

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

С. В. БАЮРКА, С. А. КАРПУШИНА, В. І. СТЕПАНЕНКО, С. М. ПОЛУЯН, Т. О. ТОМАРОВСЬКА

Національний фармацевтичний університет

АНАЛІЗ ВЕНЛАФАКСИНУ В КРОВІ МЕТОДАМИ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ТА УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ

Розроблено методику ізолювання венлафаксину з крові методом рідинно-рідинної екстракції хлороформом при рН 7-8. Осадження формених елементів крові проводили 10 % розчином трихлорацетатної кислоти, для видалення співекстрактивних компонентів біологічної матриці використовували екстракційну та ТШХ-очистку. Аналіз венлафаксину в екстрактах проводили методами ТШХ та УФ-спектрофотометрії. Ефективність розробленої методики ізолювання становила 36 ± 3 %.

Ключові слова: венлафаксин; тонкошарова хроматографія; УФ-спектрофотометрія; ізолювання з крові

ВСТУП

Венлафаксин (Венлаксор) відноситься до тимоаналептиків останньої генерації з подвійною дією – до вибіркових інгібіторів зворотнього захвату серотоніну та норадреналіну (ІЗЗСН) [1]. Вказаний препарат був першим представником групи ІЗЗСН і в теперішній час розглядається як один з найбільш ефективних та доступних українським пацієнтам антидепресантів [3]. Використовується для лікування депресивних розладів різного ступеня тяжкості [2].

Серед серотонінергічних антидепресантів венлафаксин відмічають як найбільш токсичний препарат з підвищеним ризиком летальних випадків [13]. Зафіксовані випадки гострих та смертельних отруєнь венлафаксином [7, 12]. Зокрема, після надходження до організму 30 г венлафаксину летальна концентрація препарату в крові становила 21,82 мг/л [12].

У сучасних літературних джерелах наведені методики аналізу венлафаксину в плазмі крові за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з УФ- [17], флуоресцентним [6], мас-спектрометричним [15, 20] детектуванням, газо-рідинної хроматографії з нітроген-фосфорним [10, 11] та мас-спектрометричним детектуванням [14, 18] та електрокінетичної капілярної хроматографії [16]. Зазначені методи аналізу характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної пробопідготовки та спеціального коштовного обладнання, що робить їх не завжди доступними.

Метою нашого дослідження була розробка ефективних умов ізолювання венлафаксину в крові методом рідинно-рідинної екстракції з наступним аналі-

зом антидепресанта за допомогою доступних та широко впроваджених в практику хіміко-токсикологічного аналізу методів [8]: тонкошарової хроматографії та УФ-спектрофотометрії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Реактиви та обладнання

Венлаксор (75 мг) – таблетки, що містять венлафаксину гідрохлорид, було отримано у «Grindex» (Рига, Латвія). Виділення венлафаксину з таблеток проводили як описано в роботі [4].

Реактиви, які були використані, мали кваліфікацію не нижче «ЧДА».

Світлопоглинання розчинів в УФ-області спектра досліджували на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО), спектральний діапазон вимірювань становив від 190 до 1100 нм.

рН-метр 5123 (Elvgo, Вроцлав, Польща).

Водяна баня LW-4 (Бітом, Польща).

Хроматографічні пластинки Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10 × 20 см, Німеччина).

Мірні колби на 10 мл, 25 мл 2-го класу, градуйовані піпетки 1-го класу (Simax, Чехія).

Методика виділення венлафаксину з крові.

До 10 мл донорської крові людини додавали по 1 мл водних розчинів венлафаксину, які містили від 100 до 500 мкг препарату, суміші перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили «холості» дослід з біологічною рідиною. Після цього до модельних проб крові додавали по 10 мл 10 % розчину кислоти трихлорацетатної і перемішували. Суміші центрифугували протягом 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугати зливали з осадів і переносили до ділительних ліжок та двічі екстрагували домішки діетилловим етером по 10 мл кожного разу при рН 1. Фазу

© Колектив авторів, 2015

органічного розчинника відокремлювали та відкидали, не досліджуючи у подальшому. Кислу фазу, що залишилася, підлугували до рН 7-8 20 % розчином натрію гідроксиду (за універсальним індикатором) та тричі екстрагували венлафаксин хлороформом по 10 мл кожного разу. Отримані екстракти з крові додатково очищували від домішок екстракційним та ТШХ-методом.

Методика екстракційної очистки. Отримані екстракти переносили до порцелянової чашки і випаровували їх на водяній бані при температурі, не вищій, ніж 40 °С до видалення органічного розчинника. Потім до сухого залишку у фарфоровій чашці додавали 20 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної, вміст чашки ретельно перемішували та переносили до ділильної лійки і кислий розчин (рН 1) двічі, по 10 мл кожного разу, збовтували з діетиловим етером, відкидаючи фазу органічного розчинника. Після цього кислий водний залишок підлугували 20 % розчином натрію гідроксиду до рН 7-8 і тричі екстрагували венлафаксин хлороформом. Органічні екстракти фільтрували через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату, попередньо змоченого відповідним органічним розчинником. Хлороформні екстракти випаровували при 40 °С та доводили їх об'єм до 25 мл у відповідній мірній колбі.

Методика аналізу екстрактів на венлафаксин методом тонкошарової хроматографії. На дві хроматографічні пластинки Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10 × 20 см) наносили за допомогою каліброваного капіляра по 10 мкл модельного розчину препарату у хлороформі з концентрацією 1 мг/мл (10 мкг у пробі), поряд смугою наносили пробу біологічного екстракту, отриманого після додаткової екстракційної очистки (об'ємом від 0,5 до 3,0 мл, який було попередньо випарено до мінімального об'єму ~ 0,05 мл). На одну з хроматографічних пластинок додатково наносили другу пробу біологічного екстракту об'ємом 2,0-5,0 мл, випареного до мінімального об'єму, для наступного елюювання досліджуваної речовини. Поряд наносили 0,5-3,0 мл біологічного екстракту з «холостого» досліджу. Спочатку хроматограми розвивали у рухомій фазі хлороформ для відокремлення домішок від препарату (домішки переважно мігрували з фронтом розчинника до лінії фінішу, а досліджуваний антидепресант залишався на лінії старту). Хроматограму, яка містила пробу для елюювання венлафаксину, розвивали в рухомій фазі метанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (100 : 1,5). Другу хроматограму розвивали в рухомій фазі толуен – ацетон – етанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (45 : 45 : 7,5 : 2,5). Детектували венлафаксин розчином підкисленого йодо-платинату, спостерігаючи синьо-фіолетове забарвлення плям. Пробу біологічного екстракту для елюювання проявником не обробляли. З непроявленої смуги хроматограми препарат двічі елюювали метанолом (по 2 мл кожного разу).

Дослідження елюатів методом УФ-спектрофотометрії. УФ-спектри елюатів, що містили венлафаксин, досліджували у діапазоні довжин хвиль 200-350 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Кількісне визначення венлафаксину в елюатах проводили УФ-спектрофотометричним методом при довжині хвилі 277 нм за методикою, описаною в роботі [4]. Як розчин порівняння використовували елюат «холостого» досліджу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для аналізу венлафаксину, виділеного з крові методом ТШХ, нами було використано рухому фазу метанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (100 : 1,5), рекомендовану ТІАФТ для загального ТШХ-скринінгу лікарських речовин [10], а також рухому фазу толуен – ацетон – етанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (45 : 45 : 7,5 : 2,5), яка також широко використовується у вітчизняній практиці судово-токсикологічних досліджень [5].

Плями венлафаксину, виділеного з крові, та венлафаксину в модельному розчині за величинами R_f співпадали та склали у рухомій фазі метанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (100 : 1,5) $0,65 \pm 0,03$, у рухомій фазі толуен – ацетон – етанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (45 : 45 : 7,5 : 2,5) – $0,71 \pm 0,05$ (середні з п'яти визначень). Витяжки з «холостих» дослідів не давали плям із вказаними значеннями R_f . Чутливість підкисленого йодо-платинату як проявника венлафаксину становила 2,0 мкг в пробі. Попередньо було встановлено, що ступінь елюювання венлафаксину метанолом з хроматографічної пластинки складав $98,2 \pm 1,0$ %.

УФ-спектри світлопоглинання венлафаксину, виділеного з крові, та венлафаксину в модельному розчині в метанолі (концентрація $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) співпадали та мали три смуги поглинання при довжинах хвиль 226 ± 2 ($A_1^1 = 339,0$), 277 ± 2 ($A_1^1 = 43,8$) та 284 ± 2 нм ($A_1^1 = 37,0$). УФ-спектр елюату, отриманого у «холостому» досліді, максимумів світлопоглинання при вказаних довжинах хвиль не мав.

Кількісне визначення венлафаксину в елюатах проводили з використанням градуювального графіка, який описувався рівнянням: $Y = (0,00370 \pm 2,5 \cdot 10^{-5})X$ [4]. Методика характеризувалась діапазоном лінійності в межах концентрацій венлафаксину 10,8-275 мкг/мл. Значення LOD та LOQ були розраховані на основі параметрів градуювальної прямої (стандартного відхилення вільного члена (S_y) та її тангенсу нахилу (b)) і становили, відповідно, 3,6 мкг/мл та 10,8 мкг/мл. Таким чином, УФ-спектрофотометрична методика кількісного визначення венлафаксину характеризується достатньою чутливістю та діапазоном лінійності відносно очікуваних фатальних концентрацій антидепресанту в крові.

Нами було проведено оцінку впливу ендогенних компонентів досліджуваної біологічної матриці на результати кількісного визначення. Для цього були роз-

раховані межі виявлення та кількісного визначення венлафаксину в екстрактах з крові на основі значень світлопоглинання «холостих» дослідів при $\lambda_{\max} = 277$ нм згідно з рівняннями [19]: $LOD = X_{\min} + 3S$ та $LOQ = X_{\min} + 10S$, де: X_{\min} – межа виявлення відносно концентрації аналіту, при цьому $X_{\min} = Y_{\min}/b$, де Y_{\min} – межа виявлення відносно величини аналітичного сигналу, тобто – світлопоглинання «холостого» досліді; b – коефіцієнт інструментальної чутливості методики, який дорівнює тангенсу кута нахилу прямолінійної ділянки градуувальної прямої $Y = bX + a$; S – стандартне відхилення. Світлопоглинання елюатів, отриманих у «холостих» дослідах, складало $0,011 \pm 0,001$ ($n = 5$, $RSD = 9,1\%$, $\varepsilon = 11,3$). Розраховані значення LOD та LOQ становили 3,9 та 5,7 мкг/мл відповідно, що свідчить про відсутність впливу компонентів біологічної матриці на результати кількісного визначення антидепресанту в елюатах. Таким чином, розроблена методика виділення венлафаксину з крові забезпечує достатній ступінь очистки екстрактів від ендогенних компонентів біологічної матриці.

Методику ізолювання венлафаксину з крові та додаткової екстракційної очистки отриманих екстрактів було оптимізовано на основі попереднього вивчення ступеня екстракції венлафаксину з водних розчинів у залежності від рН водного середовища та природи органічного розчинника. Отримані дані показали, що оптимальним екстрагентом антидепресанту з водного середовища був хлороформ, максимальний ступінь екстракції (45-49 %) спостерігали при рН 7-8. Найменша кількість досліджуваної речовини (0,3-0,5 %) екстрагувалась гексаном та діетиловим етером з кислого середовища при рН 1.

Ступінь ізолювання венлафаксину з крові за наведеною методикою становив $36 \pm 3\%$ (табл.).

Слід відзначити, що венлафаксин характеризується відносно невисоким ступенем зв'язування з білками плазми ($F_b = 30\%$) [8]. Таким чином, зменшення ефективності процедури пробопідготовки відносно ступеня екстракції венлафаксину обраними органічними розчинниками у відповідних умовах, ймовірно, обумовлено зв'язуванням венлафаксину з еритроцитами крові на фоні невисокого ступеня зв'язування венлафаксину з білками плазми [9].

ВИСНОВКИ

1. Досліджена можливість використання рідинно-рідинної екстракції як методу вилучення венлафаксину з крові. Методику ізолювання було оптимізовано з урахуванням ступеня екстракції венлафаксину з водних розчинів у залежності від рН водного середовища та природи органічного розчинника. Розроблена методика дозволила виділити $36 \pm 3\%$ досліджуваного антидепресанту. Втрати досліджуваної речовини під час пробопідготовки, ймовірно, обумовлені зв'язуванням венлафаксину з еритроцитами крові.

Таблиця

СТУПІНЬ ІЗОЛЮВАННЯ ВЕНЛАФАКСИНУ З КРОВІ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ

Додано венлафаксину до 10 мл крові, мкг	Виділено венлафаксину, %	Метрологічні характеристики
100	40	$\bar{X} = 36$ $S = 2,6$ $RSD = 7,2\%$ $S_{\bar{x}} = 1,2$ $\Delta\bar{X} = 3$ $\varepsilon = 9\%$
200	34	
300	38	
400	34	
500	35	

2. Опрацьовані методики додаткової екстракційної та ТШХ-очистки екстрактів від ендогенних компонентів біологічної матриці. Показано, що запропоновані методики забезпечують ефективну очистку, що робить можливим використання УФ-спектрофотометрії для виявлення та кількісного визначення антидепресанту в крові.
3. Опрацьовано методику аналізу венлафаксину в крові методом тонкошарової хроматографії з використанням двох рухомих фаз та високочутливого проявника – підкисленого йодоплатинату (чутливість 2,0 мкг у пробі).
4. Показано, що розроблені методики аналізу венлафаксину в крові з використанням методів тонкошарової хроматографії та УФ-спектрофотометрії характеризуються достатньою чутливістю відносно очікуваних летальних концентрацій зазначеного антидепресанту в крові.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Аведисова А. С. Венлафаксин (Велаксин): результати міжнародних досліджень антидепресанта III покоління / А. С. Аведисова // Психіатрія і психофармакотерапія. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 2-7.
2. Ильина Н. А. Опыт применения велаксина (венлафаксина) при тревожных депрессиях / Н. А. Ильина // Журн. неврол. и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2008. – Т. 108, № 3. – С. 24-28.
3. Матюха А. В. К вопросу о фармакологической и терапевтической эквивалентности антидепрессантов двойного действия / А. В. Матюха // Здоров'я України. – 2007. – № 17. – С. 66-67.
4. Розробка УФ-спектрофотометричного та екстракційно-спектрофотометричного методів кількісного визначення венлафаксину, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу / С. В. Баюрка, С. А. Карпушина, В. І. Степаненко, Л. Ю. Томаровська // Укр. біофармац. журн. – 2014. – № 5 (30). – С. 56-61.
5. Хіжніченко О. В. Хіміко-токсикологічне дослідження нових лікарських засобів – потенційних об'єк-

- тів немедичного використання методом хроматографії у тонких шарах сорбенту / О. В. Хижніченко, Н. В. Гузенко, О. В. Чубенко // Фармац. журн. – 2011. – Вип. 6. – С. 74-78.
6. Ardakani Y. H. Development and validation of a rapid HPLC-fluorescence method for simultaneous determination of venlafaxine and its major metabolites in human plasma / Y. H. Ardakani, A. Foroumadi, M. R. Rouini // *Daru J. Pharm. Res.* – 2010. – Vol. 18 (2). – P. 97-102.
 7. Banham N. Fatal venlafaxine overdose / N. Banham // *Med. J. Aust.* – 1998. – Vol. 169 (8). – P. 445-448.
 8. Clarke's Analytical Forensic Toxicology / Ed. by Sue Jickells, Adam Negrusz. – London: Pharmaceutical Press, 2008. – 648 p.
 9. Fisar Z. Distribution of antidepressants between plasma and red blood cells / [Z. Fisar, K. Fuksová, J. Sikora et al.] // *Neuro Endocrinol. Lett.* – 2006. – Vol. 27 (3). – P. 307-313.
 10. Long C. Comparison of analytical methods in the determination of two venlafaxine fatalities / [C. Long, J. Crifasi, D. Maginn et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 1997. – Vol. 21. – P. 166-169.
 11. Martinez M. A. Simultaneous determination of viloxazine, venlafaxine, imipramine, desipramine, sertraline and amoxapine in whole blood: comparison of two extraction/cleanup procedures for capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection / M. A. Martinez, C. S. de la Torre, E. Almarza // *J. Anal. Toxicol.* – 2002. – Vol. 26 (5). – P. 296-302.
 12. Mazur J. Fatality related to a 30-g venlafaxine overdose / J. Mazur, J. Doty, A. Krygiel // *Pharmacotherapy.* – 2003. – Vol. 23 (12). – P. 1668-1672.
 13. Mines D. Prevalence of risk factors for suicide in patients prescribed venlafaxine, fluoxetine, and citalopram / D. Mines, D. Hill, H. Yu, L. Novelli // *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* – 2005. – Vol. 14 (6). – P. 367-372.
 14. Papoutsis I. A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry / [I. Papoutsis, A. Khraiwesh, P. Nikolaou et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – Vol. 70. – P. 557-562.
 15. Patel B. N. Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma and its application to a bioequivalence study / [B. N. Patel, N. Sharma, M. Sanyal et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – Vol. 47. – P. 603-611.
 16. Purdeli N. C. Determination of venlafaxine toxic levels from human serum by non-aqueous capillary electrophoresis / [N. C. Purdeli, D. Balalau, M. Ilie et al.] // *Farmacia.* – 2010. – Vol. 58 (1). – P. 62-69.
 17. Raut B. B. A rapid and sensitive HPLC method for the determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma with UV detection / [B. B. Raut, B. L. Kolte, A. A. Deo et al.] // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 2003. – Vol. 26. – P. 1297-1313.
 18. Salgado-Petinal C. Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry / [C. Salgado-Petinal, J. P. Lamas, C Garcia-Jares et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2005. – Vol. 382. – P. 1351-1359.
 19. SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines [Electronic resource]. – 2006. – 24p. – Режим доступу: http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf.
 20. Qin F. Simultaneous quantification of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study / [F. Qin, N. Li, T. Qin et al.] // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2010. – Vol. 878. – P. 689-694.

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8**С. В. Баярка, С. А. Карпушина, В. И. Степаненко, С. М. Полуян, Т. А. Томаровская
АНАЛИЗ ВЕНЛАФАКСИНА В КРОВИ МЕТОДАМИ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
И УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**

Разработана методика изолирования венлафаксина из крови методом жидкостно-жидкостной экстракции хлороформом при pH 7-8. Осаждение форменных элементов крови проводили 10 % раствором трихлоруксусной кислоты, для удаления соэкстрактивных компонентов биологической матрицы использовали экстракционную и ТСХ-очистку. Анализ венлафаксина в экстрактах проводили методами ТСХ- и УФ-спектрофотометрии. Эффективность разработанной методики изолирования составляла 36 ± 3 %.

Ключевые слова: венлафаксин; тонкослойная хроматография; УФ-спектрофотометрия; изолирование из крови

UDC 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8**S. V. Baiurka, S. A. Karpushina, V. I. Stepanenko, S. M. Poluyan, T. A. Tomarovska
ANALYSIS OF VENLAFAXINE IN BLOOD BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND UV SPECTROPHOTOMETRY
METHODS**

The method of venlafaxine isolation from the blood by liquid-liquid extraction with chloroform at pH 7-8 has been developed. The blood cell precipitation was carried out by 10 % trichloroacetic acid solution, back extraction and TLC purification was used for removing the coextracted biological matrix components. Analysis of venlafaxine in the extracts was performed by TLC and UV spectrophotometry. The efficiency of the isolation method developed was 36 ± 3 %.

Key words: venlafaxine; thin layer chromatography; UV-spectrophotometry; isolation from blood

Адреса для листування:

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.

Тел. (0572) 68-89-11.

E-mail: sveta.karpushina.63@mail.ru.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 08.10.2015 р.