

## Techniki ekstrakcyjne w analizie wenlafaksyny i jej metabolitów w materiale biologicznym

### Extraction techniques for analysis of venlafaxine and its metabolites in biological matrices

Ewelina Dziurkowska, Marek Wesołowski

Katedra i Zakład Chemii Analitycznej GUM  
Kierownik: prof. dr hab. n. farm. M. Wesołowski

#### Summary

Venlafaxine (VEN), which was introduced into therapy in 1990s is one of the most often used antidepressants. The monitoring of its concentration in the organism is recommended, particularly in the case when a patient suffers of others illnesses and is treated with different drugs, which can interfere with VEN. The most popular diagnostic material for the determination of VEN level is blood. The present study is the review of actual reports on the methods of extraction of VEN and its metabolite from blood and other human diagnostic materials, like saliva and urine, and also from animals tissues. The paper shows the classic extraction methods, such as liquid-liquid extraction and solid-phase extraction. It also contains the modifications of these methods such as liquid-phase microextraction and cloud point extraction. According to the literature it can be stated that the best recovery of VEN and its main metabolite, O-demethylvenlafaxine, was obtained when the liquid-liquid extraction was used. The new, modified methods of extraction, are cost-effective, owing to the reduced use of solvents and also smaller volume of diagnostic material, but the results of the analysis, especially the recovery of the analytes, were lower than those obtained by classic methods of extraction.

**Słowa kluczowe:** wenlafaksyna, O-demetylowenlafaksyna, SPE, LLE, krew, ślina, mocz

**Key words:** venlafaxine, O-demethylvenlafaxine, SPE, LLE, blood, saliva, urine

#### Wstęp

Leki przeciwdepresyjne stosuje się od lat 50. XX w., kiedy to po raz pierwszy zaobserwowano poprawiające nastrój działanie izoniazydu, leku przeciwgruźliczego. Spowodowało to wprowadzenie do lecznictwa związku o podobnej strukturze – iproniazydu, klasyfikowanego jako inhibitor monoaminooksydazy. W tym samym okresie zauważono, że działanie poprawiające nastrój wykazuje również imipramina, pierwszy lek z grupy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych. Dalsze badania prowadzone w tym kierunku pokazały, że podobny efekt terapeutyczny można uzyskać działając na układ adrenergiczny, co skutkowało wprowadzeniem w połowie lat 70.

XX w. selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego adrenaliny. Punktem zwrotnym w terapii depresji było pojawienie się w latach 80. XX w. selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny, które są aktualnie najczęściej stosowane w leczeniu depresji. Dopiero pod koniec XX w. pojawiły się pierwsze selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny, takie jak np. wenlafaksyna [1, 2].

Wenlafaksynę (VEN), lek przeciwdepresyjny drugiej generacji, wprowadzono do lecznictwa w 1993 r. Otrzymuje się ją w postaci mieszaniny dwóch enancjomerów, z których każdy ma inny wpływ na wychwyt zwrotny neuroprzekaźników w szczelinie synaptycznej. Forma (-)-(R) blokuje wchłanianie noradrenaliny i serotoniny, podczas gdy enancjomer (+)-(S) jest inhibitorem wychwytu zwrotnego tylko serotoniny. Z danych literaturowych wynika ponadto, że VEN w niewielkim stopniu działa hamująco na wychwyt zwrotny dopaminy [3, 4].

VEN najczęściej jest stosowana w leczeniu i zapobieganiu nawrotom epizodów ciężkiej depresji o różnym podłożu. Podawana jest również w terapii uogólnionych zaburzeń lękowych, fobii społecznych, lęków napadowych i zespołów agorafobii [5, 6]. Preparaty VEN to tabletki konwencjonalne bądź tabletki lub kapsułki o przedłużonym uwalnianiu. Sposób dawkowania uzależniony jest od przyjmowanej formy leku. Tabletki konwencjonalne w dawce podzielonej podawane są najczęściej 2–3 razy dziennie, natomiast formy o przedłużonym uwalnianiu (retard) raz dziennie. Zakres dawkowania wynosi zazwyczaj od 75 do 225 mg/d. w leczeniu depresji bądź od 150 do 225 mg/d. w przypadku terapii zaburzeń lękowych uogólnionych [6].

### Farmakokinetyka, interakcje, działania niepożądane

Z pojedynczej dawki VEN wchłania się przynajmniej w 92%, a po wchłonięciu podlega w znacznym stopniu efektowi pierwszego przejścia przez wątrobę. Jej całkowita dostępność biologiczna mieści się w granicach od 40 do 45% – w zależności od metabolizmu w organizmie [7]. W krwiobiegu wiąże się z białkami osocza w 27%. VEN jest transformowana przez dwa enzymy z grupy cytochromu P450: CYP2D6 i CYP3A4, przy czym jest uważana za słaby inhibitor izoenzymu CYP2D6 odpowiadającego za proces O-demetylacji [8, 9]. Jej główny i najważniejszy metabolit, O-demetylowenlafaksyna (ODV), tworzy się w ilości 56%, posiada aktywność farmakologiczną i ma podobny wpływ na wychwyt zwrotny monoamin jak VEN. Pozostałe metabolity – N,O-didemetylowenlafaksyna (16%) i N-demetylowenlafaksyna (1%) – nie odznaczają się aktywnością biologiczną [3].

Średni okres półtrwania VEN wynosi  $5 \pm 2$  h, natomiast jej głównego metabolitu, ODV,  $11 \pm 2$  h. Znaczna część leku, około 87%, wydalana jest przez nerki w ciągu 48 h, w tym w postaci niezmienionej (5%), wolnej ODV (29%), sprzężonej ODV (26%) bądź w formie nieaktywnych metabolitów (27%). U osób z zaburzeniami czynności nerek okres półtrwania w fazie eliminacji jest znacznie dłuższy, co skutkuje koniecznością zmniejszenia przyjmowanej dawki [7].

Mimo iż VEN oraz ODV w niewielkim stopniu wpływają na enzymy wątrobowe, mogą wykazywać interakcje z lekami metabolizowanymi przez te same izoenzymy. W przypadku równoczesnego stosowania inhibitorów CYP2D6, np. difenhydraminy,

dochodzi do wzrostu poziomu VEN we krwi [8]. Natomiast substancje indukujące ten izoenzym powodują przyspieszenie metabolizmu VEN i skrócenie czasu działania leku. Podobnie – zastosowanie inhibitorów CYP3A4 odpowiadających za metabolizm ODV, np. ketokonazolu, może przyczynić się do wzrostu poziomu ODV we krwi, a także obniżenia jej klirensu. Ma to szczególne znaczenie z uwagi na okres półtrwania ODV, który jest dłuższy niż VEN [8, 9].

W piśmiennictwie zwraca się szczególną uwagę na możliwość wystąpienia zespołu serotoninowego w trakcie leczenia VEN. Jest to stan potencjalnego zagrożenia życia, zwłaszcza w przypadku podawania leku razem z innymi substancjami wpływającymi na przewodnictwo serotoninergiczne, jak np. inhibitory monoaminooksydazy (IMAO) [7]. Dlatego też nie należy stosować tych leków jednocześnie z VEN. Nie powinno się też rozpoczynać leczenia VEN wcześniej niż 14 dni po zakończeniu leczenia inhibitorami MAO. Wymagana jest również siedmiodniowa przerwa po zakończeniu leczenia VEN w celu dalszego leczenia inhibitorami MAO. Okres ten należy także zachować stosując sole litu.

VEN może zwiększać ryzyko krwawienia poprzez zaburzenie czynności płytek krwi. Jest to szczególnie niebezpieczne u pacjentów przyjmujących antykoagulanty i inhibitory płytek krwi. Dlatego też w takich przypadkach VEN należy stosować z dużą ostrożnością. Nie powinna ona zaburzać funkcji umysłowych i motorycznych, zależy to jednak od cech osobniczych pacjenta. Może nasilać działanie etanolu, dlatego nie jest wskazane spożywanie alkoholu w trakcie leczenia VEN, podobnie jak w przypadku wszystkich substancji oddziałujących na OUN [7].

Najczęściej występujące objawy niepożądane w terapii VEN, stwierdzone podczas badań klinicznych u więcej niż jednej osoby na dziesięć, to nudności, suchość w ustach, ból głowy, pocenie się, w tym poty nocne. Z kolei nagłe przerwanie leczenia może doprowadzić do objawów odstawienia, do których zalicza się m.in. zawroty głowy, pobudzenie lub lęk, zaburzenia czucia, snu (w tym bezsenność lub intensywne sny), nudności, wymioty, drgawki, ból głowy i objawy grypopodobne. Objawy te mają zazwyczaj łagodny przebieg i powinny ustąpić samoistnie.

### **Metody ekstrakcji VEN z materiału biologicznego**

Duże znaczenie VEN w terapii depresji skutkuje koniecznością opracowania odpowiednich metod analitycznych umożliwiających monitorowanie poziomu leku i jego metabolitów w organizmie. Metody te powinny odznaczać się takimi cechami, które umożliwią oznaczenie VEN i jej aktywnego metabolitu w zakresie stężeń terapeutycznych obu analitów. Dane literaturowe wskazują, iż stężenie terapeutyczne VEN powinno mieścić się w granicach od 0,07 do 0,3 mg/L, natomiast ODV 0,2–0,5 mg/L. Wielokrotne podanie VEN powoduje, że jej poziom we krwi waha się w przedziale 0,07–0,27 mg/L, a ODV 0,24–0,52 mg/L [10]. Z kolei wyniki badań farmakokinetyki VEN wskazały, że jej stężenie we krwi u 1 781 pacjentów mieściło się w granicach 0,13–2,50 mg/L (127,6–2496,6 µg/L) [11]. Zaobserwowano także, że w przypadku pacjentów po 65 r.ż. oraz kobiet poziom VEN we krwi był wyższy mimo leczenia zwykle

stosowanymi dawkami terapeutycznymi. Świadczy to o konieczności monitorowania poziomu VEN, w szczególności w przypadku tych grup pacjentów.

Najczęściej stosowanymi materiałami diagnostycznymi, w których oznaczano stężenie VEN i jej metabolitów, są osocze i surowica krwi. Prowadzono również badania nad wykorzystaniem w tym celu śliny i moczu. Ponadto VEN oznaczano w materiale pochodzenia zwierzęcego, np. w wątrobie i mózgu szczurów. W związku z powyższym postanowiono dokonać przeglądu piśmiennictwa pod kątem oceny przydatności metod ekstrakcyjnych do przygotowania materiału biologicznego w celu oznaczenia w nim VEN i jej metabolitów.

### Ekstrakcja typu SPE

Jak wynika z danych literaturowych, technika ekstrakcji do fazy stałej (Solid-Phase Extraction – SPE) jest jedną z najczęściej stosowanych metod izolacji VEN i jej metabolitów z materiału biologicznego. Jest ona wybierana z racji swojej selektywności. Pozwala także uzyskać dobry stopień oczyszczenia próbki i wysoką wydajność ekstrakcji. W porównaniu z ekstrakcją typu ciecz-ciecz (Liquid-Liquid Extraction – LLE) ekstrakcja SPE jest znacznie mniej pracochłonna, jej zastosowanie pozwala ograniczyć zużycie toksycznych rozpuszczalników organicznych, a także umożliwia zwiększenie wykrywalności badanych związków.

Mandrioli i wsp. [12] oznaczali VEN i jej główny metabolit, ODV, w osoczu krwi pacjentów przyjmujących stałe dawki leku w ciągu dnia – 75 lub 150 mg. Do ekstrakcji zastosowano metodę SPE z użyciem kolumnienek typu C1, a oznaczanie przeprowadzono za pomocą HPLC z detekcją spektrofluorymetryczną, uzyskując całkowity odzysk powyżej 92% dla VEN, 93% dla ODV i 97% dla wzorca wewnętrznego, którym był citalopram. Zakres liniowości metody mieścił się w przedziale od 1 do 1000 ng/mL, natomiast granicę wykrywalności oszacowano na poziomie 0,3 ng/mL dla obu badanych związków.

Optymalizując proces ekstrakcji, stosowano też inne kolumnienki: hydrofilowo-lipofilową (HLB), cyjanopropylową (CN), fenyłową (PH) oraz C2 i C8. Uzyskane piki chromatograficzne po ekstrakcji przy użyciu kolumnienek typu HLB i CN były jednak zbyt niskie w stosunku do stężeń badanych substancji, a kolumnienki PH nie były wystarczająco selektywne. Z kolei kolumnienki C2 i C8 nie dawały satysfakcjonującego poziomu odzysku wzorca wewnętrznego, a ponadto użycie kolumnienek C8 nie pozwoliło na oznaczenie ODV, natomiast pik VEN na chromatogramie był zbyt niski w stosunku do jej stężenia. Stwierdzono również, że lepsze wyniki uzyskano przemycając kolumnienki 30% roztworem metanolu niż czystą wodą.

Clement i wsp. [13] oznaczali także VEN i ODV w osoczu krwi ludzkiej przy zastosowaniu ekstrakcji SPE z kolumnienkami zawierającymi żywicę krzemionkową z karboksymetylocelulozą. Analizy wykonano za pomocą HPLC z detekcją kulometryczną, uzyskując względnie wysoki całkowity odzysk dla VEN – 74%, a dla jej metabolitu – 67%. Krzywe kalibracji dla badanych związków mieściły się w zakresie stężeń 10–200 ng/mL, a granica wykrywalności dla obu substancji wyniosła 0,5 ng/mL. Dzięki zastosowaniu ekstrakcji SPE metoda okazała się znacznie szybsza i prostsza niż

ta przy użyciu ekstrakcji LLE i może być wykorzystana do określania stężeń analitów w małej objętości próbki. Zaobserwowano też, że użycie w procesie elucji 1% roztworu amoniaku w metanolu powodowało wzrost selektywności ekstrakcji, natomiast wyższe stężenia amoniaku zwiększały elucję do ekstraktów zanieczyszczeń z matrycy. Było to niekorzystne, ponieważ powodowało spadek selektywności ekstrakcji i pojawienie się dodatkowych pików na chromatogramach.

He i wsp. [14] w osoczu krwi ludzkiej oznaczali oprócz VEN także fluoksetynę, citalopram i paroksetynę. Badania przeprowadzono przy użyciu HPLC sprzężonej ze spektrometrią mas. W celu oczyszczenia próbek zastosowano ekstrakcję z kolumnami hydrofilowo-lipofilowymi (HLB1cc). Całkowity odzysk dla wszystkich czterech związków przekroczył 73%, przy czym dla VEN mieścił się w granicach od 87 do 95%. Metoda była liniowa w przedziale między 5 a 1000 ng/mL, natomiast granica wykrywalności dla VEN wyniosła 0,1 ng/mL. Porównując uzyskane dane z wynikami ekstrakcji LLE otrzymanymi we wcześniejszych badaniach, wykazano, że ekstrakcja typu SPE daje lepszą czułość oraz wyższy odzysk.

Kingbäck i wsp. [15] oznaczali VEN i jej metabolity, a także enancjomery tych związków w osoczu i w pełnej krwi ludzkiej. Do analizy wykorzystano chromatografię cieczą sprężoną z tandemową spektrometrią mas, a ekstrakcję SPE wykonano przy użyciu kolumny ze złożem C8. Całkowity odzysk dla VEN przekroczył 75%, liniowość dla VEN i ODV oznaczanych w osoczu wyniosła od 1 do 1000 nmol/L, a w pełnej krwi od 10 do 4000 nmol/L, natomiast dla N,O-didemetylowenlafaksyny i N-demetylowenlafaksyny 0,5–500 nmol/L w osoczu i 5–2000 nmol/L w pełnej krwi. Badania wykazały, że HPLC z tandemową spektrometrią mas nadaje się do oznaczania stężeń poszczególnych enancjomerów zarówno w osoczu, jak i w pełnej krwi – w przeciwieństwie do metody HPLC z detekcją UV, która okazała się mniej selektywna.

Ekstrakcja SPE zapewnia wysoki odzysk, co pozwala na użycie mniejszych objętości próbek. Jest to szczególnie ważne przy wykorzystaniu tej ekstrakcji podczas analizy pełnej krwi, ponieważ matryca tej próbki może prowadzić do szybkiego zatykania się kolumny.

Z punktu widzenia toksykologicznego istotne jest oznaczenie poziomu VEN i ODV w materiale uzyskanym *post mortem*. Wille i wsp. [16] oznaczali 12 substancji o działaniu przeciwdepresyjnym we krwi, mózgu i włosach samobójców. Przed przystąpieniem do izolacji analitów próbki mózgu odpowiednio oczyszczano z uwagi na dużą zawartość lipidów, a włosy przemywano w celu usunięcia zewnętrznych zanieczyszczeń. Oznaczanie analitów techniką GC/MS wykazało, że w mózgu i włosach można określić poziom VEN i ODV nawet wówczas, gdy nie jest to już możliwe we krwi. Ponadto zaobserwowano, że analizowane związki są równomiernie rozmieszczone w mózgu, w związku z czym nie ma potrzeby izolacji analitów z określonego obszaru mózgu. Analiza włosów dostarcza natomiast informacji o terapii VEN w ciągu ostatnich kilku lat.

Kingbäck i wsp. [17] izolowali VEN, ODV oraz enancjomery obu substancji z krwi żyły udowej osób zmarłych przy użyciu kolumny C8. Kolumny przemywano kolejno wodą, mieszaniną metanolu i wody, a następnie acetonitrylem, po czym elucję analitów przeprowadzono mieszaniną acetonitrylu i kwasu trifluoroctowego.

Analiza LC/MS/MS wykazała, że średnie stężenie VEN we krwi wynosiło od 0,1 do 1,0  $\mu\text{g/g}$ . Badając również metabolizm VEN wykryto, że szybkość tego procesu jest ściśle skorelowana z genotypem izoenzymu CYP2D6 pacjenta.

### Ekstrakcja typu LLE

Ekstrakcja ciecz-ciecz jest drugim obok ekstrakcji SPE najczęściej stosowanym sposobem izolacji VEN i jej metabolitów z matrycy biologicznej. Często charakteryzuje się ją jako dającą gorsze wyniki i niższą czułość w porównaniu z SPE. Jednak zwraca uwagę to, że w przeciwieństwie do ekstrakcji SPE nie wymaga użycia specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego, a ponadto sprawdza się w badaniach rutynowych [18].

Metodę ekstrakcji typu LLE zastosowali Luan Vu i wsp. [3], oznaczając VEN i jej główny metabolit w osoczu krwi ludzkiej za pomocą HPLC z detekcją fluorymetryczną. Do ekstrakcji wykorzystano mieszaninę alkoholu izoamyłowego i heksanu (7,5/92,5 v/v), natomiast jako wzorca wewnętrznego użyto maprotylinę. Optymalizując proces ekstrakcji stwierdzono, że wyższe stężenie alkoholu izoamyłowego w mieszaninie zwiększa odzysk ODV, co wynika z lepszej niż VEN rozpuszczalności metabolitu w tym rozpuszczalniku. Jednocześnie powoduje to obniżenie odzysku VEN, a ponadto zwiększa stopień ekstrakcji związków endogennych, które mogą zakłócić oznaczenie. Wskazano, że zastosowana metoda ekstrakcji zapewnia odpowiednio wysoką czułość podczas jednoczesnego oznaczania VEN i ODV w osoczu krwi ludzkiej. Odzysk dla VEN wynosi około 100%, a dla ODV prawie 70%. Metoda jest liniowa dla obu analitów w zakresie stężeń 1–2000 ng/mL, a granica wykrywalności wynosi 1 ng/mL dla VEN i 5 ng/mL dla ODV.

Matoga i wsp. [19] również oznaczali VEN i ODV w osoczu krwi ludzkiej, używając do oznaczeń HPLC z detekcją UV. Do ekstrakcji LLE użyto mieszaninę alkoholu izoamyłowego i heksanu (1/99 v/v), a jako wzorzec wewnętrzny opipramol. W celu zwiększenia odzysku VEN i ODV z matrycy biologicznej, a także lepszego oczyszczenia próbki z endogennych składników osocza, zastosowano chloroform, octan etylu, eter dietylowy i heksan. Wyniki badań wykazały, że spośród tych rozpuszczalników tylko heksan umożliwił odpowiednie oczyszczenie próbki. Chloroform umożliwił oznaczenie VEN w zakresie badanych stężeń, jednak na chromatogramach pojawiły się dodatkowe piki pochodzące z matrycy. Krzywe kalibracji były liniowe dla obu związków w zakresie stężeń 0,2–4  $\mu\text{g/mL}$ .

Rudaz i wsp. [20] zastosowali elektroforezę kapilarną z detekcją DAD do oznaczania VEN i jej głównego metabolitu oraz ich enancjomerów w osoczu krwi ludzkiej. W badaniach wykorzystano cyklodekstryny obdarzone ładunkiem, które dodano do fazy ruchomej. Do izolacji analitów za pomocą ekstrakcji typu ciecz-ciecz zastosowano mieszaninę heksan-octan etylu (80/20 v/v), która umożliwiła oczyszczenie próbek z zanieczyszczeń pochodzących z matrycy i zapewniła najlepszy odzysk VEN i jej głównego metabolitu – powyżej 70%. Wzorcem wewnętrznym był chlorowodorek tramadolu, a metoda była liniowa w zakresie stężeń 25–500 ng/mL.

Jednostopniową ekstrakcję LLE wykorzystali również Qin i wsp. [21] do oznaczania VEN i ODV w osoczu krwi ludzkiej szybką chromatografią cieczową (Ultra

Performance Liquid Chromatography – UPLC) sprzężoną z tandemową spektrometrią mas. W trakcie optymalizacji ekstrakcji zastosowano m.in. octan etylu, cykloheksan i heksan, ale najlepsze wyniki uzyskano stosując eter dietylowy, który charakteryzował się największą lotnością i znacząco skracał czas przygotowania próbki. Wzorcem wewnętrznym był werapamil, a całkowity odzysk dla VEN i jej metabolitu przekroczył 88%. Dla obu badanych związków metoda była liniowa w zakresie stężeń 0,2–200 ng/mL; granica wykrywalności – 0,2 ng/mL. Stwierdzono, że metoda jest bardzo szybka i czuła oraz nadaje się do oznaczania VEN i ODV w osoczu krwi ludzkiej.

Tournel i wsp. [22] oprócz VEN oznaczali także inne leki przeciwdepresyjne w surowicy krwi ludzkiej: fluoksetynę, citalopram, sertralinę, paroksetynę, milnacipram i fluwoksaminę. Do oznaczeń wykorzystano HPLC z detekcją UV i klomipraminę jako wzorzec wewnętrzny. Badane związki ekstrahowano z surowicy mieszaniną chloroformu, 2-propanolu i n-heptanu (960/14/26 v/v/v), co pozwoliło na uzyskanie odzysku rzędu 86,4% i liniowości w przedziale 25–500 ng/mL. Mieszaninę tych rozpuszczalników zastosowano z tego względu, że nie tworzy emulsji w trakcie ekstrakcji. Zapewnia ponadto dobry odzysk analitów z badanych próbek.

Ekstrakcję LLE wykorzystali też Goeringer i wsp. [10] do oznaczania VEN i ODV w wątrobie, krwi obwodowej, żółci, moczu i ciele szklistym, materiale pochodzącym w większości przypadków od samobójców. Do homogenizacji wątroby użyto ultradźwięków, a po inkubacji próbek w roztworze NaOH o stężeniu 10 mol/L i izolacji analitów chlorkiem butylu analizowano je techniką LC-MS. Wykazano, iż w materiale *post mortem* zarówno VEN, jak i ODV występują w stężeniu wyższym w wątrobie i żółci niż w ciele szklistym i krwi obwodowej. Dodatkowo określono również stosunek VEN do ODV w każdej z tkanek, stwierdzając, że w przypadku samobójców wynosi on w przybliżeniu 10:1.

### Zmodyfikowane techniki ekstrakcji

Obok klasycznych technik ekstrakcji VEN i jej metabolitów z materiału biologicznego, w piśmiennictwie można spotkać także liczne ich modyfikacje. Należą do nich: ekstrakcja micelarna w punkcie zmętnienia (Cloud Point Extraction – CPE), ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego (Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE), a także mikroekstrakcja do fazy ciekłej (Liquid-Phase Microextraction – LPME). Modyfikacje mają na celu ograniczenie zużycia rozpuszczalników i zmniejszenie objętości próbki materiału biologicznego koniecznej do analizy.

Qin i wsp. [23] zajmowali się oznaczaniem VEN w osoczu krwi za pomocą HPLC z detekcją spektrofotometryczną. Do ekstrakcji VEN zastosowano metodę typu CPE. W technice tej do badanej próbki dodawany jest surfaktant, po czym ogrzewa się próbkę do takiej temperatury, w której dochodzi do rozdziału fazy surfaktantu od fazy wodnej, przy czym analit przechodzi z fazy wodnej do fazy surfaktantu. W badaniach wykorzystano niejonowy surfaktant Triton X-114 (eter glikolu polietylenowego i tert-oktylofenylu) i maprotylinę jako wzorzec wewnętrzny. Stwierdzono, że ekstrakcja CPE w porównaniu z klasycznymi technikami ekstrakcji jest łatwa w wykonaniu i bardziej efektywna. Jej zastosowanie nie wymaga dużej objętości toksycznych roz-

puszczalników, co zmniejsza m.in. zanieczyszczenie środowiska. Wykazano również, że ekstrakcja CPE odznacza się wysokim odzyskiem, dla VEN przekraczającym 93%, a ponadto jest liniowa w zakresie stężeń 10–800 ng/mL.

Unceta i wsp. [24] zajmowali się oznaczaniem VEN, a także fluoksetyny i citalopramu w moczu i osoczu ludzkim oraz w próbkach mózgu szczurów za pomocą HPLC z detekcją spektrofluorymetryczną. Do ekstrakcji badanych związków wykorzystano metodę typu SBSE realizowaną w kilku etapach. Pierwszy etap polegał na ekstrakcji analitu do fazy stałej, którą stanowił ruchomy element sorpcyjny pokryty polidimetylosiloksanem (PDMS). Następnie przeprowadzono termiczną desorpcję analitu z elementu sorpcyjnego do fazy wodnej. Odzysk całkowity dla badanych związków przy zastosowaniu tej metody mieścił się w przedziale 50–92%, a liniowości w przedziale 1–20000 ng/mL w przypadku analizy moczu, 0,2–2000 ng/mL analizując osocze i 2–50000 ng/g w przypadku tkanki mózgowej.

Optymalizując ekstrakcję, w procesie desorpcji stosowano również inne rozpuszczalniki, jak np. metanol, acetonitryl i fazę ruchomą, acetonitryl – 0,4% chlorek tetrametyloamoniowy o pH 4 (60/40 v/v). Stwierdzono, iż najlepszy odzysk otrzymano stosując acetonitryl. Ponadto badano wpływ parametrów na proces desorpcji, takich jak temperatura, czas trwania procesu i pH użytego roztworu. Zauważono, że wzrost temperatury zwiększa odzysk, natomiast – analizując czas desorpcji analitu w zakresie 5–30 min. – wykryto, że optymalny czas tego procesu to 15 min. Dalsze wydłużenie procesu desorpcji nie wpływało na jego efektywność. Badania przeprowadzono używając roztworów o pH w zakresie 2–11. Optymalne okazało się pH 11. W podsumowaniu wskazano, że opracowana metoda może być stosowana w kryminalistyce oraz kontroli prawidłowego leczenia pacjentów badanymi lekami.

Ekstrakcję typu LPME zastosowali w swoich badaniach da Fonseca i wsp. [4] do oznaczania VEN i jej metabolitu w próbkach z wątroby szczura. Do oznaczeń użyto HPLC z detekcją UV. W ekstrakcji typu LPME stosuje się trzy różne rodzaje rozpuszczalników. W pierwszym etapie analit jest ekstrahowany z fazy wodnej (donorowej, jest nią materiał diagnostyczny) do fazy organicznej, po czym w drugim etapie ponownie przeprowadza się ekstrakcję do kolejnej fazy wodnej (akceptorowej). Stosując tę ekstrakcję, odzysk dla analizowanych związków przekroczył 41% dla ODV i 47% dla VEN. Wartości odzysku mieściły się w zakresie referencyjnym dla tego typu ekstrakcji, a zastosowana metoda była liniowa w przedziale 200–5000 ng/mL.

W trakcie optymalizacji ekstrakcji badano wpływ na wydajność procesu trzech różnych faz organicznych (1-oktanol, eter di-n-heksylowy, octan dodecyłu) oraz faz akceptorowych (kwasy: chlorowy(VII), octowy, trifluorooctowy, o stężeniach 0,1 mol/L). Uzyskane wyniki wskazały, że najlepsze efekty daje połączenie ekstrakcji 1-oktanołem z kwasem octowym, z kolei zastosowanie kwasu chlorowego(VII) nie pozwoliło na oznaczenie badanych związków.

Wydajność ekstrakcji typu LPME zależy też w dużym stopniu od współczynnika podziału oznaczanych związków pomiędzy poszczególne fazy. Największy wpływ na wydajność ekstrakcji ma skład zastosowanej fazy organicznej, który powinien zapewnić odpowiednią rozpuszczalność analitów. Jeżeli rozpuszczalność analitu w fazie organicznej jest niska, związki będą przechodzić do niej w niewielkim stopniu, natomiast



przy wysokiej rozpuszczalności analitów w fazie organicznej nie będą one ulegały ekstrakcji do roztworu akceptorowego.

W badaniach wzięto również pod uwagę czas i szybkość wytrząsania próbek podczas ekstrakcji. Stwierdzono, że odzysk wzrastał, gdy ekstrakcja trwała dłużej, ale wydłużenie czasu wytrząsania powyżej 20 min. nie powodowało wzrostu odzysku. Zauważono także, że wraz ze zwiększeniem amplitudy wytrząsania wzrastał odzysk badanych związków.

### Podsumowanie

Oznaczanie VEN i jej metabolitów umożliwia monitorowanie zmian stężenia leku we krwi, a tym samym optymalizację dawkowania. Przedstawiony przegląd piśmiennictwa na temat metod ekstrakcji VEN i jej metabolitów z materiału diagnostycznego pozwala stwierdzić, iż klasyczne metody ekstrakcji, a w szczególności LLE, dają lepszy odzysk analitów niż otrzymany przy użyciu zmodyfikowanych technik ekstrakcji. Użycie w zmodyfikowanych metodach mniejszych objętości rozpuszczalników lub objętości próbek jest niezwykle cenne, szczególnie w przypadku użycia tych metod do badania farmakokinetyki leku we krwi, a także pozwala obniżyć koszt analizy. Jednak otrzymane przy użyciu tych metod wyniki nie zawsze są zadowalające. Wśród zmodyfikowanych metod ekstrakcji najlepszy odzysk (powyżej 93%) otrzymano stosując ekstrakcję CPE. W przypadku pozostałych dwóch metod ekstrakcji, SBSE i LPME, odzysk nie był tak wysoki i zależał od użytego materiału diagnostycznego.

W przypadku LLE do najczęściej stosowanych mieszanin rozpuszczalników należały te zawierające heksan i alkohol izoamylowy w różnych stosunkach objętościowych. Pozwoliły one uzyskać najwyższy odzysk, powyżej 85%. Ekstrakcja SPE jest uznawana za bardziej wydajną i bardziej selektywną niż ekstrakcja ciecz-ciecz, jednak w przypadku izolacji VEN i jej metabolitów z matrycy biologicznej odzysk tych związków nieznacznie przekraczał 70%. Zastosowanie kolumnienek ze złożem C1 pozwoliło na uzyskanie odzysku przekraczającego 90%.

### Экстракционные техники в анализе венлафаксина и его метаболитов в биологическом материале

#### Содержание

Венлафаксин (ВЕН) был введен в лечебную практику в 90. годах прошлого столетия и часто используется в лечении депрессивных состояний. При его использовании показана проверка его содержания в организме, особенно в случае, когда пациент страдает иными заболеваниями, а принимаемые лекарства могут вызывать интеракцию с ВЕН. Наиболее популярным диагностическим материалом является кровь.

В настоящей работе представлен литературный обзор о методах экстракции ВЕН из крови и иных диагностических материалов человеческого происхождения, м.п. из слюны, мочи, а также из тканей животных. Представлены классические способы экстракции ВЕН таких как экстракция жидкость-жидкость и жидкость-тело постоянное. Учтены также современные техники экстракции, такие как микроэкстракция до жидкой фазы и мицеллярная экстракция в пункте помутнения. Цитированная литература указывает, что лучшее получение ВЕН и его главного метаболита О-деметило венлафаксина, получено при применении классической

экстракциж жидкость–жидкость. Новые модифицированные методы экстракции, несмотря на то, что позволяют на снижение расходов анализа путем ограничения использования растворителей экстракции, а также значительное уменьшение объема материала для исследований, не характеризуются так хорошим получением аналитов, какие при классических методах экстракции.

**Ключевые слова:** венлафаксин, О-деметило венлафаксин, SPE, LLE, кровь, слюна, моча

### Extraktionsverfahren in Analyse von Venlafaxin und ihrer Metaboliten im biologischen Material

#### Zusammenfassung

Venlafaxin (VEN) wurde zur Behandlung in der 90er Jahren eingeführt, es ist eins der häufiger eingesetzten Antidepressiva. Es ist angebracht, ihren Spiegel im Organismus zu beobachten, insbesondere, wenn der Patient an andere Erkrankungen leidet und die verabreichten Medikamente Interaktionen mit Venlafaxin hervorrufen können. Das populärste Material für die Diagnostik ist Blut. Die vorliegende Arbeit bespricht die Übersicht der aktuellen Literatur zu den Extraktionsmethoden von VEN vom Blut und anderen diagnostischen Stoffen menschlicher Herkunft, u.a. Speichel, Urin und auch vom tierischen Gewebe. Man beschrieb die klassischen Extraktionsverfahren von VEN, wie die Flüssig-Flüssig-Extraktion und Flüssig-Fest-Extraktion. Man berücksichtigte auch die neuesten Extraktionstechniken, solche wie Mikroextraktion zu Flüssigphase und Mizellphase durch Cloud-Point-Extraktion. Die zitierte Literatur weist hin, dass die beste Extraktion von VEN und des Hauptmetaboliten, O-Desmethylvenlafaxin, erzielt wurde, wenn die klassische Extraktion Flüssig-Flüssig angewendet wurde. Neue, modifizierte Extraktionsverfahren, obwohl sie die Kosten der Analyse durch die Beschränkung im Gebrauch von Lösungsmitteln und das Volumen des zu Untersuchungen gebrauchten Materials signifikant senken, zeichnen sich nicht mit so einem guten Extrahieren aus, wie man bei den klassischen Extraktionsverfahren erreicht.

**Schlüsselwörter:** Venlafaxin, O-Demethylvenlafaxin, SPE, LLE, Blut, Speichel, Urin

### Les techniques d'extraction de venlafaxine et de ses métabolites dans le matériel biologique

#### Résumé

La venlafaxine (VEN), introduite dans la thérapie durant les années 90, est un des antidépresseurs le plus souvent appliqués. On recommande le monitoring de son niveau dans l'organisme, surtout quand le patient souffre encore d'autres maladies et quand ses médicaments peuvent entrer en réaction avec VEN. Le sang est un matériel biologique le plus souvent utilisé pour le diagnostic. Ce article donne une revue de la littérature parlant des méthodes d'extraction de VEN du sang et d'autre matériel biologique (urine, salive, tissu animal). Les auteurs présentent les méthodes classiques d'extraction de VEN telles que l'extraction liquide-liquide et l'extraction en phase solide ainsi que les méthodes les plus nouvelles : microextraction en phase liquide et extraction CPE (cloud point extraction). La littérature citée indique que l'on obtient la meilleure récupération de VEN et de son métabolite O-demethylvenlafaxine en usant l'extraction liquide-liquide. Les méthodes nouvelles, bien qu'elles diminuent les frais en permettant limiter l'usage des solvants et en diminuant le volume du matériel analysé, n'ont pas si bonne récupération des analytes que les méthodes classiques d'extraction.

**Mots clés :** venlafaxine, O-demethylvenlafaxine, SPE, LLE, sang, salive, urine

#### Piśmiennictwo

1. Jarema M. *Psychiatria w praktyce*. Warszawa: Medical Education; 2011, s. 44-51
2. Jarema M, Rabe-Jabłońska J. *Psychiatria*. Warszawa: PZWL; 2011, s. 494-503.

3. Luan Vu R, Helmeeste D, Albers L, Reist C. *Rapid determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection*. J. Chromatogr. B. 1997; 703: 195–201.
4. Fonseca P, Bonato PS. *Chiral HPLC analysis of venlafaxine metabolites in rat liver microsomal preparations after LPME extraction and application to an in vitro biotransformation study*. Anal. Bioanal. Chem. 2010; 396: 817–824.
5. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Farmakologia Goodmana & Gilmana, Tom I*. Lublin: CZELEJ; 2007.
6. Stahl S. *Podstawy psychofarmakologii*. Gdańsk: Via Medica; 2010, s.242.
7. <http://leki-informacje.pl/lek/charakterystyka-szczegolowa/2216,efectin-er-37-5.html> [dostęp: 26.08.2013]
8. Spina E, Santoro V, D'Arrigo C. *Clinically relevant pharmacokinetic drug interactions with second-generation antidepressants: an update*. Clin. Ther. 2008; 30: 1206–1227.
9. Rotzinger S, Bourin M, Akimoto Y, Couatts RT, Baker GB. *Metabolism of some "second"- "fourth"- generation antidepressants: iprindole, viloxazine, bupropion, mianserin, maprotiline, trazodone, nefazodone and venlafaxine*. Cell. Mol. Neurobiol. 1999; 19: 427–442.
10. Goeringer KE, McIntyre IM, Drummer OH. *Post mortem tissue concentrations of venlafaxine*. Forensic Sci. Int. 2001; 121: 70–75.
11. Reis M, Aamo T, Spigset O, Ahlner J. *Serum concentrations of antidepressant drugs in a naturalistic setting: Complication based on a large therapeutic drug monitoring database*. Ther. Drug Monit. 2009; 31: 42–56.
12. Mandrioli R, Mercolini L, Cesta R, Fanali S, Amore M, Raggi MA. *Analysis of the second generation antidepressant venlafaxine and its main active metabolite O-desmethylvenlafaxine in human plasma by HPLC with spectrofluorometric detection*. J. Chromatogr. B. 2007; 856: 88–94.
13. Clement EM, Odontialis J, Franklin M. *Simultaneous measurement of venlafaxine and its major metabolite, oxydesmethylvenlafaxine, in human plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection and utilisation of solid-phase extraction*. J. Chromatogr. B. 1998; 705: 303–308.
14. He J, Zhou Z, Li H. *Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI)*. J. Chromatogr. B. 2005; 820: 33–39.
15. Kingbäck M, Josefsson M, Karlsson L, Ahler J, Bengtsson F. *Stereoselective determination of venlafaxine and its three demethylated metabolites in human plasma and whole blood by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometric detection and solid phase extraction*. J. Pharm. Biomed. Anal. 2010; 53: 583–590.
16. Wille SMR, De Letter EA, Piette MHA, Van Overschelde LK, Van Peteghem CH, Lambert WE. *Determination of antidepressants in human postmortem blood, brain tissue and hair using gas chromatography-mass spectrometry*. Int. J. Legal Med. 2009; 123: 451–458.
17. Kingbäck M, Karlsson L, Zackrisson A-L, Carlsson B, Josefsson M, Bengtsson F. *Influence of CYP2D6 genotype on the disposition of the enantiomers of venlafaxine and its major metabolites in postmortem femoral blood*. Forensic Sci. Int. 2012; 214: 124–134.
18. Liu W, Cai H, Li H. *High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI) method for simultaneous determination of venlafaxine and its three metabolites in human plasma*. J. Chromatogr. B. 2007; 850: 405–411.
19. Matoga M, Pehourcq F, Titier K, Dumora F, Jarry C. *Rapid high-performance liquid chromatographic measurement of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma. Application to management of acute intoxications*. J. Chromatogr. B. 2001; 760: 213–218.
20. Rudaz S, Stella C, Balant-Gorgia A, Fanali S, Veuthey J. *Simultaneous stereoselective analysis of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine enantiomers in clinical samples by capillary electrophoresis using charged cyclodextrins*. J. Pharm. Biomed. Anal. 2000; 23: 107–115.

21. Qin F, Li N, Zhang Y, Li 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*. J. Chromatogr. B. 2010; 878: 689–694.
22. Tournel G, Houndret N, Hédouin V, Deveaux M, Gosset D, Lhermitte M. *High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitate seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum*. J. Chromatogr. B. 2001; 761: 147–158.
23. Qin X, Meng J, Li X, Zhou J, Sun X, Wen A. *Determination of venlafaxine in human plasma by high-performance liquid chromatography using cloud-point extraction and spectrofluorometric detection*. J. Chromatogr. B. 2008; 872: 38–42.
24. Unceta N, Ugarte A, Sánchez A, Gómez-Caballero A, Goicolea M, Barrio R. *Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples*. J. Pharm. Biomed. Anal. 2010; 51: 178–185.

Adres: Marek Wesołowski  
Katedra i Zakład Chemii Analitycznej GUM  
80-416 Gdańsk, al. Gen. J. Hallera 107

Otrzymano: 1.03.2012  
Zrecenzowano: 28.05.2012  
Otrzymano po poprawie: 19.07.2012  
Przyjęto do druku: 9.08.2013