

УДК 615.214.24:543.05:543.544.5.068.7

І.Й. Галькевич, Б.С. Зіменковський

ЗАСТОСУВАННЯ Н-КЛИНОПТИЛОЛІТУ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПЛАЗМИ КРОВІ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ВЕНЛАФАКСИНУ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,
м. Львів, Україна

e-mail: galkirin@meduniv.lviv.ua

Резюме: У статті наводяться результати експериментальних досліджень твердофазної екстракції венлафаксину з водних розчинів та плазми крові на колонках з Н-клинотилолітом. Підібрано умови кондиціонування сорбційних колонок та оптимальний елюент. Розроблено умови визначення венлафаксину методом високоєфективної рідинної хроматографії.

Ключові слова: венлафаксин, плазма, Н-клинотилоліт, метод ВЕРХ.

Вступ. Венлафаксин, є одним із представників класу антидепресантів другого покоління, що із середини 90-х років ХХ ст. широко використовується в медичній практиці для лікування важкої депресії та тривожних неврозів^{1,4}. За механізмом дії є інгібітором зворотнього захоплення серотоніну та норадреналіну, а в хімічному відношенні це представник класу похідних фенілетиламіну із структурною формулою, представленою на рис. 1.

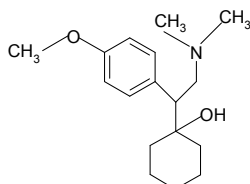


Рис.1. Структурна формула венлафаксину

Терапія із застосуванням венлафаксину є довготривалою, тому при припиненні прийому спостерігається синдром відміни^{6,10,12}. Недотримання умов застосування, одночасне поєднання венлафаксину з алкоголем та антикоагулянтами стають причиною появи симптомів побічної та токсичної дії, часто з летальними наслідками. В останні роки значно зросла кількість смертельних отруєнь венлафаксином в результаті передозування^{3,5,8}.

Для контролю рівня концентрації венлафаксину в крові (сироватка, плазма) широко використовують хроматографічні методи дослідження, серед яких найпоширеніший ме-

тод високоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). У цих дослідженнях аналіз проводиться на колонках *Chiralpak AD, C8, C18*. При підготовці біологічної рідини для дослідження методом ВЕРХ очистка та концентрування здійснюється методами рідинної екстракції чи мікроекстракції^{2,7,11}.

В останні роки одним із перспективних методів очистки біологічної проби є метод твердофазної екстракції. Тому значна увага приділяється пошуку нових сорбентів, які можна широко використовувати при проведенні серійних досліджень. Як показали наші експериментальні дослідження, одним із доступних та ефективних сорбентів є представник класу цеолітів – клинотилоліт. Цей сорбент широко застосовується в промисловості для концентрування іонів важких металів, очистки води та промислових стоків, концентрування газів, тощо^{13,14}. Значні родовища клинотилоліту розташовані в с. Сокирниця Хустського району Закарпатської області і є доступні для широкого кола споживачів. Сорбент характеризується високими іонообмінними властивостями та «ситовим» ефектом. Експериментальними дослідженнями було встановлено, що клинотилоліт також ефективно сорбує органічні сполуки, до яких теж відносяться лікарські засоби і його можна ефективно використовувати при очистці біологічних проб⁹. Це дозволяє розробляти селективні методики концентрування, розділення і відокремлення органічних речовин

від домішок білків, жирів, електролітів при дослідженні біологічних рідин.

Метою дослідження було вивчення сорбційних властивостей Н-клинотилоліту щодо венлафаксину та встановлення ефективності твердофазної екстракції цього засобу із плазми цим сорбентом.

Матеріали та методи дослідження. Для виготовлення сорбційних колонок використовували клинотилоліт із Сокирницького родовища Закарпатської області (ТУУ 14.5-00292540.01) із масовим складом у %: SiO_2 – 71,5; Al_2O_3 – 13,1; Fe_2O_3 – 0,9; TiO_2 – 0,5; CaO – 3,44; MgO – 0,68; P_2O_5 – 0,014, $\text{K}_2\text{O-Na}_2\text{O}$ – 3,03; масове співвідношення $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ – 5,5. Для досліджень відбирали фракцію клинотилоліту з діаметром зерен 0,20-0,215 мм.

Оскільки клинотилоліт містить пил, сорбент промивали дистильованою водою шляхом декантації, після чого висушували при 60°C. Встановлено, що Н-формою клинотилоліту сорбуються вищі кількості венлафаксину. Для отримання Н-форми сорбент настоювали з 1 М розчином хлоридної кислоти 6 год. (на 1 г сорбенту припадало 20 мл розчину кислоти). Після настоювання клинотилоліт промивали дистильованою водою до негативної реакції на хлорид-іони, висушували при 105-110°C та зберігали в ексікаторі. Для виготовлення сорбційних колонок використовували медичні шприци об'ємом 2 см³, в які поміщали по 0,6 г сухого сорбенту (між фільтри). Перед внесенням проби (водний розчин венлафаксину чи плазми з досліджуваним засобом) сорбент у колонках промивали 2 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти у метанолі та 2 мл води. Після пропускання досліджуваної проби сорбент в колонках промивали 4 мл дистильованої води та 4 мл водно-метанольного розчину (1:1) та підсушували в потоці азоту. Елюювали венлафаксин з сорбенту 3 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти у метанолі.

Проби, що містили венлафаксин пропускали через колонки із швидкістю 0,5 мл/хв, всі інші розчинники – із швидкістю 1 мл/хв. Елюати випаровували в потоці азоту та розчиняли в 1 мл метанолу.

При розробці умов концентрування венлафаксину на колонках з Н-клинотилолітом та виборі оптимального елюенту через сорбційні колонки пропускали по 2 мл водних розчинів препарату, в яких містилось 0,4; 1,0; 2,0; 10,0 та 20,0 мкг венлафаксину у внесений пробі. При визначенні залежності ефективності очистки та концентрування венлафаксину на колонках з Н-клинотилолітом у 2 мл плазми вводили водний розчин венлафа-

ксину, щоб концентрація препарату в 1 мл плазми становила 0,2, 0,5, 1,0; 5,0 та 10,0 мкг/мл.

Водні розчини та модельні суміші плазми з венлафаксином досліджували у день виготовлення та через 24 год. після виготовлення. При цьому відібрані зразки плазми з внесеним препаратом зберігали при -5°C, а водні розчини – при 7°C.

Вміст венлафаксину у метанольних розчинах визначали методом ВЕРХ, застосовуючи методику абсолютної калібровки. Рівняння градувальної прямої розраховували методом найменших квадратів. Для цього готували серію розчинів венлафаксину гідрогенхлориду (*Sigma, USA*) у метанолі із концентраціями 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 та 20 мкг/мл.

Дослідження проводили на хроматографі *Waters 2690 (Separation Module)* та колонці *ACE 5 C18 (Silica Type, 250 мм x 4, 6 мм)*. Температура колонки в робочому стані 25°C. Рухома фаза: суміш ацетонітрилу (розчин А) та 0,05% водний розчин трифлуорацетатної кислоти (ТФА) (розчин Б).

Розчин трифлуорацетатної кислоти готували на бідистильованій та демінералізованій воді. Застосовували градієнтний режим подачі рухомої фази. Співвідношення між об'ємами розчинів А та Б протягом 1-ої хвилини – 90:10, з 2-ої по 20-ту хвилину – 40:60, з 21-ої по 25-ту хвилину – 10:90 і з 26-ої по 30-ту хвилину – 95:5. Швидкість рухомої фази 1 мл/хв, об'єм введеної проби 10 мкл. Довжина хвилі детектування 224 нм (діодноматричний детектор). Ацетонітрил, трифлуорацетатна кислота та метанол відповідали кваліфікації розчинників для ВЕРХ (*Merck, Germany*). Всі інші реагенти відповідали кваліфікації х.ч. чи ч.д.а. Плазму отримували у Львівській обласній станції переливання крові і зберігали при -20°C.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що градувальний графік кількісного визначення венлафаксину методом ВЕРХ у метанольних розчинах в діапазоні концентрацій 0,2-20 мкг/мл описується рівнянням: $Y=2,4 \cdot 10^4 \cdot X+4,57 \cdot 10^3$, де Y – площа піку, X – концентрація венлафаксину, мкг/мл ($r=0,9995$).

Час утримування піку венлафаксину $11,998 \pm 0,033$ хв. Компоненти плазми, які потрапляють в елюат характеризуються відмінними параметрами утримування, ніж параметри утримування венлафаксину (рис. 2).

Вміст домішок у досліджуваних пробах не перевищує 3% (розраховано методом внутрішнього нормування) і ступінь очистки на колонках з Н-клинотилолітом є задовільною.

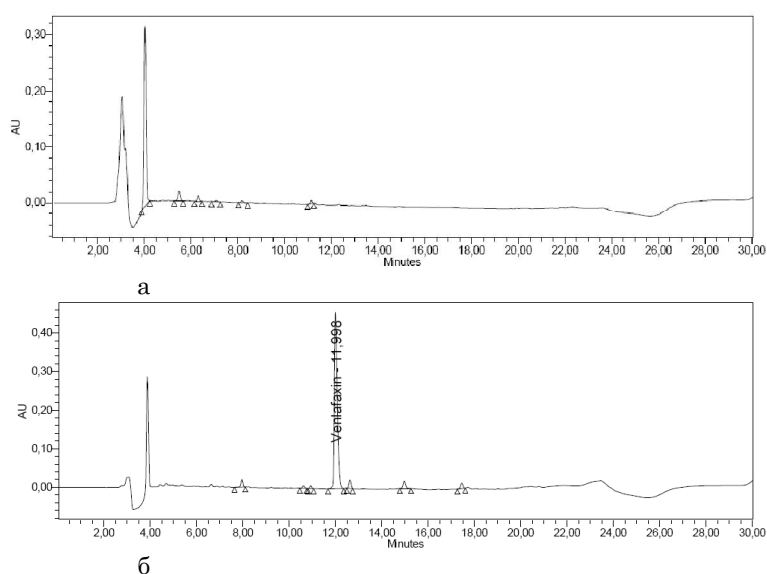


Рис. 2. Хроматограма проб плазми, після очистки на колонці з Н-клинотилолітом (а – контрольна проба, б – проба плазми із венлафаксином).

Встановлено, що венлафаксин у найвищих кількостях елююється із колонок з Н-клинотилолітом 0,1 М розчином хлоридної кислоти в метанолі. Сорбційна ємність Н-клинотилоліту відносно венлафаксину становить

1430 мкг/г. Сорбційну колонку з Н-клинотилолітом можна використовувати до 10-12 разів. Регенерація колонки проводиться 4 мл водно-метанольного розчину (1:1) та 2 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти у метанолі.

Таблиця 1. Відтворюваність результатів очистки венлафаксину на колонках з Н-клинотилолітом (n= 5 для кожної серії концентрацій)

Об'єкт дослідження	Вміст венлафаксину у пробі, мкг	Дослідження першого дня			Дослідження другого дня		
		Визначено венлафаксину		R.S.D., %	Визначено венлафаксину		R.S.D., %
		мкг ± S. D.	%		мкг ± S. D.	%	
Водний розчин, 2 мл	0,4	0,382 ± 0,019	95,5	4,97	0,384 ± 0,024	96,0	6,25
	1,0	0,996 ± 0,011	99,6	1,10	0,999 ± 0,022	99,9	2,15
	2,0	1,998 ± 0,033	99,9	1,65	1,998 ± 0,036	99,9	1,80
	10,0	10,046 ± 0,010	100,5	0,99	10,034 ± 0,100	100,3	1,00
	20,0	19,924 ± 0,172	99,6	0,86	19,916 ± 0,177	99,6	0,89
Плазма, 2 мл	0,4	0,310 ± 0,025	77,5	8,06	0,308 ± 0,028	77,0	9,09
	1,0	0,764 ± 0,044	76,4	5,76	0,758 ± 0,018	75,8	2,37
	2,0	1,554 ± 0,015	77,7	0,96	1,554 ± 0,010	77,7	0,64
	10,0	7,752 ± 0,066	77,6	0,85	7,696 ± 0,055	76,9	0,71
	20,0	15,420 ± 0,52	77,1	3,38	15,580 ± 0,540	77,9	3,46

В табл. 1 наведено значення ступеня ізолювання венлафаксину із водних розчинів та із плазми на колонках з Н-клинотилолітом. Ці дані показують, що при використанні Н-клинотилоліту із водних розчинів ізолюється 95,5-100,5% венлафаксину, а із плазми – 75,8-77,7%. Результати паралельних серій

досліджень є відтворюваними. Максимальна внутрішньо серійна відносна похибка визначення венлафаксину у пробах, після твердофазної екстракції на колонках з Н-клинотилолітом у розчинах не перевищує 6,25%, а у плазмі – 9,09%.

Висновки:

1. Підібрано умови концентрування венлафаксину на колонках з Н-клинотилолітом з водних розчинів та плазми крові. З водних розчинів Н-клинотилолітом можна вилучити 95,5-100,5% венлафаксину, а з плазми – 75,8-77,7%.
2. Опрацьовані умови кількісного визначення венлафаксину методом ВЕРХ на колонці ACE 5 C18 при довжині хвилі 224 нм.

Література:

1. Канаева Л.С. Терапия селективными ингибиторами обратного захвата серотонина и венлафаксином: особенности формирования ремиссии / Л.С. Канаева, К.В.Захарова // Фарматека. – 2008. – № 3-08. – С. 45-49.
1. Dziurkowska E. Extraction techniques for analysis of venlafaxine and its metabolites in biological matrices / E. Dziurkowska, M. Wesolowski // Psychiatr. Pol. – 2013. – №5. – P. 909-919.
2. Goeringer K.E. Postmortem tissue concentrations of venlafaxine / K.E. Goeringer, I.M. McIntyre, O.H. Drummer // Forensic. Sci. Int. – 2001. – V.121. – P.70-75.
3. Jarema M. Psychiatria / M. Jarema, J. Rabe-Jablonska. – Warszawa: PZWL, 2011. – 706 p.
4. Leikin J.B. Post-mortem toxicology: what the dead can and cannot tell us / J.B. Leikin, W.A. Watson // Journal of toxicology: clinical toxicology. – 2003. – №1. – P. 47-56.
5. Lopez Ibor J.J. Effectiveness and safety of venlafaxine extended release in elderly patient / J.J. Lopez Ibor, J.L. Carrasco., R. Prieto // Arch. Geront. Geriatrics. –2008. – V.46. – P.317-326.
6. Mandrioli R. Analysis of the second generation antidepressant venlafaxine and its main active metabolite o-desmethylvenlafaxine in human plasma by HPLC with spectrofluorometric detection / R. Mandrioli, L. Mercolini, S. Cesta // J. Chromatogr. B. – 2007. – V. 856. – P. 88-94.
7. Milner A. Suicide research: selected reading / A. Milner, K.E. Kolves, D.De Leo // Griffith University, 2011. – 210 p.
8. Natural zeolite in medicine: SWB Bourgas, 2010. – 302 p.
9. Plesničar B.K. Efficacy and tolerability of venlafaxine release in patients with major depressive disorder / B.K. Plesničar // Psychiatria Danubina. – 2010. – V.22. – №3. – P. 413-417.
10. Qin X. Determinatio of venlafaxine in human plasma by HPLC using cloud-point extraction and spectrofluorometric detection / X. Qin, J. Meng, A. Sanches // J. Chromatogr. B. – 2008. – V. 872. – P. 38-42.
11. Uzun S. Management of side effects of antidepressants – brief review of recommendations from guidelines for treatment of major depressive disorder // S. Uzun, O. Kozumplik // Psychiatria Danubina. – 2009. – V.21. – P. 91-94.
12. Vasylechko V.O. Sorption of terbium on transcarpatian clinoptilolite / V.O.Vasylechko, G.V. Gryshchouk, V.P. Zakordonskiy // Microporous and Mesoporous Materials. – 2013. – V. 167. – P. 155-161.
13. Vasylechko V.O. Adsorption of cadmium on acid-modified transcarpatian / V.O. Vasylechko, G.V. Gryshchouk, Yu.B. Kuz'ma // Microporous and Mesoporous Materials. – 2003. –V. 60. – P. 183-196.

УДК 615.214.24:543.05:543.544.5.068.7

ПРИМЕНЕНИЕ Н-КЛИНОПТИЛОЛИТА ДЛЯ ОЧИСТКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ВЕНЛАФАКСИНА МЕТОДОМ ВИСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

И.И. Галькевич, Б.С. Зименковский

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г. Львов, Украина

Резюме: В статье представлены результаты экспериментальных исследований твердофазной экстракции венлафаксина с водных растворов и плазмы крови на колонках с Н-клиноптилолитом. Выбраны условия кондиционирования сорбционных колонок и оптимальный элюент. Разработаны условия определения венлафаксина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: венлафаксин, плазма, Н-клиноптилолит, метод ВЭЖХ.

UDC 615.214.24:543.05:543.544.5.068.7

DETERMINATION OF VENLAFAXINE IN BLOOD PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AFTER PURIFICATION ON H-CLINOPTILOLITE COLUMNS

I.J. Halkevych, B.S. Zimenkovsky

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Summary: Results of experimental investigation of venlafaxine solid-phase extraction from water solutions and plasma on H-clinoptilolite columns are represented in this article. Conditions of the columns conditioning and optimal eluent are chosen. HPLC technique of venlafaxine quantification is elaborated.

Keywords: venlafaxin, plasma, H-clinoptilolite, HPLC.

Надійшла до редакції 18.11.2013 р.