

APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS TO ANALYSIS OF TRICYCLIC PSYCHOTROPIC DRUGS

Katarzyna MADEJ, Michał WO NIAKIEWICZ

Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow

ABSTRACT: Two separation modes of capillary electrophoresis (CE): capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) were used for toxicological analysis of blood samples and pharmaceutical preparations. These two techniques were tested on commonly used phenothiazines (PHE) and tricyclic antidepressants (TCA), which are drugs of forensic interest. The analytical potential of CZE and MECC was exemplified by the separation of four-drug mixtures added to blood and single-drug analyses of pharmaceuticals. The detection limit for promazine in blood and repeatability of identification parameters (standard deviations of relative migration times) for desipramine in a pharmaceutical preparation and promazine in blood samples were determined.

KEY WORDS: Capillary zone electrophoresis; Micellar electrokinetic capillary chromatography; Phenothiazines; Tricyclic antidepressants; Blood samples; Pharmaceuticals.

Problems of Forensic Sciences, vol. LII, 2002, 52–63

Received 5 November 2002; accepted 2 December 2002

INTRODUCTION

The first applications of capillary electrophoresis (CE) to drug analysis took place in the late seventies and early eighties [3]. Plastic capillaries were used at that time. In 1988 fused silica capillaries were introduced, which initiated the dynamic development of electrophoretic methods for drugs analysis. At present in this area, three CE separation modes are mostly used: capillary zone electrophoresis (CZE), micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) and chiral separations. At the beginning of the nineties, the first papers concerning CE applications to toxicological analysis appeared. For instance, this technique was applied to analysis of: barbiturates in serum and urea [4], benzodiazepines in urea [6] and serum [5], antiarrhythmic drugs, tricyclic neuroleptics and tricyclic antidepressants in urea [1] and phenothiazines in pharmaceutical preparations [2].

The aim of this work was to study the possibility of application of CZE and MECC to the analysis of psychotropic drugs in the phenothiazine (PHE)

and tricyclic antidepressant (TCAD) groups, in whole blood and pharmaceuticals as well.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The following drugs from PHE and TCAD groups were included in the study:

- PHE: chlorpromazine, levomepromazine, perazine, promazine, thioridazine;
- TCAD: amitriptyline, imipramine, clomipramine, desipramine, doxepin, nortriptyline, noxipityline.

The drug standards were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). The following electrolytes were used as separation buffers:

- CZE: 50 mM CAPSO (3-[cyclohexylamino]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid (Sigma, Germany) + methanol (HPLC grade – Merck, Germany) (70:30, v/v), pH = 9.5;
- MECC: 40 mM sodium tetraborate (POCH, Gliwice), pH = 9.5 with addition of 10 mM STDC (sodium salt of taurodeoxycholic acid) (Sigma, Germany).

Blood that had passed its expiration date was taken from the local blood bank (“blank samples”) in Cracow, Poland. Pharmaceutical preparations: Petylyl (Arzneimittelwerk, Dresden, Germany) and Anafranil SR (Novartis Pharma AG Basle, Switzerland) were bought in a Polish pharmacy.

Preparation of samples for analysis

The drugs were analysed as single drugs or drug mixtures after appropriate dilution of their methanolic standard solutions with water.

One tablet of each pharmaceutical preparation was pulverised in an agate mortar (after washing off the external layer from the tablet), dissolved in a suitable amount of methanol, subjected to ultrasound and filtered. Before analysis, methanolic solutions were appropriately diluted with water.

1 ml of “blank” blood was spiked with drug standard mixtures, in amounts of 5 µg each. In order to estimate the detection limit of promazine, this drug was added to “blank” blood in the following concentrations: 5; 2.5; 1.25; 0.63 and 0.31 µg/ml. Next the blood samples were extracted by the liquid-liquid technique, according to the following procedure. 1 ml of the sample was alkalisied with 3ml 0.6 M NaOH to pH = 12 and extracted using 5 ml of hexane with isoamyl alcohol (99:1, v/v). The whole was gently shaken for 10 min and then centrifuged (3000 rpm) for 10 min. The organic layer was

gradually transferred into 1.5 ml Eppendorf probes and evaporated to ca 0.5 ml under nitrogen. Using CZE the examined drugs were re-extracted into 0.01% phosphoric acid, and, in the case of MECC, into 0.01% phosphoric acid in 0.01 M aqueous solution of STDC. To this end, the organic layer was shaken with 50 μ l of appropriate medium for 3 min and centrifuged (5000 rpm) for 4 min. The separated aqueous layer was injected into the capillary.

Apparatus

A Prince 550 air thermostated capillary electrophoresis system (Prince Technologies, Emmen, Holland) with Lambda 1010 spectrophotometer (Bischoff, Leonberg, Germany) was used.

The separations of compounds were carried out in a bare fused silica capillary of 50 μ m ID and 100 cm/66 cm length, at 30 kV. Samples were injected into the capillary by the hydrodynamic technique using a pressure of 100 mbar for 6 sec. Detection of the analytes was carried out in light of wavelength 210 and 254 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The following 12 commonly used psychotropic drugs in the phenothiazine derivatives and tricyclic antidepressants groups (chlorpromazine, levomepromazine, perazine, promazine, thioridazine, amitriptyline, imipramine, clomipramine, desipramine, doxepin, nortriptyline and noxyptyline) were included in the study. Two separation modes of capillary electrophoresis: CZE and MECC were used. First, these techniques were tested on standard single drug solutions. The obtained results indicated that all tested drugs can be determined in pharmaceutical preparations.

In order to examine the separation possibilities of CZE and MECC methods in relation to the tested groups of compounds, these drugs were analysed as standard mixtures. Good separations were obtained for a maximum of four (Figure 1 and 2) and five (Figure 3) drugs. In the case of four-component mixtures, two PHEs (promazine and chlorpromazine) and two TCADs (desipramine and nortriptyline) were separated, and also four TCADs (doxepin, imipramine, amitriptyline and clomipramine). In the five-component mixture, five TCADs (desipramine, nortriptyline, imipramine, doxepin and amitriptyline) were separated.

Next, analyses of blood samples spiked with standard mixtures were carried out, and identification of the active substances in pharmaceuticals was performed as well. In the case of pharmaceuticals analysis, the matrix effect was not significant and both CE modes could be used interchangeably. For a higher repeatability of the identification parameter, a second standard

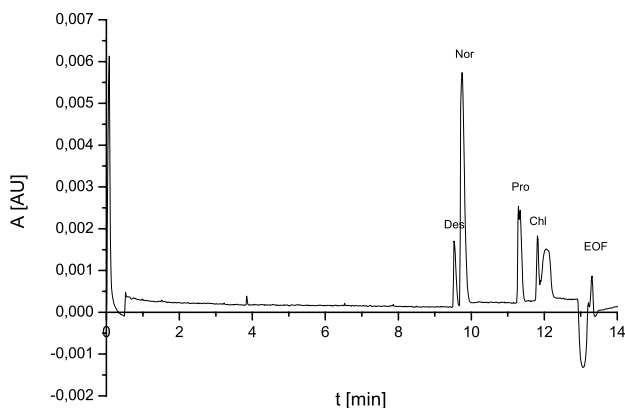


Fig. 1. Separation of a standard mixture of two PHEs: chlorpromazine (Chl), promazine (Pro) and two TCADs: desipramine (Des), nortriptyline (Nor) by CE-CZE. Separation buffer: 50 mM CAPSO + methanol (70: 30, v/v), pH = 9.5; EOF – electroosmotic flow.

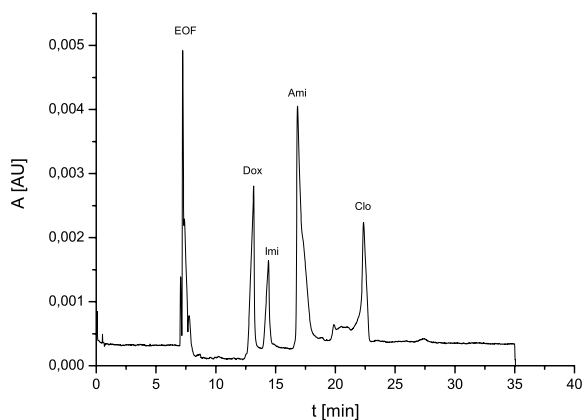


Fig. 2. Separation of a standard mixture of four TCADs: doxepin (Dox), imipramine (Imi), amitriptyline (Ami) and clomipramine (Clo) by CE-MECC. Separation buffer: 40 mM sodium tetraborate, pH = 9.5 with addition of 10 mM STDC; EOF – electroosmotic flow.

drug was added as an internal standard to preparation samples. The electropherograms gained for the analysed preparations are shown in Figures 4 and 5.

Application of CZE and MECC to the analysis of blood samples for tricyclic psychotropic drugs did not yield equally effective separation results (Figure 6 and 7). The influence of the biological matrix on the determination

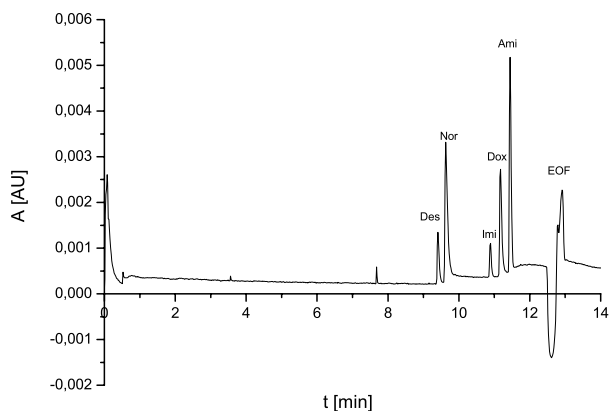


Fig. 3. Separation of a standard mixture of five TCADs: desipramine (Des), nortriptyline (Nor), imipramine (Imi), doxepin (Dox) and amitriptyline (Ami) by CE-CZE. The remaining data are the same as in Fig. 1.

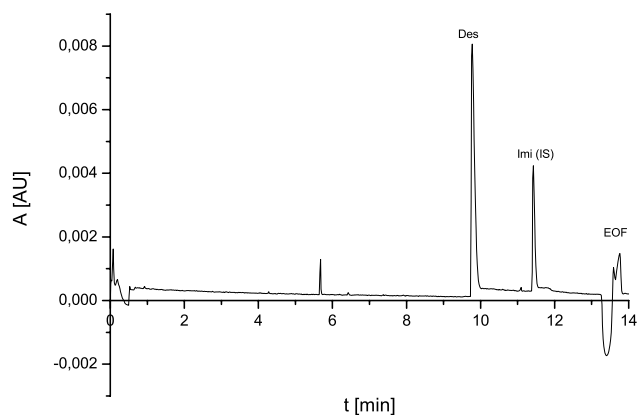


Fig. 4. Analysis of Petylyl (desipramine) with addition of imipramine (Imi) as an internal standard (IS) by CE-CZE. The remaining data are the same as in Fig. 1.

of desipramine, nortriptyline, promazine and chlorpromazine in blood by CZE was sufficiently significant to render impossible separation and identification of two out of the four drugs in the mixture (Figure 6). In this case, good separation of desipramine and nortriptyline was obtained, but promazine was poorly separated from the blood matrix, and chlorpromazine was completely masked by the “biological background”. However, the presence of endogenous compounds in the blood extract did not significantly influence the course of analysis by MECC of this material containing four drugs (Figure 7).

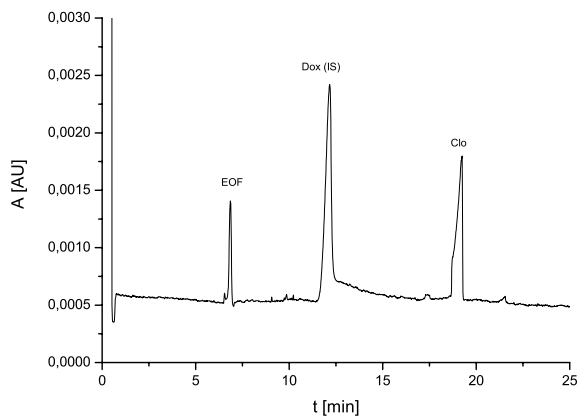


Fig. 5. Analysis of Anafranil (clomipramine) with addition of doxepin as an internal standard (IS) by CE-MECC. The remaining data are the same as in Fig. 2.

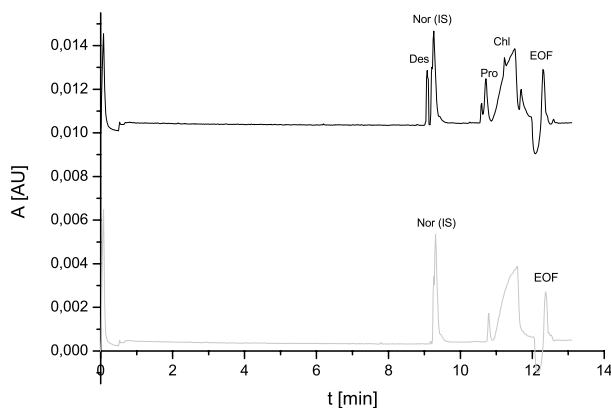


Fig. 6. Analysis of: (a) blood with addition of a standard mixture of two PHEs: chlorpromazine (Chl), promazine (Pro) and two TCADs: desipramine (Des), nortriptyline (Nor) and (b) "blank" blood by CE-CZE. The remaining data are the same as in Fig. 1.

Good separation of all four components (doxepin, imipramine, amitriptyline and clomipramine) in the mixture was achieved, but the peaks corresponding to the tested drugs were relatively broad, and the separation time was rather long (over 40 min).

The relative migration times (identification parameters) and their corresponding standard deviations for analyses of: promazine in blood by MECC

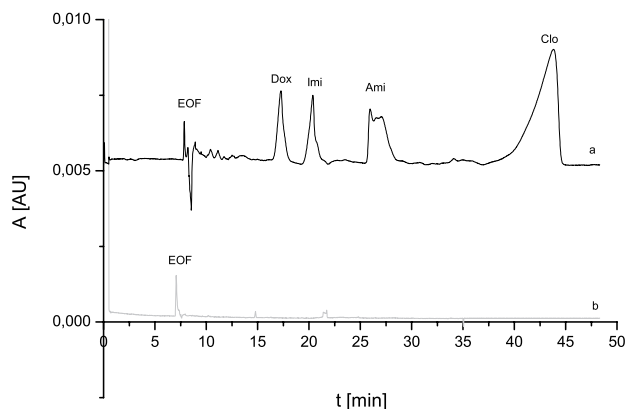


Fig. 7. Analysis of: (a) blood with addition of a standard mixture of four TCADs: doxepin (Dox), imipramine (Imi), amitriptyline (Ami) and clomipramine (Clo); (b) "blank" blood, by CE-MECC. The remaining data are the same as in Fig. 2.

and desipramine in a pharmaceutical preparation by CZE are given in Table I. The detection limit of promazine in blood was also estimated.

TABLE I. ANALYSIS OF PROMAZINE IN BLOOD BY MECC AND DESIPRAMINE IN A PHARMACEUTICAL PREPARATION (PETYLYL) BY CZE

Sample	Separation mode	Drug	Internal standard	Relative migration time	Standard deviation	LOD [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Number of repeated measurements
Blood	MECC	Promazine	Imipramine	1.08	0.05	0.65	5
Tablet	CZE	Desipramine	Imipramine	0.86	0.01	—	3

CONCLUSIONS

1. The peaks on electrophoregrams corresponding to tested drugs obtained by the CZE method were narrower and their migration times were shorter and more repeatable as compared with the appropriate peaks in the case of application of the MECC method.
2. Both separation modes: CZE and MECC may be equally effectively used for identification of the tested psychotropic drugs in pharmaceutical preparations.
3. MECC is preferable (to CZE) for blood analysis, because it possesses greater separation possibilities and significantly reduces the influence of the biological matrix on the separation results. In the case of appli-

cation of CZE to blood samples analysis, cleaner extracts, e.g. by using the SPE technique, are required. Alternatively, application of a combination of two CE variants (e.g. CZE with an addition of appropriate surfactant) may eliminate the matrix effect.

4. The estimated detection limit for promazine in blood (0.65 µg/ml) indicates that the CE procedure may be applied to the analysis of most commonly used tricyclic psychotropic drugs present in blood at low toxic concentration levels. An appropriately greater pre-concentration of blood samples, taking into account the possibility of analysis of small samples by CE (of the order of a dozen or so µl, and a single injection into the capillary – a few nl) will most probably allow a lowering of the detection limit to therapeutic concentration levels.

References:

1. Aumatell A., Wells R. J., Determination of a cardiac antiarrhythmic, tricyclic antipsychotics and antidepressants in human and animal urine by micellar electrokinetic capillary chromatography using a bile salt, *Journal of Chromatography B* 1995, vol. 669, pp. 331–344.
2. Muijselaar P. G. H. M., Claessens H. A., Cramers C. A., Determination of structurally related phenothiazines by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A* 1996, vol. 735, pp. 395–402.
3. Thormann W., Caslavská J., Capillary electrophoresis in drug analysis, *Electrophoresis* 1998, vol. 19, pp. 2691–2694.
4. Thormann W., Meier P., Marcolli C. [et al.], Analysis of barbiturates in human serum and urine by high-performance capillary electrophoresis-micellar electrokinetic capillary chromatography with on-column multi-wavelength detection, *Journal of Chromatography* 1991, vol. 545, pp. 445–460.
5. Tomita M., Okuyama T., Application of capillary electrophoresis to the simultaneous screening and quantitation of benzodiazepines, *Journal of Chromatography B* 1996, vol. 678, pp. 331–337.
6. Tomita M., Okuyama T., Sato S [et al.], Simultaneous determination of nitrazepam and its metabolites in urine by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography (Biomedical Applications)* 1993, vol. 621, pp. 249–255.

ZASTOSOWANIE ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ W ANALIZIE TRÓJPIERŚCIENIOWYCH LEKÓW PSYCHOTROPOWYCH

Katarzyna MADEJ, Michał WO NIAKIEWICZ

WSTĘP

Pierwsze zastosowania elektroforezy kapilarnej (CE) do analizy leków przypadają na przełom lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych dwudziestego wieku [3]. Stosowano wówczas kapilary plastikowe. W roku 1988 wprowadzono kapilary kwarcowe, które zapoczątkowały dynamiczny rozwój elektroforetycznych metod analizy leków. Aktualnie w tej dziedzinie najczęściej wykorzystuje się trzy warianty elektroforezy kapilarnej: kapilarną elektroforezę strefową (CZE), micelną elektrokinetyczną chromatografię kapilarną (MECC) oraz rozdziały chiralne. Od początku lat dziewięćdziesiątych pojawiają się również prace dotyczące zastosowań CE w analizie toksykologicznej. Technikę tę zastosowano m.in. do analizy barbituranów w surowicy i moczu [4], benzodiazepin w moczu [6] i surowicy [5], leków antyarytmicznych oraz trójpierścieniowych leków neuroleptycznych i przeciwdepresyjnych w moczu [1], a także fenotiazyn w preparatach farmaceutycznych [2].

Celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości zastosowania CZE i MECC do analizy leków psychotropowych z grupy fenotiazyn (PHE) i trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (TCAD) w pełnej krwi oraz w preparatach farmaceutycznych.

MATERIAŁY I METODY

Materiały

W badaniach uwzględniono następujące leki z grup PHE i TCAD:

- PHE: chlorpromazyna, lewomepromazyna, perazyna, promazyna, tiorydazy-na;
- TCAD: amitryptylina, imipramina, klomipramina, dezypramina, doksepin, nortryptylina i noksyptylina.

Standardy badanych leków były zakupione w firmie Sigma-Aldrich (Niemcy). Zastosowano następujące elektrolity jako bufony separacyjne:

- CZE: CAPSO kwas 3-[cyclohexylamino]-2-hydroksy-1 propanesulfonowy (Sigma, Germany) + metanol (HPLC grade – Merck, Niemcy) (70:30, v/v), pH = 9,5;
- MECC: 40 mM tetraboran sodu (POCH, Gliwice); pH = 9,5 z 10 mM STDC (sodowa sól kwasu taurodeoksycholinowego) (Sigma, Niemcy).

Przeterminowaną krew od dawców (“ślepa krew”) otrzymano w stacji krwiodawstwa w Krakowie. Preparaty farmaceutyczne: Petylyl (Arzneimittelwerk, Drezno, Niemcy) oraz Anafranil SR (Novartis Pharma AG Bazylea, Szwajcaria) zakupiono w aptece.

Przygotowanie próbek do analizy

Leki badano pojedynczo lub w mieszaninach po odpowiednim rozcieńczeniu wodą ich metanolowych roztworów wzorcowych.

Jedną tabletkę z każdego preparatu farmaceutycznego osobno ucierano w moździerzu agatowym (po uprzednim zmyciu z niej zewnętrznej warstwy), rozpuszczano w odpowiedniej ilości metanolu, poddawano działaniu ultradźwięków i filtrowano. Przed analizą metanolewe roztwory preparatów odpowiednio rozcieńczano wodą.

Do 1 ml ślepej próby krwi dodawano mieszaniny standardowych leków w ilościach po 5 µg każdy. W celu oszacowania granicy detekcji promazyny, do krwi dodawano ten lek w stężeniach: 5; 2,5; 1,25; 0,63 i 0,31 µg/ml. Następnie próbki krwi poddawano ekstrakcji typu ciec-z ciec według podanej dalej procedury. 1 ml próbki alkaliczowano 3 ml 0,6 M NaOH do pH = 12 i ekstrahowano 5 ml heksanu z alkoholem izoamylovym (99:1, v/v). Całość delikatnie wytrząsano przez 10 min, a następnie wirowano (3000 × rpm) przez 10 min. Warstwę organiczną przenoszono sukcesywnie do 1,5 ml plastikowych probówek Eppendorfa i odparowywano w atmosferze azotu do ok. 0,5 ml. Stosując wariant CZE leki reekstrahowano do 0,01% kwasu fosforowego, natomiast w przypadku zastosowania MECC – do 0,01% kwasu fosforowego w 0,01 M wodnym roztworze STDC. W tym celu warstwę organiczną wytrząsano z 50 µl odpowiedniego medium przez 3 min i odwirowywano przez 4 min (5000 × rpm). Oddzieloną wodną warstwę wstrzykiwano do kapilary.

Aparatura

W badaniach zastosowano termostatowany powietrzem system do elektroforezy kapilarnej Prince 550 (Prince Technologies, Emmen, Holandia) połączony ze spektrofotometrem (Bischoff, Leonberg, Niemcy).

Rozdziały związków przeprowadzane były w pustej kapilarze kwarcowej o średnicy 50 µm i długości 100 cm/66 cm pod napięciem 30 kV. Próbki wstrzykiwano do kapilary techniką hydrodynamiczną przy użyciu ciśnienia 100 mbar przez 6 s. Detekcję analitów prowadzono przy długościach fal światła 210 i 254 nm.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

W badaniach uwzględniono 12 powszechnie stosowanych leków psychotropowych z grupy pochodnych fenotiazyn i trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (chlorpromazynę, lewomepromazynę, perazyne, promazynę, tiorydazyne, amitryptylinę, imipraminę, klomipraminę, dezypraminę, doksepin, nortryptylinę i noksyptylinę). Zastosowano dwa warianty separacyjne elektroforezy kapilarnej, tj. CZE i MECC. W pierwszej kolejności wspomniane techniki testowano na wzorcowych roztworach pojedynczych leków. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że wszystkie testowane leki mogą być oznaczane w preparatach farmaceutycznych.

W celu zbadania możliwości separacyjnych zastosowanych metod: CZE i MECC w odniesieniu do testowanej grupy związków, leki te analizowano w ich wzorcowych mieszaninach. Dobre rozdziały uzyskano maksymalnie dla czterech (rycina 1 i 2) i pięciu (rycina 3) leków. W przypadku mieszanin czteroskładnikowych były to: dwie pochodne fenotiazyny (promazyna i chlorpromazyna) i dwa trójpierścieniowe leki

przeciwdepresyjne (dezypramina i nortryptylina) oraz cztery trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (doksepin, imipramina, amitryptylina i klomipramina), natomiast mieszaninę pięcioskładnikową stanowiło pięć trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych (dezypramina, nortryptylina, imipramina, doksepin i amitryptylina).

W następnej kolejności wykonano analizy próbek krwi z dodatkiem wzorcowych mieszanin leków, a także przeprowadzono identyfikację substancji czynnych w preparatach farmaceutycznych. W przypadku analizy środków farmaceutycznych efekt matrycowy nie odgrywał znaczącej roli i oba warianty CE mogły być stosowane zamiennie. W celu uzyskania większej powtarzalności parametru identyfikacyjnego do próbek preparatów dodawano drugi lek wzorcowy jako standard wewnętrzny. Uzyskane elektroforegramy dla analizowanych preparatów pokazano na rycinach 4 i 5.

Zastosowanie CZE i MECC do analizy próbek krwi na zawartość trójpierścieniowych leków psychotropowych nie dało jednakowo efektywnych wyników rozdzielania (ryciny 6 i 7). W przypadku analizy krwi na zawartość dezypraminy, nortryptyliny, promazyny i chlorpromazyny metodą CZE wpływ matrycy biologicznej okazał się na tyle istotny, że uniemożliwił on rozdział oraz identyfikację dwóch spośród czterech leków w mieszaninie (rycina 6). W tym przypadku uzyskano dobry rozdział dla dezypraminy i nortryptyliny, natomiast promazyna została słabo oddzielona od matrycy krwi, a chlorpromazyna została całkowicie zamaskowana przez „tło” biologiczne. Natomiast obecność związków endogennych w ekstrakcie krwi nie miała większego znaczenia dla przebiegu analizy metodą MECC tego materiału zawierającego cztery leki (rycina 7). Uzyskano dobry rozdział wszystkich czterech składników w mieszaninie (doksepin, imipramina, amitryptylina i klomipramina), jakkolwiek piki odpowiadające testowanemu lekom były stosunkowo szerokie, a czas separacji długi (ponad 40 min).

W tabeli I podano względne czasy migracji (parametry identyfikacyjne) i odpowiadające im odchylenia standardowe w dwóch przypadkach analiz: dla promazyny we krwi metodą MECC i dezypraminy w preparacie farmaceutycznym metodą CZE. Dla promazyny oszacowano również granicę detekcji we krwi.

WNIOSKI

1. Piki leków na elektroforegramach uzyskiwane metodą CZE są węższe, a czasy migracji krótsze i bardziej powtarzalne w porównaniu z odpowiednimi czasami migracji w przypadku zastosowania metody MECC.
2. Oba warianty separacyjne CZE i MECC mogą być równoważnie stosowane do identyfikacji testowanych leków psychotropowych w preparatach farmaceutycznych.
3. W odniesieniu do analizy krwi, wariant MECC jest bardziej preferowany niż wariant CZE, gdyż posiada on większe możliwości separacyjne i w znacznym stopniu redukuje wpływ matrycy biologicznej na wynik rozdzielania. W przypadku stosowania CZE do analizy próbek krwi wymagane są czystsze ekstrakty, np. przez zastosowanie techniki SPE. Alternatywną drogą eliminacji efektu matrycowego może być zastosowanie kombinacji dwóch wariantów CE, na przykład CZE z odpowiednim dodatkiem surfaktanta.

4. Oszacowana granica wykrywalności dla promazyny we krwi (0,65 $\mu\text{g/ml}$) wskazuje, że zastosowana procedura CE może być wykorzystywana w analizie większości powszechnie stosowanych trójpierścieniowych leków psychotropowych znajdujących się we krwi w niskich stężeniach toksycznych. Odpowiednio większe zatężenie próbki przy możliwości analizowania techniką CE małych objętości próbek (rzędu kilkunastu μl , pojedynczy nastrzyk próbki na kolumnę – kilka nl) najprawdopodobniej pozwoli obniżyć granicę wykrywalności do poziomu stężeń terapeutycznych.