



METHODOLOGY OF STEREOSELECTIVE DETERMINATION OF VERAPAMIL IN SERUM

Jolanta WILIMOWSKA¹, Wojciech PIEKOSZEWSKI², Ewa FLOREK³

¹*Department of Analytical Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Krakow*

²*Institute of Forensic Research, Krakow*

³*Laboratory of Environmental Research, Department of Toxicology, University of Medical Sciences, Poznań*

Abstract

Verapamil was extracted from serum by liquid-liquid extraction (pH 9) with hexane. For the analysis of extracts, high performance liquid chromatography with fluorescence detector was used (excitation at 230 nm, emission at 312 nm). Oxprenolol was used as an internal standard. The stereoselective separation of verapamil was carried out on a ChiraDex column. More than 60% of the enantiomers of verapamil were separated from each other using a mobile phase of 5% triethylamine acetate – methanol (80:20, v/v). The flow rate of the mobile phase was 1 ml/min. The method developed was characterised by linearity of concentration ranging from 2.5 to 200 ng/ml for each of the verapamil enantiomers. The enantiomers were identified at an average retention time of 10.8 min for S(–)-verapamil and 11.7 min for R(+)-verapamil. The limit of detection equalled 0.7 ng/ml and 0.6 ng/ml for S(–)- and R(+)-verapamil respectively. The limit of quantitation was 2.5 for both verapamil isomers. Intra and inter-day precision ranged from 3.1–8.5%. This method was applied to analysis of verapamil in one case of fatal poisoning, one acutely poisoned patient and in three pregnant women who had received verapamil for therapeutic purposes.

Key words

Stereoselectivity; Chiral chromatography; Verapamil.

Received 15 November 2005; accepted 28 December 2005

1. Introduction

Verapamil is a known calcium channel blocker, a derivative of phenylalkylamine and used in clinical practice for treatment of cardiovascular system diseases, especially in controlling arterial hypertension, angina pectoris and supraventricular arrhythmias [9]. It is available as a racemic mixture in both immediate and sustained release preparations. The stereoselective properties of verapamil, determined by an asymmetric centre within its molecular structure, indicate the existence of two enantiomers of verapamil, which differ in their pharmacodynamics and pharmacokinetics. S(–)- and R(+)-verapamil belong to a category of chiral

drugs that have qualitatively similar, but quantitatively different, activity [7]. The negative dromotropic effect is up to 20 times more potent for S-verapamil than R-verapamil. Both enantiomers of verapamil are metabolised by the same enzymes, mainly CYP3A4, CYP1A2 and CYP2C, but at different rates. S-verapamil is preferentially metabolised. Serum levels of the S-enantiomer are always lower than those of the less active R-enantiomer. After intravenous administration, the R to S serum concentration ratio is around 2 and increases to 5 after oral administration, which is caused by an extensive stereoselective presystemic first-pass metabolism. As a consequence, oral bioavailabilities of R-verapamil and S-verapamil are

around 50% and 20% respectively [3, 6]. In addition, the apparent oral clearance of S-verapamil is almost five times higher than R-verapamil [4]. The pharmacokinetic disposition of verapamil enantiomers has more often been studied after oral administration, because of the significant differences in the pharmacokinetic parameters of the two enantiomers. In some research, the effect of age on stereoselective pharmacokinetics and pharmacodynamics of verapamil has been shown [1, 8, 10].

In the literature some methods of determination of verapamil enantiomers are described [2, 4, 5, 11, 12]. All these methods utilised the direct separation of enantiomers by high performance liquid chromatography on chiral stationary phases. Chu et al. as the first, separated verapamil enantiomers and determined their serum concentrations [4]. In this study, achiral-chiral high performance liquid chromatography was used. The composition of verapamil and norverapamil enantiomers was separated on an α -1-acid glycoprotein chiral stationary phase (Chiral AGP-CSP) after prior analysis of a racemic mixture of verapamil and norverapamil on a hydrophobic phase column (Hisep) [4]. The next study utilised a chiral stationary phase composed of 3,5-dimethylphenylcarbamate-derivatised amylose coated on silica, which is commercially known as Chiralpak AD [11]. Fieger and Blaschke developed a method of determination of the enantiomeric ratio of verapamil in plasma by HPLC on the α -1-acid glycoprotein chiral stationary phase (Chiral AGP) after the acetylation of the main metabolite norverapamil, which interferes with the separation of verapamil [5]. As a consequence, verapamil and norverapamil were determined simultaneously without prior derivatisation on a Chiralpak AD column [5]. Most authors have used fluorescence detection to detect this drug and its metabolite.

The aim of this paper was to develop and validate a rapid, simple and inexpensive method of determination of verapamil enantiomers in human plasma on a ChiraDex column, and apply it to forensic, toxicological and clinical cases.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

S(-)-verapamil hydrochloride and R(+)-verapamil hydrochloride were obtained from Research Biochemicals International (RBI). Oxprenolol hydrochloride, used as the internal standard, was purchased from Polfa (Warszawa, Poland). Methanol and triethyl-

ammonium acetate, applied to prepare the mobile phase, and hexane, used for extraction, were supplied respectively by Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) and were all HPLC grade. Purified water was obtained by distillation in an internal hospital distillery and then deionization in Synchrom System. Drug-free human plasma was obtained from the Blood Donation Centre (Krakow, Poland).

2.2. Instrumentation

A Crystal 200 (ATI Unicam) liquid chromatography system equipped with a 7125 Rheodyne injector with a 100 μ l loop and Spectra SYSTEM FL 2000 (ATI Unicam) fluorescence detector were used in the study.

The separation of verapamil enantiomers was carried out on a LichroCART 250-4 ChiraDex column (250 mm \times 4.0 mm, 5 μ m particle size) with a LiChroCART 4-4 HPLC guard column ChiraDex (4.0 mm \times 4.0 mm μ m particle size) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The detector was set at an excitation wavelength of 230 nm and an emission wavelength of 312 nm.

For analytes, isocratic conditions were applied, using as a mobile phase a mixture of 5% triethylammonium acetate and methanol (80:20, v/v). A constant flow rate of the mobile phase was established at 1ml/min.

2.3. Serum, standards and controls

2.3.1. Standard solutions

Stock solutions (60 μ g/ml) were prepared by dissolving the appropriate amounts (powder) of R- and S-verapamil in distilled water and these were then stored in aliquots of 200 μ l at -20° C. The working solutions of the analytes were prepared by diluting the stock solutions with mobile phase to concentrations ranging from 100 ng/ml to 4 μ g/ml. These solutions were then used to spike plasma samples for calibration curves from 2.5 to 200 ng/ml for each enantiomer of verapamil. A single standard solution contained both R- and S-verapamil.

A stock solution of IS (oxprenolol) at a concentration of 1 mg/ml was prepared in ethanol and then diluted with the mobile phase to the desired concentration of the working solution.

The control samples used for evaluating the validation parameters were prepared by spiking negative se-

rum (drugs free) to obtain the following concentration of enantiomers of verapamil: 25, 75 and 150 ng/ml.

2.3.2. Sample preparation

200 μ l of 3.5M NaOH and 100 μ l of 100 μ g/ml internal standard (oxprenolol) were added to all standard, control and studied samples (1.0 ml of serum). Such samples were mixed for 30 s. Next, the samples were subjected to liquid-liquid extraction with 6 ml of hexane, shaken for 30 min and centrifuged (2500 rpm) for 10 min. The hexane layer was decanted into a clean glass tube and evaporated to dryness under a dry nitrogen stream at room temperature. After evaporation, the residue was dissolved in 200 μ l of the mobile phase and 100 μ l was injected into the chiral HPLC system.

2.3.3. Biological samples

Autopsy samples (whole blood) were kindly received from the Institute of Forensic Research in Krakow. Serum samples from poisoned patients were sent to the laboratory at the Toxicology Clinic, Jagiellonian University. Samples of serum were collected from patients with a steady-state level of verapamil after chronic administration of 120 mg of verapamil every six hours. All the examinations (of living persons) were carried out for diagnostic purposes.

3. Results and discussion

Chiral separation of verapamil was achieved on a ChiraDex column containing spherical particles of silica gel with β -cyclodextrin bonded covalently. Cyclodextrins are naturally occurring oligosaccharides with hydrophobic cavities, which form an inclusion complex with organic substances in aqueous solutions. These properties of β -cyclodextrins, linked with chiral glucose units, enable their use in stereoselective chromatographic separation.

One major advantage of ChiraDex is that very simple solvents can be used in the mobile phase. The most successful separations with ChiraDex have used mixtures of methanol and water, phosphate buffer or triethylammonium acetate as a mobile phase. The choice of the organic solvent influences the enantioselectivity of ChiraDex. With increasing polarity of the organic solvent (methanol > ethanol > acetonitrile), the separation of the enantiomers is improved. The separation of optical isomers is better by using buffers or triethylammonium acetate.

From the research carried out on the chiral separation of verapamil, it was shown that a mobile phase composed of 5% triethylammonium acetate – methanol (80:20, v/v) gives the best results.

The optimal pH of the mobile phase in the stereoselective analysis of verapamil was 4.5 and room temperature was selected for all performed determinations.

The enantiomers of verapamil were separated more than 60 percent from each other in the selected HPLC condition. The retention time of R-verapamil and S-verapamil was approximately 11.7 and 10.8 min. respectively. The retention time for the internal standard was 4.4 min. Chromatographic separation of verapamil enantiomers is shown in Figure 1.

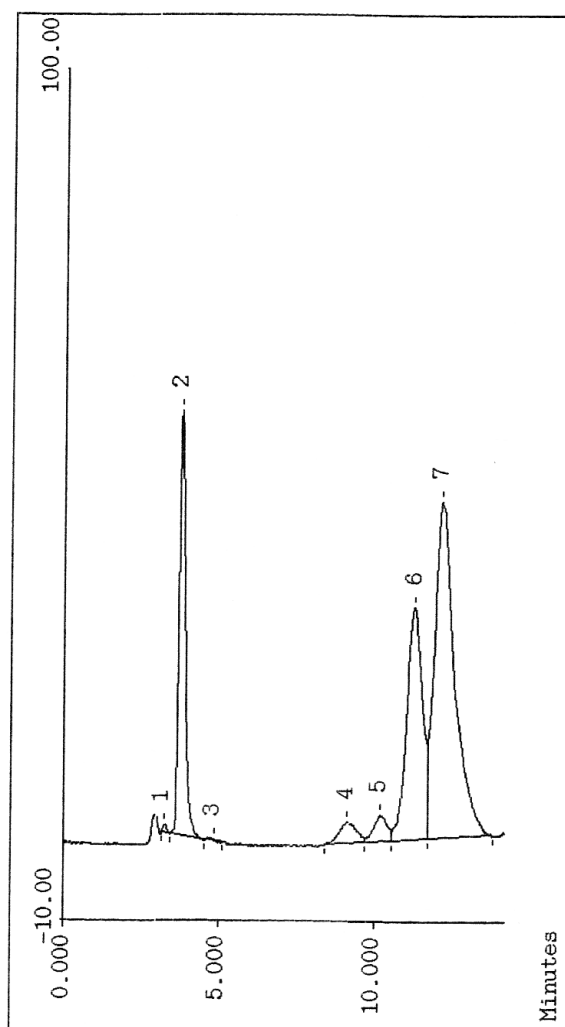


Fig. 1. 1 – chromatographic separation of verapamil enantiomers; 2 – internal standards; 6 – S(-)-verapamil; 7 – R(+)-verapamil.

TABLE I. ANALYTICAL METHOD VALIDATION PARAMETERS FOR HPLC-FL DETERMINATION OF ENANTIOMERS OF VERAPAMIL IN SERUM

	S(-)-verapamil	R(+)-verapamil		
Linearity [ng/ml]		5–200		
LOD [ng/ml]	0.7	0.6		
LOQ [ng/ml]	2.5			
Inter-day precision (<i>n</i> = 4), RSD [%]				
20 ng/ml	3.1	3.4		
75 ng/ml	8.5	6.6		
150 ng/ml	7.8	7.8		
Inter-day precision (<i>n</i> = 4), RSD [%]				
20 ng/ml	6.4	6.6		
75 ng/ml	6.9	6.9		
150 ng/ml	5.6	5.6		
Recovery				
Measured concentration [ng/ml]	69.9	172.8	95.0	171.6
Target concentration [ng/ml]	75	150	75	150
Recovery [%]	93.3	115.2	95.0	114.4

For evaluating precision and recovery of the method (the internal standard was added to samples after extraction), a calibration curve was constructed for both enantiomers by measuring negative serum and serum spiked with analytes in the range from 2.5 to 200 ng/ml. Calibration curves were linear in this range. Regression and correlation coefficients of the calibration curves were, for R(+)-verapamil: $y = 0.0085x + 0.0117$ ($r^2 = 0.982$) and S(-)-verapamil: $y = 0.083x + 0.013$ ($r^2 = 0.981$).

High correlation factors confirm the suitability of the method for chromatographic analysis of compounds of interest in biological material.

The limit of detection (LOD) for R(+)-verapamil and S(-)-verapamil was 0.7 ng/ml and 0.6 ng/ml respectively, which were the concentrations of drugs at which the signal to noise ratio S/N was 3:1. The lowest concentration on the standard curve was taken as the limit of quantification (LOQ) (Table I).

The inter-day precision was evaluated by analysing four serum samples spiked with analytes to obtain three different levels (25, 75 and 150 ng/ml) in one series (Table I). The relative standard deviation (RSD) ranges were from 3.4% to 7.8% for R(+)-verapamil and 3.1% to 7.8% for S(-)-verapamil.

Inter-day reproducibility data (inter-assay precision) was determined by analysing of four spiked se-

rum samples at the same level as during study of inter-assay precision. The obtained results are presented in Table I.

The recovery of R(+)-verapamil ranged from 95.0 to 114.4% and 93.3 to 115.2% for S(-)-verapamil (Table I).

The developed and validated method was applied to determination of verapamil enantiomers in real samples. In the autopsy sample (whole blood), concentrations were 4720 ng/ml and 5610 ng/ml for S- and R-verapamil respectively. In the serum of the acutely poisoned patients, the concentration at the moment of admission to hospital was 810 ng/ml for S-verapamil and 2252 ng/ml for R-verapamil. After 72 hours, the concentration dropped to 24 ng/ml and 113 ng/ml respectively. In the three cases where verapamil was used for therapeutic purposes, concentrations were 59 ng/ml, 48 ng/ml and 70 ng/ml for S-verapamil and 215 ng/ml, 226 ng/ml and 265 ng/ml for R-verapamil.

4. Conclusion

The developed method of verapamil enantiomers quantification in serum with the use of oxprenolol as an internal standard is characterised by high sensitivity and appropriate validating parameters – linearity, precision

and recovery, allowing routine monitoring of verapamil enantiomers during therapy and determination of these compounds in poisoning (acute and fatal) cases.

ma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 1995, 667, 349–354.

References

1. Abernethy D. R., Wainer I. W., Longstreth J. A. [et al.], Stereoselective verapamil disposition and dynamics in aging during racemic verapamil administration, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993, 266, 904–911.
2. Asafu-Adjaye E. B., Shiu G. K., Solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography determination of verapamil and norverapamil enantiomers in urine, *Journal of Chromatography B* 1998, 707, 161–167.
3. Busse D., Fromm M. F., Mörike K., Disposition and pharmacologic effects of R/S-verapamil in patients with chronic atrial fibrillation: an investigation comparing single and multiple dosing, *Clinical Pharmacology Therapeutics* 2001, 69, 324–332.
4. Chu Y., Wainer I. W., The measurement of warfarin enantiomers in serum using coupled achiral/chiral, high-performance liquid chromatography (HPLC), *Journal of Chromatography* 1989, 497, 191–200.
5. Fieger H., Blaschke G. J., Direct determination of the enantiomeric ratio of verapamil, its major metabolite norverapamil and gallopamil in plasma by chiral high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1992, 575, 255–260.
6. Karim A., Piergies A., Verapamil stereoisomerism: enantiomeric ratios in plasma dependent on peak concentrations, oral input rate, or both, *Clinical Pharmacology Therapeutics* 1995, 58, 174–184.
7. Rentsch K. M. J., The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory, *Biochemistry Biophysics Methods* 2002, 54, 1–9.
8. Schwartz J. B., Capili H., Wainer I. W., Verapamil stereoisomers during racemic verapamil administration: effects of aging and comparisons to administration of individual stereoisomers, *Clinical Pharmacology Therapeutics* 1994, 56, 368–376.
9. Schwartz J. B., Keefe D. L., Kirsten R., Prolongation of verapamil elimination kinetics during chronic oral administration, *American Heart Journal* 1982, 104, 198–203.
10. Schwartz J. B., Troconiz I. F., Verotta D., Aging effects on stereoselective pharmacokinetics and pharmacodynamics of verapamil, *Clinical Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993, 265, 690–698.
11. Shibukawa A. Wainer I. W., Simultaneous direct determination of the enantiomers of verapamil and norverapamil in plasma using a derivatized amylose high-performance liquid chromatographic chiral stationary phase, *Journal of Chromatography* 1992, 574, 85–92.
12. Stagni G., Gillespie W. R., Simultaneous analysis of verapamil and norverapamil enantiomers in human plas-

Corresponding author

Wojciech Piekoszewski
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Krakow
e-mail: wpiekoszewski@ies.krakow.pl

METODA OZNACZANIA STEREOIZOMERÓW VERAPAMILU W SUROWICY

1. Wstęp

Verapamil należy do znanych blokerów kanałów wapniowych. Chemicznie jest pochodną fenyloalkilaminy i w praktyce klinicznej znajduje zastosowanie w leczeniu schorzeń układu sercowo naczyniowego, szczególnie nadciśnienia, duszniczy bolesnej i ponadkomorowej [9].

W lecznictwie występuje jako mieszanina racemiczna w preparatach o natychmiastowym i spowolnionym uwalnianiu. Ze względu na obecność w cząsteczce asymetrycznego węgla, verapamil występuje w postaci dwóch enancjomerów różniących się właściwościami farmakokinetycznymi i farmakodynamicznymi. Aktywność biologiczna S(-) i R(+) verapamilu pod względem jakościowym jest taka sama, natomiast różni się ilościowo intensywnością działania [7]. Ujemne działanie dromotropowe S-verapamilu jest około 20 razy silniejsze niż odmiany R. Oba izomery są metabolizowane przez te same enzymy, przede wszystkim CYP 3A4, CYP 1A2 i CYP 2C, ale szybkość tego procesu jest różna. Szybszej biotransformacji ulega S-verapamil, co powoduje, że poziom tego izomeru w surowicy jest niższy niż R-verapamilu. Po podaniu dożylnym stosunek stężeń enancjomeru R do S wynosi około 2, a po podaniu doustnym 5. Różnice te są spowodowane intensywnym metabolizmem leku w czasie pierwszego pasażu przez wątrobę. W konsekwencji efektu pierwszego przejścia dostępność biologiczna wynosi odpowiednio 50% i 20% dla R-verapamilu i S-verapamilu [3, 6]. Dodatkowo względny klirens po podaniu doustnym izomeru S jest prawie pięciokrotnie większy niż izomeru R [4].

Ze względu na znaczne różnice pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi enancjomerów verapamilu dyspozycja tego leku po podaniu doustnym jest często badana. Niektóre badania wykazały różnice w farmakokinetyce izomerów verapamilu w zależności od wieku pacjentów [1, 8, 10].

W piśmiennictwie naukowym wiele metod oznaczania stereoizomerów verapamilu zostało już opisanych [2, 4, 5, 11, 12]. Wszystkie te metody polegają na bezpośrednim rozdzieleniu izomerów techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej na chiralnych fazach stacjonarnych. Chu i współpracownicy jako pierwsi rozdzielili i wyznaczyli stężenie izomery verapamilu w surowicy [4]. W swoich badaniach zastosowali oni achiralno-chiralną wysokosprawną chromatografię cieczową. Enancjomery verapamilu i norverapamilu były rozdzielone na chiralnej fazie stacjonarnej, w skład której wchodził 1-kwaśny glikoproteid (Chiral AGP-CSP). Analiza ra-

cemicznej mieszaniny verapamilu była analizowana na fazie hydrofobowej (Hisep) [4]. W innych badaniach jako fazę stacjonarną zastosowano żel krzemionkowy pokryty pochodną dimetylofenylokarbamianu amylozy, dostępny pod handlową nazwą Chiralpac AD [11]. Fieger i Blaschke do wyznaczenia stosunku stężeń enancjomerów verapamilu w surowicy metodą HPLC zastosowali jako fazę stacjonarną 1-kwaśny glikoproteid (Chiral APG). Wcześniej przeprowadzona acetylacja głównego metabolitu verapamilu – norverapamilu wyeliminowała jego wpływ na wyniki oznaczania enancjomerów verapamilu [5]. Po zastosowaniu kolumny Chiralpak AD opracowana metoda pozwoliła na rozdzielenie izomerów verapamilu i norveapamilu bez wcześniejszej derywatywacji [5]. W większości opracowanych metod oznaczania verapamilu i jego metabolitu stosowana była detekcja fluorescencyjna.

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie szybkiej, prostej i niedrogiej metody oznaczania enancjomerów verapamilu w surowicy z zastosowaniem kolumny ChiraDex i wdrożenie jej do oznaczeń w przypadkach ostrych i śmiertelnych zatruc verapamilem.

2. Materiał i metoda

2.1. Odczynniki

Chlorowodorek S(-)-verapamilu i R(+)-verapamilu zostały zakupione w firmie Research Biochemicals International (RBI). Chlorowodorek oksprenololu stosowany w opracowanej metodzie jako standard wewnętrzny pochodził z Polfy Warszawa. Metanol i octan trietyloamonowy o czystości do HPLC będące składnikami fazy ruchomej oraz heksan (odczynnik do ekstrakcji) zostały dostarczone przez firmę Merck (Darmstadt, Niemcy) i Sigma Aldrich (Steinheim, Niemcy). Wodę destylowaną otrzymano w wewnętrznej destylarni szpitala i dejonizowano w systemie Synchron System. Surowica wolna od leków pochodziła ze Centralnej Stacji Krwiodawstwa w Krakowie.

2.2. Aparatura

W badaniach wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową Crystal 200 (ATI Unicam) z dozownikiem Rheodyne 7125 oraz pętlą dozującą o pojemności 100 μ l i detektorem fluorescencyjnym Spectra System FL 2000 (ATI Unicam).

Rozdział izomerów verapamilu prowadzony był w warunkach izokratycznych na kolumnie LichroCART 250-4 ChiraDex (250 mm 4,0 mm, 5 m) z prekolumną LiChroCART 4-4 (4,0 mm 4,0 mm, 5 m) zakupioną w firmie Merck (Darmstadt, Niemcy). Długość fali wzbudzenia detektora wynosiła 230 nm, a emisji 312 nm.

Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę 5% octanu trietyloamonowego i metanolu (80:20, v/v). Szybkość przepływu fazy wynosiła 1 ml/min.

2.3. Roztwory standardowe i kontrolne

2.3.1. Roztwory standardowe

Roztwór podstawowy R- i S-verapamilu (60 g/ml) był przygotowany przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości tych związków w wodzie destylowanej i przetrzymywany w porcjach po 200 l w temperaturze -20°C . Roztwory robocze analizów były przygotowane przez rozcieńczenie roztworu podstawowego fazą ruchomą w celu uzyskania stężeń od 100 ng/ml do 4 g/ml. Tak przygotowane roztwory były dodawane do surowicy (wolnej od leków) w celu otrzymania roztworów wzorcowych (krzywa wzorcowa) o stężeniach każdego z enancjomerów verapamilu od 2,5 do 200 ng/ml.

Roztwór podstawowy oksprenololu – standardu wewnętrznego (IS) o stężeniu 1 mg/ml – był przygotowany w etanolu i następnie rozcieńczony fazą ruchomą do uzyskania stężenia roboczego (100 g/ml).

Próby kontrolne enancjomerów verapamilu wykorzystywane w procesie walidacji metody przygotowano przez dodanie do surowicy wolnej od leków badanych związków u ilościach powodujących otrzymanie stężeń 23, 75 i 150 ng/ml.

2.3.2. Przygotowanie próbek do oznaczeń

Do wszystkich próbek wzorcowych, kontrolnych i badanych (1,0 ml surowicy) dodawano 200 l 3,5 M NaOH i 100 l IS o stężeniu 100 g/ml, po czym mieszano przez 30 sekund. Następnie do próbek dodawano 6 ml heksanu i wytrząsano przez 30 min. Po tym czasie próby wirowano (2500 rpm) przez 10 min. Pobraną warstwę organiczną odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu pozostałość rozpuszczano w 200 l fazy ruchomej i 100 l próbki wprowadzano do dozownika aparatu.

2.3.3. Próby biologiczne

Próbki krwi z materiału sekcyjnego otrzymano z Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie. Próbki surowicy od osób zatrutych zostały przysłane do rutynowych badań laboratoryjnych prowadzonych w Zakładzie Toksykologii Analitycznej i Terapii Monitorowanej CM UJ

w Krakowie. Próby surowicy (pacjenci leczeni verapami-lem) były pobrane w stanie stacjonarnym od pacjentów, którym podawano lek w dawce 120 mg co 6 godzin. Wszystkie badania (u osób żywych) były wykonane dla celów diagnostycznych.

3. Wyniki i ich dyskusja

Rozdział izomerów verapamilu został przeprowadzony na kolumnie ChiraDex. Kolumna ta jest wypełniona sferycznymi cząstkami żelu krzemionkowego pokrytymi związaną kowalencyjnie -cyklodekstryną. Cyklodekstryny to naturalne oligosacharydy z miejscami hydrofobowymi kompleksującymi substancje organiczne w środowisku wodnym. Te właściwości -cyklodekstryn związane z chiralną cząsteczką glukozy umożliwiają ich użycie do stereoselektywnego rozdzielania chromatograficznego. Zaletą fazy ChiraDex jest możliwość stosowania bardzo prostych składników w fazie ruchomej; najczęściej są to mieszaniny metanolu i buforu fosforanowego lub octanu trietyloamonowego. Wybór rozpuszczalnika organicznego ma duży wpływ na zdolność rozdzielczą tej fazy stacjonarnej. Wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika organicznego (metanol > etanol > acetonitryl) rozdział stereoisomerów ulega poprawie; wpływa na niego również dodatek buforów lub octanu trietyloamonowego.

Z przeprowadzonych badań wynika, że do rozdzielania enancjomerów verapamilu najlepsza faza ruchoma to mieszanina 5% octanu trietyloamonowego i metanolu w stosunku objętościowym 80:20, której pH wynosi 4,5. W tych warunkach izomery verapamilu rozdzielały się więcej niż w 60%. Czas retencji R-verapamilu wynosił 11,7 min, a S-verapamilu 10,8 min. Czas retencji standardu wewnętrznego był krótszy i wynosił 4,4 min. Przykładowy rozdział chromatograficzny enancjomerów verapamilu przedstawia rycina 1.

W celu wyznaczenia parametrów precyzji i odzysku metody (substancja wzorcowa była dodana do próbek po ekstrakcji) wyznaczono zakres liniowości metody. Kalibracje przeprowadzono przez wyznaczenie stężenia dodanych do surowicy niezawierającej leków obu enancjomerów verapamilu w ilościach pozwalających na osiągnięcie stężeń w zakresie 2,5–200 ng/ml. Równania regresji i współczynniki korelacji dla tych krzywych mają postać: $y = 0,0085x + 0,00117$ ($r^2 = 0,982$) dla R(+)-verapamilu, a $y = 0,0083x + 0,0013$ ($r^2 = 0,981$) dla S(-)-verapamilu. Wysokie współczynniki korelacji dla obu izomerów verapamilu potwierdzają przydatność opracowanej metody do ich oznaczania w materiale biologicznym.

Granica wykrywalności (LOD), za którą przyjęto stosunek sygnału do szumów 3:1 (S/N) dla R(+)-verapamilu, wynosiła 0,7 ng/ml, a dla S(-)-verapamilu 0,6 ng/ml.

Jako limit oznaczalności metody przyjęto najniższe stężenie na krzywej kalibracyjnej (tabela I).

W tabeli I przedstawiono wyznaczoną powtarzalność metody pomiędzy dniami dla trzech różnych poziomów stężeń (25, 75, 150 ng/ml) badanych enancjomerów.

Względny współczynnik zmienności dla izomeru R wynosił od 3,4% do 7,8%, a dla izomeru S verapamilu wahał się od 3,1% do 7,8%. Powtarzalność w ciągu dnia wyznaczono poprzez czterokrotne oznaczenie stężenia enancjomerów verapamilu w próbie o tym samym stężeniu zadanym. Uzyskane wyniki przedstawia tabela I.

Badania odzysku wykazały, że dla R-verapamilu wynosi on od 95,0 do 114,4%, a dla S-verapamilu od 93,3 do 115,2%.

Opracowaną metodę zastosowano do oznaczeń enancjomerów verapamilu w próbach rzeczywistych. W próbie krwi pobranej ze zwłok osoby śmiertelnie zatrutej verapamilem stężenie S(-) i R(+) verapamilu wynosiło odpowiednio 4720 ng/ml i 5610 ng/ml. W surowicy osób ostro zatrutych preparatem zawierającym verapamil w momencie przyjęcia ich do szpitala stężenie izomeru S-verapamilu wynosiło 810 ng/ml, a R-verapamilu 2252 ng/ml. Po upływie 72 godzin stężenia te wynosiły odpowiednio 24 i 113 ng/ml. W trzech przypadkach, w których verapamil podawano w celach terapeutycznych, stężenie S-verapamilu wynosiło 59 ng/ml, 48 ng/ml i 70 ng/ml, a R-verapamilu 215 ng/ml, 226 ng/ml oraz 265 ng/ml.

4. Wnioski

Opracowana metoda oznaczania enancjomerów verapamilu w materiale biologicznym (krew, surowica) z zastosowaniem oksprenololu jako wzorca wewnętrznego charakteryzuje się dużą czułością, a parametry walidacyjne tej metody (liniowość, powtarzalność, odzysk) potwierdzają jej przydatność do rutynowego stosowania. Może ona być wykorzystana zarówno do oznaczania stosunkowo niskich stężeń enancjomerów verapamilu obserwowanych po podaniu dawek terapeutycznych, jak i wysokich stężeń w przypadku zatruc (ostrych, śmiertelnych) preparatami zawierającymi verapamil.