

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO VALPRÓICO EM SORO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD), APÓS DERIVATIZAÇÃO COM BROMETO DE FENACILA

Marina Venzon Antunes, Viviane Nagel e Rafael Linden*

Centro Universitário Feevale, Rodovia RS 239, 2755, 93352-000 Novo Hamburgo - RS, Brasil

Helenice Orosco Werlang e Daniela Hermes

Weinmann Laboratório, Rua Ramiro Barcelos 910/5, 90035-001 Porto Alegre - RS, Brasil

Recebido em 10/7/08; aceito em 12/12/08; publicado na web em 30/4/09

DETERMINATION OF VALPROIC ACID IN SERUM BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH DIODE ARRAY DETECTION (HPLC-DAD), AFTER DERIVATIZATION WITH PHENACYL BROMIDE. Valproic acid (VA) is a drug used to control seizures in several epileptic conditions. In VA pharmacotherapy, therapeutic drug monitoring is recommended to obtain adequate seizure control and avoid toxicity. The aim of this study was to validate a method for the determination of valproic acid in serum, employing high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD), after derivatization with phenacyl bromide. The calibration curve ($y=0.0133x-0.0025$) presented good linearity with $r^2=0.9999$. Accuracy (101-115%), intra-assay precision (4.53-8.15%) and inter-assay precision (3.15-6.77%) were acceptable. The quantification limit was 2.0 $\mu\text{g/mL}$. The method presented similar results to enzyme immunoassay.

Keywords: valproic acid; phenacyl bromide; HPLC-DAD.

INTRODUÇÃO

O ácido valpróico (ácido 2-propil-pentanóico) (AV) (Figura 1) é um ácido graxo de cadeia curta que apresenta ampla efetividade no controle de convulsões de variadas etiologias, especialmente na epilepsia idiopática generalizada.¹ Seu mecanismo de ação está associado à limitação dos disparos neuronais repetitivos, através do bloqueio dos canais de sódio e do aumento das concentrações de GABA no cérebro.^{1,2}

As concentrações de AV no soro apresentam ampla variabilidade interindividual e o monitoramento de suas concentrações plasmáticas é uma prática usual no manejo de pacientes com regimes de dosagem estáveis.³ Cerca de 50% dos pacientes apresentam resposta terapêutica adequada em concentrações séricas de 80 $\mu\text{g/mL}$.¹ Por outro lado, apenas 20% dos pacientes respondem adequadamente a concentrações na ordem de 50 $\mu\text{g/mL}$.¹ Efeitos tóxicos relevantes manifestam-se com maior frequência em concentrações séricas superiores a 200 $\mu\text{g/mL}$.^{1,3} A faixa terapêutica consensual para AV é de 50 a 100 $\mu\text{g/mL}$ em soro.^{1,3}

Diversos métodos foram publicados para a determinação de AV em soro. A cromatografia gasosa (CG), tanto com detectores por ionização em chama (DIC) ou seletivos de massas, tem sido empregada com procedimentos de derivatização do AV, incluindo metilação, sililação e fenacilação.⁴⁻⁶ Recentemente, Shahdousti *et al.*⁷ descreveram um método para determinação de AV em soro sem etapa de derivatização, empregando microextração em fase sólida associada à CG-DIC. O AV não possui cromóforos ou fluoróforos, sendo que sua determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também está associada à derivatização, tanto com a utilização de detectores fluorimétricos⁸ como espectrofotométricos,⁹ embora exista um relato recente da determinação de AV em soro por CLAE-UV sem esta etapa pré-analítica.¹⁰ Gupta *et al.*⁹ relataram a análise de derivados fenacilados de AV por CLAE, com resultados satisfatórios. Entretanto, os autores não apresentaram dados de validação, tampouco compararam o comportamento do método proposto frente aos imunoenaios enzimáticos, os quais são predominantemente uti-

lizados no monitoramento terapêutico de AV em ambientes clínicos, especialmente devido à sua facilidade operacional e possibilidade de completa automação. Entretanto, considerando que os imunoenaios têm sido utilizados apenas em laboratórios com elevada demanda, devido ao tempo de validade restrito dos reagentes imunoenzimáticos e aos seus custos de aquisição, é relevante a disponibilidade de métodos cromatográficos confiáveis para esta determinação. Além disto, a cromatografia é o método de escolha para as determinações dos demais anticonvulsivantes e a utilização da mesma infra-estrutura para a análise de AV representa uma alternativa interessante.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi validar um método de determinação de AV por CLAE empregando derivatização com brometo de fenacila e comparar o comportamento deste método em relação ao imunoenamo enzimático competitivo (IEC), com o propósito de disponibilizar uma alternativa para esta determinação em laboratórios que empregam a CLAE para outras análises de interesse clínico.

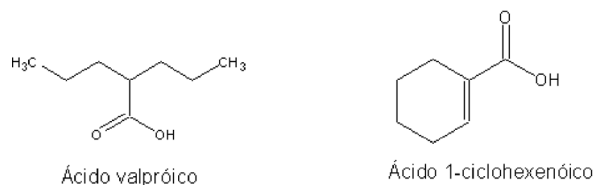


Figura 1. Estruturas químicas do ácido valpróico e do padrão interno ácido 1-ciclo-hexenóico

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e soluções

O ácido valpróico foi adquirido da United States Pharmacopeia (Rockville, Estados Unidos). O ácido 1-ciclo-hexenóico foi proveniente da Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). O brometo de fenacila foi proveniente da Fluka (Buchs, Suíça). Fosfato de sódio monobásico, ácido fosfórico

*e-mail: rafael.linden@feevale.br

e acetonitrila grau HPLC foram provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). Hexano grau HPLC e ácido sulfúrico foram provenientes da Mallinckrodt (Philipsburg, Estados Unidos). Água purificada foi obtida através de um sistema Elga Purelab Ultra da Elga Labwater (Lane End, Reino Unido). O *Antiepileptic Serum Calibration Standard* foi proveniente da Chromsystems (Munique, Alemanha). A solução de derivatização foi preparada através da diluição de 100 mg de brometo de fenacila em 10 mL de acetonitrila. A solução-mãe de ácido 1-ciclo-hexenóico foi preparada através da dissolução de 470 µL desta substância em 10 mL de acetonitrila. A solução de trabalho de ácido 1-ciclo-hexenóico (500 µg/mL), utilizada como padrão interno, foi preparada diluindo-se 100 µL da solução-mãe a 10 mL com acetonitrila.

Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Class VP (Kioto, Japão), composto de um sistema quaternário de bombas LC-10AT, módulo controlador SCL-10A, desgaseificador DGV-14A, forno de coluna CTO-10AS, auto-injetor SIL-10AF e detector de arranjo de diodos SPD-M10A. A coluna utilizada foi Shimpack CLC-ODS (150 X 4,6 mm, d.p. 5 µm) da Shimadzu (Kioto, Japão). O sistema de cromatografia foi controlado pelo programa Class VP 6.13 SP2, da Shimadzu.

Preparação da fase móvel e condições cromatográficas

A fase móvel foi preparada através da mistura de tampão fosfato pH 2,3 (50 mM) e acetonitrila (40:60, v/v). O tampão fosfato foi preparado através da dissolução de 6,66 g de fosfato de potássio monobásico em 900 mL de água purificada, seguida da adição de 4,8 g de ácido fosfórico 85% (v/v). O volume foi completado para 1000 mL com água purificada e o pH foi ajustado com a adição de ácido fosfórico ou hidróxido de potássio 0,1 M. Antes da utilização, o tampão foi filtrado através de membrana de acetato de celulose com poros de 0,45 µm (Sartorius, Alemanha) e desgaseificada em banho ultra-sônico por 5 min. O fluxo da fase móvel foi de 2,0 mL/min. A coluna foi mantida a 30 °C durante a análise. A detecção foi realizada a 246 nm, com a aquisição de espectros de varredura entre 200 e 380 nm.

Curva de calibração

As curvas de calibração foram obtidas através da adição de ácido valpróico em soro humano a fim de obter amostras com concentrações de 2, 5, 10, 25, 50, 75, 150 e 300 µg/mL. Para a construção da curva de calibração, foi utilizada a média de três determinações de cada calibrador. A curva de calibração foi construída através do estabelecimento da correlação entre a razão das áreas dos picos referentes aos derivados fenacilados do ácido valpróico e do padrão interno (y) e as concentrações de ácido valpróico adicionadas (x). A curva foi avaliada com base no coeficiente de determinação (r^2).

Coleta e conservação das amostras

Foram coletadas amostras de sangue de pacientes sob farmacoterapia com ácido valpróico (n = 66), imediatamente antes da primeira dose diária, em tubos de coleta com gel separador, para as análises de rotina. Logo após a coleta, o soro foi transferido para outro tubo e armazenado sob refrigeração a 4 °C até a análise.

Preparo das amostras

Uma alíquota de 250 µL de soro, em tubos com tampa rosca, foi adicionada de 50 µL da solução de trabalho de ácido 1-ciclo-

hexenóico (padrão interno), 250 µL de ácido sulfúrico 1 M e 2,2 mL de n-hexano. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 30 s e posteriormente centrifugada a 2.000 g por 10 min. Após isso, 2 mL da fase orgânica foram transferidos para tubo de evaporação e adicionados de 20 µL de trietilamina e 20 µL da solução de derivatização. A mistura resultante foi homogeneizada por 30 s em vórtex e transferida para bloco de aquecimento. Os tubos foram mantidos por 1 h a 50 °C, sob leve fluxo de ar, com a completa evaporação do solvente. O resíduo seco foi retomado com 200 µL de fase móvel. Uma alíquota de 25 µL foi injetada no sistema CLAE-DAD.

Avaliação da seletividade

Amostras de soro de 6 indivíduos não usuários de ácido valpróico foram processadas e avaliou-se a presença de picos interferentes. Considerando que usualmente o ácido valpróico é administrado conjuntamente com outros anticonvulsivantes, também foi avaliada a presença de picos nos tempos de retenção dos derivados fenacilados do ácido valpróico e do padrão interno em uma amostra do *Antiepileptic Serum Calibration Standard*, o qual contém concentrações terapêuticas de sultiame, etosuximida, primidona, lamotrigina, 10-hidróxi-carbamazepina, fenobarbital, carbamazepina-10,11-epóxido, oxcarbamazepina, fenitoína e carbamazepina.

Estabilidade

Amostras de soro adicionadas de ácido valpróico na concentração de 100 µg/mL foram preparadas e imediatamente armazenadas a 4 °C. Alíquotas destas amostras foram analisadas no dia da preparação e 2, 7 e 14 dias após. A estabilidade foi avaliada através da diferença percentual entre os valores obtidos no dia da preparação e os obtidos nos demais dias, calculados através da curva de calibração.

Ensaio de precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de análises de amostras calibradoras, preparadas em soro humano, contendo ácido valpróico nas concentrações 4, 40 e 200 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata e repetidas em 4 dias diferentes. As precisões intra-ensaios e inter-ensaios foram calculadas pela análise de variância (ANOVA), usando-se dia como variável agrupadora. A exatidão foi calculada como percentagem média obtida do valor teórico adicionado na amostra.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação de cada analito foram determinados a partir do cálculo da concentração de 3 e 10 vezes, respectivamente, a área do ruído da linha de base produzido pela matriz, de acordo com Shah *et al.*¹¹

Comparação entre os resultados obtidos por CLAE e imunoensaio

Além da determinação por CLAE, as amostras foram analisadas empregando-se IEC através de um sistema de automação Fusion, proveniente da Johnson & Johnson (New Brunswick, Estados Unidos), segundo procedimento estabelecido na rotina de um laboratório de análises clínicas de grande porte. Foram obtidas 66 concentrações de ácido valpróico em soro, por ambas as metodologias. Os resultados obtidos foram comparados através de gráfico de Bland-Altman e regressão de Passing-Bablok.

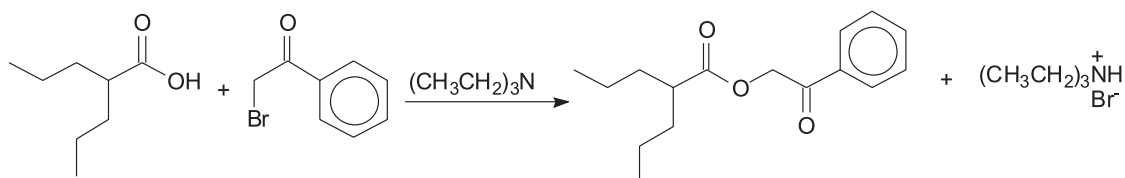


Figura 2. Reação de derivatização do ácido valpróico com brometo de fenacila, catalisada pela trietilamina

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta a reação entre o AV e o brometo de fenacila, catalisada pela trietilamina. Nesta reação, o AV atua como nucleófilo, substituindo o bromo do brometo de fenacila, com a participação da trietilamina facilitando a desprotonação do ácido bem como a retirada do bromo do derivatizante. O produto formado é solúvel em hexano.

Com as condições cromatográficas utilizadas foi possível obter uma separação adequada dos derivados fenacilados do ácido valpróico e do padrão interno dos demais compostos presentes nas amostras analisadas. O tempo total de análise cromatográfica foi de 9 min. O pico referente ao AV apresentou tempo de retenção médio de 7,4 min e o pico referente ao padrão interno apresentou tempo médio de retenção de 3,5 min. A Figura 3 apresenta cromatogramas típicos do método.

Em todas as análises, os picos referentes aos analitos foram avaliados com respeito à sua pureza espectral e similaridade com os espectros de absorção de referência, através de rotinas disponíveis no sistema CLAE-DAD, e não foram observados interferentes. Da mesma forma não foram observados picos nos tempos de retenção dos analitos em amostras de soro isentas de ácido valpróico e no *Antiepileptic Serum Calibration Standard*, demonstrando a seletividade do método mesmo quando outros anticonvulsivantes estão presentes na amostra. As concentrações de ácido valpróico mostraram-se estáveis quando as amostras de soro são mantidas em refrigeração, em um intervalo de até 14 dias, com diferenças entre os valores pré e pós-armazenamento inferiores a 5%.

Os dados de validação do método são apresentados na Tabela 1. A curva de calibração obtida apresentou linearidade adequada, com de r^2 de 0,9999. A precisão intra-ensaios esteve entre 4,53 e 8,15% e a precisão inter-ensaios esteve entre 3,15 e 6,77%, demonstrando a adequada repetibilidade do método. A exatidão foi determinada entre 101 e 115%, também dentro dos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos preconizados por Shah *et al.*⁸ Considerando o propósito da metodologia proposta neste estudo, focada no monitoramento terapêutico de pacientes usuários de AV, os limites de detecção e quantificação são bastante inferiores aos menores níveis terapêuticos.

A diferença média entre os valores obtidos por CLAE e IEC foi de 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Nas 66 determinações, apenas 1 apresentou valor fora da faixa de 2 desvios-padrão da média das diferenças entre os métodos (Figura 4). Os valores obtidos por CLAE (faixa de 34,1 a 143,5 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram, em média, 103% dos valores obtidos por IEC (faixa de 30,9 a 142,6 $\mu\text{g/mL}$). A relação entre os valores obtidos foi expressa pela equação $\text{CLAE} = 0,9178 \text{ IEC} + 7,1699$, com r^2 de 0,9263, denotando uma elevada proporcionalidade entre os valores. A correlação entre os dados não diverge da linearidade ($P > 0,10$). A análise da regressão, avaliando os intervalos de confiança da inclinação (0,8485-1,0079) e do intercepto (0,3017-11,8021), demonstra que os métodos não divergem por um valor constante e que existe uma pequena diferença proporcional entre os métodos. Através da representação gráfica da regressão de Passing-Bablok (Figura 5), observa-se que a diferença entre os métodos de determinação de AV está relacionada com as suas concentrações, embora não existam diferenças significativas entre os resultados. Quando comparadas com as concentrações obtidas por IEC, os valores obtidos por CLAE tendem a ser superiores nas concentra-

ções mais baixas de AV e inferiores em concentrações mais elevadas, conforme demonstrado pela interseção da reta obtida pela regressão com a linha da identidade, em 85 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5). Resultados semelhantes foram relatados por Braun *et al.*¹² e Kumps *et al.*¹³ e podem estar relacionados com a reatividade cruzada dos anticorpos do IEC com metabólitos de AV. Entretanto, apenas 5 valores apresentaram valores marginalmente fora do intervalo de confiança de 95%, caracterizando a comparabilidade entre os resultados obtidos.

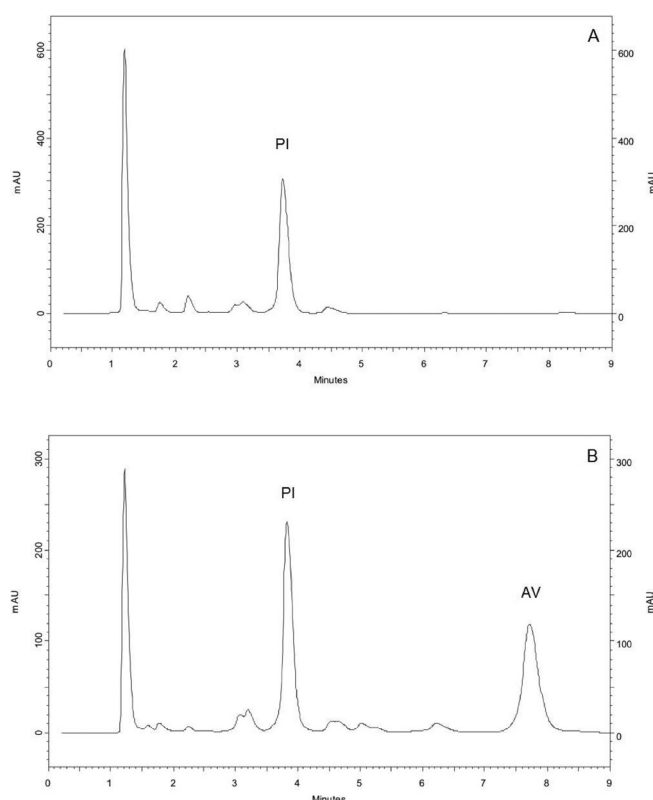


Figura 3. Separação cromatográfica obtida com monitoramento em 246 nm: (A) amostra de soro isenta de ácido valpróico, com padrão interno (PI); (B) amostra de soro de paciente em farmacoterapia com AV (61,9 $\mu\text{g/mL}$)

Tabela 1. Parâmetros de validação do método

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-dias (C.V. %)	Intra-dias (C.V. %)	Exatidão (%)
200,0	4,53	3,15	101
40,0	6,50	5,70	114
4,0	8,15	6,77	115
Equação regressão linear	r^2	LDD ($\mu\text{g/mL}$)	LDQ ($\mu\text{g/mL}$)
$y = 0,0133x + 0,0025$	0,9999	0,6	2,0

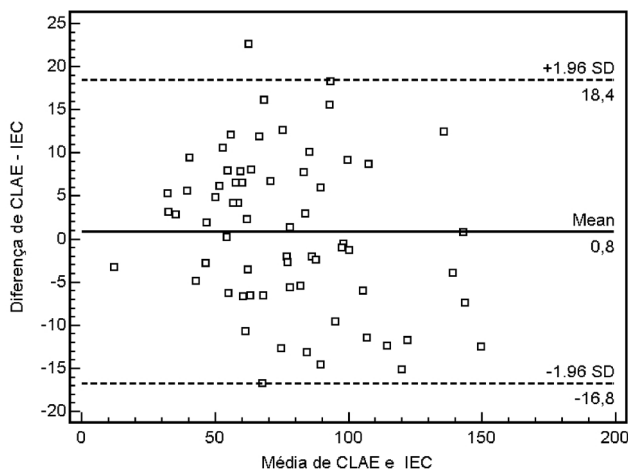


Figura 4. Gráfico de Bland e Altman: comparação entre as concentrações de AV obtidas por CLAE e IEC

CONCLUSÃO

Um método para a determinação de ácido valpróico por CLAE-DAD foi desenvolvido e validado. A preparação das amostras foi simples e rápida. O método foi preciso e exato, com sensibilidade adequada para o monitoramento terapêutico do ácido valpróico, permitindo a determinação fidedigna de AV em laboratórios que disponham de equipamentos de CLAE com detectores espectrofotométricos. As pequenas diferenças entre os resultados obtidos por CLAE e IEC demonstram que os resultados obtidos por ambas as metodologias são comparáveis.

REFERÊNCIAS

1. Neels, H. M.; Sierens, A. C.; Naelaerts, K.; Scharpé, S. L.; Hatfield, G. M.; Lambert, W. E.; *Clin. Chem. Lab. Med.* **2004**, *42*, 1228.
2. Patsalos, P. N.; *Epilepsia* **2005**, *46*, 140.
3. Warner, A.; Privitera, M.; Bates, D.; *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1085.
4. Gaetani, E.; Laureri, C.; Carlo, F.; Vitto, M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1982**, *10*, 193.

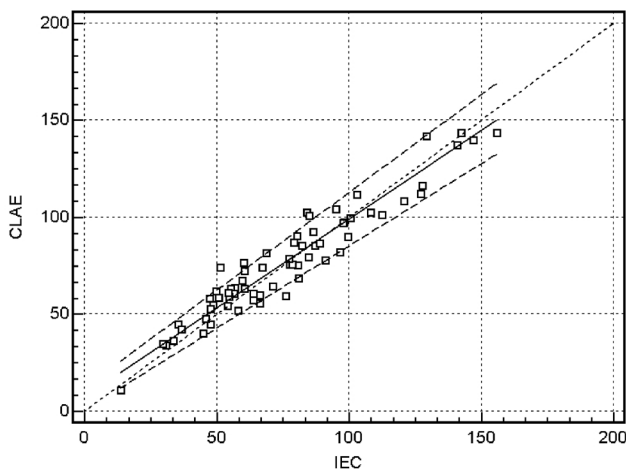


Figura 5. Regressão de Passing-Bablok: comparação entre as concentrações de AV obtidas por CLAE e IEC

5. Tatsuhara, T.; Muro, H.; Matsuda, Y.; Imai, Y.; *J. Chromatogr.* **1987**, *399*, 183.
6. Gupta, R. N.; Keane, P. M.; Gupta, M. L.; *Clin. Chem.* **1979**, *11*, 1984.
7. Shahdousti, P.; Mohammadi, A.; Alizadeh, N.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *850*, 128.
8. Lin, M.-C.; Kou, H.-S.; Chen, C.-C.; Wu, S.-M.; Wu, H.-L.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *810*, 169.
9. Gupta, R. N.; Eng, F.; Gupta, M. L.; *Clin. Chem.* **1979**, *25*, 1303.
10. Amini, H.; Javan, M.; Ahmadiani, A.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *830*, 368.
11. Shah, V. P.; Midha, K. K.; Findlay, J. W.; Hill, H. M.; Hulse, J. D.; McGilveray, I. J.; McKay, G.; Miller, K. J.; Patnaik, R. N.; Powell, M. L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C. T.; Yacobi, A.; *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1551.
12. Braun, S. L.; Tausch, A.; Vogt, W.; Jacob, K.; Knedel, M.; *Clin. Chem.* **1981**, *27*, 169.
13. Kumps, A. H.; Kumps-Grandjean, B.; Mardens, Y.; *Clin. Chem.* **1981**, *27*, 1788.