

УДК 543.42.062:535.24:615.214.24:547:821

ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛЬПРОЄВОЇ КИСЛОТИ У КРОВІ МЕТОДОМ РЕАКЦІЙНОЇ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Г.П.Петюнін, Ісам Насер

Харківська медична академія післядипломної освіти,
61176, м. Харків, вул. Корчагінців, 58. E-mail: petyunin48@mail.ru

Ключові слова: вальпроєва кислота; реакційна ВЕРХ; токсикологічне визначення

Здійснена взаємодія вальпроєвої кислоти з 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарином і розроблено її визначення у крові методом реакційної вискоефективної рідинної хроматографії. Вивчений вплив різних методів депротеїнізації на вивільнення вальпроєвої кислоти та оптимізовані умови пробопідготовки.

DETERMINATION OF THE VALPROIC ACID IN BLOOD BY THE REACTION HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

G.P.Petyunin, Isam Naser

The interaction of the valproic acid with 3-(2'-bromoacetyl)-7-methoxycoumarin has been carried out and its determination in blood by the reaction high performance liquid chromatography method has been developed. The influence of various methods of deproteinization on the yields of the valproic acid has been studied and the conditions of the sample preparing has been optimized.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ МЕТОДОМ РЕАКЦИОННОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Г.П.Петюнин, Исам Насер

Осуществлено взаимодействие вальпроевой кислоты с 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарином и разработано ее определение в крови методом реакционной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Изучено влияние различных методов депротеинизации на выходы вальпроевой кислоты и оптимизированы условия пробоподготовки.

Вальпроєва кислота є одним з найважливіших протиепілептичних засобів, що знаходить широке застосування у медичній практиці [1, 2]. Для терапевтичного моніторингу запропоновано декілька методів її визначення у крові [3-10]. Однак, судово-токсикологічне визначення має свої особливості, обумовлені морфологією трупної крові, що потребує вивчення методів пробопідготовки. Так, на вихід речовин великий вплив має метод депротеїнізації. Окрім того, пряме визначення вальпроєвої кислоти методом вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) неможливе.

Тому було цікаво розробити методику реакційної ВЕРХ, що допускає використання спектрофотометричного і флуориметричного детекторів.

У зв'язку з вищевикладеним мета даної роботи полягала у вивченні варіантів пробопідготовки крові, включаючи вибір умов депротеїнізації, пошук оптимальних умов взаємодії вальпроєвої кислоти з 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарином і розробку на основі отриманих даних методики визначення вальпроєвої кислоти у крові методом ВЕРХ.

Проведене попереднє дослідження методом газорідинної хроматографії (ГРХ) показало, що ви-

вільнення вальпроєвої кислоти з крові залежить від типу речовини, яка використовувалась для депротеїнізації проби (табл. 1).

Найкращі результати були отримані при використанні ацетонітрилу, що слід вважати позитивним моментом, враховуючи подальше застосування ВЕРХ у якості кінцевої аналітичної операції. Інші осаджувачі призводили до значних втрат вальпроєвої кислоти при депротеїнізації.

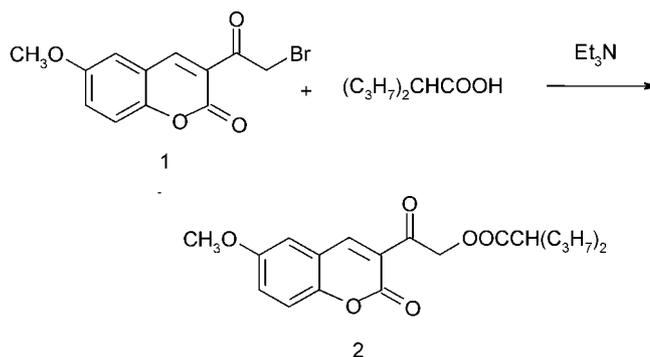
Як реагент для дериватизації вальпроєвої кислоти був використаний люб'язно наданий кафедрою органічної хімії НФаУ 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарин (1) [11]. Взаємодія останнього з вальпроєвою кислотою у присутності триетиламіну приводить до утворення відповідного ефіру вальпроєвої кислоти (2) (схема).

Вивчення умов взаємодії, а також продуктів реакції проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ). При хроматографуванні реакційних сумішей було виявлено по 2 добре розділених та флуоресціюючих при УФ-світлі плями: перші жовтого кольору, які відповідають реагенту -3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарину (1); інші жовто-зеленого кольору, що відповідають продукту його взаємодії з вальпроєвою кислотою (2) (табл. 2).

Таблиця 1

Результати визначення вальпроєвої кислоти методом ГРХ після її ізолювання з крові різними методами

Осаджувач білка	Введено, мг	Знайдено, мг	Вихід, %
1М розчин трихлороцтової кислоти	3,5	0,084	2,4
Фосфорно-вольфрамова кислота	3,5	0,935	26,9
Етанол	3,5	1,078	30,8
Ацетонітрил	3,5	2,231	63,7
10% розчин хлорводневої кислоти	3,5	0,118	3,4



Схема

Експериментально отримані результати залежності відгуків кумаринового похідного вальпроєвої кислоти за площами піків від концентрації вальпроєвої кислоти наведені в табл. 4.

При цьому методом лінійного регресійного аналізу (методом найменших квадратів) було одержано лінійну залежність в усьому діапазоні концентрацій, що вивчались, виражену рівнянням:

$$S = a + bC,$$

де: $a = 0,1037$;
 $b = 0,1329$ ($r = 0,9989$; $S_y = 0,2298$)

$$C = (S - 0,1037) / 0,1329, \quad (1)$$

де: C — концентрація (мкг/мл);
 S — площа піку.

Лінійність побудованого графіка спостерігається в інтервалі концентрацій вальпроєвої кислоти у крові від 10 до 1000 мкг/мл, відносна помилка середнього результату — $\pm 2,35\%$. Метод був визначений з межею чутливості 1 мкг/мл у крові.

Експериментальна частина

Підготовка крові до експерименту. До 200,0 г трупної крові додавали 0,1400 г вальпроєвої кислоти, ретельно перемішували і поміщали на добу до холодильника.

Ізолювання вальпроєвої кислоти із крові. Підготовану кров (5 мл) вмішували у центрифужну пробірку і для висадження білків додавали 5 мл ацетонітрилу (або насиченого розчину фосфорно-вольфрамової кислоти, або 1 М розчину трихлороцтової кислоти, або 96% етанолу, або 10% роз-

Таблиця 3

Залежність оптичної густини розчину продукту взаємодії вальпроєвої кислоти з 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарином від температури та часу перебігу реакції

Т °С	Час, хв								
	Оптична густина, А								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
30	0,135	0,147	0,159	0,161	0,163	0,165	0,167	0,169	0,169
60	0,148	0,166	0,169	0,169	-	-	-	-	-

Таблиця 4

Результати кількісного аналізу вальпроєвої кислоти у розчинах методом ВЕРХ

Вміст вальпроєвої кислоти (мкг/мл)	Площа піку (середнє з трьох визначень)	Знайдено вальпроєвої кислоти		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
10	1,2559	8,667	86,67	$\bar{X}=99,92$ $SKO= 2,35\%$ $\Delta\bar{X}=6,04$ $S=5,750$ $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}=99,92\pm 6,04$
50	6,773	50,172	100,34	
100	13,746	102,630	102,63	
250	33,261	249,434	99,77	
500	66,359	498,445	99,69	
1000	133,122	1000,68	100,07	

чину хлороводневої кислоти). Вміст пробірки перемішували, залишали стояти на 10 хв і потім центрифугували протягом 5 хв при швидкості 5000 об/хв. Для очистки цільових компонентів від найбільш гідрофобних сполук (ліпідів) після відділення надосадової рідини проводили екстракцію гексаном. Для чого до надосадової рідини додавали гексан у співвідношенні 1:5 (за об'ємом), струшували протягом 5 хв, після розділення шарів верхній гексановий шар відкидали, а нижній вміщували у пробірку з позначкою і доводили до об'єму 5,0 мл і досліджували методом ГРХ для визначення виходу вальпроєвої кислоти. Операцію проводили тричі.

Окрім того, ізолювання вальпроєвої кислоти проводили з сухої суміші крові з натрію сульфатом за методами [12, 13]. В останньому випадку в якості екстрагентів застосовували 50 мл хлороформу, діетилового ефіру та етанолу. Після екстракції проби упарювали до об'єму 5,0 мл і досліджували також методом ГРХ.

Вивчення взаємодії вальпроєвої кислоти з 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарином. Розчини вальпроєвої кислоти і 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарину змішували у співвідношенні 1:1 і витримували у термостаті при температурі 30 або 60°C. Кожні 10 хв відбирали по 20 мкл реакційних розчинів і наносили на лінію старту пластинок Сорбфіл. Паралельно наносили 10 мкл розчину 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарину. Хроматографування проводили у трьох системах розчинників (табл. 2). Після хроматографування пластинки висушували і переглядали в УФ-світлі. Далі зони сорбенту з пластинок, що відповідають флуоресцюючим плямам отриманого ефіру вальпроєвої кислоти, зішкрібали, кількісно переносили у флакон, куди додавали 5,00 мл етанолу, ретельно струшували. Через 10 хв визначали оптичну густину одержаних розчинів при максимумі поглинання продукту реакції 296 нм на спектрофотометрі СФ-46. Залежність оптичної густини розчинів продукту реакції від температури і часу перебігу взаємодії надана у табл. 3.

Приготування розчинів для дослідження

1. Приготування розчину вальпроєвої кислоти. Наважку 0,1400 г вальпроєвої кислоти вміщували

до мірної колби місткістю 10,0 мл, розчиняли у 5 мл ацетонітрилу і доводили об'єм до позначки ацетонітрилом (концентрація розчину вальпроєвої кислоти складає 0,001 моль/л).

2. Приготування розчину 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарину. 0,329 г 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарину вміщували до мірної колби місткістю 10,0 мл, розчиняли у 5 мл ацетонітрилу, додавали 0,1160 г триетиламіну і доводили об'єм до позначки ацетонітрилом (концентрація розчину 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарину складає 0,0011 моль/л).

Умови проведення ВЕРХ. Дослідження проводили на рідинному хроматографі "Міліхром А-02" при наступних умовах: колонка 0,2x75 мм з оберненою фазою ProntoSIL-120-5-C18AQ і з розміром часток 5 мкм; елюенти: А-(0,2М LiClO₄ — 0,005М HClO₄), В — ацетонітрил; елюювання градієнтне від 5% В до 100% В за 40 хв. Швидкість рухомої фази — 100 мкл/хв. Температура термостату колонки — 40°C. УФ-детектування за довжини хвилі 300 нм.

Визначення вальпроєвої кислоти проводили методом встановлення градууювальної залежності відгуків кумаринового похідного вальпроєвої кислоти за площами піків від концентрації вальпроєвої кислоти.

Методика побудови градууювального графіка. До 1 мл відповідного градууювального розчину вальпроєвої кислоти додавали 1 мл розчину 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарину і витримували суміш у термостаті при 60°C протягом 30 хв. Потім 20 мкл суміші вводили у рідинний хроматограф (табл. 4).

Приготування розчинів вальпроєвої кислоти для градуювання з концентраціями 10; 50; 100; 250; 500; 1000 мкг/мл.

10 мг (точна наважка) вальпроєвої кислоти вміщували у мірну колбу місткістю 10,0 мл, розчиняли у ацетонітрилі і доводили до позначки ацетонітрилом (вихідний розчин).

0,1 мл; 0,5 мл; 1 мл; 2,5 мл; 5 мл вихідного розчину вміщували у мірні колби місткістю 10,0 мл і доводили до мітки ацетонітрилом.

Методика проведення визначення вальпроєвої кислоти у крові трупа методом ВЕРХ. 5 мл крові

вміщували у центрифужну пробірку, до неї додавали 5 мл ацетонітрилу. Вміст пробірки перемішували, залишали стояти на 10 хв, потім центрифугували протягом 5 хв при 5000 об/хв. Надосадову рідину вміщували у ділильну лійку, до неї додавали 25 мл гексану, струшували протягом 5 хв. Після розділення шарів нижній шар фільтрували і доводили ацетонітрилом до об'єму 5,0 мл. Верхній гексановий шар відкидали.

Потім відбирали 1 мл досліджуваного розчину, додавали 1 мл розчину 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарину і витримували суміш у термостаті при 60°C протягом 30 хв. Потім 20 мкл суміші вводили у хроматограф. За отриманими величинами S (площами піків ефірів вальпроєвої кисло-

ти) проводили відповідні розрахунки C (концентрації вальпроєвої кислоти у крові в мкг/мл) за формулою 1.

Коефіцієнт варіації (CV%) методики складає 10%.

Висновки

1. Вивчено методом ГРХ вплив різних депротейнізаторів на виходи вальпроєвої кислоти з трупної крові та оптимізовані умови прободіготовки.

2. Вивчено за допомогою методів ТШХ та УФ-спектроскопії умови взаємодії вальпроєвої кислоти з 3-(2'-бромацетил)-7-метоксикумарином.

3. Розроблено методику визначення вальпроєвої кислоти у трупній крові методом реакційної ВЕРХ.

Література

1. Zenkov L.P. // *Russ. med. zhurn.* — 2000. — №10. — С. 411-417.
2. Chez M.G., Hammer M.S., Loeffel M. et al. // *J. Child. Neurol.* — 2005. — №14. — P. 239-242.
3. Eva Olvecka // *Grant PRIF UK.* — 2002. — Vol. 5. — P. 277.
4. Manuela C., Monica B., Erica C. et al. // *J. Chromatogr. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* — 2003. — Vol. 15 (828). — P. 113-117.
5. Kishore P., Rajani K.V., Satyanarayana V. et al. // *Pharmacie.* — 2003. — Vol. 58 (6). — P. 378-380.
6. Ramakrishna N.V., Vishwottam K.N., Santosh M. et al. // *Analytical Toxicol.* — 2005. — Vol. 24, №8. — P. 685-690.
7. Speed D.J., Dickson S.J., Cairns E.R. et al. // *J. Mass. Spectrom.* — 2000. — Vol. 35, №6. — P. 698-704.
8. Lin W., Kelly A.R. // *Rapid commun. mass spectrum.* — 2005. — Vol. 19 (14). — P. 1970-1978.
9. Jorg Leis H., Windischhofer W., Rechberger G.N. et al. // *Analytical Biochemistry and Mass Spectrometry.* — 2002. — Vol. 24 (5). — P. 631-635.
10. Zhong Y., Jiao Z., Yu Y. // *Biomed. Chromatogr.* — 2006. — Vol. 20 (4). — P. 319-326.
11. Irina O. Zhuravel., Sergiy M. Kovalenko., Sergiy V. Vlasov and Valentin P. Chernykh // *Molecules.* — 2005. — №10. — P. 444-456.
12. Болотов В.В., Тернінко І.І. // *Фізіологічно активні речовини.* — 2002. — №2 (34). — С. 45-48.
13. Клисенко М.А., Калинина А.А., Новикова К.Ф. и др. *Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде.* — М.: Колос, 1992. — 567 с.

Надійшла до редакції 13.03.2006 р.