

# DETERMINAÇÃO DOS NIVEIS PLASMATICOS DO ACIDO VALPROICO (ACIDO DIPROPILACETICO) POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

*LOLITA M. TSANACLIS \**  
*TELMA G. GARCIA \**

O avanço na monitorização de drogas antiepilépticas, apoiado no desenvolvimento de novas tecnologias, permitindo conhecer concentrações em material biológico, possibilita o ajuste da dose a ser administrada ao paciente e a detecção de falhas no esquema terapêutico.

Com a introdução do valproato na terapêutica das epilepsias, muitos métodos de determinação foram descritos<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>. Schmidt & col.<sup>8</sup>, em 1977, ao investigarem a variabilidade interlaboratorial na determinação do ácido valpróico, observaram que somente 4 dos 13 laboratórios participantes do estudo, apresentaram resultados dentro dos 95% do limite de confiança. O autor atribuiu a variabilidade dos resultados encontrados a diferenças metodológicas e ao emprego do sal sódico do ácido valpróico como padrão. Sugeriu ele então que cada laboratório envolvido na análise de drogas antiepilépticas deveria participar de um esquema de controle de qualidade, que diminuísse os riscos de erro de análise.

O presente trabalho tem como objetivo a padronização de um método de determinação do ácido valpróico por cromatografia em fase gasosa, destacando o preparo da solução padrão do valproato do sódio.

## MATERIAL E METODOS

*Reagentes* — Valproato de sódio, Siegfried\*\* (Suíça); ácido caprílico, Carlo Erba (São Paulo); éter etílico, anidrido acético, clorofórmio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, álcool etílico e ácido perclórico, todos de procedência Merck (São Paulo).

*Solução estoque de valproato de sódio (0,03 M)* — Foram dissolvidos 500 mg do sal em 100 ml de água destilada. Uma alíquota de 20 ml dessa solução foi transferida a um bequer e evaporada até *secura completa*. O resíduo assim obtido foi dissolvido com

---

Trabalho do Centro de Investigações em Neurologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo: \* Bloquímica.

*Agradecimento* — Os autores agradecem a colaboração da Dra. Jussara Barbato, responsável pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Pravaz-Recordati Laboratórios S/A (São Paulo).

\*\* Gentilmente cedido pela Pravaz-Recordati Laboratórios S/A (São Paulo).

50 ml de anidrido acético e titulado potenciométricamente com ácido perclórico 0, 1 N, fatorado 9. Sabendo-se que 1,0 ml de ácido perclórico equivale a 16,62 mg de valproato de sódio, os cálculos foram efetuados a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{V \times f \times 16,2 \times 100}{v} = \text{mg \% de valproato de sódio na qual: } V = \text{volume gasto}$$

de ácido perclórico 0, 1 N;  $f$  = fator do ácido perclórico;  $v$  = alíquota da solução estoque de valproato de sódio (115,3 mg % de valproato de sódio equivalem a 100 mg % de ácido valpróico). Esta solução é estável por tempo indeterminado, quando conservada a 4°C.

*Solução de ácido caprílico* (padrão interno) — Foram dissolvidos 75 mg de ácido caprílico em 20 ml de álcool etílico. A solução de trabalho do padrão interno foi preparada no momento da análise, misturando-se 2,0 ml da solução em 50 ml de ácido clorídrico 1,0 N. A concentração final desta solução é de 150  $\mu\text{g/ml}$ .

*Extração* — O método de extração adotado, foi descrito por Hershey 3, em 1979. A etapa inicial envolve adição de 1,0 ml do ácido clorídrico diluído, contendo o padrão interno, a 1,0 ml de plasma. São adicionados 8,0 ml de éter etílico ao plasma acidificado. Após agitação, centrifugação e transferência da fase orgânica para outro tubo extrator, é adicionado 1,0 ml de NaOH 0,25 N. O tubo é submetido a nova agitação e centrifugação e a fase orgânica é desprezada. A camada aquosa é transferida para um tubo cônico, juntamente com 0,2 ml de HCl 2 N e 0,2 ml de clorofórmio. O tubo é agitado vigorosamente e centrifugado. Uma alíquota de 3,0  $\mu\text{l}$  da fase orgânica é injetada no cromatógrafo.

*Condições cromatográficas* — A análise cromatográfica foi efetuada em cromatógrafo a gás (Modelo 37 D, Instrumentos Científicos CG Ltda, São Paulo), equipado com: detector de ionização de chama, coluna de vidro (6 pés x 1/8 polegada); suporte sólido (Chromosorb W 80-100 Mesh) sinalizado e fase estacionária FFAP 10%; amplificador e registrador. Temperatura de operação: vaporizador e detector, 22°C; coluna, 210°C. Fluxo do gás de arraste (N<sub>2</sub>), 40 ml/min.

*Curva de referência* — Para a construção da curva de referência, um volume conhecido da solução estoque de valproato de sódio foi adicionado ao plasma branco em concentrações crescentes, abrangendo a faixa de 20-80 mg/ml de ácido valpróico. Os plasmas adicionados foram submetidos às mesmas condições de análise da amostra.

*Controle de qualidade* — Foi analisado um soro controle, Seronorm R Pharmaca (Nyegaard Co., Oslo), contendo 130  $\mu\text{g/ml}$  de ácido valpróico.

## RESULTADOS

Um cromatograma típico pode ser observado na figura 1. Os picos de ácido valpróico e padrão interno são quase simétricos e bem separados um do outro.

Não há interferentes, o que pode ser verificado ao se submeter um plasma branco às mesmas condições de análise da amostra. A etossuccimida, que também é extraída,

não interfere visto que seu tempo de retenção é maior que o tempo de retenção do ácido valpróico.

A curva de calibração foi construída colocando-se em um gráfico a relação das alturas dos picos do ácido valpróico e padrão interno versus as concentrações do ácido valpróico em  $\mu\text{g/ml}$  (figura 2).

O método é sensível e capaz de detectar quantidades inferiores a  $10 \mu\text{g/ml}$ .

Para o estudo da reprodutibilidade, um plasma adicionado de  $68 \mu\text{g/ml}$ , foi analisado 10 vezes, sendo encontrado um valor médio de  $69,7 \mu\text{g/ml}$ , com um desvio padrão de  $4,0 \mu\text{g/ml}$  e coeficiente de variação de 5,7%.

A exatidão do método foi verificada ao se analisar o soro controle Seronorm, contendo um valor discriminado de  $130 \mu\text{g/ml}$ . O valor médio encontrado pelo método foi de  $129 \mu\text{g/ml}$ .

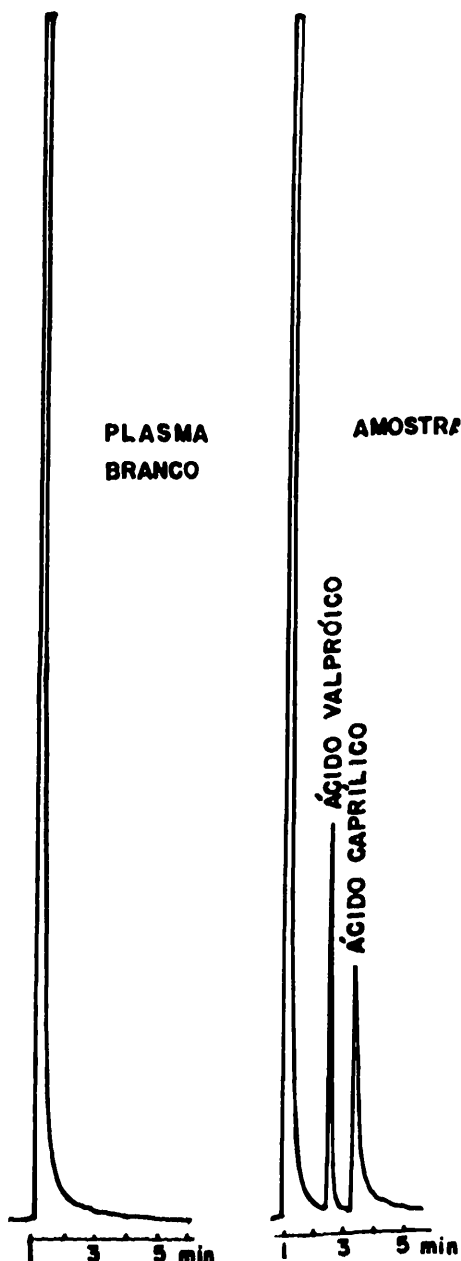


Fig. 1 — Separação cromatográfica do ácido valpróico e ácido caprílico (direita); cromatograma de um plasma branco (esquerda).

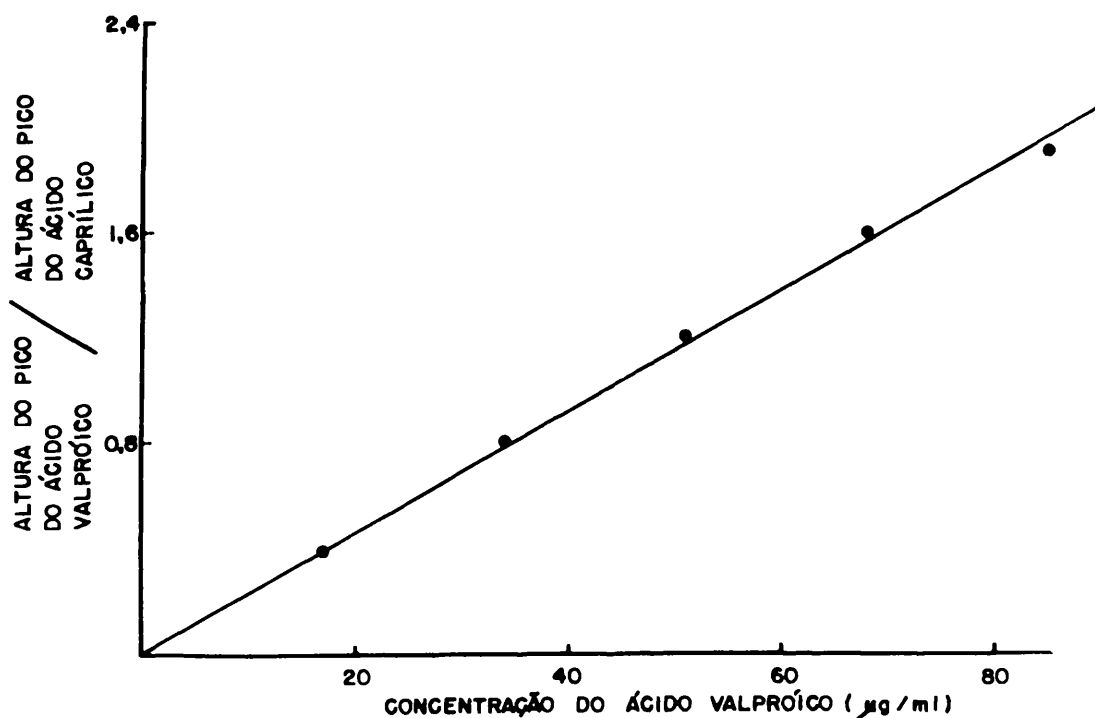


Fig. 2 — Curva de calibração para o ácido valpróico em plasma.

#### COMENTARIOS

Para finalidades clínicas, exige-se um método rápido e exato de determinação dos níveis plasmáticos do ácido valpróico.

O sal sódico do ácido valpróico — empregado por muitos investigadores como padrão — pode determinar um aumento dos valores dos resultados, dada a sua higroscopicidade. Este problema foi contornado, titulando-se a solução estoque padrão com ácido perclórico. Optou-se pela titulação potenciométrica; o ponto de viragem da titulação também pode ser visualizado, empregando-se violeta cristal a 5% em anidrido acético, como indicador.

O ácido valpróico é volátil em temperatura ambiente e a perda de droga por volatilização é desproporcional à perda do padrão interno por volatilização, quando a evaporação é empregada na extração. O esquema de extração descrito por Hershey<sup>3</sup>, possui etapas de transferência de solventes que evitam a evaporação.

A utilização do soro controle (Seronorm<sup>®</sup> Pharmaca), permitiu estabelecer o controle de qualidade do método descrito.

#### RESUMO

Foi padronizado um método de determinação dos níveis plasmáticos do ácido valpróico por cromatografia a gás. Trata-se de método rápido e exato, que evita etapas como evaporação ou derivação. O padrão empregado foi o sal sódico do ácido valpróico em solução aquosa, cuja concentração exata é

determinada através de titulação potenciométrica com ácido perclórico. O método foi avaliado, ao se submeter um plasma controle, às condições de análise.

#### SUMMARY

##### *Determination of plasmatic levels of valproic acid by gas chromatography.*

A specific and sensitive procedure for determination of valproic acid at therapeutic concentrations in human plasma has been standardized according to Hershey. The method requires solvents transfer but not solvent evaporation.

For preparations of standard solution of high accuracy a sodium salt of valproic acid was used, titred potentiometrically with 0.1 N perchloric acid.

Tests for sensibility and reproductibility were performed. The quality control of the assay was established using a control quality sera (Seronom, Pharmaca).

#### REFERENCIAS

1. BERRY, D. J. & CLARKE, L. A. — Determination of valproic acid (dipropylacetic acid) in plasma by gas-liquid chromatography. *J. Chromatography* 156:301-307, 1978.
2. FELLEBERG, A. J. & POLLARD, A. C. — A rapid and sensitive gas-liquid chromatographic procedure for the microdetermination of sodium valproate (Sodium Di. N-Propylacetate) in plasma or serum. *Clin. Chim. Acta* 81:203-208, 1977.
3. HERSHEY, A. F.; PATTON, J. R. & DUDLE, K. H. — Gas chromatographic method for the determination of valproic acid in human plasma. *Therapeutic Drug Monitoring* 1:217-241, 1979.
4. JAKOBS, G.; BOJASCH, M. & HANEFELD, F. — New direct micro-method for determination of valproic acid in serum by gas chromatography. *J. Chromatography* 146:494-497, 1978.
5. JENSEN, C. J. & GUGLER, R. — Sensitive gas-liquid chromatographic method determinations of valproic acid in biological fluids. *J. Chromatography* 137:188-193, 1977.
6. KUPFERBERG, H. J. — Gas-liquid chromatographic quantitation of valproic acid. *In* Pippenger, C. E.; Penry, J. K. & Kutt, H. eds.: *Antiepileptic Drugs, Quantitative Analyses and Interpretation*. Raven Press, New York, 1978, pp. 147-151.
7. LEVY, R. H.; MORTIS, L. & LAI, A. A. — GLC determination of valproic acid in plasma. *Analytical Letters*, B. 11 (3):257-267, 1978.
8. SCHMIDT, D.; FERRANDES, B.; GRADJEON, D.; GUGLER, R.; JAKOBS, C.; JOHANNENSEN, S.; KLOTZ, U.; KOCHEN, W.; KUPFERBERG, H. J.; MEIJER, J. W.A.; RICHENS, A.; SCHÄFER, H.; SHULZ, H. U. & WINDORFER, A. — Inter-laboratory variability of valproic acid determinations *Arzn. Forsch.* 27:1.078-1.081, 1977.
9. United States Pharmacopeia. Nineteenth Revision, United States Pharmacopeal Convention, Inc. Mack Publ. Co., Easton, 1974, pp. 770.