

Определение вальпроевой кислоты в биологических жидкостях методом ВЭЖХ с УФ детекцией и предколоночной дериватизацией фенацил бромидом

А.А. Дутов, В.И. Летунов, Д.А. Никитин, М.М. Дуйсебеков

Лаборатория клинической фармакокинетики Читинского областного медицинского диагностического центра (главный врач - Коржов Б.В.)

Кафедра химии Читинского университета (ректор — проф. Резник Ю.Н.)

321 Окружной военный клинический госпиталь СибВО (начальник Тохта-Ходжаев Ш.С.)

Предложен ВЭЖХ метод определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях, реализованный на стандартном хроматографическом оборудовании. Разработана твердофазная микроэкстракция вальпроевой кислоты из сыворотки, слюны и спинномозговой жидкости на картриджах с 50 мг LiChroprep RP-18. В качестве внутреннего стандарта предложена β -липовая кислота. Дериватизация производилась с помощью фенацил бромида в присутствии триэтиламина при $80 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 30-40 мин. Хроматографическое разделение фенацильных производных реализовано на коротких колонках (50×4 мм) с Диасфер C_{18} 5 μ . УФ детекция при 254 нм. Элюент: ацетонитрил — вода (70:30, v/v) + 1% изопропанола. Времена удерживания фенацильных производных липовой и вальпроевой кислот составили 1.96 и 3.13 мин, соответственно. Степень выхода вальпроевой кислоты (экстракция + дериватизация) не менее 96%. Коэффициент вариации для стандартной дозы липовой кислоты составил 6.7 %, для вальпроевой — 5.2%. Чувствительность (предел детекции) составила около 10 нг для фенацилвальпроевой и около 15 нг — для фенациллиповой кислот при соотношении сигнал/шум > 3 . Метод пригоден для рутинного клинического мониторинга вальпроевой кислоты.

Введение

Вальпроевая (2 пропил-пентановая) кислота известна как эффективное противоэpileптическое средство простой химической структуры. Она практически прозрачна для ультрафиолетовых лучей, потому ее определение традиционными хроматографическими методами с УФ детектированием затруднено. Предпринимались попытки определения вальпроевой кислоты без дериватизации (Lovett et al, 1987), с постколоночной (Farinotti, Mahuzier, 1979) и предколоночной дериватизацией (Gupta et al, 1979; Kline et al, 1982; Moody and Allan, 1983; Nakamura et al, 1984) с целью получения производных, хорошо поглощающих в УФ спектре. Известны также методы получения флуоресцирующих производных вальпроевой кислоты (Liu et al, 1992; Nara et al, 1999), причем, некоторые из них хорошо поглощают в УФ спектре (Liu et al, 1992). Эти методы сложны, продолжительны и требуют специального оборудования. Главная же проблема дериватизационных технологий — невысокая воспроизводимость. Она определяется двумя факторами: стабильностью экстракции и стабильностью дериватизации. В классическом варианте вальпроевую кислоту экстрагируют из подкисленной сыворотки в малополярный органический растворитель типа этилацетата или дихлорметана (Farinotti, Mahuzier, 1979; Kline et al, 1982). Затем раст-

воритель упаривают и проводят дериватизацию, как правило, в безводном ацетонитриле. Однако, Liu et al. (1992) справедливо указывают на такое важное свойство вальпроевой кислоты как летучесть. Поэтому методы жидко-жидкостной экстракции вряд ли можно считать адекватными. Другая проблема возникающая в этой связи — дериватизация разных доз стандартов вальпроата *in vitro*, которая необходима для отработки параметров дериватизационной реакции и как референтный метод для оценки степени экстракции. Водные стандарты дериватизируются плохо, спиртовые — немногим лучше, упаренные — непредсказуемо. В ацетонитриле вальпроевая кислота растворяется плохо. С учетом изложенных проблем, мы попытались разработать относительно надежные методы экстракции и дериватизации: твердофазную микроэкстракцию вальпроевой кислоты из сыворотки без упаривания и последующую дериватизацию с помощью фенацил бромида. В качестве прототипа дериватизационной реакции, мы использовали модифицированный метод получения фенацильных производных вальпроевой кислоты (Nakamura et al, 1984). Кроме того, нами предложен новый внутренний стандарт — β -липовая кислота и проведена оценка его пригодности в этом качестве для рутинных клинических анализов вальпроата в сыворотке и слюне.

Методы исследования

Реактивы. Дериватизационный реагент — фенацил бромид (или α -бромацетофенон, Fluka, Germany) растворяли в безводном ацетонитриле, 5 мг/мл, хранили при $+4^{\circ}\text{C}$ в темных флакончиках (сохраняется более 1 месяца). Триэтиламин (ICN, USA) получали в готовом виде и хранили при комнатной температуре в герметичной таре. Ацетонитрил (Криохром, Санкт-Петербург), метанол и изопропанол (Fluka) квалификации «ОСЧ» и HPLC-grade, соответственно. Дихлорметан квалификации «ХЧ» (Вектон, Санкт-Петербург), фосфорная (ортофосфорная) кислота квалификации Puriss (Fluka). Базовые растворы стандартов — натриевой соли вальпроевой кислоты (Sigma, USA) и β -липоевой кислоты (ICN) — готовили на бидистиллированной воде в концентрации 1000 нг/мкл и хранили в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$. Рабочие растворы готовили в день исследования разбавлением базовых бидистиллированной водой и добавляли к 0,5 мл бланковой сыворотки в концентрациях 3125, 6250, 12500, 25000 и 50000 нг (объем каждой дозы 50 мкл, терапевтическая концентрация вальпроата 50–100 мкг/мл, чему соответствуют 25000 и 50000 нг в 0,5 мл сыворотки). Липоевую кислоту добавляли к 0,5 мл бланковой сыворотки или сыворотки пациента в стандартной дозе — 50000 нг (50 мкл базового раствора).

Аппаратура и оборудование. УФ детектор Uvidex 100 (Jasco, Japan), насос высокого давления Marathon-2 (Rigas Labs, Greece-USA), инжектор Rheodyne 7725i (USA), модуль давления Alltech (USA), компьютер Pentium-MMX с хроматографической программой «Мультихром», версия 1.43 (Амперсанд, Москва). Аналитическая колонка 50×4 мм с Диасфер-110- C_{16} 5 мкм, 3200–3500 ТТ (БиоХимМак, Москва). Экстракционные картриджи на основе 3-мл полипропиленовых шприцов с фторопластовыми фильтрами (Supelco, USA), упакованные 50 мг LiChroprep RP-18, 40–63 мкм (Merck, Germany) по собственной технологии. Для высушивания сорбента картриджами использовали безмасляный насос с регулируемым вакуумом Millipore (USA). Дериватизацию с одновременным упариванием реагентов проводили в термостате Boekel Scientific (USA).

Результаты и их обсуждение

Экстракция. К 0,5 мл сыворотки пациента или бланковой сыворотки с добавленными стандартами, помещенных в 1,5 мл полипропиленовую пробирку, добавляли 20 мкл концентрированной фосфорной кислоты и 50 мкл липоевой кислоты (внутренний стандарт, IS). Осторожно перемешивали и выдерживали 5 мин перед аппликацией в картридж. При анализе вальпроата в слюне, ее собирали в 15-мл полипропиленовые пробирки, замораживали-оттаивали, центрифугировали 5 мин при 2000 g и далее обрабатывали аналогично сыворотке. Картридж регенерировали последовательно 0,5 мл дихлорметана (или хлороформа), 0,5 мл метанола, 0,5 мл воды и 0,5 мл смеси вода — концентрирован-

ная H_3PO_4 (1:0.04, v/v¹). Пропускали забуференную сыворотку через картридж самотеком и промывали его 0,2 мл смеси вода — метанол (4:1, v/v). Высушивали сорбент картриджа под вакуумом (-15 mmHg) в течение 2 мин и элюировали вальпроевую кислоту и IS 0,4 мл безводного ацетонитрила в стеклянный флакончик ($\varnothing=10$ мм, $h=20$ мм).

Дериватизация. К 0,4 мл ацетонитрила добавляли 0,2 мл раствора фенацил бромида и 0,1 мл триэтиламина (схема дериватизационной реакции на рис. 1). Флакончики помещали в термостат при $80 \pm 2^{\circ}\text{C}$ и выдерживали до полного испарения летучих компонентов (не менее 30 минут). Сухой остаток растворяли в 100 мкл ацетонитрила и 5 мкл вводили в петлю инжектора.

Хроматография. Колонка 50×4 мм, Диасфер-110- C_{16} 5 μ , УФ детекция при 254 нм, элюент ацетонитрил-вода (70:30, v/v) + 1% изопропанола, скорость потока 800 мкл/мин, давление 350 psi. Типичная хроматограмма представлена на рис. 2.

Оценивать степень экстракции необходимости не было: бланковая сыворотка и сыворотка пациентов обрабатывались одинаково и одновременно. Картриджи предварительно тестировали, пропуская стандартные дозы липоевой и вальпроевой кислот. Если разброс по степени выхода (экстракция + дериватизация) превышал 10%, то такие картриджи выбраковывали. Коэффициент вариации для стандартной дозы липоевой кислоты составил 6,7%, для вальпроевой — 5,2 %. Выход (экстракция + дериватизация) разных доз вальпроевой и липоевой кислоты из бланковой сыворотки представлен на рис. 3.

В рутинных клинических исследованиях калибровочные кривые достаточно корректировать 1–2 раза в месяц, а построение их, равно как и расчет концентраций, легко реализуются с помощью хроматографической программы «Мультихром».

Чувствительность (предел детекции) составила около 10 нг для фенацилвальпроевой и около 15 нг — для фенациллипоевой кислот при соотношении сигнал/шум > 3 . Этого вполне достаточно для анализа вальпроевой кислоты в сыворотке и слюне.

Добавление к сыворотке перед экстракцией фосфорной кислоты преследует две цели: высвобождение вальпроевой кислоты из связи с белками плазмы, степень связывания которой может превышать 90% (Battino et al, 1995) и улучшение ее сорбции на картридже при низком pH (2–3). Для стабилизации адсорбции к сыворотке, наряду с фосфорной кислотой, можно добавить 5% метанола. Регенерацию картриджа в этом случае надо проводить той же смесью, состоящей из воды, фосфорной кислоты и метанола. Разбавление сыворотки перед экстракцией кислыми буферными растворами, мы не рекомендуем. Хотя в этом случае

¹ Volume/volume, т.е. соотношения по объемам.

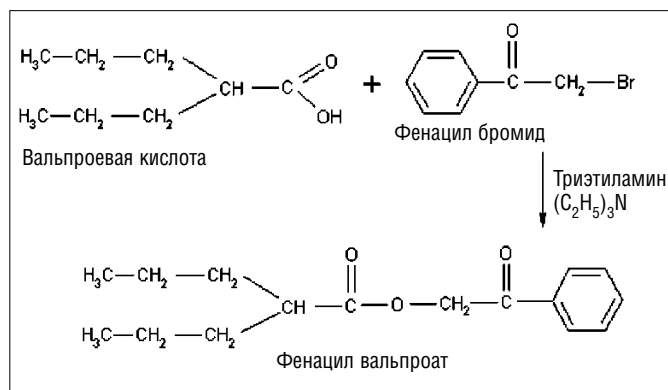


Рис. 1. Схема дериватизации вальпроевой кислоты.

скорость загрузки картриджа возрастает, возможен «проскок» вальпроевой кислоты и IS, которые являются полярными соединениями. Для минимизации экстракционных потерь, следует избегать лишних промывок картриджа — для этого вполне достаточно 0,2 мл 20% водного метанола. Просушка картриджа перед финальным элюированием — обязательное условие последующей успешной дериватизации. Оптимальное время просушки под вакуумом 2-3 мин, удлинение времени до 5 мин и более, может сопровождаться потерей веществ, особенно при невысокой влажности окружающего воздуха. В среднем картридж выдерживал 8-10 экстракций без потери эффективности. Критерием

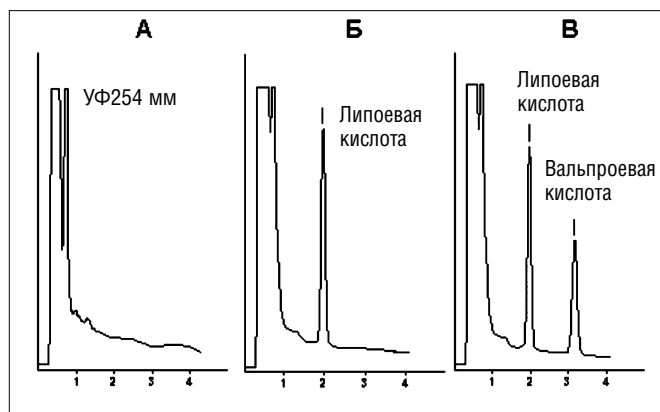


Рис. 2. Хроматограммы экстрактов бланковой сыворотки (А), бланковой сыворотки с добавленным внутренним стандартом — липоевая кислота 2500 нг (Б) и сыворотки пациента, получающего 600 мг вальпроата натрия в сутки (В). Рассчитанная концентрация вальпроевой кислоты — 53 мкг/мл (терапевтические 50-100 мкг/мл). Степень выхода 96% (экстракция + дериватизация). Объем микроинъекции 5 мкл (соответствует 0,025 мл сыворотки).

смены картриджа служило резкое замедление скорости потока из-за забивки фильтров биоматриком.

Приведенные параметры дериватизационной реакции можно считать оптимальными: 30-40 мин вполне достаточно для относительно полной дериватизации, тем более что стандарты и экстракт биопробы находятся в одинаковых условиях. Важное значение имеет выбор посуды: дериватизационная реакция должна прой-

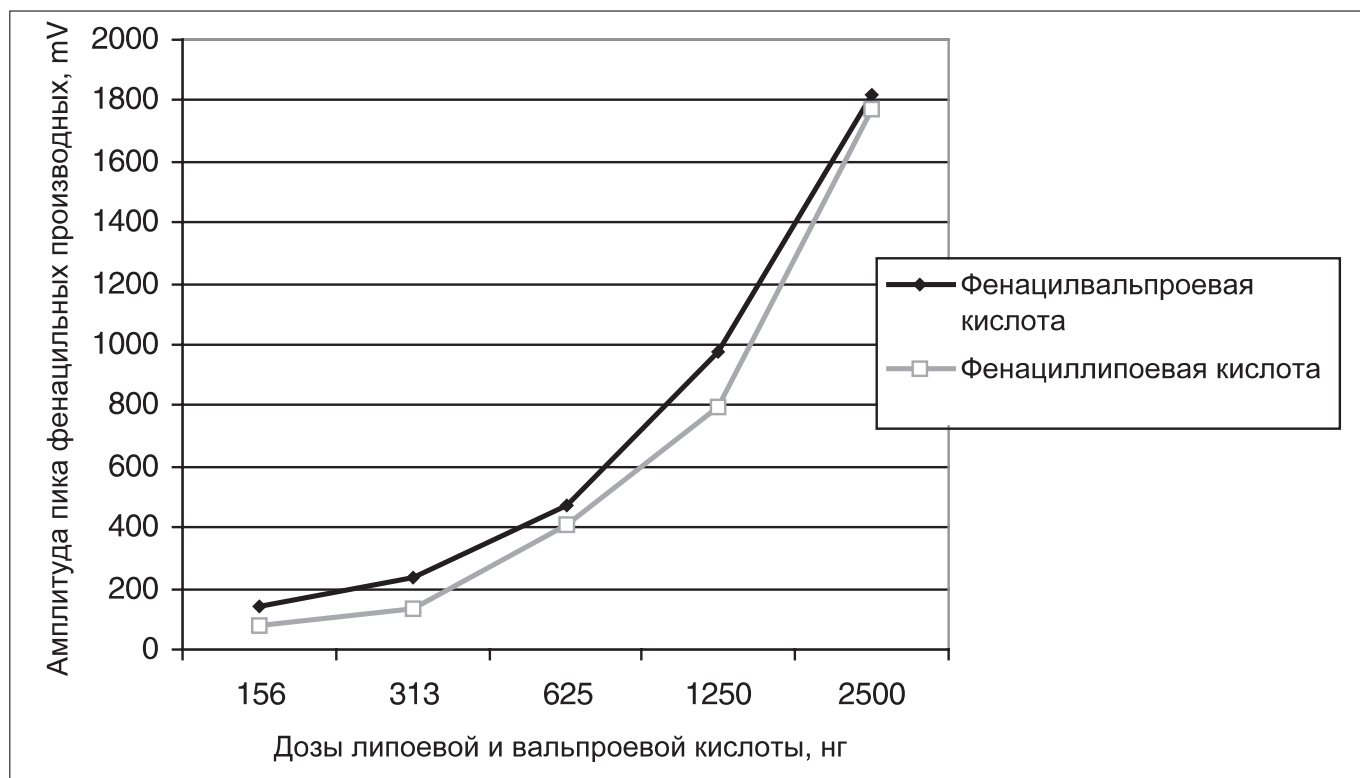


Рис. 3. Экспоненциальная зависимость между исходными дозами вальпроевой и липоевой кислот и амплитудой пика дериватизированных стандартов (фенацилвальпроевая и фенациллиповая кислоты).

ти до того, как полностью испарятся компоненты. К примеру, если проводить ее в конических 10-мл центрифужных пробирках, то при той же температуре ее продолжительность составляет 75-80 мин, а выход феноцил вальпроата возрастает в 1.3-1.4 раза. Испарять досуха не обязательно, важно чтобы конечный объем, в котором растворяется экстракт, составлял 100 мкл. Феноцильные производные вальпроевой и липоевой кислот практически не улетучиваются при испарении. Тем не менее, выбор параметров термостата существенно сказывается на результатах дериватизации: в нем не должно быть движения воздуха, должен обеспечиваться равномерный прогрев посуды и желательно, чтобы он был оснащен пассивной вытяжкой (триэтиламин — пахучее и коррозорирующее соединение).

Хроматографический анализ феноцилвальпроата обычно производят на стандартных колонках длиной 100-250 мм и диаметром 4-4,6 мм (Gupta et al, 1979; Moody and Allan, 1983; Nakamura et al, 1984). Однако для этих целей вполне подойдут колонки длиной 50 мм, упакованные любым обращенно-фазным сорбентом (C₁₆ или C₁₈). При этом существенно сокращается время анализа и регенерации колонки. Проблем с разделением феноцильных производных липоевой и вальпрое-

вой кислоты не возникает ($\alpha = 1,6$). Полный хроматографический цикл около 10 мин: около 3 мин уходит на разделение IS и вальпроата и около 7 мин на регенерацию перед следующим анализом. В конце работы колонку рекомендуется промыть тем же элюентом и небольшими порциями изопропанола в течение 15-20 мин до стабилизации нулевой линии на исходном уровне.

Предложенный метод в течение нескольких лет используется в нашей лаборатории и хорошо зарекомендовал себя в качестве рутинного при проведении терапевтического лекарственного мониторинга. Экстракция занимает около 10 мин, дериватизация 30-40 мин, полный хроматографический цикл около 10 мин. Одновременно можно обрабатывать до 20 биопроб. Метод пригоден для анализа вальпроевой кислоты в сыворотке крови, слюне и спинномозговой жидкости. Использование коммерчески доступного внутреннего стандарта позволяет скорректировать потенциальные потери вещества при экстракции и дериватизации. К достоинствам предлагаемого метода следует отнести возможность его реализации на стандартном хроматографическом оборудовании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Battino D, Estienne M, Avanzini G. Clinical pharmacokinetics of antiepileptic drugs in pediatric patients. Part 1: Phenobarbital, primidone, valproic acid, ethosuximide and mesuximide. «Clin. Pharmacokinetics», 1995, v. 29 (4), p. 257-286.
2. Farinotti R, Mahuzier G. Simultaneous determination of six anticonvulsants in serum by high performance liquid chromatography. «J. Liquid Chromatogr.», 1979, v. 2, p. 345-357.
3. Gupta RN, Keane PM, Gupta ML. Valproic acid in plasma, as determined by liquid chromatography. «Clin. Chem.», 1979, v. 25 (11), p. 1984-1985.
4. Hara S, Kamura M, Inoue K, Fukuzawa M, Ono N and Kuroda T. Determination of valproic acid in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. «Biol. Pharm. Bull.», 1999, v. 22(9), p. 975-977.
5. Kline WE, Enogonio BP, Reitor DJ, May WE. Rapid chromatographic determination of valproic acid in human serum. «J. Liquid Chromatogr.», 1982, v. 5 (9), p. 1697-1709.
6. Liu H, Forman LJ, Montoya J et al. Determination of valproic acid by high-performance liquid chromatography with photodiode-array and fluorescence detection. «J. Chromatogr. — Biomed. Appl.», 1992, v.576, p. 163-169.
7. Lovett LJ, Nygard GA, Erdmann GR, Burley CZ, Wahba Khalil K. HPLC determination of valproic acid in human serum using ultraviolet detection. «J. Liquid Chromatogr.», 1987, v. 10 (4), p. 687-699.
8. Moody JP and Allan SM. Measurement of valproic acid in serum as the 4-bromophenacyl ester by high performance liquid chromatography. «Clinica Chimica Acta», 1983, v. 127, p. 263-269.
9. Nakamura M, Kondo K, Nishioka R, Kawai S. Improved procedure for high-performance liquid chromatographic determination of valproic acid in serum as its phenacyl ester. «J. Chromatogr.», 1984, v. 310, p. 450-454.