



## De bepaling van venlafaxine (Efexor®) in serum; het kan altijd beter!

**B.A. Liestro-Hondorp**

Slingeland Ziekenhuis, Klinisch Farmaceutisch Laboratorium, Postbus 169, 7000 AD Doetinchem.

### Samenvatting

Venlafaxine (Efexor®) is een antidepressivum (ingedeeld bij de SSRI's), dat wordt voorgeschreven bij depressie, angstgevoelens en gespannenheid. Bij de HPLC-bepaling in het Slingeland ziekenhuis te Doetinchem worden venlafaxine en zijn belangrijkste metaboliet O-desmethylvenlafaxine geëxtraheerd met diisopropylether en vindt terugextractie in zwavelzuur plaats. Er wordt gebruik gemaakt van fluorescentiedetectie. Fluorescentiedetectie heeft zowel vanwege gevoeligheid als selectiviteit de voorkeur boven UV-detectie. Er is onderzocht of de bepalingmethode efficiënter kan door het gebruik van disposable buizen en een cryostaat. De geoptimaliseerde methode is sneller, patiëntvriendelijker en milieubewuster. De eerste resultaten die behaald zijn met de geoptimaliseerde methode maken het de moeite waard deze in de nabije toekomst te valideren.

### Sleutelwoorden

**Venlafaxine, desmethylvenlafaxine, Efexor®, HPLC, fluorescentiedetectie, diisopropylether, cryostaat.**

### Inleiding

Venlafaxine (Efexor®) wordt door artsen voorgeschreven bij depressie, angstgevoelens en gespannenheid. Het regelt in de hersenen de hoeveelheid serotonine. Deze natuurlijk voorkomende stof speelt een rol bij emoties en stemmingen. Venlafaxine en zijn belangrijkste metaboliet O-desmethylvenlafaxine remmen sterk de heropname van serotonine en in mindere mate die van norepinefrine. Venlafaxine wordt vanwege zijn bijwerkingenprofiel ingedeeld bij de specifieke serotonineheropnameremmers (SSRI's). In de lever vindt metabolisering plaats door CYP2D6 tot het actieve O-desmethylvenlafaxine en door CYP3A4 tot N-desmethylvenlafaxine. Ook worden nog andere metabolieten gevormd. Eliminatie vindt voornamelijk in de nieren plaats. De werking is 2 tot 4 weken na start van de therapie merkbaar. Bij overdosering zijn de meest voorkomende symptomen: slaperigheid, opwinding, onrust, maagdarfstoornissen, tremor, hypertensie, hypotensie, tachycardie, bradycardie, ECG-veranderingen, vertigo, convulsies en coma. Gevallen met fatale afloop zijn gemeld, in het bijzon-

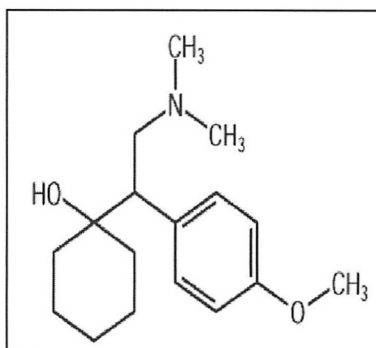
der in combinatie met alcohol en/of andere geneesmiddelen. [1, 2]

Therapeutische waarden: venlafaxine + desmethylvenlafaxine 250-750 µg/l.

Toxische waarden: venlafaxine + desmethylvenlafaxine 1000-1500 µg/l. [3]

In Extract, juli 2006 [4] is de bepaling van venlafaxine in plasma beschreven met gebruikmaking van UV-detectie. Bij de HPLC-bepaling van venlafaxine in het Slingeland ziekenhuis te Doetinchem wordt gebruikt gemaakt van fluorescentiedetectie. Voordelen van deze detectietechniek zijn de grote selectiviteit en sensitiviteit.[5]

**Figuur 1: Structuurformule venlafaxine [2]:**



In de huidige methode in ons laboratorium wordt venlafaxine geëxtraheerd met diisopropylether en vindt terugextractie in zwavelzuur plaats [6]. Dit is een nogal tijdrovende voorbereiding. Mogelijk kan deze methode verbeterd worden. De seriegrootte bedraagt gemiddeld 20 buizen. De snelheid van de voorbereiding wordt vooral beperkt door het aantal extractiebuisen dat in de centrifuge past, namelijk maximaal 8 buizen. Daarnaast wordt de benodigde tijd voor de voorbereiding ook bepaald door het indampen van het extract. Door gebruik te maken van kleinere, disposable buizen en een cryostaat is geprobeerd de methode efficiënter te maken. Kleinere buizen vereisen wel aanpassing van de volumina.

## Materialen en methoden

### Grondstoffen/chemicaliën:

Artikel	Artikelnummer
• VenlafaxineHCL	Weyth Reference Standards 1493
• Desmethylvenlafaxine	Weyth Reference Standards 1508
• Cocaine HCl	BUFA B.V. 227708
• di-Natriumtetraborat-Decahydrat	Merck 1.06308.0500
• Diisopropylether p.a.	Merck 1.00867.1000
• Zwavelzuur 95-97% p.a.	Merck 100731
• Kaliumdiwaterstoffosfaat	Merck 1.04873.1000
• Acetonitrile HPLC Supra-gradient	Biosolve Valkenswaard 01203501
• Acidum phosphoricum conc.	BUFA B.V. 241547

### Reagentia:

Reagens	Bereiding
• Interne standaardoplossing	24 mg Cocaine HCl in 1000 ml aquadest.
• Di-Natriumtetraboraatbuffer	10.0 g di-Natriumtetraborat-Decahydrat in 500 ml aquadest.
• Zwavelzuur 0,1 M	5,5 ml Zwavelzuur 95-97% Merck in maatkolf van 1000 ml gevuld met 600 ml aquadest, aanvullen tot 1000 ml.
• Kaliumdiwaterstoffosfaatbuffer 0,05M pH 4,0	34,02 g Kaliumdiwaterstoffosfaat in 5000 ml aquadest, op pH 4,0 gebracht met geconcentreerd fosforzuur.

### HPLCstelsel:

Er wordt gebruik gemaakt van een HPLC van Shimadzu, bestaande uit de volgende modules:

• Degasser	DGU-20A5
• Dual plunger pomp	LC-20AD
• Controller	CBM-20A
• Kolomoven	CTO-20A
• Autosampler	SIL-20A
• Fluorescentiedetector	RF-10Axi
• UV/VISdetector	SPD-20A
• Bijbehorende software	LCsolution

Met behulp van de dual plunger gradiëntpomp wordt de samenstelling van het eluens gereguleerd.

• Kolom	Varian Polaris 5C18A
• Eluens	Kaliumdiwaterstoffosfaatbuffer 0,05M pH 4,0 / Acetonitril 80/20
• Flow	1,2 ml/min
• $\lambda_{excitatie}$	230 nm
• $\lambda_{emissie}$	300 nm
• Kolomoventemperatuur	40 °C

### Overige apparatuur:

• Schudmachine	Edmund Bühler (typenr. B1)
• Centrifuge	Hettich Rotina 35
• Droogdampapparaat met opzetstuk voor stikstof	Reactitherm Pierce (typenr. 18790)
• Cryostaat	Julabo FP50

## Testmateriaal:

### Blancoserum:

Autonorm™, Sero AS Noorwegen, art.nr. 100005

### Kalibratie-oplossing:

Oplossing A: 40,40 mg venlafaxineHCL in 50 ml aquadest.  
Oplossing B: 42,80 mg desmethylvenlafaxine in 25 ml aquadest aangezuurd met enkele druppels geconcentreerd zoutzuur.

Kalibratie-oplossing: 400 µl oplossing A en 400 µl oplossing B in 25 ml aquadest.

De kalibratie-oplossing bevat 11,41 µg/ml venlafaxine en 26,98 µg/ml desmethylvenlafaxine.

### Interne kwaliteitscontrole (QC):

Oplossing A: 49,46 mg venlafaxineHCL in 50 ml aquadest.  
Oplossing B: 46,29 mg desmethylvenlafaxine in 25 ml aquadest aangezuurd met enkele druppels geconcentreerd zoutzuur.

Interne kwaliteitscontrole: 600 µl oplossing A en 500 µl oplossing B in 100 ml aquadest.

De interne kwaliteitscontrole bevat 5,24 µg/ml venlafaxine en 9,12 µg/ml desmethylvenlafaxine.

Voor de gemeten resultaten van de interne kwaliteitscontrole zijn de volgende eisen vastgesteld:

Venlafaxine: [200,4 - 219,0 µg/l].

Desmethylvenlafaxine: [339,6 - 390,4 µg/l].

### Patiëntenserum:

Dalspiegel, afgenomen in stolbuis zonder gel.

### Werkwijze huidige methode

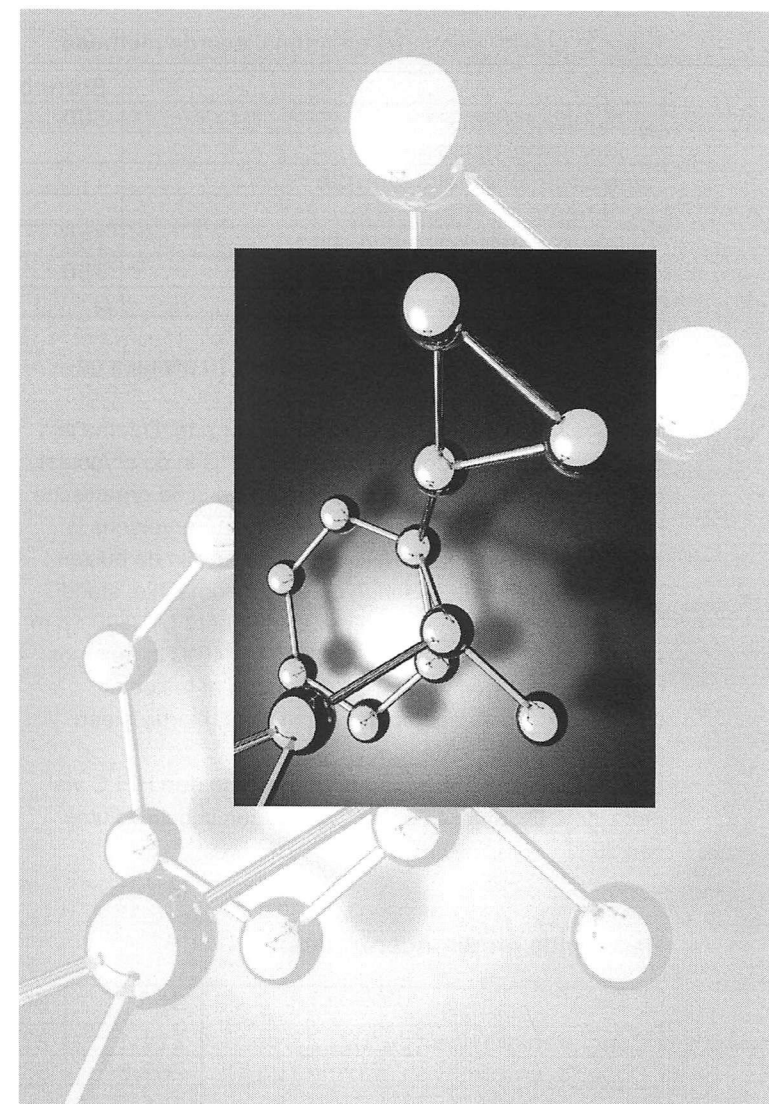
Er is gepipetteerd in genummerde glazen extractiebuisen van 20 ml volgens tabel 1.

Tabel 1: pipetteerschema huidige methode.

	Blanco	St 1	St 2	St 3	St 4	controle	test
µl blanco serum	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
µl kalibratie-oplossing		10	20	30	40		
µl interne kwaliteitscontrole						40	
µl patiëntenserum							1000
µl interne standaardoplossing	300	300	300	300	300	300	300
µl di-Natriumtetraboraatbuffer	500	500	500	500	500	500	500
ml Di-isopropylether p.a.	10	10	10	10	10	10	10

Vervolgens zijn de buizen afgesloten en 10 minuten geschud op de schudmachine, stand 3.5.

Er is 5 minuten gecentrifugeerd bij 2500 r.p.m. en de organische laag is overgeschonken in een schone extractiebuis. Daarna is er 200 µl Zwavelzuur 0.1M toegevoegd en zijn de buizen gedurende 1 minuut geschud op de schudmachine, stand 3.5. Er is opnieuw 5 minuten gecentrifugeerd bij 2500



r.p.m. en de etherlaag is verwijderd door middel van decanteren. De zwavelzuurfase is kort ingedampd bij 40°C onder stikstof om de resterende etherlaag te verwijderen (4 à 5 minuten). Het residu is overgebracht in een HPLC vial met insert. De analyse is gestart met een injectievolume van 10 µl.

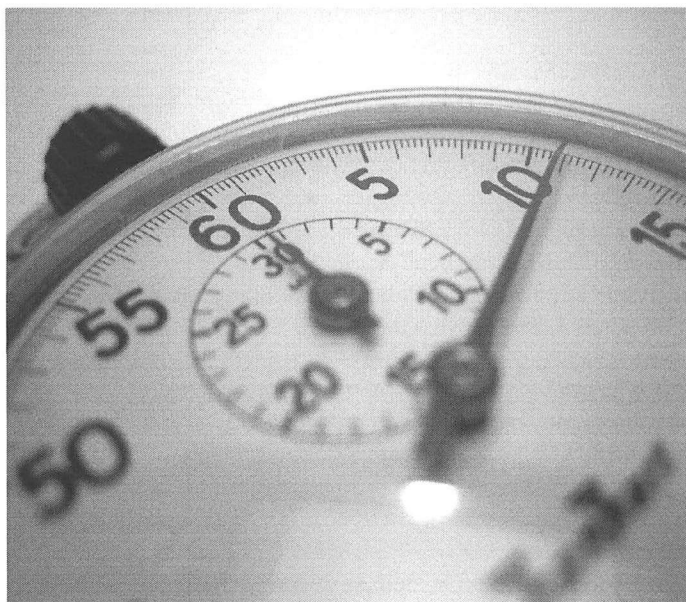
## Werkwijze geoptimaliseerde methode:

Er is gepipetteerd in genummerde glazen buizen (70\*12mm) volgens tabel 2.

Tabel 2: pipetteerschema geoptimaliseerde methode.

	Blanco	St 1	St 2	St 3	St 4	controle	test
µl blanco serum	500	500	500	500	500	500	
µl kalibratie-oplossing		5	10	15	20		
µl interne kwaliteitscontrole						20	
µl patiëntenserum							500
µl interne standaardoplossing	150	150	150	150	150	150	150
µl di-Natriumtetraboraatbuffer	250	250	250	250	250	250	250
ml Di-isopropylether p.a.	3	3	3	3	3	3	3

Vervolgens zijn de buizen afgesloten en 10 minuten geschud op de schudmachine, stand 3.5. Er is 5 minuten gecentrifugeerd bij 2500 r.p.m. Daarna zijn de buisjes één voor één geplaatst bij -40°C in de cryostaat om minimaal 30 seconden af te koelen en is de organische laag overgeschonken in een schone buis. Vervolgens is er 200 µl Zwavelzuur 0.1M toegevoegd en zijn de buizen gedurende 1 minuut geschud op de schudmachie, stand 3.5. Er is opnieuw 5 minuten gecentrifugeerd bij 2500 r.p.m. en de buisjes zijn weer één voor één bij -40°C in de cryostaat geplaatst om minimaal 30 seconden af te koelen. De etherlaag is afgegoten in een afvalvat, hierbij is een klein restje ether achter gebleven. Er is 150 µl van het residu overgebracht in een HPLC vial met insert. De analyse is gestart met een injectievolume van 20 µl.



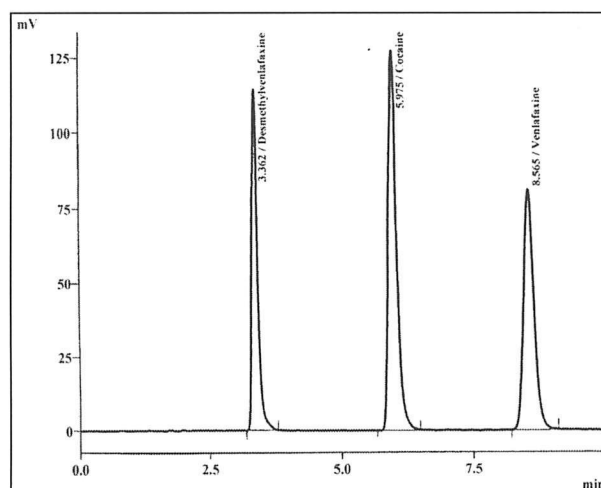
## Berekende eindconcentraties:

	St 1	St 2	St 3	St 4	controle
Conc. venlafaxine (µg/l)	114,1	228,3	342,4	457,7	209,7
Conc. desmethylvenlafaxine (µg/l)	269,8	539,6	809,4	1079,2	365,0

## Resultaten en discussie

De vermindering van volumina die nodig is voor de geoptimaliseerde methode wordt mogelijk door het injectievolume te verdubbelen. De gevoeligheid van de fluorescentiedetectie is vele malen groter dan de gevoeligheid van UV-detectie (figuur 2 en 3). Bovendien laat het UV-spectrum meerdere extra pieken zien, de piek met RT = 1,550 minuten is mogelijk een gevolg van zwavelzuur dat aanwezig is in het extract.

In de testmonsters zijn bij fluorescentiedetectie geen storende componenten aanwezig. Uit ervaring blijkt dat de reguliere co-medicatie van patiënten die venlafaxine gebruiken geen storing oplevert bij fluorescentiedetectie, in tegenstelling tot UV-detectie.

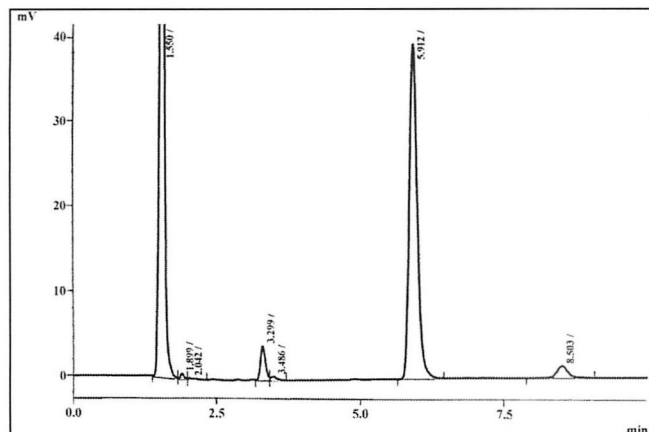


Figuur 2: Chromatogram interne kwaliteitscontrole volgens geoptimaliseerde methode met fluorescentiedetectie (λexcitatie =230nm, λemissie =300nm)

## Retentietijden:

Desmethylvenlafaxine	3,362 min.
Cocaine (interne standaard)	5,975 min.
Venlafaxine	8,565 min.

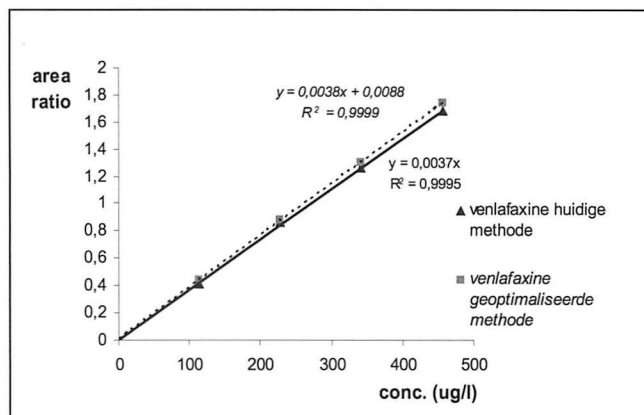
**Figuur 3:**  
Chromatogram interne kwaliteitscontrole volgens geoptimaliseerde methode met UVdetectie ( $\lambda=225\text{nm}$ )



## Retentietijden:

Desmethylvenlafaxine	3,299 min.
Cocaine (interne standaard)	5,912 min.
Venlafaxine	8,503 min.

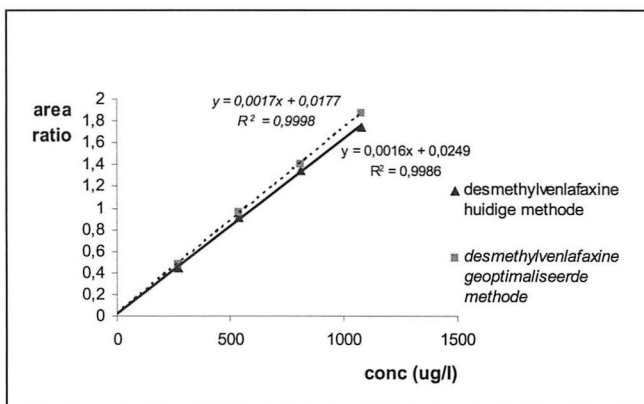
Voor het berekenen van de kalibratiecurve wordt de verhouding tussen piekoppervlak analiet/piekoppervlak interne standaard (area-ratio) uitgezet tegen de concentratie. De kalibratiecurves van venlafaxine en desmethylvenlafaxine zijn voor beide methodes lineair (figuur 4 en 5).



**Figuur 4:** Kalibratiecurve venlafaxine

Kalibratiecurve venlafaxine huidige methode:  $y = 0.0037x$ ;  $R^2 = 0.9995$ .

Kalibratiecurve venlafaxine geoptimaliseerde methode:  $y = 0.0038x + 0,0088$ ;  $R^2 = 0.9999$ .



**Figuur 5:** Kalibratiecurve desmethylvenlafaxine

Kalibratiecurve desmethylvenlafaxine huidige methode:  $y = 0.0016x + 0,0249$ ;  $R^2 = 0.9986$ .

Kalibratiecurve desmethylvenlafaxine geoptimaliseerde methode:  $y = 0.0017x + 0,0177$ ;  $R^2 = 0.9998$ .

Ook de interne kwaliteitscontrole voldoet aan de gestelde eisen met beide methodes:

	Conc. venlafaxine ( $\mu\text{g/l}$ ) (eis: 200.37-219.04 $\mu\text{g/l}$ )	Conc. desmethylvenlafaxine ( $\mu\text{g/l}$ ) (eis: 339.60-390.38 $\mu\text{g/l}$ )
Huidige methode	213	370
Geoptimaliseerde methode	212	369

De voordelen van de geoptimaliseerde methode ten opzichte van de huidige methode zijn:

- tijds winst : de capaciteit van de centrifuge is toereikend voor de hele serie, het decanteren van de buizen gaat sneller en eenvoudiger door de bevroren fase, door het gebruik van disposable buizen is geen schoonmaak nodig.
- patiëntvriendelijker : er is minder patiëntenmateriaal nodig.
- milieuvriendelijker : verbruik van minder organische oplosmiddelen.

## Conclusie

Bij de bepaling van venlafaxine in serum heeft fluorescendetectie zowel vanwege gevoeligheid als selectiviteit de voorkeur boven UV-detectie.

De huidige bepaling van venlafaxine in serum kan in elk geval sneller. Of de nieuwe methode even goed of zelfs beter is dan de huidige methode zal blijken uit de validatie. De eerste resultaten die behaald zijn met de geoptimaliseerde methode maken het de moeite waard deze validatie in de nabije toekomst uit te voeren.

### Literatuur/referenties

- [1] *Farmacotherapeutisch Kompas: medisch farmaceutische voorlichting/uitgave van de Commissie Farmaceutische Hulp van het College voor zorgverzekeringen, Amstelveen, (2006), blz 116-117.*
- [2] *www.kennisbank.knmp.nl geraadpleegd op 23-09-2007.*
- [3] *www.bepalingenwijzer.umcg.nl geraadpleegd op 23-09-2007.*
- [4] *H. Holthuysen, Bepaling van venlafaxine (Efexor®) in plasma, Extract, jaargang 17, nummer 2, (juli 2006), pag. 7-8.*
- [5] *D.G. Watson, Pharmaceutical Analysis, (2005), pag. 149-155.*
- [6] *D.R. Hicks, D. Wolaniuk, A. Russell, N. Cavanaugh Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Venlafaxine and O-Desmethylvenlafaxine in Biological Fluids, Therapeutic Drug Monitoring, 16, (1994), pag. 100-107.*

*Met dank aan mijn collega's van het Klinisch Farmaceutisch Laboratorium Slingeland ziekenhuis voor het aanleveren van analysedata en goede adviezen.*

## Nawoord

Bovenstaand artikel is geschreven als opdracht voor de module communicatie van de Specialistische cursus Klinische Farmacie en Toxicologie in het najaar van 2007. Enkele weken later heeft de directie van het Slingeland ziekenhuis besloten het Klinisch Farmaceutisch Laboratorium te integreren in het Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium (KCHL) en de functie van farmaceutisch analist per 1 februari 2008 op te heffen. Voorlopig wordt een aantal analyses uitgevoerd op het KCHL, waaronder de hierboven beschreven bepaling van venlafaxine. Of deze situatie zo blijft, is op dit moment (april 2008) nog niet duidelijk.