

Проблемная комиссия «Эпилепсия. Пароксизмальные состояния» РАН
и Министерства здравоохранения Российской Федерации

Российская Противозпилептическая Лига

ЭПИЛЕПСИЯ и пароксизмальные состояния

2018 Том 10 №2



EPILEPSY AND PAROXYZMAL CONDITIONS

ISSN 2077-8333

2018 Vol. 10 №2

www.epilepsia.su

Включен в перечень ведущих
рецензируемых журналов и изданий ВАК

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта <http://www.epilepsia.su>. Не предназначено для использования в коммерческих целях. Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@igbis-1.ru. Copyright © 2018 Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

Определение вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС)

Малыгин А. С., Попов Н. С., Демидова М. А., Кудряшова М. Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации (ул. Советская, 4, Тверь 170100, Россия)

Резюме

Цель – разработка методики ВЭЖХ-МС/МС определения вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови для терапевтического лекарственного мониторинга. **Материалы и методы.** Хроматографию выполняли с использованием хроматографа Agilent 1260 Infinity II (аналитическая колонка Phenomenex synergi Fusion 4 мкм-С182×50 мм). В качестве подвижной фазы использовали смесь метанола и воды деионизированной в соотношении 90:10 с добавлением 0,1% аммония ацетата в изократическом режиме, скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин. Масс-спектрометрическую идентификацию вальпроевой кислоты осуществляли при отрицательной поляризации в режиме регистрации множественных ионов (МИМ) по значению m/z 143,1. Диапазон применения методики составил от 1 до 200 мкг/мл. Масс-спектрометрическую идентификацию 2-пропил-4-пентаноил-β-О-глюкуроида, 2-пропил-4-пентеновой, 3-гидрокси-2-пропилпентановой, 4-гидрокси-2-пропилпентановой, 2-пропилпентандиовой и 3-оксо-2-пропилпентановой кислот осуществляли при отрицательной поляризации по значению MRM-переходов: m/z 319,2→143,2; m/z 140,1→140,1; m/z 159,1→101; m/z 159,1→123,1; m/z 173→129,1; 157,05→113 соответственно. Аналитический диапазон методики определения метаболитов составил 10-500 нг/мл. **Результаты.** Разработанная методика позволяет определять вальпроевую кислоту и ее метаболиты в одной пробе без отдельной пробоподготовки, что увеличивает информативность исследования без повышения его стоимости. **Заключение.** Внедрение методики количественного определения вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови в работу клинических лабораторий позволит обеспечить индивидуальный подход к лечению пациентов с эпилепсией, тем самым повысить эффективность и безопасность фармакотерапии.

Ключевые слова

ВЭЖХ-МС/МС, противосудорожные средства, вальпроевая кислота, метаболиты, лекарственный терапевтический мониторинг.

Статья поступила: 16.03.2018 г.; в доработанном виде: 17.04.2018 г.; принята к печати: 18.06.2018 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в отношении данной публикации.

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Для цитирования

Малыгин А. С., Попов Н. С., Демидова М. А., Кудряшова М. Н. Определение вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2018; 10 (2): 35-42. DOI: 10.17749/2077-8333.2018.10.2.035-042.

Chromatography-tandem MASS spectrometry (HPLC-MS/MS) for the detection of valproic acid and its metabolites in blood plasma

Malygin A. S., Popov N. S., Demidova M. A., Kudrayshova M. N.

Tver State Medical University (4 Sovetskaya Str., Tver 170100, Russia)

Summary

Aim: to adapt the HPLC-MS/MS technique to determining valproic acid and its metabolites in blood plasma for drug therapy monitoring. **Materials and Methods:** The chromatographic assay was run using an Agilent 1260 Infinity II chromatograph with a Phenomenex synergi Fusion analytical column 4 μm -C18 2×50 mm. The mobile phase consisted of 0.1% ammonium acetate in distilled water and 0.1% ammonium acetate in methanol (10:90 v/v, 0.5 ml/min). The multiple ions monitoring (MIM) mode was used for mass-spectrometric detection of valproic acid at $m/z = 143.1$, with the negative ion mode. The method was found applicable over the range from 1 mcg/ml to 200 mcg/ml of valproic acid. For the mass spectroscopy detection of valproic acid metabolites, the multiple reaction monitoring (MRM mode) was used. MS identifications of 2-propyl-4-pentanoil- β -O-glucuronide; 2-propyl-4-pentenoic acid, 3-hydroxy-2-propylpentanoic acid, 4-hydroxy-2-propylpentanoic acid, 2-propylglutaric acid and 3-oxo-2-propylpentanoic acid in the negative ion mode were carried out at m/z 319.2 \rightarrow 143.2; m/z 140.1 \rightarrow 140.1; m/z 159.1 \rightarrow 101; m/z 159.1 \rightarrow 123.1; m/z 173 \rightarrow 129.1 and m/z 157.05 \rightarrow 11, respectively. The method was sensitive over the range from 10 ng/ml to 500 ng/ml of the tested compounds. **Results:** The developed technique allows for determining valproic acid and its metabolites in a single sample; thus, the preliminary stage of separate sample preparation can be omitted, which increases the informative value of the assay without increasing its cost. **Conclusion:** This innovative methodology for the quantification of valproic acid and its metabolites in the blood plasma is expected to facilitate the individual approach to the treatment of patients with epilepsy, thereby increasing the efficacy and safety of the pharmacotherapy.

Key words

HPLC-MS/MS, antiepileptic drugs, valproic acid, metabolites, drug therapy monitoring.

Received: 16.03.2018; **in the revised form:** 17.04.2018; **accepted:** 18.06.2018.

Conflict of interests

The authors declare about the absence of conflict of interest with respect to this publication.

All authors contributed equally to this article.

For citation

Malygin A. S., Popov N. S., Demidova M. A., Kudrayshova M. N. Chromatography-tandem MASS spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the detection of valproic acid and metabolites in blood plasma. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2018; 10 (2): 35-42. DOI: 10.17749/2077-8333.2018.10.2.035-042. (in Russian).

Corresponding author

Address: 4 Sovetskaya Str., Tver 170100, Russia.

E-mail address: shurik.malygin@mail.ru (Malygin A. S.).

Введение

Необходимость проведения лекарственного терапевтического мониторинга при лечении противоэpileптическими препаратами, в т.ч. вальпроатами, доказана многочисленными исследованиями [1-5] и регламентирована нормативными документами (Приказ МЗ РФ от 22.10.2003 №494) [6]. Фармакокинетика вальпроатов характеризуется выраженным индивидуальным характером, развитие токсических реакций возможно даже при их использовании в средних терапевтических дозах, особенно у пациентов с генетически замедленным метаболизмом, что подтверждает важность лекарственного терапевтического мониторинга [5,7-8]. Основными показаниями к определению концентрации вальпроевой кислоты в крови являются первичное назначение препарата (с целью подбора дозировки), изменение дозы препарата, смена торгового наименования и лекарственной формы (например, при переходе на пролонгированные препараты), назначение новой комбинации противоэpileптических средств, неэффективность проводимой терапии, появление побочных

эффектов, подозрение на нарушение режима приема препарата, текущий контроль концентрации в крови (1-2 раза в год), беременность (в соответствии с официальной инструкцией по применению противопоказаны в I триместре из-за тератогенности, во II и III триместре разрешены в меньших дозах и по серьезным показаниям), у детей младшего возраста в связи с быстрым изменением массы тела (1 раз в 3 месяца).

Учитывая высокую потребность в проведении лекарственного терапевтического мониторинга вальпроатов, необходимо наличие специфичной, точной, небольшой по продолжительности и объему исследуемого биологического материала, по возможности недорогой методики количественного определения вальпроевой кислоты в плазме крови. В настоящее время одним из наиболее эффективных методов проведения аналитических исследований лекарственных средств является высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [9,10]. Преимуществом данного метода для клинической практики при проведении лекарственного терапевти-

ческого мониторинга является возможность определения не только вальпроевой кислоты, но и ее метаболитов [11,12].

Целью исследования явилось определение вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови ВЭЖХ-масс-спектрометрическим методом при проведении лекарственного терапевтического мониторинга.

Материалы и методы

Забор крови для определения вальпроевой кислоты и ее метаболитов осуществляли из кубитальной вены с помощью вакуумных систем BD Vacutainer® с K_3 ЭДТА («Бектон Дикинсон Б.В», Нидерланды). Для получения плазмы образцы крови центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 10 мин. Пробоподготовку осуществляли осаждением белков плазмы крови метанолом. Для этого к 200 мкл исследуемого образца добавляли 600 мкл метанола с 0,1% аммония ацетата. Пробы встряхивали на вортекс-шейкере в течение 30 сек., термостатировали 20 мин. при температуре 37°C, далее центрифугировали в течение 10 мин. при 13000 об./мин., надосадочную жидкость использовали для исследования.

При первичном назначении вальпроатов исследование проводили после достижения равновесной концентрации в крови (не менее 5 периодов полувыведения – 2-3 дня, так как $T_{1/2}$ вальпроевой кислоты составляет 9-16 ч). Для определения минимальной равновесной концентрации (C_{min}) забор крови осуществляли до приема вальпроата, для оценки максимальной плазменной концентрации (C_{max}) исследование выполняли через 1-3 ч после.

Определение вальпроатов в плазме крови осуществляли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, ФРГ). Для анализа образцов плазмы крови использовали следующие условия хроматографирования: неподвижная фаза – аналитическая колонка Phenomenex synergі Fusion 4 мкм-С18 2×50 мм при температуре 50°C; подвижная фаза – смесь метанола и воды деионизированной в соотношении 90:10 с добавлением 0,1% аммония ацетата; скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин.; объем вводимой пробы – 10 мкл; общее время изократического элюирования – 5 мин.

Детекцию вальпроевой кислоты и ее метаболитов осуществляли масс-спектрометрически с помощью тройного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200 MD (AB Sciex, Сингапур) с электрораспылительным источником ионов (Turbo V с зондом TurbolonSpray). Для получения устойчивой масс-спектрограммы использовали следующие условия детектирования: отрицательная поляризация, напряжение электроспрея – 4500,0 В, потенциал декластеризации – 45,0 В; при давлении газа завесы 20,0 psi и газа распыления 40,0 psi, потенциал ввода – 9,0 В.

Методика ВЭЖХ-масс-спектрометрического определения вальпроатов в плазме крови была валидирована в соответствии с отечественными и международными рекомендациями по валидации биоаналитических методов [13,14] по критериям селективности, правильности, линейности, прецизионности, стабильности и кросс-переноса. Предел обнаружения вальпроевой кислоты при масс-детектировании в режиме MIM был равен 0,5 мкг/мл (соотношение сигнал/шум – 4,3:1), а нижний предел количественного определения – 1 мкг/мл (соотношение сигнал/шум – 11,4:1). Аналитический диапазон методики составил 1-200 мкг/мл. В данном диапазоне отмечалась линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации вальпроевой кислоты в анализируемой пробе ($r^2=0,9999$). Эта зависимость описывается следующим уравнением: $y=29,4x+2650$, где x – концентрация вальпроевой кислоты мкг/мл, y – величина аналитического сигнала. Учитывая тот факт, что терапевтическая концентрация вальпроевой кислоты в плазме крови в среднем составляет 50-100 мкг/мл, аналитический диапазон методики позволяет использовать ее для лекарственного терапевтического мониторинга. Аналитический диапазон методики определения метаболитов вальпроевой кислоты (2-пропил-4-пентеновой, 3-гидрокси-2-пропилпентановой, 4-гидрокси-2-пропилпентановой, 2-пропилпентадиновой и 3-оксо-2-пропилпентановой кислот) составил 10-500 нг/мл.

В качестве программного обеспечения использовали Analyst MD 1.6.3. Software (AB Sciex).

Результаты и обсуждение

Идентификацию вальпроевой кислоты и ее метаболитов осуществляли масс-спектрометрически по значению MRM-переходов. С этой целью в начале исследования получали масс-спектры путем прямого ввода исследуемых образцов в масс-детектор с помощью шприцевого насоса. В качестве растворителя использовали метанол с 0,1% аммония ацетата.

Детекцию вальпроевой кислоты при ее количественном определении осуществляли в режиме регистрации множественных ионов (MIM) при отрицательной поляризации. Применение режима MRM (мониторинга множественных реакций) для определения вальпроевой кислоты считали нецелесообразным, так как она не фрагментируется на ионы-продукты на втором квадруполе и ее масс-спектры первого и второго порядков являются одинаковыми (m/z 143,1→143,1) (рис. 1).

Учитывая, что в процессе метаболизма вальпроевой кислоты образуется большое количество промежуточных и конечных продуктов, на предварительном этапе исследования среди множества метаболитов отбирали наиболее значимые для лекарственного терапевтического мониторинга.

Известно, что вальпроевая кислота в организме человека метаболизируется преимущественно в пе-

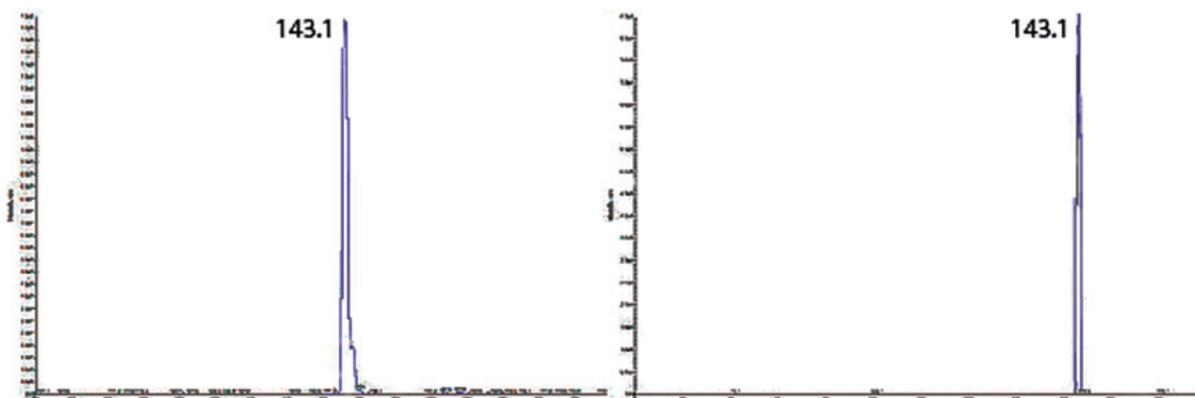


Рисунок 1. Масс-спектр 1 и 2 порядков вальпроевой кислоты $[M-H]^-$ (в режиме сканирования отрицательно заряженных ионов).

Figure 1. First and second order mass spectra of valproic acid $[M-H]^-$ (in the mode of negatively charged ions scanning).

чени по нескольким направлениям: путем конъюгации с глюкуроновой кислотой (до 50%), с помощью β -окисления жирных кислот в митохондриях (до 40%) и немитохондриального ω -окисления при участии цитохрома P450 (до 10%), менее 5% вальпроевой кислоты выделяется в неизменном виде через почки с мочой [15].

Ряд метаболитов вальпроевой кислоты (особенно продукты ω -окисления), являясь высоко реакционноспособными, обладают выраженной токсичностью. Скорость и направление метаболизма вальпроевой кислоты зависит от активности ферментных систем организма, что, в свою очередь, может быть генетически детерминировано (например, наибольшее клиническое значение для метаболизма вальпроевой кислоты имеет ген CYP2C9, мутантные варианты которого вызывают замедление метаболизма вальпроатов. По особенностям метаболизма выделяют следующие группы: распространенные метаболи-

заторы вальпроевой кислоты – гомозиготные носители полиморфного аллельного варианта гена CYP2C9; медленные метаболизаторы – гетерозиготные носители мутантных аллельных вариантов генов CYP2C9; сверхмедленные метаболизаторы – гомозиготные носители полиморфных мутантных аллельных вариантов генов CYP2C9 или их гетерозиготной комбинации [7]), варьировать в различных возрастных группах, изменяться при заболеваниях печени, зависеть от особенностей питания, применения лекарственных препаратов, влияющих на активность ферментов, участвующих в метаболизме вальпроевой кислоты и др. В связи с тем, что на метаболизм вальпроатов влияют различные факторы, одного генетического исследования для оценки лекарственного метаболизма недостаточно и весьма актуальным при проведении лекарственного терапевтического мониторинга представляется определение наиболее значимых метаболитов.

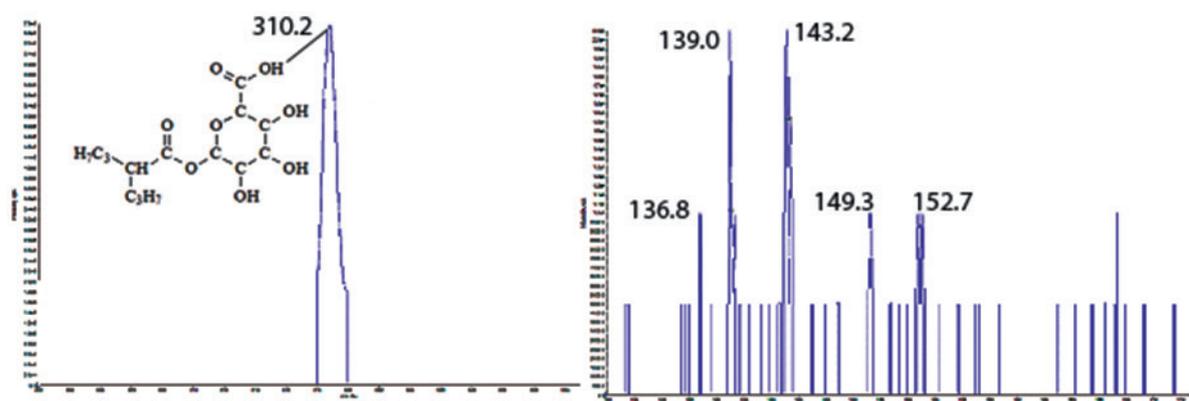


Рисунок 2. Масс-спектр 1-го и 2-го порядков 2-пропил-4-пентаноил- β -О-глюкуронида $[M-H]^-$ (в режиме сканирования отрицательно заряженных ионов).

Figure 2. First and second order mass spectra of 2-propyl-4-pentanoyl- β -O-glucuronide $[M-H]^-$ (in the mode of negatively charged ions scanning).

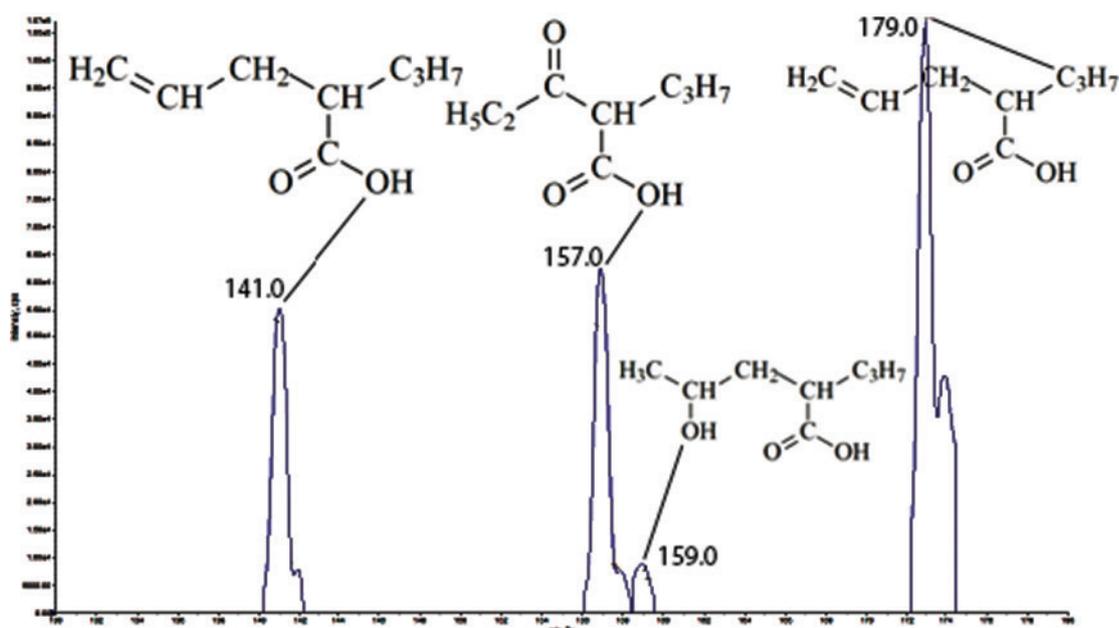


Рисунок 3. Масс-спектр 1-го порядка метаболитов вальпроевой кислоты (2-пропил-4-пентеновой, 3-гидрокси-2-пропилпентановой, 4-гидрокси-2-пропилпентановой, 2-пропилпентандиовой и 3-оксо-2-пропилпентановой кислот) в режиме сканирования отрицательно заряженных ионов.

Figure 3. First-order mass spectra of valproic acid metabolites (2-propyl-4-pentenoic acid, 3-hydroxy-2-propylpentanoic acid, 4-hydroxy-2-propylpentanoic acid, 2-propylpentandioic acid and 3-oxo-2-propylpentanoic acid) in the mode of negatively charged ions scanning.

Основным метаболитом вальпроевой кислоты является продукт ее конъюгации с глюкуроновой кислотой – 2-пропил-4-пентаноил-β-О-глюкуронид (VPA-G). Глюкуронирование вальпроевой кислоты протекает с участием косубстрата уридиндифосфата (УДФ) глюкуроновой кислоты при участии фермента УДФ-глюкурозилтрансферазы (UDP 1-9; 1-3; 1-4; 1-10; 1-8; 1-6; 2B7; 2B15 [15]). Глюкуронидные конъюгаты вальпроевой кислоты нетоксичны, являются полярными соединениями, растворимы в воде, выводятся из организма через почки с мочой. Идентификацию 2-пропил-4-пентаноил-β-О-глюкуронида осуществляли по значению MRM-перехода (m/z 319,2→143,2) при отрицательной поляризации ($[M-H]^-$) (рис. 2).

Ключевым метаболитом P450-зависимого пути метаболизма вальпроевой кислоты в эндоплазматическом ретикулуме является 2-пропил-4-пентеновая кислота (4-en-VPA). В образовании этой ненасыщенной жирной кислоты принимают участие CYP2C9, CYP2A6 и CYP2B6. Под влиянием этих же ферментов происходит образование 5-гидрокси-2-пропилпентановой кислоты (5-OH-VAP, которая превращается в 2-пропилпентандиовую (2-пропилглутаровую) кислоту (2PGA)) и 4-гидрокси-2-пропилпентановой кислот (4-OH-VAP превращается в 4-оксо-2-пропилпентановую кислоту, а далее – в 2-пропилбутандиовую (2-пропилантарную) кислоту). С помощью CYP2A6

вальпроевая кислота окисляется до 3-гидрокси-2-пропилпентановой кислоты (3-OH-VAP). Кроме того, из вальпроевой кислоты могут образовываться следующие непредельные жирные кислоты 2-пропил-2-пентеновая кислота (2-en-VPA), (3E)2-пропил-3-пентеновая кислота ((3E)-3-en-VAP), (3Z)2-пропил-3-пентеновая кислота ((3Z)-3-en-VAP) и 2-пропил-2,4-пентадиеновая кислота (2,4-dien-VPA).

В качестве индикаторных метаболитов для лекарственного терапевтического мониторинга были выбраны 2-пропил-4-пентеновая кислота, 2-пропилпентандиовая кислота, образующаяся из 5-гидрокси-2-пропилпентановой кислоты (промежуточного продукта метаболизма вальпроевой кислоты); 4-гидрокси-2-пропилпентановая кислота; 3-гидрокси-2-пропилпентановая кислота и продукт ее метаболизма 3-оксо-2-пропилпентановая кислота (этот метаболит образуется также в процессе митохондриального β-окисления). Для каждого метаболита были получены масс-спектры и определены MRM-переходы: 2-пропил-4-пентеновая кислота (m/z 140,1→140,1); 3-гидрокси-2-пропилпентановая кислота (m/z 159,1→101); 4-гидрокси-2-пропилпентановая кислота (m/z 159,1→123,1); 2-пропилпентандиовая кислота (m/z 173→129,1); 3-оксо-2-пропилпентановая кислота (m/z 157,05→113) (рис.3).

Предложенные условия высокоэффективной жидкостной хроматографии являлись универсальными

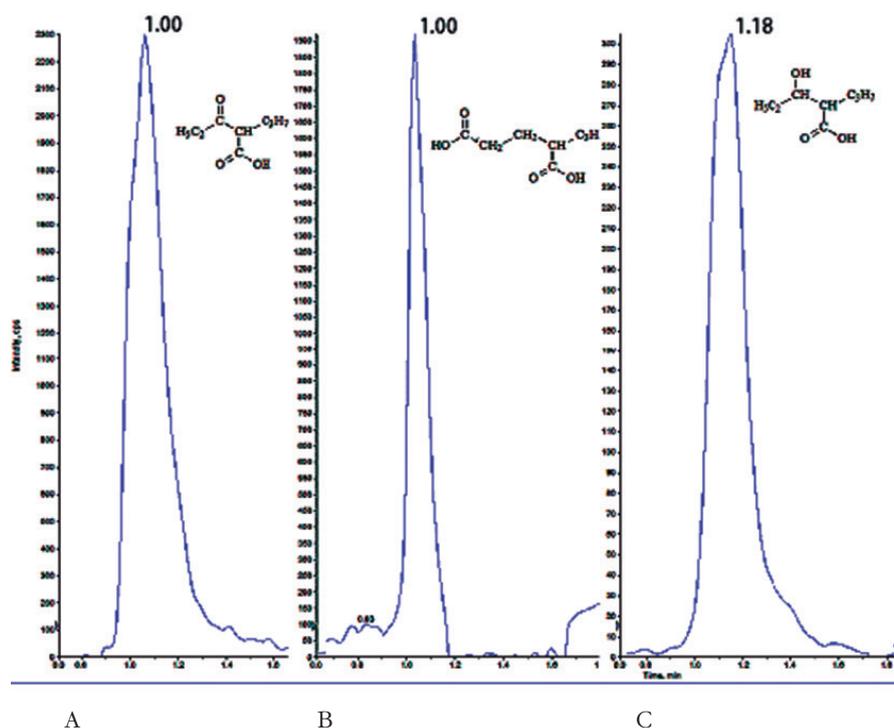


Рисунок 4. Хроматограммы 3-окси-2-пропилпентановой кислоты (А), 2-пропилпентадиовой кислоты (В), 3-гидрокси-2-пропилпентановой кислоты (С) (плазма крови больного эпилепсией, получавшего препарат вальпроевой кислоты).

Figure 4. Chromatograms of 3-hydroxy-2-propylpentanoic acid (A), 2-propylpentadiolic acid (B), 3-hydroxy-2-propylpentanoic acid (C) (blood plasma of a patient with epilepsy treated with valproic acid).

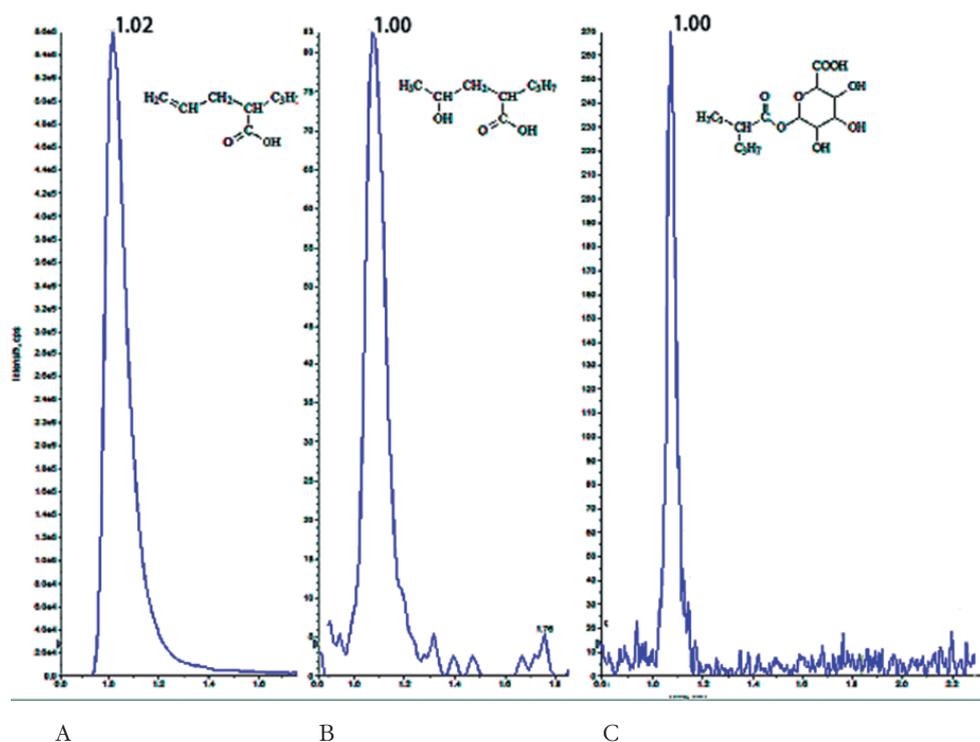


Рисунок 5. Хроматограммы 2-пропил-4-пентеновой кислоты (А), 4-гидрокси-2-пропилпентановой кислоты (В), 2-пропил-4-пентаноил-β-О-глюкуронида (С) (плазма крови больного эпилепсией, получавшего препарат вальпроевой кислоты).

Figure 5. Chromatograms of 2-propyl-4-pentenoic acid (A), 4-hydroxy-2-propylpentanoic acid (B), 2-propyl-4-pentanoil-β-O-glucuronide (C) (blood plasma of a patient with epilepsy treated with valproic acid).

для вальпроевой кислоты и ее метаболитов. Общее время изократического элюирования не превышало 2 мин. для всех исследованных метаболитов. На **рисунках 4-5** показаны хроматограммы плазмы крови пациента, получавшего вальпроевую кислоту (перед приемом очередной дозы вальпроата).

Таким образом, анализ результатов проведенного исследования показал, что разработанная и валидированная методика ВЭЖХ-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) позволяет определять вальпроевую кислоту и ее метаболиты в одной пробе (с использованием двух режимов масс-спектрометрической детекции – MIM и MRM), что существенно экономит время на проведение исследования, не требует отдельной пробоподготовки для каждого аналита, характеризуется небольшим объемом биологического материала для исследования (200 мкл плазмы крови на один анализ). Разработанная методика была апробирована для определения вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови пациен-

тов с эпилепсией, получавших вальпроаты. Аналитический диапазон методики ВЭЖХ-МС/МС определения вальпроевой кислоты (1-200 мкг/мл) и метаболитов (10-500 нг/мл) позволяет использовать ее для лекарственного терапевтического мониторинга, так как у всех обследованных пациентов содержание вальпроевой кислоты и ее метаболитов было в пределах данных диапазонов. Внедрение методики количественного определения вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови в работу клинических лабораторий позволит обеспечить индивидуальный подход к лечению пациентов с эпилепсией, тем самым повысив эффективность и безопасность фармакотерапии. В связи с тем, что данная методика не требует отдельной пробоподготовки для определения метаболитов, а их идентификация обеспечивается только изменением режима детекции, ее внедрение позволит повысить информативность анализа, не увеличивая стоимость и продолжительность исследования.

Литература:

1. Айвазян С. О. Терапевтический лекарственный мониторинг антиконвульсантов у детей. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2010; 2 (3): 2-7.
2. Батурин В. А., Батурина М. В., Котова А. А., Скрипнюк А. А. Рутинная практика терапевтического лекарственного мониторинга – некоторые итоги работы в системе ОМС. Качественная клиническая практика. 2016; 1: 47-49.
3. Белоусов Ю. Б., Леонова М. В., Штейнберг Л. Л., Тищенко И. Ф. Терапевтический лекарственный мониторинг в реальной практике. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2013; 3: 6-15.
4. Леонова М. В., Ивиц М. А., Тищенко И. Ф. и др. Терапевтический лекарственный мониторинг антиконвульсантов у детей в реальной практике. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2017; 9 (1): 26-34.
5. Якунина А. В., Повереннова И. Е. Роль терапевтического лекарственного мониторинга при использовании противозлепептических препаратов. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2016; 3: 66-73.
6. Приказ МЗ РФ от 22.10.2003 №494 «О совершенствовании деятельности врачей клинических фармакологов».
7. Шнайдер Н. А., Дмитренко Д. В. Хроническая интоксикация вальпроевой кислотой в эпилептологии: диагностика и лечение. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2016; 8 (2): 94-99.
8. Sztajnkrzyer M. D. Valproic acid toxicity: overview and management. J Toxicol Clin Toxicol. 2002; 40 (6): 789-801.
9. Попов Н. С., Малыгин А. С., Демидова М. А. Разработка ВЭЖХ-МС/МС-метода для идентификации и количественного определения нового производного тиадиазола. Современные проблемы науки и образования. 2017; 5: URL: www.science-education.ru/ru/article/view?id=26988. Дата обращения: 12.03.2018.
10. Zhao M., Li G., Qiu F., Sun Y. Development and Validation of a Simple and Rapid UPLC-MS Assay for Valproic Acid and Its Comparison With Immunoassay and HPLC Methods. Ther Drug Monit. 2016; 38 (2): 246-252.
11. Wen D., Chen Z., Yang C., Liu H. et al. A rapid and simple HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of valproic acid and its five metabolites in human plasma and application to study pharmacokinetic interaction in Chinese epilepsy patients. J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2018; 149 (5): 448-456.
12. Zhao M., Zhang T., Li G., Qiu F., Sun Y., Zhao L. Simultaneous Determination of Valproic Acid and Its Major Metabolites by UHPLC-MS/MS in Chinese Patients: Application to Therapeutic Drug Monitoring. J Chromatogr Sci. 2017; 55 (4): 436-444.
13. Береговых В. В. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. М. 2008; 18-65.
14. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Government Printing Office, Washington, DC, 2001.
15. Upendra A., Rimmel A., Rimmel P. Effect of Aging on Glucuronidation of Valproic Acid in Human Liver Microsomes and the Role of UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A4, UGT1A8, and UGT1A10. Drug Metabolism and Disposition. 2009; 37 (1): 229-236.

References:

- Ajvazyan S. O. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2010; 2 (3): 2-7.
- Baturin V. A., Baturina M. V., Kotova A. A., Skripnyuk A. A. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika* (in Russian). 2016; 1: 47-49.
- Belousov Yu. B., Leonova M. V., Shtejnberg L. L., Tishchenkova I. F. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2013; 3: 6-15.
- Leonova M. V., Ivzhic M. A., Tishchenkova I. F. et al. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2017; 9 (1): 26-34.
- Yakunina A. V., Poverennova I. E. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions* (in Russian). 2016; 3: 66-73. DOI: 10.17749/2077-8333.2016.8.3.066-073.
- The order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 22.10.2003 № 494 "On the improvement of the activity of physicians of clinical pharmacologists" [Prikaz MZ RF ot 22.10.2003 №494 «O sovershenstvovanii deyatel'nosti vrachej klinicheskikh farmakologov» (in Russian)].
- Shnajder N. A., Dmitrenko D. V. *Nevrologiya, nejrropsihiatriya, psihosomatika* (in Russian). 2016; 8 (2): 94-99.
- Sztajnkrzyer M. D. Valproic acid toxicity: overview and management. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2002; 40 (6): 789-801.
- Popov N. S., Malygin A. S., Demidova M. A. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* (in Russian). 2017; 5: URL: www.science-education.ru/ru/article/view?id=26988. Accessed: 12.03.2018.
- Zhao M., Li G., Qiu F., Sun Y. Development and Validation of a Simple and Rapid UPLC-MS Assay for Valproic Acid and Its Comparison With Immunoassay and HPLC Methods. *Ther Drug Monit.* 2016; 38 (2): 246-252.
- Wen D., Chen Z., Yang C., Liu H. et al. A rapid and simple HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of valproic acid and its five metabolites in human plasma and application to study pharmacokinetic interaction in Chinese epilepsy patients. *J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2018; 149 (5): 448-456.
- Zhao M., Zhang T., Li G., Qiu F., Sun Y., Zhao L. Simultaneous Determination of Valproic Acid and Its Major Metabolites by UHPLC-MS/MS in Chinese Patients: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *J Chromatogr Sci.* 2017; 55 (4): 436-444.
- Beregoviy V. V. Validation of analytical techniques for drug manufacturers. The typical management of the enterprise for the production of medicines [Validaciya analiticheskikh metodik dlya proizvoditelej lekarstv. Tipovoe rukovodstvo predpriyatiya po proizvodstvu lekarstvennykh sredstv (in Russian)]. Moscow. 2008; 18-65.
- Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Government Printing Office, Washington, DC, 2001.
- Upendra A., Rimmel A., Rimmel P. Effect of Aging on Glucuronidation of Valproic Acid in Human Liver Microsomes and the Role of UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A4, UGT1A8, and UGT1A10. *Drug Metabolism and Disposition.* 2009; 37 (1): 229-236.

Сведения об авторах:

Малыгин Александр Сергеевич – ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинский университет Минздрава России. E-mail: shurik.malygin@mail.ru.

Попов Никита Сергеевич – ассистент кафедры фармации, ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинский университет Минздрава России. E-mail: ns.popov@mail.ru.

Демидова Марина Александровна – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармации, ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинский университет Минздрава России. Тел.: +7(4822)53-86-55. E-mail: demidova.m.a@mail.ru.

Кудряшова Марина Николаевна – к.б.н., доцент кафедры фармации, ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинский университет Минздрава России. E-mail: marinabstrv@rambler.ru.

About the authors:

Malygin Aleksandr Sergeevich – Resident-in-Training, Chair of Pharmacology & Clinical Pharmacology, Tver State Medical University. E-mail: shurik.malygin@mail.ru.

Popov Nikita Sergeevich – Assistant, Chair of Pharmacy, Tver State Medical University. E-mail: ns.popov@mail.ru.

Demidova Marina Aleksandrovna – MD, Professor & Head, Chair of Pharmacy, Tver State Medical University. Tel.: +7(4822)53-86-55. E-mail: demidova.m.a@mail.ru.

Kudrayshova Marina Nikolaevna – PhD (Biology), Associate Professor, Chair of Pharmacy, Tver State Medical University. E-mail: marinabstrv@rambler.ru.