

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 339–344

Eine gaschromatographische Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Ethosuximid und Valproinat im Serum

Von W. R. Külpmann

Institut für Klinische Chemie (geschäftsf. Direktor Prof. Dr. Dr. J. Büttner) Medizinische Hochschule Hannover

(Eingegangen am 14. November 1979/14. Februar 1980)

Zusammenfassung: Es wird ein gaschromatographisches Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung von Ethosuximid und Valproinat beschrieben. Nach Zusatz von inneren Standards wird die Serumprobe mit Chloroform und Schwefelsäure versetzt und extrahiert. 2 µl der organischen Phase werden unmittelbar in den Gaschromatographen injiziert. Die Auftrennung erfolgt an SP 1000 isotherm, ohne Derivatbildung. Der Variationskoeffizient als Maß für die Präzision von Tag zu Tag betrug für Ethosuximid 2,6% und für Valproinat 5,2%. Bei Ringversuchen lagen die Meßwerte stets um weniger als eine Standardabweichung vom Sollwert entfernt. Die Nachweisgrenze lag mit 11,6 µmol/l für Ethosuximid und 2,3 µmol/l für Valproinat weit unterhalb des therapeutischen Bereichs. Zur Prüfung der Spezifität wurden u. a. die relativen Retentionszeiten von etwa 100 Arzneimitteln mit denen der Antiepileptica und ihren inneren Standards verglichen.

A gaschromatographic method for the simultaneous determination of ethosuximide and valproate in serum

Summary: A gaschromatographic procedure for the simultaneous determination of ethosuximide and valproate is presented. After addition of the two internal standards the serum sample is acidified and extracted by chloroform. 2 µl of the organic phase is directly injected into the gaschromatograph without previous evaporation. The gaschromatographic analysis is carried out on SP 1000 under isothermal conditions without derivatisation. The coefficients of variation for the precision from day to day were 2.6% (ethosuximide) and 5.2% (valproate). In external quality control the results for both substances always differed less than one standard deviation from the mean. The detection limits (11.6 µmol/l for ethosuximide and 2.3 µmol/l for valproate) were far below the usual therapeutic range. The specificity of the method was proven by comparison of the relative retention times of about 100 drugs, the investigated antiepileptic drugs and their internal standards.

Einleitung

Die Bedeutung der Überwachung der Antiepilepticatherapie mit Hilfe von Konzentrationsbestimmungen im Blut unter definierten Entnahmebedingungen ist allgemein anerkannt (1, 2). Die Analysen werden zu einem großen Teil unter Einsatz der Gaschromatographie durchgeführt. Das vergleichsweise spät in die Therapie eingeführte Valproinat wird üblicherweise einzeln bestimmt (3–12), während man gewöhnlich die Ethosuximidkonzentration gemeinsam mit der der anderen Antikonvulsiva zu ermitteln versucht (13–21). Auf Grund des unterschiedlichen gaschromatographischen Verhaltens ist jedoch die Messung von Ethosuximid zusammen mit Carbamazepin, Phenobarbital, Phenytoin und Primidon unbefriedigend und führt dazu, daß das vergleichsweise weniger oft eingesetzte Ethosuximid die Optimierung der Verfahren für die häufiger applizierten Antiepileptica verhindert: Bei der Probenaufarbeitung muß die Flüchtigkeit des Ethosuximid be-

rücksichtigt werden (14, 19) und bei der Gaschromatographie müssen Temperaturprogramme eingesetzt werden, die 100 °C und mehr überbrücken müssen (14, 16, 18, 21).

Wir haben das seinerzeit von Vree et al. (5) ohne nähere Prüfung der Zuverlässigkeit für die Valproinatbestimmung vorgeschlagene Verfahren aufgegriffen und für die gemeinsame Bestimmung der in vielen Eigenschaften ähnlichen Verbindungen Valproinat und Ethosuximid modifiziert und evaluiert. Die Methode erlaubt nach gemeinsamer, einfacher Probenvorbereitung, die der leichten Flüchtigkeit der beiden Verbindungen Rechnung trägt, die gaschromatographische Bestimmung simultan, isotherm und ohne Derivatbildung durchzuführen. Damit ist die Möglichkeit gegeben, ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der übrigen therapeutisch wichtigen Antiepileptica auf Carbamazepin, Phenobarbital, Phenytoin und Primidon zu beschränken und für diese gaschromato-

graphisch vergleichsweise ähnlichen Substanzen die Bedingungen zu optimieren (22).

Material und Methodik

Material

Natriumvalproinat (2-Propyl-valeriansäure, Natriumsalz), M_r 166,2 (Labaz GmbH, Erkrath-Untersfeldhaus); Ethosuximid (2-Ethyl-2-methyl-succinimid), M_r 141,2 (Parke, Davis & Comp., München 2); Caprylsäure, M_r 144,2 (Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm); 2,2,3-Trimethylsuccinimid, M_r 141,2 (Aldrich-Europe, Nettetal 2). Schwefelsäure (6 mol/l), Natronlauge (2 mol/l) und Eisessig, jeweils p. a. werden ohne Vorreinigung verwendet, Chloroform und Ethylacetat (p. a.) werden vor Gebrauch destilliert (Merck, Darmstadt). Ortho Anticonvulsant Control Serum (Ortho Diagnostics, Heidelberg). EMIT-aed® (Enzym-Immuno-Assay für die Ethosuximidbestimmung, Merck, Darmstadt).

Lösungen

Natriumvalproinat, Ethosuximid und 2,2,3-Trimethylsuccinimid werden in Ethylacetat-Eisessig (100 ml + 1 ml) bzw. in destilliertem Wasser gelöst: Konzentration: 50 bzw. 100 mg/l. Haltbarkeit bei Raumtemperatur: Mindestens 3 Monate. Caprylsäure (20 µl) wird in End-zu-End kalibrierten Kapillaren (Brand, Wertheim) aufgenommen und in 10 ml Ethylacetat/Eisessig (100 ml + 1 ml) ausgeschüttelt. Zur Herstellung der wäßrigen Caprylsäurelösung wird die gefüllte Kapillare (20 µl) in 10 ml Natronlauge (0,1 ml NaOH (2 mol/l) + 10 ml dest. Wasser) ausgeschüttelt. Haltbarkeit bei Raumtemperatur: Mindestens 3 Monate.

Glasgeräte

Spitzzöhrchen mit Schliffstopfen, Inhalt 10 ml.

Gaschromatographie

Glassäule, silikonisiert, 1,2 m lang, Innendurchmesser 2 mm. Säulenfüllung: 1% SP 1000 auf Supelcoport, 100/120 mesh (Supelco, Bellefonte, USA). Gaschromatograph: Varian 1400 mit Flammenionisationsdetektor (Varian, Darmstadt). Säulentemperatur: 125 °C, Einlaßtemperatur: 180 °C, Detektortemperatur: 180 °C. Trägergas: Nachgereinigter Stickstoff (40 ml/min).

Methodik

500 µl des Patientenserums werden mit 50 µl der wäßrigen Caprylsäurelösung (interner Standard für die Valproinatbestimmung) bzw. mit 50 µl der wäßrigen 2,2,3-Trimethylsuccinimid-Lösung (interner Standard für die Ethosuximidbestimmung) versetzt. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform werden 50 µl Schwefelsäure (6 mol/l) zugesetzt und 2 Minuten geschüttelt. Es wird 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. 2 µl der organischen Unterphase werden in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Auswertung der Gaschromatogramme erfolgt über die Ausmessung der Peakhöhen von Proben und Standards.

Ergebnisse

Präzision

Die Präzision in der Serie wurde mit Serum bestimmt, das mit Ethosuximid und Valproinat aufgestockt wurde. Jeweils 500 µl wurden mit den inneren Standards versetzt und analysiert. In Tabelle 1 wurden die Ergebnisse zusammengefaßt. Die Variationskoeffizienten schwankten zwischen 1,0 und 2,2%. Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit einem ebenfalls selbst hergestellten, aufgestockten Serumpool und einem Kontrollserum (Ortho Anticonvulsant Control Serum) ermittelt. Die Variationskoeffizienten betragen zwischen 2,0 und 5,2% (Tab. 2).

Richtigkeit und Spezifität

Die Wiederfindung von Ethosuximid ohne Berücksichtigung des inneren Standards betrug 68,1% (Variationskoeffizient: 7,4%, Anzahl n = 50), die Wiederfindung von Valproinat wurde unkorrigiert zu 75,9% (Variationskoeffizient: 6,3%, Anzahl n = 50) bestimmt.

Die Gaschromatogramme von Pharmaka-freien Sera bzw. von Patienten unter Therapie mit Antikonvulsiva lassen keine Verunreinigungen oder störende Peaks von Metaboliten erkennen (Abb. 1–3).

Tab. 1. Gaschromatographische Bestimmung von Ethosuximid und Valproinat. Präzision in der Serie.

Substanz	Anzahl der Analysen n	Mittelwert \bar{x} (µmol/l)	Variationskoeffizient (%)	Sollwert μ (µmol/l)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100$
Ethosuximid	10	340,2	1,6	354,1	- 3,9
	10	677,0	1,0	708,2	- 4,4
Valproinat	10	285,8	1,2	300,8	- 5,0
	10	603,5	2,2	601,7	+ 0,3

Tab. 2. Gaschromatographische Bestimmung von Ethosuximid und Valproinat. Präzision von Tag zu Tag (Einzelwerte).

Substanz	Anzahl der Analysen n	Mittelwert \bar{x} (µmol/l)	Variationskoeffizient (%)	Sollwert μ (µmol/l)	$\frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100$
Ethosuximid (1)	10	350,2	2,6	354,1	± 1,1
	10	692,8	2,0	708,2	- 2,2
Valproinat (1)	10	311,3	5,2	300,8	+ 3,5

(1) Selbst hergestelltes, aufgestocktes Poolserum
(2) Ortho Anticonvulsant Control Serum

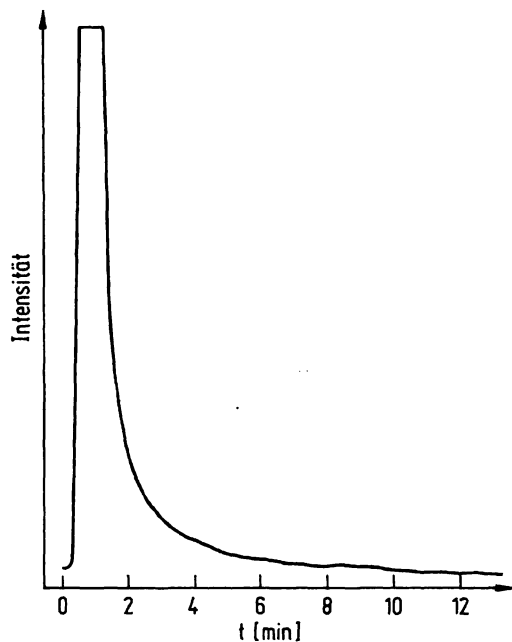


Abb. 1. Gaschromatogramm eines medikamentenfreien Serumextraktes.

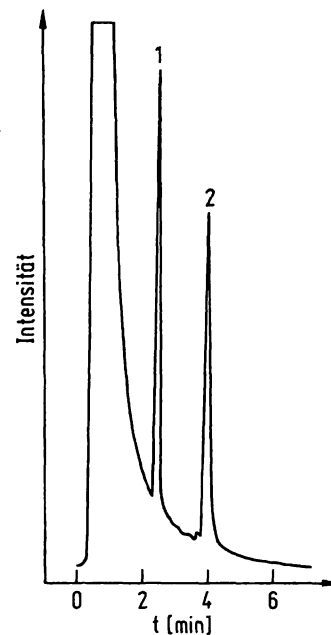


Abb. 2. Gaschromatogramm eines Serumextraktes von einem Patienten unter Valproinattherapie.
1: Valproinat (503 $\mu\text{mol/l}$)
2: Caprylsäure (innerer Standard)

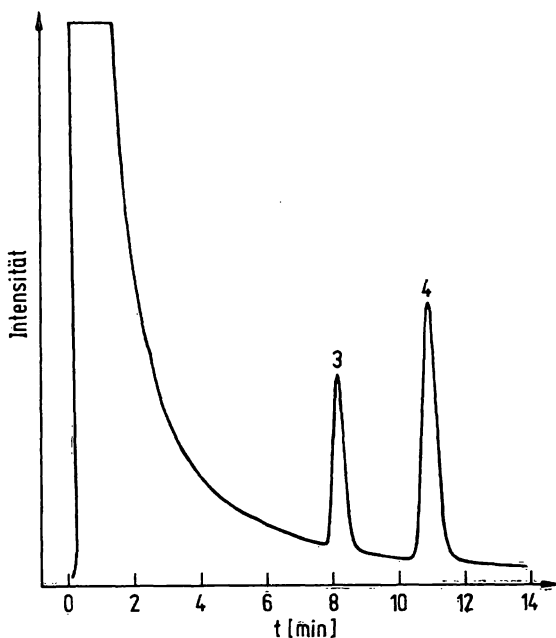


Abb. 3. Gaschromatogramm eines Serumextraktes von einem Patienten unter Ethosuximidtherapie.
3: 2,2,3-Trimethylsuccinimid (innerer Standard)
4: Ethosuximid (747 $\mu\text{mol/l}$).

Es wurde geprüft, ob die folgenden Medikamente auf Grund ihrer Retentionszeit und ihres Extraktionsverhaltens stören könnten. Dazu wurden jeweils 10 mg der Reinsubstanz bzw. 5 ml der Flüssigkeit verwendet, die in 10 ml der organischen Unterphase einer Mischung von Chloroform und Schwefelsäure (6 mol/l) (100 ml + 10 ml) gelöst wurden. 2 μl wurden in den Gaschromatographen injiziert. Auf diese Weise wird zugleich die Lös-

lichkeit als auch das gaschromatographische Verhalten der Substanzen geprüft, und eine mögliche Störung der Analyse durch ein Pharmakon in einem Schritt erfaßt. Andererseits sind deshalb genaue Angaben der geprüften Konzentrationen nicht zu geben. Auf Grund der eingesetzten Mengen liegen sie jedoch im toxischen und letalen Bereich.

Die Ethosuximidbestimmung wird durch keines der aufgeführten Medikamente gestört:

Acidum acetylosalicylicum
Acidum ascorbicum
Acidum niflumicum
Adipiodon (Methylglucamins. 5 ml)
Allopurinol
Amidotrizoesäure (Methylglucamins. 5 ml)
Aminophenazon
Amitryptilin
Ampicillin
Amphetamin
Antazolin
Azapropazon
Benzbromaron
Bisacodyl
Carbamazepin
Carbocromen
Carbromal
Cetobemidon
Chlordiazepoxid
Chloroquin
Chlorprothixen
Clofibrat

Clomethiazol
 Clonazepam
 Codein
 Cyclophosphamid
 Dextran (5 ml)
 Dextromoramid
 2,2-Diethylallylacetamid
 Diazepam
 Digoxin
 Diphenhydramin
 Doxepin
 Ethinamat
 Fenetyllin
 Fenfluramin
 Fluphenazin
 Furosemid
 Gentamycin
 Glafenin
 Glibenclamid
 Glutethimid
 Haloperidol
 Hyoscin-N-butylbromid
 Imipramin
 Indometazin
 Levorphanol
 Mebhydrolin
 Meclizin
 Mephentoin
 Mesuximid
 Methadon
 Methaqualon
 Methotrexat
 Methyldopa
 Methylpentynol
 Methylstiryldibromhydantoin
 Methyprylon
 Mianserin
 Miroton®
 Modenol®
 Morphin
 Neoplasmagel (5 ml)
 Nicotinamid
 Nitrazepam
 Nitrofurantoin
 Nomifensin
 Noramidopyrini methanosulfonas natrium
 Norfenefrin
 Normethadon
 Oxazepam
 Oxyphenbutazon
 Paramethadion
 Paraxin®
 Penicillamin
 Phenylethylmalondiamid

Phenformin
 Pheniramin-*p*-amino-salicylat
 Phenobarbital
 Phenprocumon
 Phenylbutazon
 Phenytoin
 Polybion®
 Prazepam
 Prednisolon
 Primidon
 Probenecid
 Promethazin
 Prothipendyl
 Pyrithyldion
 Reserpin
 Spironolacton
 Sulfadiazin
 Sulfametoxydiazin
 Sultiam
 Tetracyclin
 Thioridazin
 Tolbutamid
 Triflupromazin
 Trimethadion

Die Bestimmung von Valproinat wird lediglich durch hohe Konzentrationen von Carbromal und Clomethiazol gestört. Beim Vergleich der Ergebnisse, die durch Analyse von Ethosuximidhaltigen Sera mittels eines homogenen Enzymimmunoassays (EMIT®) und gaschromatographisch erhalten wurden, ergab sich eine gute Übereinstimmung (23). Die Abweichungen, die bei Ringversuchen beobachtet wurden (Ringversuchsleitung: Dr. A. Richens, St. Bartholomew's Hospital Quality Control Scheme for Antiepileptic Drugs, London), lagen bei den gaschromatographischen Analysen immer um weniger als eine Standardabweichung vom Mittelwert entfernt (Tab. 3).

Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit der Methode wurde abgeschätzt durch Bestimmung der dreifachen Standardabweichung bei Analysen im unteren Konzentrationsbereich als einem Maß für die Präzision bei der Konzentration $0 \mu\text{mol/l}$ (24). Eine Bestimmung des mittleren Leerwertes ist nicht möglich, zumal die Retentionszeit im untersten Konzentrationsbereich nicht konstant ist. Als Abschätzung kann der Vergleich zwischen Meß- und Sollwert dienen (Tab. 4). Jedenfalls erlaubt die Methode auch Konzentrationen unterhalb des therapeutischen Bereichs (Ethosuximid: $424,8\text{--}566,4 \mu\text{mol/l}$ und Valproinat: $349,0\text{--}698,0 \mu\text{mol/l}$ (25)) zuverlässig zu bestimmen.

Praktikabilität

Die Probenvorbereitung erfordert für 10 Analysen höchstens eine halbe Stunde. Alle 6 Minuten kann ein Val-

Tab. 3. Gaschromatographische Bestimmung von Ethosuximid und Valproinat. Externe Qualitätskontrolle.

Substanz	Anzahl der Teilnehmer n	Mittelwert \bar{y} ($\mu\text{mol/l}$)	Variationskoeffizient von \bar{y} (%)	Eigener Meßwert x ($\mu\text{mol/l}$)	$\frac{x - \bar{y}}{\bar{y}} \cdot 100$
Ethosuximid*	74	407,1	14,5	400,6	- 1,6
	76	207,2	20,7	230,1	+ 11,1
	78	109,9	27,4	96,5	- 13,9
	69	200,2	24,3	190,5	- 4,9
	74	220,6	19,6	224,4	+ 1,7
Valproinat*	44	298,0	13,4	300,7	+ 0,9
	55	329,0	11,9	332,2	+ 1,0
	65	347,5	17,3	380,2	+ 9,4
	82	105,1	20,7	110,6	+ 5,3
	86	452,3	15,6	411,1	- 9,1
	87	257,6	15,1	257,5	0,0
	83	644,5	18,5	617,5	- 4,1
	94	188,6	18,7	174,9	- 7,3

* bezogen auf gaschromatographische Verfahren ohne Derivatbildung

Tab. 4. Gaschromatographische Bestimmung von Ethosuximid und Valproinat. 3s-Bereich bei niedriger Konzentration.

Substanz	Anzahl der Analysen n	Sollwert μ ($\mu\text{mol/l}$)	Mittelwert \bar{x} ($\mu\text{mol/l}$)	3s Bereich ($\mu\text{mol/l}$)	Therapeutischer Bereich nach l. c. (25) ($\mu\text{mol/l}$) ¹
Ethosuximid	10	35,4	34,7	11,6	424,8–566,4
Valproinat	10	30,1	35,0	2,3	349,0–698,0

proinathaltiger Extrakt zur Analyse eingespritzt werden, alle 13 Minuten ein Ethosuximidhaltiger. Eine Störung durch Verunreinigungen mit langen Retentionszeiten, welche die Auswertung der anschließenden Gaschromatogramme erschweren, wurde nicht beobachtet. Die Materialkosten sind minimal, was einen wesentlichen Vorteil gegenüber einer entsprechenden EMIT[®]-Analyse darstellt, zumal bei dem vergleichsweise weniger oft eingesetzten Ethosuximid die besonders teuren Einzelanalysen (26) häufig sind.

Diskussion

Im Gegensatz zu anderen gaschromatographischen Methoden werden Ethosuximid und Valproinat gleichzeitig bestimmt. Dieses Vorgehen empfiehlt sich auf Grund der

ähnlichen Substanzeigenschaften, die diese Antikonvulsiva von den anderen Antiepileptica wesentlich abheben. Die Flüchtigkeit der Verbindungen zusammen mit ihren hohen therapeutischen Konzentrationen im Serum erfordert und erlaubt eine Extraktion ohne anschließende Konzentrierung des Extraktes, z. B. durch Eindampfen. Die gaschromatographische Analyse kann simultan, isotherm und ohne Derivatbildung durchgeführt werden, was die bei den ständig steigenden Analysenanforderungen dringliche Mechanisierung der gaschromatographischen Bestimmung erleichtert.

Danksagung

Frau L. Lütke-Holz und Herrn K. Petry danke ich für die zuverlässige Mitarbeit bei der Durchführung der Bestimmungen.

Literatur

- Lund, L. (1974), Arch. Neurol. 31, 289–294.
- Schmidt, D. (1977), Therapiewoche 27, 501–510.
- Meijer, J. W. A. & Hessing-Brand, L. (1973), Clin. Chim. Acta 43, 215–222.
- Loiseau, P., Brachet, A. & Henry, P. (1975), Epilepsia 16, 609–615.
- Vree, T. B., van der Kleijn, E. & Knop, H. J. (1976), J. Chromatogr. 121, 150–152.
- Dacremont, G. & Cocquyt, G. (1977), Acta Paediatr. Belg. 30, 41–44.
- Dusci, L. J. & Hackett, L. P. (1977), J. Chromatogr. 132, 145–147.
- Fellenberg, A. J. & Pollard, A. C. (1977), Clin. Chim. Acta 81, 203–208.
- Jensen, C. J. & Gugler, R. (1977), J. Chromatogr. 137, 188–193.

10. Löscher, W. (1977), *Epilepsia* 18, 225–227.
11. Schulz, H.-U. & Toseland, P. A. (1977), *Ann. Clin. Biochem.* 14, 240–242.
12. Wood, M. H., Sampson, D. C. & Hensley, W. J. (1977), *Clin. Chim. Acta* 77, 343–347.
13. Cremers, H. M. H. G. & Verheesen, P. E. (1973), *Clin. Chim. Acta* 48, 413–420.
14. Beam, R. E. (1974), *Am. J. Med. Technol.* 40, 211–218.
15. Perchalski, R. J. & Wilder, B. J. (1974), *J. Pharm. Sci.* 63, 806–807.
16. Toseland, P. A., Albani, M. & Gauchel, F. D. (1975), *Clin. Chem.* 21, 98–103.
17. Latham, A. N. & Varlow, G. (1976), *Br. J. Clin. Pharmacol.* 3, 145–150.
18. Abraham, C. V. & Gresham, D. (1977), *J. Chromatogr.* 136, 332–336.
19. Heipertz, R., Pilz, H. & Eickhoff, K. (1977), *Clin. Chim. Acta* 77, 307–316.
20. Hill, R. E. & Latham, A. N. (1977), *J. Chromatogr.* 131, 341–346.
21. Sengupta, A. & Peat, M. A. (1977), *J. Chromatogr.* 137, 206–209.
22. Külpmann, W. R. (1979), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 17, 174–175.
23. Külpmann, W. R. & Oellerich, M. In Vorbereitung.
24. Büttner, J., Borth, R., Boutwell, J. H., Broughton, P. M. G. & Bowyer, R. C. (1976), *Clin. Chim. Acta* 69, F1–F17; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14, 265–275 (1976); *Clin. Chem.* 22, 1922–1932 (1976).
25. Klotz, U. (1978), *Fortschr. Med.* 96, 9–13.
26. Oellerich, M., Külpmann, W. R., Haackel, R. & Heyer, R. (1977), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15, 353–358.

Priv.-Doz. Dr. W. R. Külpmann
Institut für Klinische Chemie
Karl-Wiechert-Allee 9
3000 Hannover 61