические жидкости, отобранные у добровольцев, не принимавших вальпроаты: пулированная слюна, плазма венозной крови, капиллярная кровь, отобранная методом "сухого пятна". Контрольные образцы (КО) готовились на 4 концентрационных уровнях (на уровне НПКО, с низкой, средней и высокой концентрациями) и исследовались в ходе каждого аналитического цикла как "неизвестные" пробы.

При оценке точности и воспроизводимости результатов, полученных при осуществлении предлагаемого способа (результаты анализа), данные, полученные для соответствующих контрольных образцов, сопоставлялись и производилась оценка среднего значения точности и коэффициентов вариации полученных результатов.

Так, при оценке точности и воспроизводимости для разных концентрационных уровней производили анализ 6 проб на каждом концентрационном уровне (всего по 24 пробы для каждого типа биологических жидкостей). Результаты оценки точности и воспроизводимости способа представлены в табл. 6.

Таблица 6

Результаты оценки точности и воспроизводимости предлагаемого способа в изучаемых биологических объектах

Тип образца	Номинальная концентрация	Среднее значение концентрации для серии из 6 проб	Точность для серии из 6 проб, %	Коэффициент вариации в серии из 6 проб, %
Слюна				
КО НПКО	1 нг/мл	1,07	107,19	6,90
КО НИЗК	3 нг/мл	3,29	109,79	5,56
КО СРЕДН	1200 нг/мл	1288,90	107,41	4,57
КО ВЫС	2800 нг/мл	2938,08	104,93	7,66
Плазма крови				
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,29	96,50	8,39
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,58	105,37	11,79
КО СРЕДН	70 мкг/мл	67,56	96,52	10,25
КО ВЫС	170 мкг/мл	170,54	100,32	10,65
Капиллярная кровь, отобранная методом «сухого пятна»				
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,29	97,46	11,23
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,54	102,38	9,87
КО СРЕДН	70 мкг/мл	65,07	92,96	6,94
КО ВЫС	170 мкг/мл	167,34	98,44	8,90

где КО - контрольный образец;

НКПО - нижний предел количественного определения;

НИЗК - низкая концентрация;

СРЕДН - средняя концентрация;

ВЫС - высокая концентрация.

Как видно из данных табл. 6, для всего концентрационного диапазона получена высокая точность и воспроизводимость результатов, полученных при осуществлении предлагаемого способа.

Результаты определения точности и прецизионности предлагаемого способа составляют: для плазмы крови точность определения варьирует от 96,50 до 105,37 %, прецизионность от 8,39 до 11,79 %; для проб капиллярной крови, отобранной методом "сухого пятна", точность определения варьирует от 92,96 до 102,38 %, а прецизионность от 6,94 до 11,23 %; для проб слюны точность определения составила от 104,93 до 109,79 %, а прецизионность от 4,57 до 7,66. Приведенные значения параметров способа полностью соответствуют требованиям нормативной документации.

Согласно требованиям нормативной документации ("Guideline on bio-analytical method validation", EMEA, 21 July 2011, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009) точность результатов анализа должна находиться в пределах 85-115 % для всех концентрационных уровней, исключая нижний предел количественного определения (НПКО), для которого допускается отклонение до 20 % (точность 80-120 %). При этом, коэффициент вариации результатов анализа для не менее 6 параллельных измерений не должен превышать 20 % для НПКО и 15% для остальных концентрационных уровней.

Пример Б. Доброволец (респондент № 5) принял препарат Депакин Хроно в дозировке 500 мг, после чего сданы биологические жидкости: плазма крови (венозная кровь), слюна и капиллярная кровь отобранная методом "сухого пятна" ("сухое пятно") по следующей схеме: точка отбора №1 соответство-

вала 1 ч после приема препарата, точка №2 - 4 ч после приема препарата, и определена концентрация вальпроевой кислоты по предлагаемому способу.

Таблица 7

Концентрации вальпроевой кислоты в исследуемых биологических жидкостях у респондента №5

Пациент ID	Точка	Измеренная концентрация		
		Плазма, мкг/мл	«Сухое пятно», мкг/мл	Слюна, нг/мл
VOL 5	Точка 1	9,746	11,185	246,306
	Точка 2	18,267	30,294	307,206

Как видно из данных табл. 7, во всех исследуемых биологических жидкостях определяется вальпроевая кислота, при этом через 4 ч концентрация кислоты повышается во всех пробах.

Параметры контрольных образцов для серии, в рамках которой выполнялся анализ этой пробы:

Таблица 8

Результаты контроля точности измерений с помощью контрольных образцов для обсуждаемого аналитического цикла (респондент №5)

Тип образца	Номинальная концентрация	Измеренное значение концентрации КО	Точность, %
Слюна			
КО НПКО	1 нг/мл	1,014 нг/мл	101,40
КО НИЗК	3 нг/мл	3,132 нг/мл	104,40
КО СРЕДН	1200 нг/мл	1212,48 нг/мл	101,04
КО ВЫС	2800 нг/мл	2538,984 нг/мл	90,68
Плазма крови			
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,270 мкг/мл	90,00
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,629 мкг/мл	108,60
КО СРЕДН	70 мкг/мл	71,102 мкг/мл	101,57
КО ВЫС	170 мкг/мл	168,031 мкг/мл	98,84
«Сухое пятно»			
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,326 мкг/мл	108,67
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,365 мкг/мл	91,00
КО СРЕДН	70 мкг/мл	66,340 мкг/мл	94,77
КО ВЫС	170 мкг/мл	154,859 мкг/мл	91,09

Как видно из данных табл. 8, результаты точности определения концентраций вальпроевой кислоты в контрольных образцах соответствуют требованиям нормативной документации.

Пример В. Доброволец (респондент №8) принял препарат Депакин Хроно в дозировке 500 мг, после чего сданы биологические жидкости по описанной выше схеме: точка отбора №1 - через 1 ч после приема препарата, точка №2 - через 4 ч после приема препарата, и определена концентрация вальпроевой кислоты по предлагаемому способу.

Таблица 9

Концентрации вальпроевой кислоты в исследуемых биологических жидкостях у респондента №8

Пациент ID	Точка	Концентрация, мкг/мл		
		Плазма	«Сухое пятно»	Слюна
VOL 8	Точка 1	46,171	104,533	430,780
	Точка 2	49,52	142,622	500,313

Как видно из данных табл. 9, вальпроевая кислота определяется во всех исследуемых пробах как через 1 ч, так и через 4 ч после приема лекарственного препарата. При этом через 4 ч концентрация препарата выше, чем через 1 ч после приема лекарства.

Параметры контрольных образцов для серии, в рамках которой выполнялся анализ этой пробы:

Таблица 10

Результаты контроля точности измерений с помощью контрольных образцов для обсуждаемого аналитического цикла (респондент №8)

Тип образца	Номинальная концентрация	Измеренное значение концентрации КО	Точность, %
Слюна			
КО НПКО	1 нг/мл	0,979 нг/мл	97,90
КО НИЗК	3 нг/мл	3,255 нг/мл	108,50
КО СРЕДН	1200 нг/мл	1261,44 нг/мл	105,12
КО ВЫС	2800 нг/мл	3129,252 нг/мл	111,76
Плазма крови			
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,337 мкг/мл	112,33
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,232 мкг/мл	82,13
КО СРЕДН	70 мкг/мл	78,118 мкг/мл	111,60
КО ВЫС	170 мкг/мл	140,486 мкг/мл	82,64
«Сухое пятно»			
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,284 мкг/мл	94,67
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,401 мкг/мл	93,40
КО СРЕДН	70 мкг/мл	70,345 мкг/мл	100,49
КО ВЫС	170 мкг/мл	170,383 мкг/мл	100,23

Как видно из данных табл. 10, результаты точности определения концентраций вальпроевой кислоты в контрольных образцах соответствуют требованиям нормативной документации.

Пример Г. Доброволец (респондент №1) принял препарат вальпроевой кислоты под торговым наименованием "Депакин Хроно" в дозировке 500 мг, после чего проведен забор биологических жидкостей по следующей схеме: проба №1 - через 1 ч после приема препарата, проба №2 - спустя 4 ч после приема препарата, и определена концентрация вальпроевой кислоты по предлагаемому способу.

Таблица 11

Концентрации вальпроевой кислоты в исследуемых биологических жидкостях у респондента № 1

Пациент ID	Точка	Измеренная концентрация, мкг/мл		
		Плазма	«Сухое пятно»	Слюна
VOL 01	Точка 1	9,007	8,368	183,784
	Точка 2	5,834	3,534	219,869

Как видно из данных табл. 11, вальпроевая кислота определена во всех биологических жидкостях, как через 1 ч, так и через 4 ч после приема лекарственного препарата. Однако через 4 ч концентрация вальпроевой кислоты ниже, чем через 1 ч после приема, а в слюне, наоборот, выше, что вероятно свидетельствует об особенностях фармакокинетики препаратов вальпроевой кислоты у этого добровольца.

Параметры контрольных образцов для серии, в рамках которой выполнялся анализ этой пробы:

Таблица 12

Результаты контроля точности измерений с помощью контрольных образцов для обсуждаемого аналитического цикла (респондент №1)

Тип образца	Номинальная концентрация	Измеренное значение концентрации КО	Точность, %

Слюна			
КО НПКО	1 нг/мл	1,095 нг/мл	109,50
КО НИЗК	3 нг/мл	3,070 нг/мл	102,33
КО СРЕДН	1200 нг/мл	1278,000 нг/мл	106,50
КО ВЫС	2800 нг/мл	3157,896 нг/мл	112,78
Плазма крови			
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,284 мкг/мл	94,67
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,623 мкг/мл	108,20
КО СРЕДН	70 мкг/мл	68,516 мкг/мл	97,88
КО ВЫС	170 мкг/мл	170,508 мкг/мл	100,30
«Сухое пятно»			
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,271 мкг/мл	90,33
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,434 мкг/мл	95,60
КО СРЕДН	70 мкг/мл	62,578 мкг/мл	89,40
КО ВЫС	170 мкг/мл	149,569 мкг/мл	87,98

Как видно из данных табл. 12, результаты точности определения концентраций вальпроевой кислоты в контрольных образцах соответствуют требованиям нормативной документации.

Пример Д. Пациент №1 (респондент №18) принимает препараты вальпроевой кислоты (депакинхроно 500) в дозировке 1000 мг (по 500 мг×2 раза в день: утром и вечером). Забор биологических жидкостей выполнен по схеме: проба №1 - до утреннего приема препарата, проба №2 - через 2 ч после приема препарата, и проведено определение концентрации вальпроевой кислоты по предлагаемому способу.

Таблица 13

Концентрации вальпроевой кислоты в исследуемых биологических жидкостях у респондента № 18

Пациент ID	Точка	Измеренная концентрация, мкг/мл		
		Плазма	«Сухое пятно»	Слюна
VOL 18	Точка 1	4,702	59,364	117,954
	Точка 2	5,157	70,83	209,698

Как видно из данных табл. 13, вальпроевая кислота определяется во всех биологических жидкостях, как до очередного (утреннего) приема лекарственного препарата, так и после. После приема концентрация выше, чем до приема лекарственного препарата.

Параметры контрольных образцов для серии, в рамках которой выполнялся анализ этой пробы.

Таблица 14

Результаты контроля точности измерений с помощью контрольных образцов для обсуждаемого аналитического цикла (респондент № 18)

Тип образца	Номинальная концентрация	Измеренное значение концентрации КО	Точность, %
Слюна			
КО НПКО	1 нг/мл	1,141 нг/мл	114,10
КО НИЗК	3 нг/мл	3,311 нг/мл	110,37
КО СРЕДН	1200 нг/мл	1372,320 нг/мл	114,36
КО ВЫС	2800 нг/мл	3007,061 нг/мл	107,40
Плазма крови			
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,289 мкг/мл	96,33
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,688 мкг/мл	112,53
КО СРЕДН	70 мкг/мл	60,519 мкг/мл	86,46
КО ВЫС	170 мкг/мл	183,730 мкг/мл	108,08

«Сухое пятно»			
КО НПКО	0,3 мкг/мл	0,282 мкг/мл	94,10
КО НИЗК	1,5 мкг/мл	1,703 мкг/мл	113,53
КО СРЕДН	70 мкг/мл	57,526 мкг/мл	82,18
КО ВЫС	170 мкг/мл	174,173 мкг/мл	102,45

Как видно из данных табл. 14, результаты точности определения концентраций вальпроевой кислоты в контрольных образцах соответствуют требованиям нормативной документации.

В рамках апробации предлагаемого способа определения вальпроевой кислоты проведено пилотное исследование с участием двух групп пациентов, принимавших вальпроевую кислоту. Первая группа состояла из 14 здоровых добровольцев, информированных о целях проведения исследования и возможных рисках, давшая свое добровольное согласие на участие в исследовании. Вторая группа состояла из лиц с подтвержденным диагнозом (биполярное расстройство личности, эпилепсия), которым лечащим врачом назначена терапия вальпроатами. Все субъекты из второй группы, включенные в исследование, или их законные представители были информированы о целях и задачах исследования, а также о побочных рисках, которые могут возникнуть в ходе проведения исследования. Во вторую группу входило 23 человека.

У здоровых добровольцев из первой группы забор биологических жидкостей (венозная кровь, слюна и капиллярная кровь, отбранная методом "сухого пятна") осуществлялся через 1 и 4 ч после однократного приема препарата вальпроевой кислоты. Необходимость двукратного забора объясняется тем, что нужно было зафиксировать изменение концентрации вальпроевой кислоты в организме и мониторировать ее динамику.

У пациентов, принимавших препараты вальпроевую кислоту на постоянной основе по поводу терапией основного заболевания, проводился забор биологических жидкостей перед очередным приёмом препарата и спустя 2-3 ч после приема. Тактика забора основана на предположении о наличии перед приемом очередной дозы препарата сравнительно невысоких, остаточных концентраций вальпроевой кислоты в системном кровотоке, тогда как после приема очередной дозы мы ожидали увидеть адекватное увеличение содержания вальпроевой кислоты, которое и необходимо было зафиксировать во всех исследуемых биологических жидкостях.

Забор биологических жидкостей осуществляли, как описано выше: венозной крови - методом флеботомии из кубитальной вены с помощью вакуумных систем BD Vacutainer с K_3ЭДТА в количестве не менее 0,5 мл. Для получения плазмы образцы крови центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, с отделением плазмы крови, хранившейся при температуре -20°С до выполнения измерений.

Сразу после забора венозной крови из кубитальной вены производился отбор проб слюны и капиллярной крови из пальца методом "сухого пятна". Забор крови методом "сухого пятна" осуществлялся по следующему протоколу: после прокола кожи пальца стерильным ланцетом, первую каплю крови вытирали стерильной марлей. Дождавшись формирования второй большой капли крови, слегка касались капли крови центром первого круга на фильтровальной бумаге Whatman903 и заполняли его только одной стороны фильтровальной бумаги с первого раза. После полного заполнения круга заполняли второй круг с первого раза. Фильтровальные карточки высушивали на воздухе в течение 1 ч без соприкосновения с другими карточками, без воздействия прямого солнечного света, упаковывались в сухой герметичный контейнер, где хранились до анализа при температуре от +2 до +8°С.

Пробу слюны собирали в 1,5 мл полиэтиленовую пробирку в объеме не менее 0,5 мл без проведения дополнительных манипуляций или инициирования слюноотделения. Пробирку герметично закрывали стерильной крышкой, хранили при температуре -20°С до проведения анализа.

Способ определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях осуществлялся, как описано выше:

Исследуемую биологическую жидкость помещали в коническую пробирку типа эппендорф на 1,5 мл. К аликвоте исследуемой биологической жидкости (50 мкл плазмы, 100 мкл слюны, диск диаметром 3,2 мм, выколотый из пятна крови на бумаге Whatman903) добавляли 600 мкл ацетонитрила и пробирку помещали в пробирочный вортекс при 1500 об/мин, на 60 с. Затем пробирку с пробой центрифугировали при 6000 об/мин, в течение 60 с. 500 мкл органического экстракта переносили в виалу для выполнения хроматографического исследования.

Аппаратное оформление:

В рамках исследования была использована ВЭЖХ система Shimadzu Nexera X2 (Kyoto, Japan), снабжённая масс-селективным детектором с тройным квадруполем Shimadzu LCMS-8060 (Kyoto, Japan).

Хроматографические параметры: колонка Kromasil 100 C18 (100мм×2.1 мм, 2.5 мкм), температура 40°С. Подвижную фазу подавали в изократическом режиме со скоростью 0,45 мл/мин. Состав подвижной фазы: смесь с объемным соотношением компонентов (60:40) ацетонитрил:вода.

Объем инжекции - 5 мкл.

В указанных условиях среднее время удерживания вальпроевой кислоты составило - 1,057 мин. Общее время выполнения хроматографического определения - 1,5 мин.

Регистрацию компонентов смеси проводили в SIM-SIM режиме по иону 142,95.

Источник ионизации работал в режиме гибридной ионизации DUIS, напряжение ESI - 4000 В, напряжение DUIS Corona Needle - 4500 В режим Negative. Температура ионного источника 300°С. Поток нагревательного газа 10 л/мин, поток газа-распылителя 2 л/мин, поток газа-осушителя 10 л/мин, температура линии десольватации 250°С. Параметры детектора и квадрупольной системы:

Таблица 15

Параметры масс-спектрометра, использованные при апробации предлагаемого способа

Parameter (параметры)	Channel (канал)	Value (величина)
Operating mode (полярность)	142,95 > 142,95	Negative (регистрация анионов)
Pause time (задержка между каналами)	142,95 > 142,95	5 мсек
Dwell time (время регистрации канала)	142,95 > 142,95	50 мсек
Mass resolution of Q1&Q3 (разрешение квадрупольной системы)	142,95 > 142,95	Unit (юнит)
Cone voltage (трансферный потенциал)	142,95 > 142,95	15.0 В
Collision energy (Энергия соударения)	142,95 > 142,95	0 В
Q3 voltage (Рабочий потенциал третьего квадруполя)	142,95 > 142,95	27 В

Расчет конечной концентрации вальпроевой кислоты выполняли по значению площади хроматографического пика на хроматограмме суммарного ионного тока в режиме SIM-SIM, методом абсолютной градуировки.

При использовании предлагаемого способа получены нижние пределы количественного определения, составившие 300 нг/мл для плазмы крови и "сухого пятна" и 1 нг/мл для слюны.

На фиг. 1-3 (см. приложение к описанию заявки) представлены репрезентативные хроматограммы проб с содержанием аналита на уровне нижнего предела количественного определения: плазма крови 300 нг/мл, капиллярная кровь, отобранная методом "сухого пятна" 300 нг/мл, слюна 1 нг/мл.

Фиг. 1. Репрезентативная хроматограмма суммарного ионного тока пробы, приготовленной из плазмы крови с концентрацией вальпроевой кислоты 300 нг/мл.

Фиг. 2. Репрезентативная хроматограмма суммарного ионного тока пробы, приготовленной из капиллярной крови, отобранной методом "сухого пятна", с концентрацией вальпроевой кислоты 300 нг/мл.

Фиг. 3. Репрезентативная хроматограмма суммарного ионного тока пробы, приготовленной из слюны с концентрацией вальпроевой кислоты 1 нг/мл.

Таким образом, в рамках пилотного исследования показана (см. приложение к описанию заявки фиг. 1-3) значительная степень связи данных полученных при анализе капиллярной крови, отобранной методом "сухого пятна" и результатов определения вальпроевой кислоты в слюне с данными полученными для стандартной биологической жидкости - плазмы крови. Таким образом, можно рекомендовать использование слюны и капиллярной крови как перспективных биологических жидкостей, приемлемых для проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

Также было проведено сравнение характеристик чувствительности и потребности в биологических жидкостях (ключевых параметров) разных способов определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях:

Таблица 16

Сравнение ключевых параметров предлагаемого способа, способа - прототипа и аналогов

	Тип метода	Ключевые параметры для разных биологических жидкостей		
		Плазма крови	Капиллярная	Слюна

				кровь, отобранная методом «сухого пятна»			
		НПКО, нг/мл	Аликвота, мкл	НПКО, нг/мл	Аликвота	НПКО, нг/мл	Аликвота, мкл
Методы – аналоги	ВЭЖХ-УФ (Z.-j. Chen et al)	1000	140-160	-	-	-	-
	ВЭЖХ-МС/МС (D. Wen et al.)	1000	100	-	-	-	-
Метод-прототип	ВЭЖХ-УФ (Дутов А.А.)	10 (предел детектирования)	500	-	-	10 (предел детектирования)	500
Предлагаемый метод	ВЭЖХ-МС/МС	300	50	300	Диск 3,2 мм	1	100

Как видно из данных табл. 16, предлагаемый способ обладает высокой чувствительностью, что позволяет производить определение вальпроевой кислоты в биологических жидкостях, используя их минимальные объёмы.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет быстро, с высокой чувствительностью и точностью определять вальпроевую кислоту в слюне, образцах капиллярной крови, отобранных методом "сухого пятна", плазме крови. При этом способ доступен для широкого применения, требует минимального количества биологических жидкостей, дает возможность неинвазивного проведения лекарственного мониторинга (определение в слюне) или снижение инвазивности путем замены венозной крови на капиллярную кровь, отобранную методом "сухого пятна".

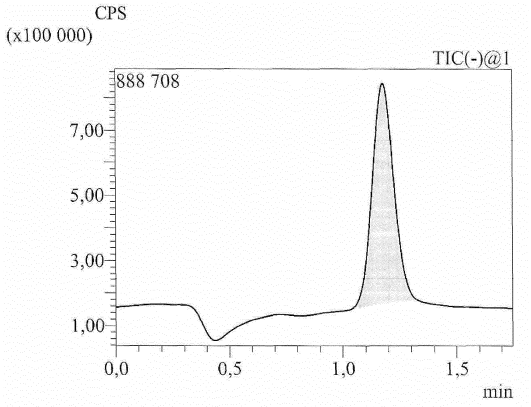
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях для лекарственного мониторинга, включающий забор биологической жидкости, подготовку пробы для хроматографического исследования, проведение хроматографического исследования и регистрацию результата, отличающийся тем, что к исследуемой биологической жидкости добавляют 600 мкл ацетонитрила, перемешивают на вортексе при 1500 об/мин, в течение 60 с, центрифугируют при 6000 об/мин, в течение 60 с, затем отбирают 500 мкл органического экстракта и проводят хроматографическое исследование, используя колонку с обращенной фазой с сорбентом С18, длиной 70-100 мм, внутренним диаметром 2,1-2,5 мм при температуре 40°С, при этом подвижную фазу, состоящую из ацетонитрил:вода (60:40), подают в изократическом режиме со скоростью 0,45 мл/мин, объем инжекции - 5 мкл, регистрацию вальпроевой кислоты проводят в SIM-SIM режиме по иону с массозарядным числом 142,95, а расчет конечной концентрации вальпроевой кислоты выполняют по значению площади хроматографического пика на хроматограмме суммарного ионного тока в режиме SIM-SIM методом абсолютной градуировки.

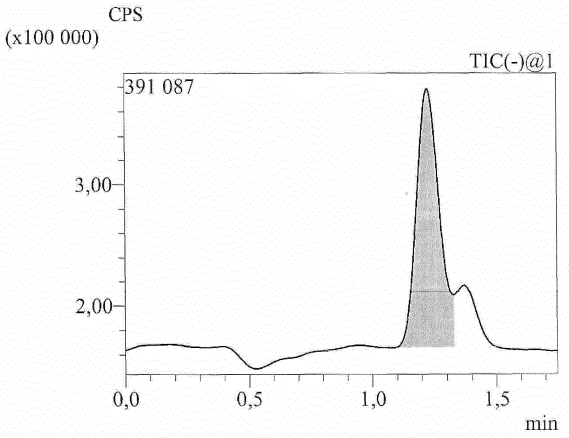
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве биологической жидкости используют слюну в количестве 100 мкл.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве биологической жидкости используют плазму крови в количестве 50 мкл.

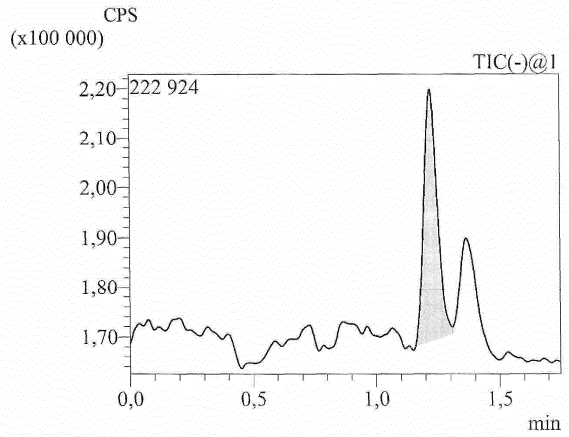
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве биологической жидкости используют капиллярную кровь, отобранную методом "сухого пятна" на бумаге Whatman 903 в виде диска диаметром 3,2 мм.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3