



УДК 543.54

Определение вальпроевой кислоты в сыворотке крови методами ионной хроматографии и капиллярного электрофореза

Никитина Т.Г.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Адамсон В.Г.

ООО «Люмэкс-Маркетинг», Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 11.02.2011 г.

Аннотация

Предложены методики определения вальпроевой кислоты в сыворотке крови методами ионной хроматографии и капиллярного электрофореза после ее экстракционного выделения из биопроб. Установлено, что использование метода капиллярного электрофореза позволяет повысить экспрессность и чувствительность определения вальпроевой кислоты по сравнению с методом ионной хроматографии. Методики были апробированы при анализе реальных проб сыворотки крови пациентов Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова и Института мозга (Санкт-Петербург).

Ключевые слова: ионная хроматография, капиллярный электрофорез, вальпроевая кислота, сыворотка крови.

Ion chromatographic and capillary electrophoresis methods were developed for the determination of valproic acid in serum after solvent extraction from serum. It was established that capillary electrophoresis allows to increase the expressivity and sensitivity of valproic acid determination in comparison with ion chromatography. Proposed methods have been applied to analysis of real samples of patient's sera from Military-Medical academy and Institute of cerebral (Saint Petersburg).

Key words: ion chromatography, capillary electrophoresis, valproic acid, serum

Введение

Вальпроевая (дипропилуксусная) кислота (ВК) является одним из широко применяемых антиэпилептических препаратов. Постоянный мониторинг уровня ВК в крови необходим для контроля терапевтической и токсической концентрации на различных этапах лечения больных эпилепсией. За рубежом определение ВК осуществляют методами газовой хроматографии [1-4] и высокоэффективной жидкостной хроматографии [5,6], как правило, после ее экстракционного выделения из биопроб, дериватизации и удаления органического растворителя. При этом длительность стадии пробоподготовки составляет 40-60 мин., и часто сопровождается потерями ВК. Существенно сократить стадию пробоподготовки

позволяют прямые (без дериватизации) методы определения ВК, требующие применения дорогостоящих методов анализа в сочетании с масс-спектрометрией [7]. Поскольку ВК является карбоновой кислотой принципиально возможно ее определение в форме вальпроат-иона методами ионной хроматографии (ИХ) и капиллярного электрофореза (КЭ). Цель настоящей работы – предложить схему определения ВК в сыворотке крови человека с использованием методов ионной хроматографии и капиллярного электрофореза после ее предварительного экстракционного выделения.

Эксперимент

Реагенты. ВК была получена от Gerot Pharmazeutika (Вена, Австрия), все остальные реактивы имели квалификацию не ниже ч.д.а. Рабочие растворы ВК и реагентов готовили на дистиллированной воде. Образцы сыворотки крови были предоставлены Военно-Медицинской академией им. С.М. Кирова и Институтом мозга (Санкт-Петербург). Модельные пробы сыворотки крови с добавками ВК готовили на сыворотке крови пациентов, не принимающих антиконвульсанты, и использовали их при построении градуировочных графиков методик определения вальпроевой кислоты методами ИХ и КЭ. В качестве экстрагента использовали перегнанный гексан ($T_{\text{кип}} = 68-69\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Пробоподготовка. Предварительная подготовка образцов крови проводилась следующим образом: в центрифужную пробирку помещали 5 мл крови и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут. Отбирали по 1 мл сыворотки в два эпендорфа. Первый использовали для проведения экстракции, а второй замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для экстракции ВК из сыворотки крови 500 мкл анализируемой сыворотки помещали в стеклянную пробирку, добавляли 50 мкл 6 М HCl и 2,0 мл гексана. Встряхивали на автоматическом вибраторе в течение 5 мин. Отбирали 1,8 мл органической фазы в сухую пробирку и извлекали ВК в 0,5 мл водного раствора с $\text{pH} > 8$, встряхивая на автоматическом вибраторе в течение 2 мин. Состав раствора для реэкстракции зависел от метода конечного определения.

Определение вальпроат-ионов в водных пробах. Анализы проводили на ионном хроматографе «Цвет-3006» с кондуктометрическим детектором. Разделительную колонку (50 x 6 мм), заполняли анионитом ХИКС-1 (емкость – $0,03 \pm 0,01$ мг-экв/г; размер частиц сорбента – 25-40 мкм), подавительную колонку (200 x 6 мм) для выполнения анализов в варианте двухколоночной ИХ – катионитом Finex CS16G- H^+ (емкость $1,5 \pm 0,1$ мг-экв/г; размер частиц сорбента – 0,1-0,2 мм). В качестве элюентов использовали водные растворы гидроксида натрия, карбоната натрия, хлорида натрия, сульфата натрия, иодида калия, скорость подачи элюента – 1,5 мл/мин. Объем дозирующей петли – 50 мкл. Хроматограммы регистрировали с помощью самописца КСП-4, множитель шкалы 4.

Эксперименты по капиллярному электрофорезу проводили на приборе «Капель-103Р» (ООО «Люмэкс», Санкт-Петербург) с фотометрическим детектором (длина волны - 254 нм) и немодифицированным кварцевым капилляром длиной 60 см (длина капилляра от анода до детектора, $l_{\text{эфф}} = 50,5$ см) с внутренним диаметром 75 мкм (Polymicro, USA). Рабочее напряжение составляло +25 кВ. Ввод пробы осуществляли с анода давлением 30 мбар в течение 10 с. Регистрацию электрофореграмм и расчеты по ним проводили с помощью программы «МультиХром» для Windows (ЗАО Амперсенд).

Результаты и их обсуждение

Применение методов ИХ и КЭ предполагает переводение ВК из сыворотки крови в водные растворы в форме вальпроат-ионов. Согласно литературным данным жидкостная экстракция является наиболее широко используемым методом извлечения ВК из биопроб. Экстракция ВК количественна при обработке подкисленной до $\text{pH} < 2$ (что достигается добавлением HCl) пробы объемом 0,1-0,5 мл последовательно двумя порциями по 1,0 мл органического растворителя (гексана, хлороформа, этилацетата в гексане) [8]. Наилучшая селективность извлечения ВК из сыворотки наблюдается при экстракции в гексан, который был использован нами в последующих экспериментах. Ре-экстракцию ВК из фазы гексана в водный раствор осуществляли путем добавления к полученному экстракту 0,5 мл раствора с $\text{pH} > 8$, состав которого зависел от метода конечного определения.

Определение вальпроат-ионов в водных растворах.

Ионохроматографическое определение вальпроат-ионов. В предварительных экспериментах нами были оптимизированы условия ИХ и КЭ определения вальпроат-ионов. Определение анионов слабых органических кислот в водных растворах методом ИХ возможно в двухколоночном (Д-ИХ) и одноколоночном (О-ИХ) вариантах с гидроксидными или карбонатными элюентами [9,10]. В результате проведенных исследований, посвященных сравнению возможностей различных вариантов ИХ, было установлено, что для определения вальпроат-иона предпочтительнее использовать О-ИХ (табл. 1). Известно, что аналитический сигнал при кондуктометрическом детектировании в ИХ зависит не только от концентрации аналита в пробе, но и разницы значений предельных электропроводностей определяемого аниона и элюента ($\lambda^{\circ}_{\text{ан}} - \lambda^{\circ}_{\text{эл}}$). Точное значение λ° для вальпроат-иона неизвестно, но исходя из данных по λ° анионов короткоцепочечных карбоновых кислот, оно не превышает $34 \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{экв}^{-1}$. Наибольшая чувствительность могла бы быть достигнута при использовании в качестве элюента растворов гидроксида натрия ($\lambda^{\circ}_{\text{ОН}} = 198 \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{экв}^{-1}$), однако время анализа составляет ~ 40 мин. Увеличение концентрации NaOH в элюенте сопровождается увеличением шумов детектора и затрудняет количественное определение вальпроат-ионов. Поэтому в качестве элюентов были использованы растворы неорганических солей, у анионов которых значение λ° находится в диапазоне $76-80 \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{экв}^{-1}$. Было установлено, что элюирующая сила растворов NaCl мала для эффективного элюирования вальпроат-ионов, тогда как Na_2SO_4 элюирует ВА в непосредственной близости от системного пика. Анионы, имеющие достаточно длинный углеводородный радикал, удерживаются на анионитах не только по ионообменному механизму, но и за счет гидрофобных взаимодействий с матрицей ионообменника. Поэтому наилучшим элюентом для ВА можно считать иодид-ионы вследствие их собственной высокой гидрофобности. Для дальнейших экспериментов в качестве элюента был выбран 0,8 мМ раствор KI , обеспечивающий максимальную эффективность анализа.

Извлечение ВК из органической фазы при ионохроматографическом определении вальпроат-иона осуществляли в 0,01 М раствор NaOH . Было установлено, что избыточное содержание гидроксид-ионов в анализируемой пробе приводит к появлению широкого системного пика и изменению времени удерживания вальпроат-ионов. Для устранения мешающего влияния гидроксид-ионов перед вводом пробы в дозирующую петлю ионного хроматографа к раствору добавляли $0,020 \pm 0,002$ г сильнокислотного катионита Finex CS16G- H^+ в H^+ -форме, что позволяло уменьшить pH пробы до 7. Типичная хроматограмма определения вальпроат-иона представлена на рис.1.

Таблица 1. Основные параметры удерживания вальпроат-иона (ВА) на сорбенте ХИКС-1 в двухколоночном и одноколоночном вариантах ИХ

Элюент		Время удерживания, t, мин		R _S	N
		сист.	ВА		
1,0 мМ Na ₂ CO ₃	Д-ИХ	2.5	3.1	< 0.5	1250±100
1,0 мМ NaOH	Д-ИХ	2.5	43	3.6	1100±100
1,0 мМ NaOH	О-ИХ	1.5	35	3.6	1200±100
1,0 мМ NaCl	О-ИХ	1.5	30	3.8	1300±100
1,0 мМ Na ₂ SO ₄	О-ИХ	1.5	5.5	1.7	1100±100
1,0 мМ KI	О-ИХ	1.5	9.5	3.0	1500±130
0,8 мМ KI	О-ИХ	1.5	12.5	4.1	1600±150
0,5 мМ KI	О-ИХ	1.5	15.0	4.3	1550±150
0,25 мМ KI	О-ИХ	1.5	20.0	4.6	1400±130

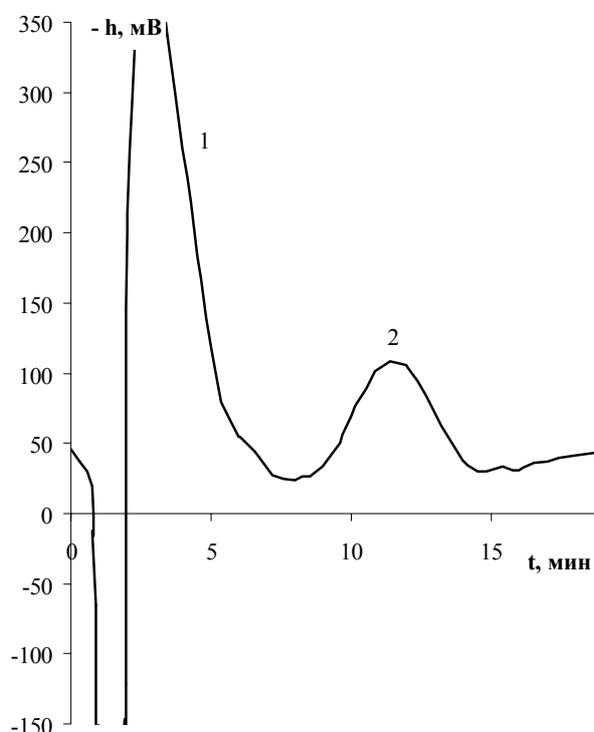


Рис. 1. Хроматограмма водной пробы, полученной после пробоподготовки сыворотки крови, содержащей 100 мг/л вальпроевой кислоты. 1 – системный пик, 2 – вальпроат-ион

При выбранных экспериментальных условиях градуировочный график определения ВК в модельной сыворотке крови линеен в диапазоне концентраций 20-300 мг/л ($h=0,04+0,21 \cdot C_{\text{ВА}}$, $n=10$, $R=0,998$), предел обнаружения, рассчитанный по 3S-критерию, составляет 10 мг/л. Время ионохроматографического определения – 15 мин, время стадии пробоподготовки -10 мин.

Электрофоретическое определение вальпроат-ионов. Определение анионов методом капиллярного электрофореза, как правило, проводят в рабочих буферных растворах с $\text{pH} > 8$. При использовании косвенного фотометрического детектирования буферный раствор содержит поглощающие в УФ-области спектра анионы, и

катионные поверхностно-активные вещества (КПАВ), изменяющие заряд поверхности кварцевого капилляра и обращающие направление электроосмотического потока (ЭОП). В этом случае направления миграции анионов и ЭОП совпадают. В качестве поглощающего аниона наиболее широко используются хромат- и фталат-ионы, в качестве КПАВ – гидроксид цетилтриметиламмония [11,12]. Электрофоретическая подвижность анионов карбоновых кислот уменьшается с увеличением числа углеродных атомов в молекуле, поэтому время определения анионов карбоновых кислот с числом атомов углерода > 5 составляет 15-20 мин. В настоящей работе была изучена возможность осуществления анализа без добавления КПАВ в рабочий буферный раствор и обращения ЭОП. Общая электрофоретическая подвижность аниона определяется по формуле:

$$\mu_{\text{общ}} = \mu_{\text{эф}} + \mu_{\text{ЭОП}},$$

где $\mu_{\text{общ}}$ – общая подвижность аниона, $\mu_{\text{эф}}$ – электрофоретическая подвижность аниона, $\mu_{\text{ЭОП}}$ – подвижность ЭОП [13].

Если выполняется условие $|\mu_{\text{эф}}| < |\mu_{\text{ЭОП}}|$, то пик аниона появится на электрофореграмме после выхода системного пика, обусловленного вводом пробы и соответствующего величине ЭОП. При чем, чем больше подвижность ЭОП, тем больше $\mu_{\text{общ}}$ и меньше время миграции аниона до детектора. Подвижность ЭОП при постоянном напряжении определяется концентрацией рабочего буферного раствора и его рН. Необходимо отметить, что согласно литературным данным, при определении анионов методом КЭ существенен выбор присутствующего в буферном растворе катиона. На примере определения неорганических анионов с обращением ЭОП, показано, что растворы, содержащие хромат-ион и амины в диапазоне рН близком к pK_a амина, обеспечивают наибольшую воспроизводимость времен миграции анионов и, как следствие, результатов анализа, по сравнению с растворами, содержащими катионы щелочных металлов [14]. В настоящей работе нами был использован буферный раствор хромата аммония с $pH=9,25$ ($pK_a^{\text{аммиака}} = 9,2$). При выборе оптимальных условий определения вальпроат-ионов было изучено влияние концентрации буферного раствора на эффективность и время анализа. Полученные результаты представлены на рис. 2 и в табл. 2. Увеличение концентрации рабочего буферного раствора приводит к уменьшению ЭОП и увеличению времени миграции системного пика и пика вальпроат-ионов, но сопровождается повышением эффективности анализа. Кроме того, пропорционально увеличению концентрации рабочего буферного раствора растет величина тока в капилляре. Поэтому, в качестве оптимального был выбран буферный раствор с концентрацией хромата аммония 8,0 мМ. Раствор такого состава можно использовать и на стадии извлечения ВК из экстракта в водную фазу вследствие высокого значения рН.

Было установлено, что при выбранных условиях определения ВК градуировочный график линеен в диапазоне концентраций 10 – 130 мг/л ($h = 0,056 + 0,0085 \cdot C_{\text{ВА}}$, $n=6$, $R = 0,999$) при вводе пробы давлением 30 мбар в течение 10 с, предел обнаружения – 5 мг/л.

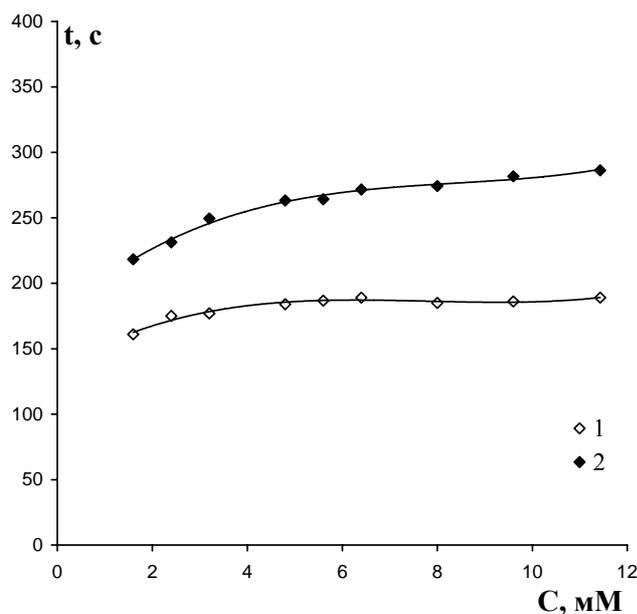


Рис. 2. Влияние концентрации рабочего буферного раствора на времена миграции системного пика и пика вальпроат-ионов
 $pH = 9,25$; рабочее напряжение $+25$ кВ, ввод пробы 30 мбар $\cdot 10$ с,
 Концентрация вальпроат-иона в пробе – 100 мг/л.
 1 – системный пик, 2- вальпроат-ион.

Таблица 2. Влияние состава буферного раствора на основные характеристики определения ВА методом капиллярного электрофореза ($n=4$, $P=0,95$; $S_r=0,03$)

Концентрация буферного раствора, C, мМ	Ток, I, мкА	Электрофоретическая подвижность		$N = 16 \frac{100}{l_{эфф}} \left(\frac{t_{BA}}{w_{BA}} \right)^2$	Асимметрия пика вальпроат-иона, α
		$\mu_{ЭОП}$, $см^2/кВ\cdot с$	$\mu_{общ}$ (ВА), $см^2/кВ\cdot с$		
11.4	145	0.640	0.360	52000	0.09
9.6	120	0.642	0.380	35000	0.10
8.0	100	0.649	0.383	30000	0.19
6.4	80	0.652	0.392	22000	0.21
5.6	72	0.655	0.396	17000	0.34
4.8	63	0.659	0.403	15200	0.31
3.2	40	0.680	0.440	4500	0.35
2.4	30	0.705	0.470	3700	0.41
1.6	20	0.750	0.515	3500	0.45

Время анализа не превышает 10 мин, включая стадию промывки капилляра после каждого анализа рабочим буферным раствором – 3 мин (Рис. 3).

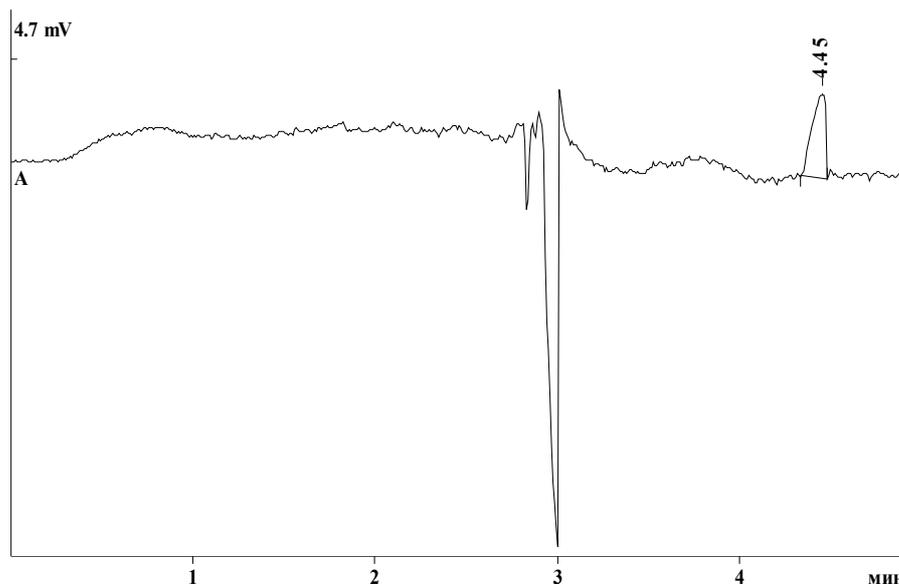


Рис. 3. Типичная электрофореграмма определения вальпроат-ионов в сыворотке крови. Концентрация вальпроат-иона в пробе – 100 мг/л. Время миграции вальпроат-иона – 4,45 мин

Правильность предлагаемых методик определения ВК была подтверждена методом введено-найдено (табл. 3).

Таблица 3. Проверка правильности методики определения ВК в модельных пробах. ($p=0,95$; $n=5$; $t_{\text{табл}} = 2,78$)

Проба	Введено ВК, C^0 , мг/л	Найдено ВК, C^H , мг/л (S_r)		$t_{\text{расч}} = \frac{ C^0 - C^H }{S} \cdot \sqrt{n}$	
		ИХ	КЭ	ИХ	КЭ
Водный раствор	25.0	24.1 (0.08)	25.3 (0.05)	1.04	0.54
Сыворотка крови	25.0	26.0 (0.11)	25.5 (0.07)	0.78	0.63
Водный раствор	50.0	48.6 (0.06)	51.2 (0.07)	1.07	0.75
Сыворотка крови	50.0	51.6 (0.08)	48.7 (0.06)	0.87	0.99
Водный раствор	100.0	104.5 (0.05)	102.7 (0.04)	1.93	1.47
Сыворотка крови	100.0	97.5 (0.06)	103.2 (0.05)	0.96	1.40

Показано, что систематические погрешности незначимы на фоне случайных погрешностей для обоих рассматриваемых методов. В табл. 4 представлены результаты определения ВК в сыворотке крови пациентов Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова и Института мозга, расчет концентраций производился по методу одного эталона (концентрации ВК в эталоне – модельной пробе сыворотке крови - 100 мг/л).

В результате проведенных исследований можно сделать вывод, что методика определения ВК методом капиллярного электрофореза характеризуется большей экспрессностью и чувствительностью анализа по сравнению с методикой ионохроматографического определения и может применяться для контроля содержания ВК в сыворотке крови и проведении фармакокинетических исследований.

Таблица 4. Определение ВК в сыворотке крови пациентов ($p=0,95$; $n=3$)

№	Найдено ВК, C_n , мг/л	
	ИХ	КЭ
1	96 ± 6	98 ± 3
2	114 ± 7	112 ± 4
3	35 ± 3	37 ± 2
4	50 ± 4	48 ± 2
5	23 ± 3	26 ± 2

Список литературы

1. Darius J., Meyer F.P. Sensitive capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for the therapeutic drug monitoring of valproic acid and seven of its metabolites in human serum application of the assay for a group of pediatric epileptics // J. Chrom. B. 1994. V. 656. P.343-347.
2. Yu D., Gordon J.D., Zheng J., Panesar S.K., Rurak D.W., Riggs K. W., Abbott F. S. Determination of valproic acid and its metabolites using gas chromatography with mass-selective detection: application to serum and urine samples from sheep. // J. Chrom. B. 1995. V. 666. P. 269-275.
3. Darius J. On-column gas chromatographic-mass spectrometric assay for metabolic profiling of valproate in brain tissue and serum // J. Chrom. B. 1996. V. 682. P. 67-75.
4. Dills R.L., Shen D.D. Methods to reduce background interferences in electron-capture gas chromatographic analysis of valproic acid and its unsaturated metabolites after derivatization with pentafluorobenzil bromide // J. Chrom. B. 1997. V. 690. P. 139-152.
5. 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. Chrom. 1984. V. 310. P. 450-454.
6. Дутов А.А., Летунов В.И., Никитин Д.А., Дуйсебеков М.М. Определение вальпроевой кислоты в биологических жидкостях методом ВЭЖХ с УФ детекцией и предколоночной дериватизацией феноцил бромидом // Клиническая фармакокинетика. 2005. вып.1. С. 34-37.
7. Mino T., Nakajima M., Wakabayashi H., Yamato S., Shimada K. Determination of Valproic Acid in Serum by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry // Anal. Sci. 2001. V. 17. P. 999-1001.
8. Abbott F.S., Kassam J., Acheampong A., Ferguson S., Panesar S., Burton R., Farrell K., Orr J. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of valproic acid metabolites in serum and urine using tert.-butyldimethylsilyl derivatives // J. Chrom. 1986. V. 375. P. 285-298.
9. Шпигун О.А., Золотов Ю.А. Ионная хроматография и ее применение в анализе вод. М. 1990. 199 С.

-
10. Fritz J.S., Gjerde D.T. Ion chromatography. New York, USA: Wiley-VCH. 2000. 254 P.
 11. Fritz J.S. Recent developments in the separation of inorganic and small organic ions by capillary electrophoresis // J. Chrom. A. 2000. V. 884. P. 261-275.
 12. Mayer B.X. How to increase precision in capillary electrophoresis // J. Chrom. A. 2001. V.907. P. 21-37.
 13. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». Санкт-Петербург. 2006. 210 С.
 14. Doble P., Andersson P. Buffered chromate electrolytes for the separation and indirect absorbance detection of inorganic anions in capillary electrophoresis // Anal. Comm. 1997. V. 34. P. 351-353.
-

Никитина Татьяна Георгиевна – к.х.н., доцент кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, тел.: (812)543-06-82

Адамсон Вера Георгиевна – инженер, ООО «Люмэкс-Маркетинг», Санкт-Петербург

Nikitina Tatiana G. – Dr.Sci.Chem., docent of analytical chemistry department of chemical faculty, Saint-Petersburg state university, Saint-Petersburg, e-mail: tgn200@yandex.ru

Adamson Vera G. – Engineer, Lumex-marketing Ltd Saint-Petersburg