

УДК: 615.214:543.544.943.3:543.422.3-76

**ВИЗНАЧЕННЯ ВЕНЛАФАКСИНУ
В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ МЕТОДОМ
ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ
ХРОМАТОГРАФІЇ**

БАЮРКА С.В., КАРПУШИНА С.А.

Національний фармацевтичний університет,
кафедра лікарської та аналітичної токсикології

Розроблено методику ідентифікації та кількісного визначення антидепресанта венлафаксина в крові методом високоефективної рідинної хроматографії з УФ-спектрофотометричним детектуванням. Пробопідготовку проводили методом рідинно-рідинної екстракції. Калібрувальний графік описувався рівнянням $y = (0,00370 \pm 2,5 \cdot 10^{-5})x$; лінійність спостерігали в межах концентрацій антидепресанта 15,0 – 400 мкг/мл; значення LOD та LOQ становили відповідно 4,0 мкг/мл та 12,2 мкг/мл.

Ключові слова: венлафаксин, високоефективна рідинна хроматографія, рідинно-рідинна екстракція.

Венлафаксин (1-[2-(диметиламіно)-1-(4-метоксифеніл)-етил]циклогексанолу гідрохлорид) – моноциклічний антидепресант з групи селективних інгібіторів зворотнього нейронального захвату серотоніна та норадреналіна. Знайшов широке використання в психіатричній практиці для лікування великого депресивного, генералізованого тривожного та панічного розладів [1]. Посідає шосте місце серед найбільш часто призначуваних антидепресантів на роздрібному ринку США (17,2 млн. рецептів, 2007 р.) [2]. Зареєстровані неоднаразові випадки гострих та летальних передозувань венлафаксином [3, 4], тому розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу зазначеного антидепресанта є актуальною задачею.

У літературі описані методики визначення венлафаксина в плазмі крові за допомогою газо-рідинної хроматографії (ГРХ) з нітроген-фосфорним [4, 5] та мас-спектрометричним детекторами (МС) [6, 7], високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з УФ- [8], МС- та МС-МС- [9, 10] детектуванням. Вищеперелічені методики характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але пов'язані з використанням високошвидкісного обладнання, потребують ретельної пробопідготовки з використанням твердофазної екстракції та мікроекстракції для отримання надійних та відтворюваних результатів (особливо методами ВЕРХ-МС, ГРХ-МС), що робить їх не завжди доступними та економічно вигідними.

Метою даних досліджень є розробка і валідація методики ідентифікації та кількісного визначення венлафаксина в крові методом обернено-фазної ВЕРХ з мультимовним УФ-спектрофотометричним детектуванням після етапу пробопідготовки, яку здійснювали методом рідинно-рідинної екстракції.

Матеріали та методи. В роботі використовували субстанцію венлафаксину гідрохлориду, яку було виділено з таблеток Венлаксор (75 мг) («Grindex», Рига, Латвія). Методику екстракції венлафаксина з крові було оптимізовано на основі попередньо отриманих нами результатів залежності ступеню екстракції венлафаксина в залежності від природи органічного розчинника та рН водної фази. Готували модельні проби крові, які містили досліджуваний антидепресант. Для цього до 10 мл донорської крові додавали по 1 мл водних розчинів венлафаксина гідрохлориду, що містили від 100 до 500 мкг препарату (у перерахунку на венлафаксин-основу), перемішували і залишали на добу. Через добу до отриманих модельних сумішей додавали по 10 мл 10 % розчину кислоти трихлорацетатної і перемішували. Після цього суміш центрифугували протягом 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат зливали та двічі екстрагували домішки діетиловим етером по 10 мл кожного разу. Фазу органічного розчинника відокремлювали та відкидали, водну фазу підлгоували до рН 10–11 20 % розчином натрій гідроксиду та двічі екстрагували препарат діе-

тиловим етером по 10 мл кожного разу. Одержані «лужні» екстракти фільтрували через фільтр з 0,5 г безводного натрій сульфату у мірну колбу об'ємом 25 мл і доводили до мітки діетиловим етером. Відповідний об'єм (5 – 10 мл) етерного екстракта випаровували до мінімального об'єму (0,05 мл) і наносили смугою скляним капіляром на лінію старта хроматографічної пластинки з закріпленим шаром силікагелю (розмір пластинок 10x20 см). Поряд наносили 10 мкл розчину венлафаксина-«свідка» в метанолі (1000 мкг/мл). Хроматограми розвивали послідовно з використанням двох рухомих фаз: хлороформ і етилацетат – метанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (85:10:5). Плям венлафаксина-«свідка» проявляли за допомогою реактива Драгендорфа у модифікації за Мун'є (R_f $0,81 \pm 0,02$). Венлафаксин елюювали 5 мл метанола з не проявленої полоси хроматограми (ступінь елюювання складала 99,2 %), елюат випаровували і розчиняли в 1 мл метанола, відбирали 10 мкл розчину і досліджували на мікроколоночному рідинному хроматографі з мультисхвильовим УФ-детектором.

Умови аналізу елюатів методом ВЕРХ. Колонка розміром 2x75 мм з оберненою фазою С 18; елюент А: 0,2 М перхлорат літію – 0,005 М перхлорна кислота, елюент Б: ацетонітрил, режим елюювання – градієнтний (від 5 % Б до 100 % Б за 4 хв, 100 % Б протягом 3 хв); швидкість подачі елюента 100 мкл/хв; температура термостата колонки 40° С; детектор мультисхвильовий УФ-спектрофотометричний. Детектування проводили при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм.

Результати та їх обговорення

Ідентифікацію венлафаксина, виділеного з крові, здійснювали за часом утримування ($t_R=17,81 \pm 0,08$ хв, $RSD=0,20\%$, $\varepsilon=0,51\%$, $P=95\%$, $v=2$) і спектральними характеристиками $R=S_\lambda/S_{210}$, які при зазначених вище довжинах хвиль становили відповідно $1,71 \pm 0,07$; $1,88 \pm 0,08$; $0,169 \pm 0,002$; $0,037 \pm 0,009$; $0,100 \pm 0,007$; $0,218 \pm 0,009$; $0,005 \pm 0,004$.

Кількісне визначення венлафаксина проводили при $\lambda_{max}=280$ нм за залежністю площі піку від концентрації

(мкг/мл). Попередньо був вивчений УФ-спектр абсорбції венлафаксина в метанолі, який мав три смуги поглинання при довжинах хвиль 226 ± 2 ($A_1 = 339,0$), 277 ± 2 ($A_1 = 43,8$) та 284 ± 2 нм ($A_1 = 37,0$). Для побудови калібрувального графіка готували стандартний розчин (СР) з вмістом 1131 мкг/мл препарату, що в перерахунку відповідав 1000 мкг/мл венлафаксина-основи. Готували десять робочих стандартних розчинів (РСР) у діапазоні концентрацій 10 – 400 мкг/мл, для цього 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,5; 3,0 та 4,0 мл СР вносили до мірних колб місткістю 10 мл та доводили об'єми розчинів до позначки метанолом; концентрація венлафаксина в отриманих РСР становила відповідно 10; 20; 30; 50; 80; 100; 150; 250; 300 та 400 мкг/мл. Калібрувальний графік описувався рівнянням $y = (0,00370 \pm 2,5 \cdot 10^{-5})x$. Лінійність спостерігали в межах концентрацій венлафаксина 15,0 – 400 мкг/мл; LOD становив 4,0 мкг/мл ($\text{LOD} = 3,3S_a^2/b$), LOQ становив 12,2 мкг/мл ($\text{LOQ} = 10S_a^2/b$). Правильність розробленої методики складала 102,7% в області низьких концентрацій ($\text{RSD} = 1,2\%$), 100,1–100,3% в областях середніх та високих концентрацій ($\text{RSD} = 0,2\text{--}0,3\%$). За допомогою розробленої методики з крові було виділено $36 \pm 3\%$ венлафаксина.

ВИСНОВКИ

Розроблена методика ідентифікації та кількісного визначення венлафаксина в крові методом ВЕРХ з мультихвильовим УФ-спектрофотометричним детектуванням задовольняє вимогам до методів, які рекомендовано для використання в судовій токсикології [11, 12], що підтверджено валідаційними характеристиками. Методика пропонується для використання в практиці токсикологічних відділень бюро судово-медичної експертизи та клінічних лабораторій по визначенню лікарських речовин в біологічних рідинах людини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дубницкая Э.Б. Перспективы психофармакотерапии депрессий – тимоаналептик двойного действия венлафаксин (обзор зарубежной литературы) // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2008. – Т. 10, № 1. – С. 21–27.

2. Top 200 Brand Drugs by Units in 2007. Drug Topics. February 25, 2008 [Electronic resource] // URL: <http://drugtopics.modernmedicine.com/drugtopics/data/articlestandard//drugtopics/072008/491207/article.pdf> [accessed: November 16, 2013].
3. Baselt C.R. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man: 9th ed. – Seal Beach, California: Biomedical Publications, 2011. – 1900 p.
4. Long C., Crifasi J., Maginn D. et al. Comparison of analytical methods in the determination of two venlafaxine fatalities // J. Anal. Toxicol. – 1997. – 21. – P. 166–169.
5. Martinez M.A., de la Torre C.S., Almarza E. 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 // J. Anal. Toxicol. – 2002. – 26 (5). – P. 296–302.
6. Papoutsis I., Khraiweh A., Nikolaou P. et al. A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2012. – 70. – P. 557–562.
7. Salgado-Petinal C., Lamas J.P., Garcia-Jares C et al. Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. – 2005. – 382. – P. 1351–1359.
8. Raut B.B., Kolte B.L., Deo A.A. et al. A rapid and sensitive HPLC method for the determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma with UV detection // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. – 2003. – 26. – P. 1297–1313.
9. Patel B.N., Sharma N., Sanyal M. et al. 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 // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2008. – 47. – P. 603–611.
10. Qin F., Li N., Qin T. et al. 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 // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. – 2010. – 878. – P. 689–694.
 11. Державна Фармакопея України. Доп. 2. / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х. : Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
 12. SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines. – 2006. – 24 р. – [Електронний ресурс], режим доступу: http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf.