

УДК 542.98:615.322

© Коллектив авторов

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ВЭЖХ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

А.А. Дутов^{1}, Д.А. Никитин², В.И. Летунов²,
П.П. Терешков¹, О.Н. Коновалова²*

¹ГБОУ ВПО “Читинская государственная медицинская академия”
Министерства здравоохранения РФ, 672090, Чита, ул. Горького 39а;
тел.(факс): 8-3022-32-30-58; эл. почта: dutovaa@yandex.ru

²ФГБОУ ВПО “Забайкальский государственный университет”, Чита

Предложен модифицированный метод определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях, включающий твердофазную экстракцию вальпроевой и гептаноевой кислот (внутренний стандарт, IS) на картриджах с 10 мг сверхсшитого полистирола (Puroser-200), которые выдерживали несколько десятков экстракций без потери эффективности. Дериватизацию карбоновых кислот с помощью 1-(бромаацетил)пирена в ацетоне в присутствии триэтиламина и последующее хроматографическое разделение дериватов, реализованное на колонках Chromolith Performance RP-18e 100×4,6 мм с уникальным монолитным обращенно-фазным сорбентом (“Merck”). Полный хроматографический цикл занимает менее 3 мин. Выход IS и вальпроевой кислоты (экстракция + дериватизация) составил 101-106%. Чувствительность (лимит детекции) составила около 1 нг для вальпроевой и около 0,6 нг для гептаноевой кислот при соотношении сигнал/шум = 3.

Ключевые слова: ВЭЖХ, вальпроевая кислота, SPE, сверхсшитый полистирол, дериватизация, 1-(бромаацетил)пирен, Chromolith Performance.

ВВЕДЕНИЕ. Вальпроевая кислота – простое по химической структуре лекарственное вещество (2-пропил-пентановая кислота), являющее антиэпилептическим препаратом широкого спектра действия и одним из наиболее востребованных в клинической практике. Вальпроаты характеризуются низким терапевтическим индексом, то есть узким диапазоном между терапевтическими и токсическими концентрациями с одной стороны, и терапевтическими и неэффективными – с другой, следовательно, эффективность применения препаратов данной группы находится в прямой зависимости от их концентрации в крови. Терапевтическая концентрация вальпроевой кислоты в плазме составляет 50-100 мкл/мл [1, 2].

Ранее нами был предложен простой и надежный метод определения вальпроевой кислоты в биологических жидкостях [3]. Однако, твердофазная экстракция (SPE) на картриджах с октадецилсиликагелем (LiChroprep RP-18, 40-63 мкм, “Merck”, Германия) не всегда обеспечивала достаточную чистоту

* - адресат для переписки

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ВЭЖХ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ

экстрактов. Поскольку вальпроевая кислота является полярным соединением, она не всегда эффективно сорбируется на модифицированных силикагелях. Кроме того, срок службы таких картриджей ограничен. В этой связи мы попытались улучшить технологию SPE, заменив LiChroprep RP-18 на полимерный сорбент на основе свёрнутого полистирола (Purosep-200). Этот отечественный сорбент обладает рядом уникальных свойств: сорбционная ёмкость в несколько раз превышает таковую у силикагеля, выдерживает pH от 0 до 14,0, одинаково эффективно сорбирует полярные и неполярные соединения, как из воды, так и из некоторых органических растворителей [4-6]. Кроме того, был заменен дериватизационный реагент – взамен ранее использовавшегося фенол бромид, был апробирован 1-(бromoацетил)пирен, который ранее для этой цели не использовался [7]. В качестве внутреннего стандарта, вместо ранее применявшейся β-липоевой кислоты, использована гептановая кислота.

МЕТОДИКА. Работа основана на результатах исследования 87 больных эпилепсией (20 мужчин, 67 женщин) в возрасте 18 лет и старше, находящихся на диспансерном учете в Краевом Противоэпилептическом Центре г. Читы. При проведении исследования соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2000 ред.). Все обследуемые получили полную информацию о проводимом исследовании и подписали информированное согласие, утверждённое в локальном этическом комитете при ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» МЗ РФ.

Реактивы и стандарты. Дериватизационный реагент – 1-(Bromoacetyl)pyrene (5 мг/мл в ацетоне, “Aldrich”, США) готовили непосредственно в день исследования. Сохраняется в темных флакончиках при комнатной температуре до 3 дней. Триэтиламин (“Fluka”, Германия) получали в готовом виде и хранили при комнатной температуре в темных флакончиках. Ацетонитрил и диметилсульфоксид (ДМСО) квалификации UV-IR-HPLC-GPC (“Panreac”, Испания), изопропанол (“Лекбиофарм”, Москва) квалификации “для ВЭЖХ”, метанол LiChrosolv for liquid chromatography (“Merck”). Ацетон, H₃PO₄ (puriss) (“Fluka”). Базовые растворы стандартов – натриевой соли вальпроевой кислоты (“Sigma”, США) и гептановой кислоты (“ICN”, США) – растворяли в ацетоне (1000 нг/мкл), фильтровали через 0,2 мкм фторопластовый фильтр и хранили в темных флакончиках при комнатной температуре.

Аппаратура и оборудование. Спектрофотометрический детектор SPD-10AVP (“Shimadzu”, Япония), насос высокого давления LC-10ADVP (“Shimadzu”), ручной инжектор 7725i Rheodyne с петлей на 100 мкл, компьютер Pentium-4 с хроматографической программой “Мультихром”, версия 1,5× (“Амперсанд”, Москва). Экстракционные картриджи на основе полипропиленовых шприцов объёмом 3 см³ с фторопластовыми фильтрами (“Supelco”, США), упакованные 10 мг свёрнутого полистирола (Purosep-200*), соответственно, по собственной технологии. Для высушивания сорбента картриджей использовали вакуумный микронасос Mosquito (США) и манифолд на 12 картриджей (“Merck”). Экстракты дериватизировали в 3-мл реакционных виалах с герметично закручивающейся крышкой (“Pierce Biotechnology Inc.”, США) в термостате с пассивной конвекцией (“Boekel Scientific”, США).

* - производится в Англии фирмой Purolite Int. Этот уникальный отечественный сорбент создан группой исследователей под руководством проф. Даванкова Вадима Александровича (Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Процедура определения вальпровой кислоты включала преаналитический этап (экстракция и дериватизация) и аналитический этап (хроматографическое разделение и математический расчёт).

Экстракция.

Стандарты. В 0,5-мл полипропиленовую пробирку (“Eppendorf”, Германия) добавляли последовательно 25 мкл IS (гептановая кислота, 1000 нг/мкл в ацетоне), 50 мкл вальпровой кислоты (1000 нг/мкл в ацетоне), 200 мкл воды и 5 мкл H_3PO_4 , перемешивали и вводили в картридж 2×140 мкл.

Плазма/сыворотка. В аналогичную пробирку отбирали 250 мкл плазмы/сыворотки, добавляли 25 мкл IS и 5 мкл H_3PO_4 , осторожно перемешивали и вводили в картридж 2×140 мкл.

Перед загрузкой стандартов или биопробы, картридж последовательно промывали 0,5 мл ДМСО и 0,5 мл ацетона, а затем кондиционировали 0,5 мл метанола и 0,5 мл воды. После загрузки самотёком, сорбент картриджа промывали 0,3 мл воды и высушивали под вакуумом 3 мин. Кислоты элюировали 2×100 мкл ацетона в реакционную виалу.

Дериватизация.

К 200 мкл элюата добавляли 50 мкл 1-(бromoацетил)пирена (5 мг/мл в ацетоне) и 10 мкл триэтиламина. Нагревали 30 мин при 40°C с закрытой крышкой в термостате, охлаждали до комнатной температуры и 5 мкл вводили в петлю инжектора (содержит 500 нг IS и 1000 нг вальпроата).

Хроматография.

Разделение на колонке Chromolith Performance RP-18e (“Merck”) 100×4,6 мм с обращено-фазным монолитным сорбентом и защитной предколонкой 5×4,6 мм (Chromolith Guard Cartridge, “Merck”). УФ детекция при 360 нм. Элюент ацетонитрил – вода – изопропанол (90:10:1, v/v/v) при скорости потока 2000 мкл/мин и давлении 21 бар (рисунок).

Использование колонок с монолитным сорбентом позволило добиться разделения дериватов менее чем за 3 мин при минимальном давлении. Для более полного разделения процент ацетонитрила можно уменьшить с 90 до 85%.

Добавление к сыворотке фосфорной кислоты – традиционная процедура для высвобождения лекарственных препаратов из связи с белками [8]. Кроме того, кислоты лучше сорбируются на полистиролах при низком pH [9]. Для промывки сорбента картриджа достаточно воды. Высушивание сорбента после промывки – ответственная процедура, поскольку последующая дериватизация эффективно идет в безводной среде. Для элюирования подходит ацетон или ацетон – триэтиламин (9:1, v/v). В последнем случае добавлять триэтиламин нет необходимости. Оба варианта элюирования равноэффективны.

В целом, экстракты получаются гораздо чище в сравнении с SPE на C_{18} -сорбентах, а картриджи выдерживают несколько десятков экстракций.

Чувствительность (лимит детекции) составила около 1 нг для вальпровой и около 0,6 нг для гептановой кислот при соотношении сигнал/шум = 3. Этого вполне достаточно для анализа вальпровой кислоты в сыворотке и слюне. При флуориметрической детекции (ex360 – em430 нм) чувствительность на пикограммовом уровне. При минимальной модификации метод можно адаптировать для анализа других органических кислот – желчных, жирных, простагландинов и полиэфирных антибиотиков.

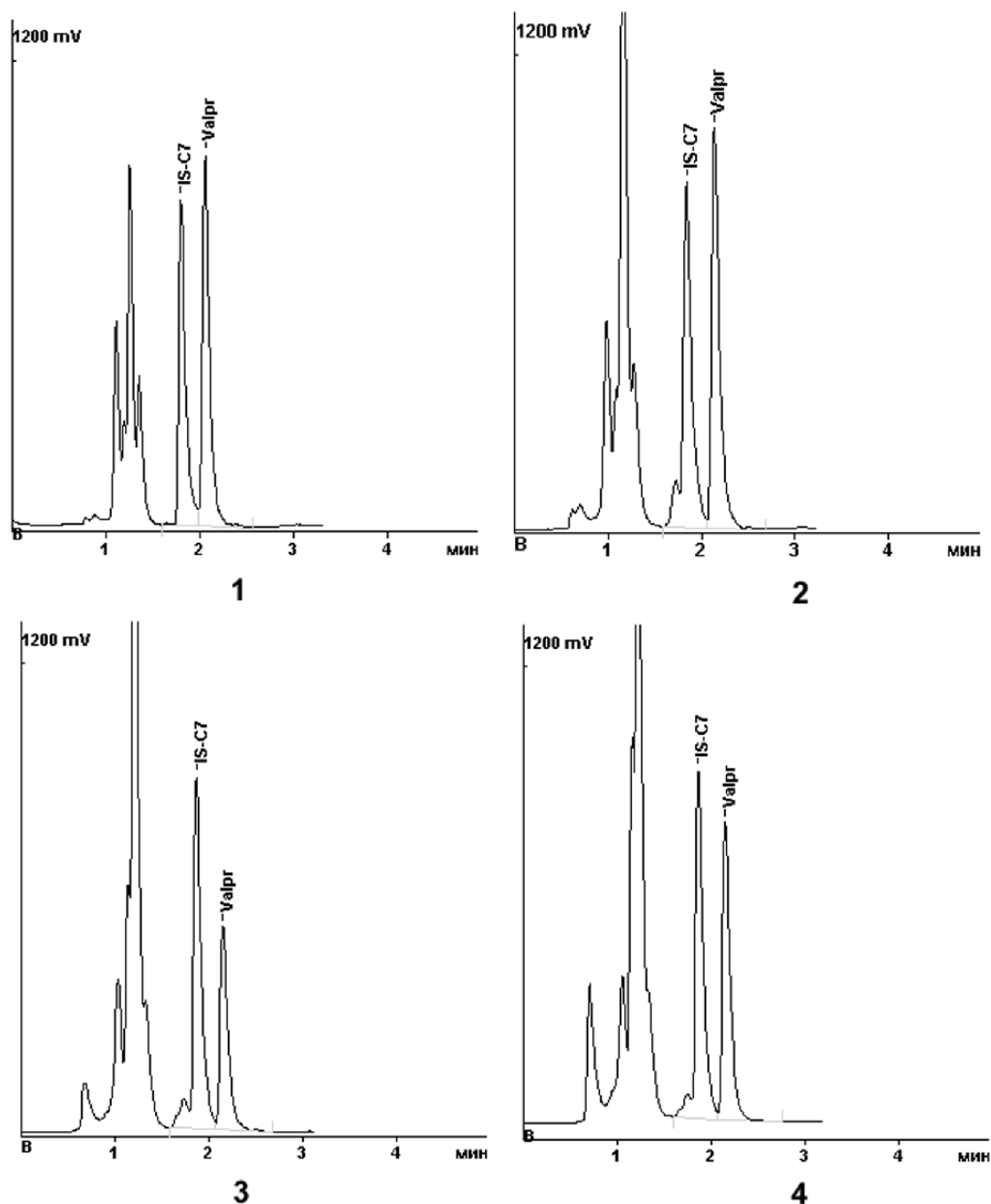


Рисунок.

Хроматограммы стандартов 500 нг (IS-C7) и 1000 нг вальпроата (Valpr) неэкстрагированных (1) и экстрагированных (2), а также экстрактов сыворотки пациентов, получающих 750 и 1500 мг вальпроата в сутки (3 и 4, соответственно). Объем микроинъекции 5 мкл.

Хроматографические условия в тексте. Выход (экстракция + дериватизация) экстрагированных стандартов 104% (IS) и 106% (вальпроат). Концентрация вальпроата в плазме/сыворотке 100,2 мкг/мл (экстракция 103%) и 148 мкг/мл (экстракция 101%) – хроматограммы 3 и 4, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зенков Л.Р.* (2000) Русский медицинский журнал, **8**(10), 411-417.
2. *Pohlmann-Eden B., Beghi E., Camfield C., Camfield P.* (2006) BMJ, **332**, 339-342
3. *Дутов А.А., Летунов В.И., Никитин Д.А., Дуйсебеков М.М.* (2005) Клиническая фармакокинетика, **1**(2), 34-37.
4. *Даванков В.А., Цюрупа М.П., Пастухов А.В., Маслова Л.А., Ильин М.М., Павлова Л.А., Андреева А.И., Тарабаева О.Г.* (1997) Природа, **10**, 51-54.
5. *Davankov V., Tsyurupa M., Ilyin M., Pavlova L.* (2002) J. Chromatogr. A, **965**, 65-73.
6. *Davankov V.A., Tsyurupa M.P.* (2010) Hypercrosslinked Polymeric Networks and Adsorbing Materials, Synthesis, Structure, Properties and Application, Elsevier, 648 p.
7. *Lynn G., Hellwig L.C.* (1998) Handbook of derivatization reactions for HPLC. John Wiley & Sons, Inc., – 1795 p.
8. *Peng G.M.* (1990) J. Chromatogr. – Biomed. Appl., **96**, 3-50.
9. Waters. Chromatography Columns and Supplies Catalog, 2004–2005 (www.waters.com и www.waters.ru).

Поступила: 20. 11. 2012.

MODIFIED HPLC METHOD OF DETERMINATION OF THE VALPROIC ACID IN BIOLOGICAL FLUIDS

A.A. Dutov¹, D.A. Nikitin², V.I. Letunov², P.P. Tereshkov¹, O.N. Kononova²

¹Chita State Medical Academy, Chita, ul. Gorkogo, 39a, 672090 Russia;
tel.(fax): 8-3022-32-30-58; e-mail: dutovaa@yandex.ru

²Trans-Baikal State University, Chita, Russia

Proposed modified HPLC method for determination of valproic acid in biological fluids. Created solid-phase extraction of valproic and heptanoic acids (internal standard, IS) on the cartridges packed hyper cross-linked polystyrene which maintain some tens extractions without losses of efficiency. Carboxylic acids are derivative with 1-(bromoacetyl)pyrene in acetone at presence of triethylamine. Chromatographic separation of derivatives is performed on Chromolith Performance RP-18e columns, which packed unique monolithic sorbent. UV detection at 360 nm. Mobile phase acetonitrile – water (90:10, v/v) plus 1% isopropanol, speed flow 2000 microL/min, pressure 21 bar. Complete chromatographic cycle less than 3 minutes. Yield of IS and valproic acid (extraction plus derivatization) was 101-106%. Sensitivity (limit detection) was near 1 ng for valproic and near 0.6 ng for heptanoic acid during signal/noise ratio = 3.

Key words: HPLC, valproic acid, SPE, hyper cross-linked polystyrene, derivatization, 1-(bromoacetyl)pyrene, Chromolith Performance.