

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### STANOVENIE ANTIARYTMÍK A ICH METABOLITOV V KLINICKÝCH VZORKÁCH KOMBINÁCIOU EXTRAKCIE NA TUHEJ FÁZI A VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRRAFIE

EVA BRANDŠTETEROVÁ  
a ANDREA FERENCOVÁ

*Katedra analytickej chémie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika*

Došlo dňa 13.III.1998

Kľúčová slová: HPLC, SPE, antiarytmiká

#### Úvod

Antiarytmiká sa používajú na liečbu porúch srdcového rytmu. Rozdeľujú sa podľa účinku na elektrofyziologickú činnosť srdcových buniek do štyroch základných skupín: antiarytmiká s priamym účinkom na bunkovú membránu (mexiletín, propafenon), betalytiká, antiarytmiká predlžujúce trvanie akčného potenciálu a inhibitory kalciových iónov (verapamil, fendilín). Vzhľadom na rôzne faktory, ovplyvňujúce správnu voľbu aplikovaného liečiva, jeho metabolizáciu, možné kontraindikácie a intoxikáciu z predávkovania, ukázala sa potreba monitorovania podávaných liečiv a ich biologicky aktívnych metabolitov ako veľmi aktuálna a vysoko informatívna.

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je v súčasnosti jedna z najrozšírejších techník používaných na spoľahlivé stanovenie viacerých liečiv v zložitých biologických matriciach a v kombinácii s účinnou čistiacou a zakoncentrovacou technikou ako je extrakcia na tuhej fáze (SPE) v off-line alebo on-line spojení s chromatografickým systémom, je HPLC vhodnou porovnávacou metódou s metódami bioanalytickými (imunologickými a enzymatickými). Navyac táto technika umožňuje simultánnu separáciu viacerých liečiv spolu s ich metabolitmi za použitia často veľmi jednoduchého izokratického systému.

V literatúre sú publikované HPLC postupy na stanovenie jednotlivých antiarytmík a ich hlavných metabolitov s použitím rôznych kolón, mobilných fáz a predseparačných postupov<sup>1-8</sup>. SPE v porovnaní s tzv. klasickými čistiacimi technikami (zrážanie proteínov, extrakcia kvapalina-kvapalina) významne redukuje potrebné úkony a manipuláciu s biologickým materiálom a v on-line prevedení umožňuje priamy nástrek klinickej vzorky do HPLC kolóny<sup>9</sup>.

Cieľom predkladanej práce bolo vypracovať kompletný, jednoduchý SPE-HPLC postup vhodný pre reálne potreby terapeutického monitorovania vybraných antiarytmík a ich hlavných biologicky aktívnych metabolitov, univerzálny, s malými obmenami použiteľný pre širšiu skupinu antiaryt-

mik. Štruktúrne vzorce sledovaných látok sú uvedené v tabuľke I.

Tabuľka I  
Štruktúrne vzorce sledovaných antiarytmík

Látka	Štruktúra
Mexiletín	
Propafenon	
5-Hydroxypropafenon	
Verapamil	
Norverapamil	
D617	
D620	
Fendilín	

## Experimentálna časť

## Prístroje a zariadenia

Na HPLC analýzu sa použil modulárny kvapalinový chromatograf zložený z pumpy Knauer 64, dávkovacieho ventilu Rheodyne 7125 (objem slučky 20  $\mu$ l), UV-VIS detektora Knauer a vyhodnocovacej jednotky Data Monitor (Watrex Bratislava). Na separáciu sa použili kolóny: Separon SGX C-18, 150 x 3 mm (Tessek Praha), Separon SGX CN, 150 x 3 mm (Tessek Praha), Nucleosil C-18, 250 x 4 mm (Watrex Bratislava). Mobilnou fázou bola zmes acetonitrilu, vody a trietylamínu (35–40 % acetonitrilu, 0,2 % trietylamínu) s prietokom 1 ml.min<sup>-1</sup>. Na SPE sa použili kolónky Chromabond C-18, 200 mg, Macherey Nagel (Watrex Bratislava).

## Chemikálie

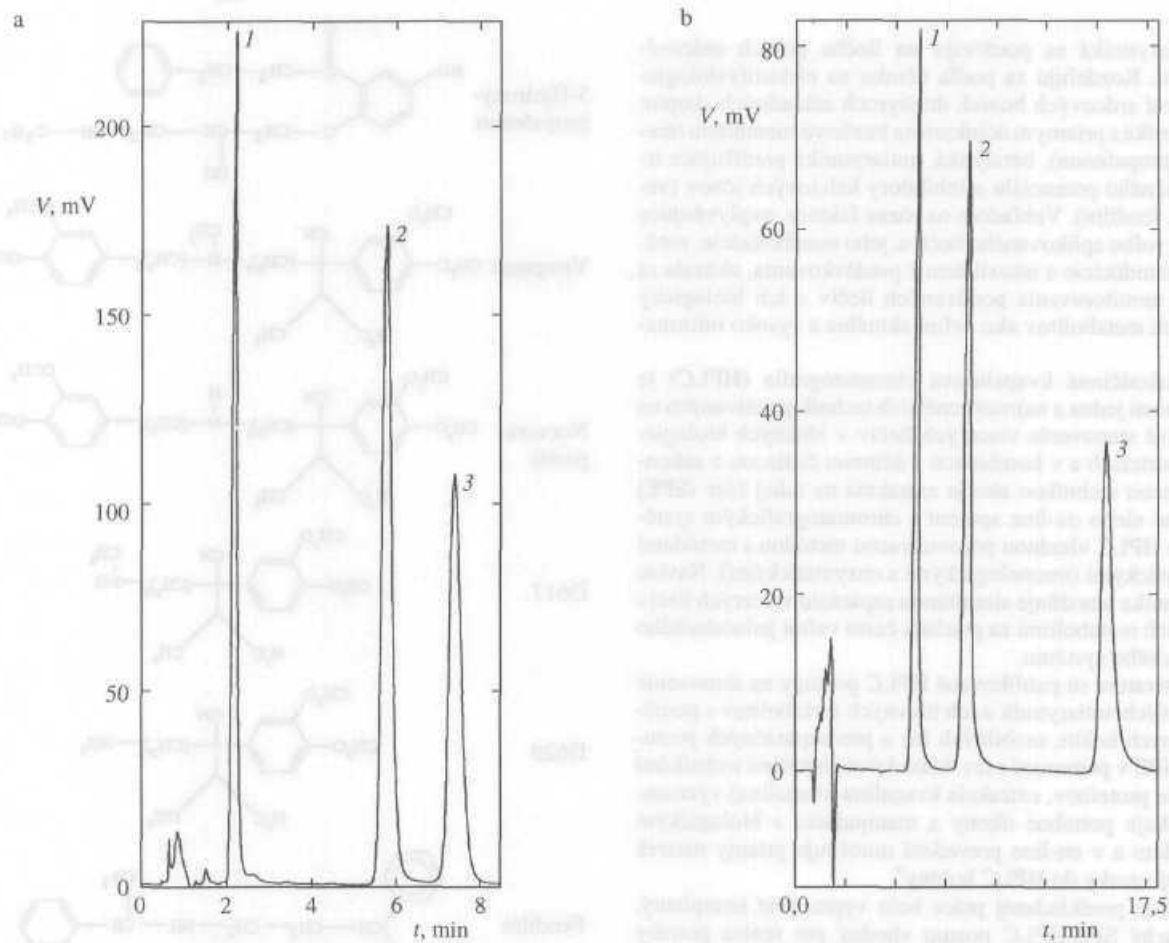
Mexiletín a fendilín boli dodané Slovakofarmou a.s. Hlohovec, propafenon, LU 29007 ako interný štandard, 5-hydroxypropafenon, verapamil, norverapamil, D-617, D-620 od firmy Knoll, Nemecko. Metanol, acetonitril, trietylamín, kyselina fosforečná, boli dodané firmou Merck, Bratislava.

## Predseparačná úprava biologickej vzorky

SPE kolónka sa premyla 3 ml metanolu, 3 ml vody a nanesla sa vzorka séra o objeme 1 ml. Po vymytí proteínov 2 ml vody a interferujúcich látok 1 ml acetonitrilu, sa antiarytmiká a ich metabolity eluovali 1 ml metanolu s prídavkom 0,5 % trietylamínu. Eluát sa odparil do sucha a zvyšok rozpustil v 200  $\mu$ l mobilnej fázy. Objem 20  $\mu$ l sa dávkoval do chromatografickej kolóny.

## Výsledky a diskusia

Na HPLC separáciu sa najskôr testovala aj CN kolónka, ale ukázalo sa, že jej separačná účinnosť bola nedostatečná, najmä na separáciu niektorých metabolitov (norverapamil). Ak je ale potrebné monitorovať len hladinu antiarytmika, prípadne rozhodnúť, ktoré a v akom množstve bolo aplikované, je možné analyzovať SPE extrakty séra s obsahom mexiletínu, propafenonu a verapamilu na CN kolóne (obr. 1a). Na spoľahlivú analýzu propafenonu, jeho hlavného metabolitu 5-hydroxypropafenonu a vnútorného štandardu LU, je lepšie použiť



Obr. 1. Chromatografický záznam separácie a) mexiletínu, propafenonu a verapamilu na kolóne Separon SGX CN (mobilná fáza: 40 % acetonitril, voda, 0,2 % trietylamín, pH 4): 1 - mexiletín, 2 - propafenon, 3 - verapamil; b) propafenonu, 5-hydroxypropafenonu a LU na kolóne Separon SGX C 18 (mobilná fáza: 40 % acetonitril, voda, 0,2 % trietylamín, pH 4): 1 - 5-hydroxypropafenon, 2 - LU, 3 - propafenon

krátku kolónu Separon SGX C-18 (obr. 1b), kde všetky tri látky sú separované s dostatočnou hodnotou chromatografického

Tabulka II

Elučné časy, kapacitné pomery a hodnoty chromatografické rozlíšenia pre analyzované látky

Kolóna: Nucleosil C-18; mobilná fáza: 35 % acetonitril, voda, trietylamín 0,2 %; prietok:  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; detekcia: 245 nm

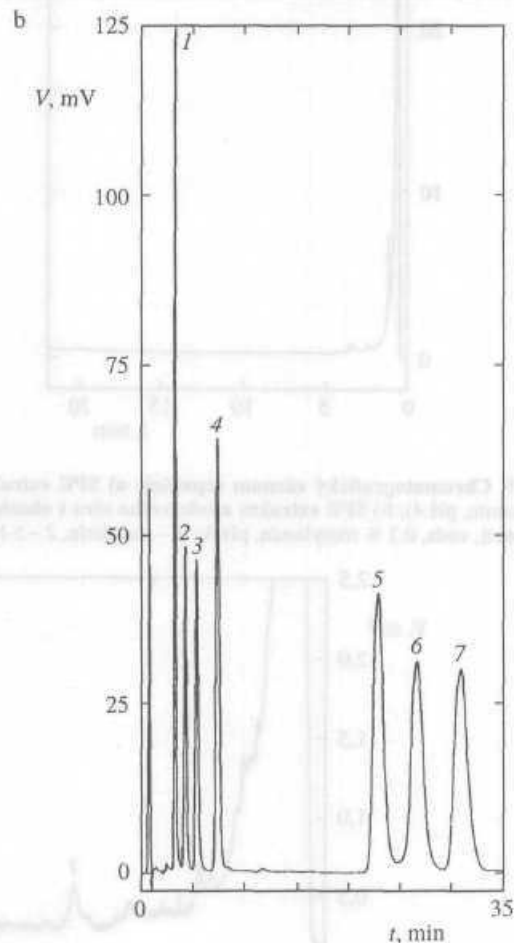
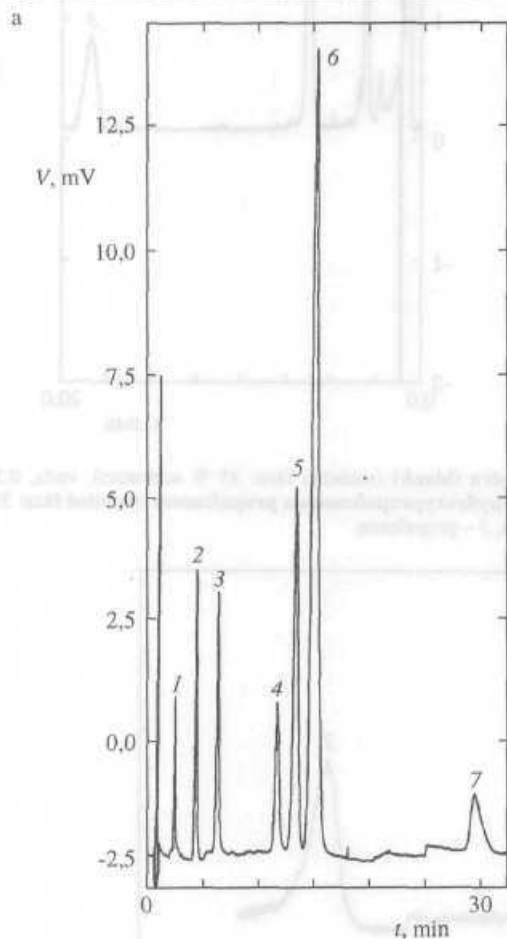
Látka	Elučný čas [min]	Kapacitný pomer	Rozlíšenie
Mexiletín	4,5	1,1	3,6
D-620	5,7	1,5	1,7
D-617	6,4	1,8	4,6
5-Hydroxypropafenon	8,6	2,8	5,1
LU	11,7	4,1	11,0
Propafenon	22,1	8,7	1,3
Norverapamil	23,8	9,4	1,9
Verapamil	26,3	10,6	

rozlíšenia. Simultánnu separáciu všetkých antiarytmík a ich metabolitov sa podarilo realizovať na kolóne Nucleosil C-18. Na obr. 2a je HPLC chromatogram separácie mexiletínu, propafenonu, verapamilu a fendilínu spolu s metabolitmi 5-hydroxypropafenonom a norverapamilom. Na obr. 2b sú navyše separované aj ďalšie metabolity verapamilu (D-617 a D-620).

Tabulka III

Prehľad testovaných SPE postupov na úpravu vzoriek séra

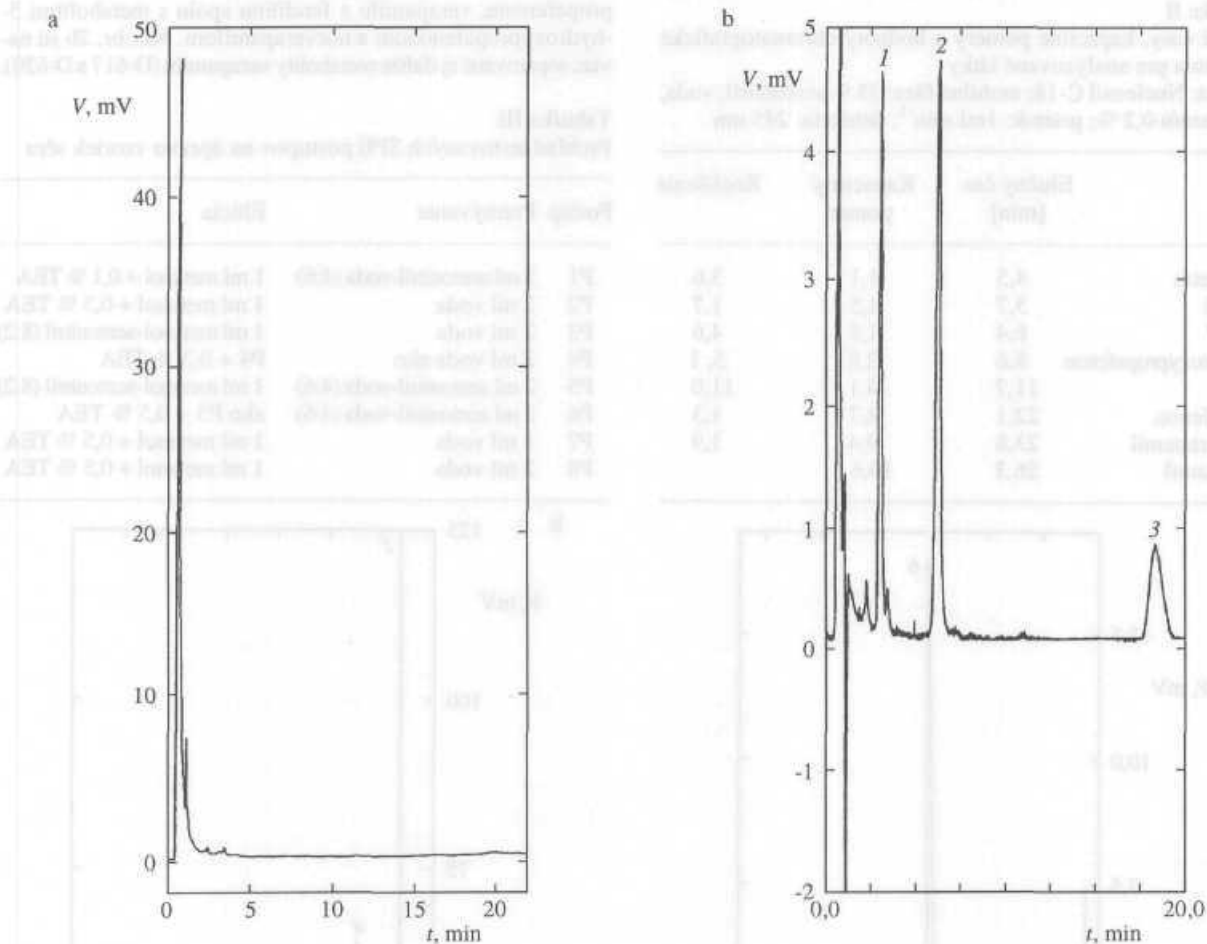
Postup	Premývanie	Elúcia
P1	3 ml acetonitril-voda (4:6)	1 ml metanol + 0,1 % TEA
P2	2 ml voda	1 ml metanol + 0,3 % TEA
P3	2 ml voda	1 ml metanol-acetonitril (8:2)
P4	2 ml voda ako	P4 + 0,3 % TEA
P5	2 ml acetonitril-voda (4:6)	1 ml metanol-acetonitril (8:2)
P6	2 ml acetonitril-voda (4:6)	ako P5 + 0,5 % TEA
P7	1 ml voda	1 ml metanol + 0,5 % TEA
P8	2 ml voda	1 ml metanol + 0,5 % TEA



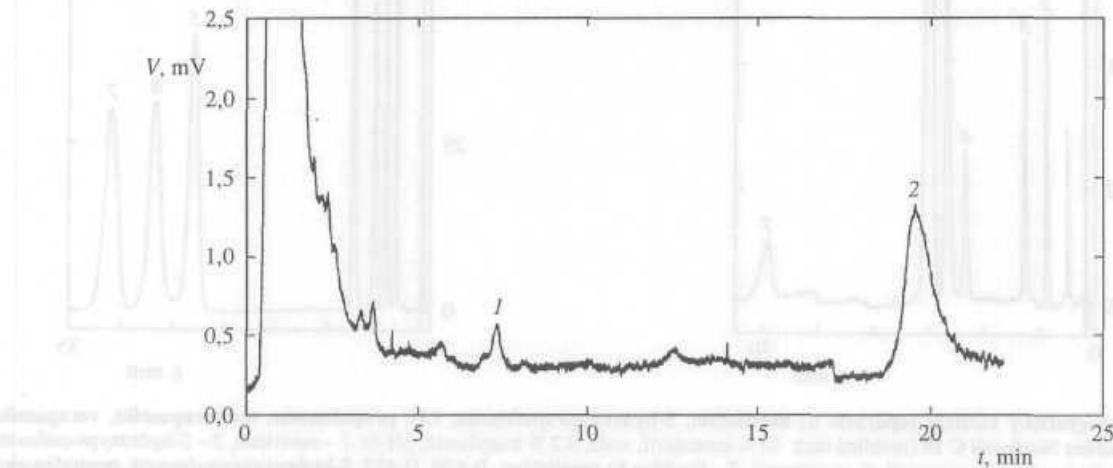
Obr. 2. Chromatografický záznam separácie a) mexiletínu, 5-hydroxypropafenonu, LU, propafenonu, norverapamilu, verapamilu a fendilínu na kolóne Nucleosil C 18 (mobilná fáza: 40 % acetonitril, voda, 0,2 % trietylamín, pH 4): 1 - mexiletín, 2 - 5-hydroxypropafenon, 3 - LU, 4 - propafenon, 5 - norverapamil, 6 - verapamil, 7 - fendilín; b) mexiletínu, D-620, D-617, 5-hydroxypropafenonu, propafenonu, norverapamilu a verapamilu na kolóne Nucleosil C-18 (mobilná fáza: 35 % acetonitril, voda, 0,2 % trietylamín, pH 4): 1 - mexiletín, 2 - D-620, 3 - D-617, 4 - 5-hydroxypropafenon, 5 - propafenon, 6 - norverapamil, 7 - verapamil

Pre tuto analýzu sa znížilo percento organického modifikátora (acetonitril) v mobilnej fáze (zo 40 % na 35 %). Hodnoty kapacitných pomerov a chromatografického rozlíšenia sú uve-

dené v tabuľke II. Medze stanoviteľnosti pre všetky analyzované látky boli dostatočné pre ich kvantitatívnu analýzu v reálnych vzorkách, pre propafenon a fendilín  $10 \text{ ng.ml}^{-1}$ , pre



**Obr. 3.** Chromatografický záznam separácie a) SPE extraktu modelového séra (blank) (mobilná fáza: 35 % acetonitril, voda, 0,2 % trietylamin, pH 4); b) SPE extraktu modelového séra s obsahom mexiletínu, 5-hydroxypropafenonu a propafenonu (mobilná fáza: 35 % acetonitril, voda, 0,2 % trietylamin, pH 4): 1 - mexiletín, 2 - 5-hydroxypropafenon, 3 - propafenon



**Obr. 4.** Chromatografický záznam separácie SPE extraktu klinickej vzorky pacienta po aplikácii propafenonu (mobilná fáza: 35 % acetonitril, voda, 0,2 % trietylamin, pH 4): 1 - 5-hydroxypropafenon, 2 - propafenon

5-hydroxypropafenon, fendilín, verapamil  $5 \text{ ng.ml}^{-1}$  a norverapamil  $3 \text{ ng.ml}^{-1}$ .

Doteraz bolo publikovaných veľmi málo informácií o použití SPE na predseparačnú úpravu študovaných liečiv a ich metabolitov. Preto sa odskúšalo niekoľko kombinácií premývacích krokov a elučných zmesí, ktoré sú uvedené v tabuľke III. HPLC chromatogram SPE extraktu sére bez obsahu antiarytmik (blank) je znázornený na obr. 3a a chromatogram modelovej vzorky séra s prídavkom mexiletínu, propafenonu a 5-hydroxypropafenonu na obr. 3b. Extrakčné výťažnosti SPE postupu sú porovnané v tabuľke IV. HPLC chromatogram SPE extraktu reálnej klinickej vzorky po SPE extrakcii postupom P8 z tabuľky III je znázornený na obr. 4. Stanovené koncentrácie boli:  $0,43 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  pre propafenon a  $0,06 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  pre 5-hydroxypropafenon.

Tabuľka IV  
Extrakčné výťažnosti SPE postupu P8

Látka	Extrakčná výťažnosť [%]	RSD [%]
Mexiletín	72,3	1,2
5-Hydroxypropafenon	84,1	2,3
Propafenon	87,5	2,1
Norverapamil	89,4	1,8
Verapamil	90,7	2,5
Fendilín	81,4	2,0

## Záver

Kompletný vypracovaný postup SPE-HPLC stanovenia vybraných antiarytmik aplikovaných v klinickej praxi spolu s ich metabolitmi bol doporučený na rutinné terapeutické mo-

nitorovanie v klinických laboratóriách ako aj pre potreby farmakokinetických štúdií.

## LITERATÚRA

1. Verbesselt R., Tjandramaga T. B., De Sepper P. J.: *Ther. Drug Monit.* 12, 157 (1991).
2. Kunicky P. K., Daczowski D., Sitkiewicz D.: *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 44, 161 (1992).
3. Tateishi T., Harada K., Ebihara A.: *J. Liq. Chromatogr.* 17, 659 (1994).
4. Kunicky P. K., Sietkiewicz D.: *J. Liq. Chromatogr.* 19, 1160 (1996).
5. Romanová D., Brandšteterová E., Králíková D., Božeková L., Kriška M.: *Pharmazie* 49 H 10, 779 (1994).
6. Brandšteterová E., Kubalec P., Rády A., Krčméry V.: *Pharmazie* 50 H 9, 597 (1994).
7. Tracqui A., Kintz P., Mangin P.: *J. Forensic Sci.* 40, 254 (1995).
8. Ueno K., Ishida Y., Kawagushi Y.: *Pharm. Med.* 12, 127 (1994).
9. Brandšteterová E., Romanová D., Králíková D., Božeková L., Kriška M.: *J. Chromatogr.* 665, 101 (1994).

**E. Brandšteterová and A. Ferencová** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Determination of Antiarrhythmics and Their Metabolites in Clinical Samples Using a SPE-HPLC Combination**

An effective and simple SPE-HPLC assay for monitoring of clinically applied antiarrhythmics and their metabolites in serum samples was developed. In particular, the generally used SPE step has been modified for the clean-up and preconcentration procedure of clinical samples. Extraction recoveries for all analyzed compounds were in the range 81.4–90.7 % for the concentration level  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  of serum.