

ANALYSIS OF PROMAZINE IN BIOLOGICAL FLUIDS BY HPLC AND MECC WITH SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION IN TWO CASES OF FATAL POISONING

Katarzyna MADEJ¹, Maria KAŁA², Michał WO NIAKIEWICZ¹

¹ Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow

² Institute of Forensic Research, Cracow

ABSTRACT: Results of quantitative analyses of promazine in biological fluids (blood and urine) by high performance liquid chromatography (HPLC) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) were compared. Spectrophotometric detection was used for both methods. The examined samples originated from two forensic cases of fatal poisoning with promazine. The obtained results were presented and summarised. The basic validation parameters of the two applied methods were determined and compared.

KEY WORDS: Promazine; High performance liquid chromatography; Micellar electrokinetic capillary chromatography; Biological fluids.

Problems of Forensic Sciences, vol. LVI, 2003, 15–23

Received 14 November 2003; accepted 18 December 2003

INTRODUCTION

Promazine (Figure 1) is a tricyclic antipsychotic compound which belongs to the most commonly used phenothiazine drugs. Promazine in its hydrochloride form is prescribed mainly for the treatment of psychosis in older people and is also used as an antiemetic medicine [1]. Therapeutic and toxic (or lethal, *L*) concentrations of this drug in blood are 0.1–0.4 and above 1 (*L* > 5) µg/ml, respectively.

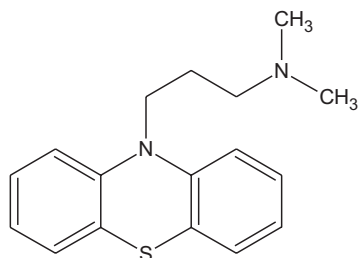


Fig. 1. Structure of promazine.

Promazine has been determined alone in various forms of pharmaceutical preparations or simultaneously with other structurally related drugs by various analytical techniques such as: chromatographic [2], electrochemical [3], spectrophotometric [4] and capillary electrophoretic [5] methods, and in biological fluids as well.

Capillary electrophoresis (CE) is a drugs analysis technique that has developed rapidly since the 1990's. Two separation modes of CE: capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) play a special role in this field. A variety of detection techniques such as: spectrophotometric, amperometric, thermo-optical and mass spectrometry have been coupled with the above mentioned separation techniques. However, to the knowledge of the authors, CE techniques have not yet been applied to the analysis of blood samples and are not routinely used in toxicological analysis.

The purpose of this work was to show that MECC may be used as a complementary or alternative method to HPLC in the toxicological analysis of promazine present in biological fluids. For this purpose, the MECC method based on the use of sodium taurodexycolate as a surfactant [6] was applied to the analysis of three samples of biological fluids originating from two forensic cases of fatal poisoning with promazine. Blood and urine samples were simultaneously examined using HPLC and MECC methods, both with spectrophotometric detection.

EXPERIMENTAL

Materials

Drug standards of promazine and imipramine (used as internal standard, IS) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). They were added to drug free blood (control blood) purchased from the local blood bank in Cracow and to drug free urine (control urine) obtained from a healthy person with no history of medicine-taking.

Forensic *post-mortem* blood and urine samples were sent to the Institute of Forensic Research in Cracow for toxicological examinations.

The mobile phase for HPLC used in gradient mode consisted of acetonitrile (B) and water with phosphoric acid (pH = 2.3) (A). The separation buffer for electrophoresis was prepared by the addition of 10 mM sodium salt of taurodeoxycholic acid (STDC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to 40 mM sodium borate, pH = 9.5.

Methods

HPLC and MECC were used as the analytical methods.

A series D-7000 liquid chromatograph equipped with an L-7450 diode array detector (DAD), LaChrom System (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) and a Prince 550 air thermostated capillary electrophoresis system

(Prince Technologies, Emmen, Holland) with a Lambda 1010 spectrophotometer (Bischoff, Leonberg, Germany) as UV-VIS detector were used.

Samples were injected into the separation column of a liquid chromatograph using a Rheodyne injection valve (fitted with a 20 μ l loop) and into the capillary using the hydrodynamic method (100 mbar pressure for 6 s).

Separation of analytes was conducted in a LiChroCART (125 \times 4 mm) column packed with octasilica LichroSpher RP Select B (5 μ m) (Merck, Darmstadt, Germany) and in a bare fused silica capillary of 50 μ m ID and 100/66 cm length at 30 kV, using HPLC and CE methods respectively. The flow rate of the mobile phase for HPLC was 1 ml/min. The gradient was programmed as follows: 80% A and 20% B linearly decreased to 70% A and increased to 30% B for 10 min, then returned to the initial conditions, i.e. 80% A and 20% B for 5 min.

Measurements of analytes were performed at 254 nm wavelength.

Extraction procedure

1 ml of control blood (or control urine) was spiked with standard solutions of promazine and imipramine (IS) at appropriate concentrations. The samples were adjusted to pH = 12 using 0.6 M NaOH (3 ml) and extracted with 5 ml hexane-isoamyl alcohol (99:1, v/v). Then 4 ml of organic layers were separated, evaporated to c.a. 0.5 ml under nitrogen and re-extracted to 100 μ l of 0.01% phosphoric acid. The aqueous layer was divided into two equal parts. One part was analysed by HPLC and the second one was evaporated to dryness, dissolved in 50 μ l of 0.01 M STDC solution and examined by MECC.

The autopsy samples of blood and urine were spiked with 5 μ g of imipramine and treated in the above mentioned way.

RESULTS

The forensic samples from two cases of fatal poisonings by promazine were analysed simultaneously by two methods: HPLC and MECC, in the conditions summarised in Table I. The quantitative results of promazine determinations achieved by these two methods are presented in Table II.

The MECC method was developed and validated for determination of promazine in relation to imipramine as the internal standard, using control blood (or control urine) spiked with the standard drug solutions. The following concentrations of promazine were obtained: 0.313; 0.625; 1.25; 2.5; 5.0 μ g/ml for blood and 1.25; 2.5; 5.0; 7.5 μ g/ml for urine. Imipramine was added to the analysed samples at a concentration of 5 μ g/ml.

TABLE I. ANALYTICAL CONDITIONS FOR HPLC AND MECC METHODS

Conditions	HPLC	MECC
Column/ capillary	RP-Select B 125 × 4 mm (5 μm)	Bare fused silica capillary $L = 100/66$ cm, $ID = 50$ μm
Mobile phase/ separation buffer	Acetonitrile + water with phosphoric acid (pH = 2.3) Gradient mode Flow = 1ml/min	40 mM sodium borate + 10 mM STDC, pH = 9.5
Detection method	Spectrophotometric $\lambda = 254$ nm	Spectrophotometric $\lambda = 254$ nm
Temperature	25°C	25°C
Voltage	–	30 kV

TABLE II. CONCENTRATIONS OF PROMAZINE IN BLOOD AND URINE SAMPLES DETERMINED BY HPLC AND MECC METHODS

Material	Case number	Concentration of promazine [μg/ml]	
		HPLC	MECC
Blood	I	4.59	4.72
	II	1.31	–
Urine	II	5.81	6.09

TABLE III. VALIDATION PARAMETERS OF HPLC AND MECC METHODS

Parameter	HPLC	MECC
Precision of identification parameter, Rt/Mt [RSD%]	0.56 ($n^* = 11$)	0.43 ($n = 9$)
Precision of quantification parameter, Ap/Ai [RSD%]	10.00 ($n = 4$)	9.88 ($n = 9$)
Limit of quantification (LOQ) [μg/ml]	0.125	0.63
Limit of linearity (LOL) [μg/ml]	0.125 – 2.0 $r^2 > 0.998$	1.25 – 5.0 $r^2 > 0.996$

*Number of repeated measurements.

The validation parameters, such as precision of identification parameter (repeatability of relative times of retention, R_t and migration, M_t), precision of quantification parameter (repeatability of the peak area ratios of promazine and imipramine, A_p/A_i), limit of quantification (LOQ), limit of linearity (LOL) and correlation coefficient (r_2) were determined and compared for both methods (Table III). The amount of blood sample from case II was not sufficient for promazine to be successfully determined by the MECC method. The obtained chromatograms and electrophoregrams were compared and presented in Figures 2 A and B.

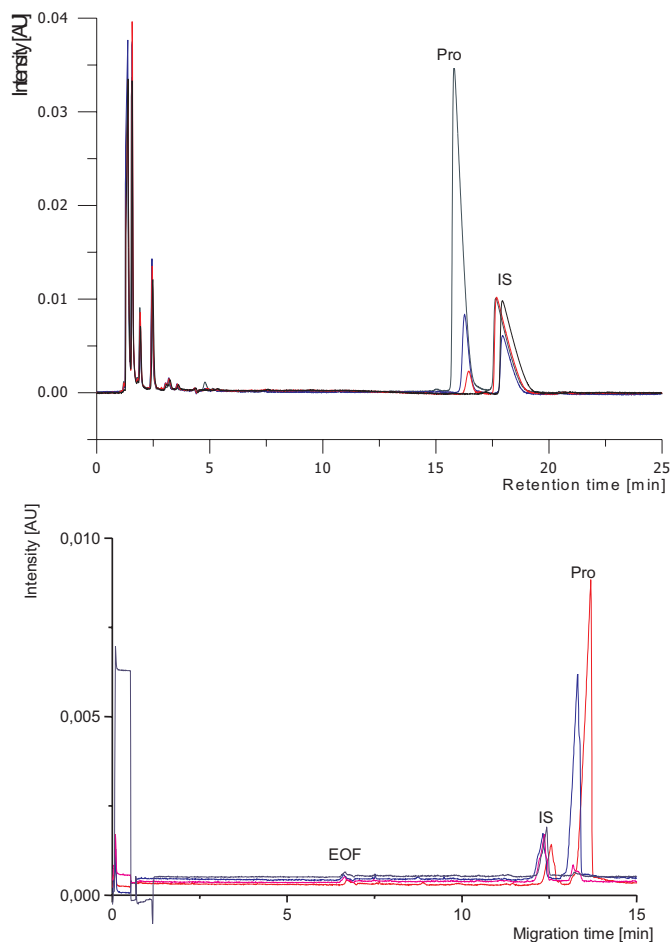


Fig. 2. Chromatograms and electrophoregrams of control blood sample spiked with standard drug mixtures of promazine (added at concentrations of: 0; 0.625; 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$) and imipramine (added at concentration of 5.0 $\mu\text{g/ml}$), examined by HPLC (A) and MECC (B) methods. EOF – electroosmotic flow, IS – imipramine, Pro – promazine.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The concentrations of promazine in blood and urine samples determined by two methods: HPLC and MECC, were comparable.

The LOQ for promazine in blood achieved by the MECC method was higher than that obtained by the HPLC method. However, the sensitivity of the MECC method allows this method to be used for biological fluids examination in cases of poisoning with promazine because the toxic concentration of promazine in blood is above 1 µg/ml. The repeatability of identification and quantitative parameters of both methods was comparable (Table I).

The linearity of both methods was examined in the concentration range of 0.125–2.0 µg/ml for HPLC and 1.25–5 µg/ml for MECC, and the obtained correlation coefficients (r^2) were greater than 0.996.

Taking into account the above mentioned facts we can conclude that the MECC technique may be used in forensic toxicological analysis of promazine, and can be considered a complementary method to HPLC. It is quite probable that other drugs that are structurally-related to promazine can also be determined by the elaborated MECC method.

References:

1. Anxiolytic, sedatives, hypnotics and antipsychotics, [in:] Martindale. The complete drug reference, Parfitt K. [ed.], Pharmaceutical Press, London 1999.
2. Madej K., Parczewski A., Kała M., HPLC/DAD screening method for selected psychotropic drugs in blood, *Toxicology Mechanisms and Methods* 2003, vol. 13, pp. 121–127.
3. Belal F., El-Ashry S. M., Shehata I. M. [et al.], Differential-pulse polarographic determination of some n-substituted phenothiazine derivatives in dosage forms and urine through treatment with nitrous acid, *Mikrochimica Acta* 2000, vol. 135, pp. 147–154.
4. El-Maaboud A. I. M., Utility of diphenylamine and N-bromosuccinimide for colorimetric determination of certain phenothiazine drugs, *Talanta* 1997, vol. 44, pp. 1173–1182.
5. 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.
6. Aumatell A., Wells R. J., Determination of 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.

ANALIZA PROMAZYNY W PŁYNACH USTROJOWYCH METODAMI HPLC I MECC ZE SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ DETEKcją W DWÓCH PRZYPADKACH ŚMIERTELNEGO ZATRUCIA

Katarzyna MADEJ, Maria KAŁA, Michał WO NIAKIEWICZ

WSTĘP

Promazyna (rycina 1) jest trójpierścieniowym związkiem przeciwpsychotycznym, który należy do najczęściej stosowanych leków fenotiazynowych. Promazyna w postaci jej chlorowodoru przepisywana jest głównie w terapii psychoz starszych ludzi oraz jest stosowana również jako lek przeciwwymiotny [1]. Stężenia terapeutyczne i toksyczne (lub spotykane w przypadkach śmiertelnych, L) tego leku we krwi wynoszą odpowiednio 0,1–0,4 i powyżej 1 ($L > 5$) $\mu\text{g/ml}$.

Promazyna była oznaczana, osobno lub jednocześnie, z innymi podobnymi strukturalnie lekami różnymi technikami analitycznymi, takimi jak metody chromatograficzne [2], elektrochemiczne [3], spektrofotometryczne [4] i elektroforezy kapilarnej [5] w różnych postaciach leku, jak również w płynach biologicznych.

Elektroforeza kapilarna (CE) jest – od ostatniej dekady ubiegłego wieku – dynamicznie rozwijającą się techniką analizy leków. W tej dziedzinie specjalną rolę odgrywają dwa jej separacyjne warianty: strefowa elektroforeza kapilarna (CZE) i micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC). Wiele różnorodnych technik detekcji, takich jak spektrofotometryczna, amperometryczna, termooptyczna i spektrometria mas, było łączonych z wyżej wspomnianymi technikami separacyjnymi. Aczkolwiek, zgodnie z wiedzą autorów, metody CE nie były jeszcze stosowane w analizie prób krwi i nie są rutynowo wykorzystywane w analizie toksykologicznej.

Celem pracy było wykazanie, że MECC może być stosowana jako uzupełniająca lub konkurencyjna metoda w stosunku do HPLC w analizie toksykologicznej promazyiny obecnej w płynach ustrojowych. W tym celu metoda MECC, oparta na zastosowaniu soli sodowej kwasu taurodeoksycholinowego jako substancji powierzchniowo czynnej [6], została zastosowana w analizie trzech prób płynów biologicznych pochodzących z dwóch ekspertyz, dotyczących zatrucia śmiertelnego promazyną. Próby krwi i moczu poddano jednoczesnemu badaniu, stosując metody HPLC i MECC, obie z detekcją spektrofotometryczną.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Materialy

Substancje wzorcowe leków: promazyiny i imipraminy (stosowane jako standard wewnętrzny, IS) otrzymano z firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, Stany Zjednoczone). Były one dodawane do krwi wolnej od leków (krew kontrolna) otrzymanej ze stacji

krwiodawstwa w Krakowie oraz do moczu wolnego od leków (mocz kontrolny) pobranego od zdrowej osoby nie przyjmującej leków.

Próby sekcyjnej krwi i moczu zostały przysłane do Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie celem przeprowadzenia badań toksykologicznych.

Faza ruchoma do HPLC, stosowana w trybie gradientu składu, składała się z acetonitrylu (B) oraz wody z kwasem fosforowym (pH = 2,3) (A). Bufor separacyjny do elektroforezy był przygotowany przez dodanie 10 mM soli sodowej kwasu taurodeoksycholinowego (STDC) (producent: firma Sigma-Aldrich, St Louis, Stany Zjednoczone) do 40 mM boranu sodowego, pH = 9,5.

Metody

Techniki HPLC i MECC zostały użyte jako metody analityczne. Zastosowano chromatograf cieczowy LaChrom System, model D-7000, wyposażony w detektor szeregu diod (DAD) L-7450 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Niemcy) oraz zestaw do elektroforezy kapilarnej Prince 550 termostatowany powietrzem (Prince Technologies, Emmen, Holandia) ze spektrofotometrem Lambda 1010 (Bischoff, Leonberg, Niemcy) jako detektorem UV-VIS.

Próbki wstrzykiwano na kolumnę separacyjną chromatografu cieczowego, używając zaworu wstrzykowego Rheodyne z pętlą 20 μ l, a do kapilary wykorzystano metodę hydrodynamiczną (ciśnienie 100 mbar przez 6 s).

Rozdział analitów prowadzono w kolumnie LiChroCART (125 \times 4 mm) z wypełnieniem typu oktasilica LichroSpher RP Select B (5 μ m) (Merck, Darmstadt, Niemcy) i w kapilarze kwarcowej o średnicy wewnętrznej 50 μ m i długości 100/66 cm z przyłożonym napięciem 30 kV, stosując – odpowiednio – metody HPLC i CE. Przepływ fazy ruchomej w metodzie HPLC wynosił 1 ml/min. Program gradientu składu fazy był następujący: 80% A i 20% B, liniowo obniżał się do 70% A i wzrastał do 30% B przez 10 min, a następnie wracał do warunków wyjściowych, tj. 80% A i 20% B przez 5 min. Pomiarów analitów przeprowadzono przy długości fali 254 nm.

Procedura ekstrakcji

Do 1 ml krwi kontrolnej (lub moczu kontrolnego) dodawano roztwory wzorcowe promazyiny i imipraminy (IS) w odpowiednich stężeniach. Próby były doprowadzane do pH = 12 za pomocą 0,6 M NaOH (3 ml) i ekstrahowane 5 ml mieszaniny heksan-alkohol izoamylowy (99:1, v/v). Następnie oddzielano 4 ml warstwy organicznej, odparowywano do ok. 0,5 ml pod azotem i reekstrahowano do 100 μ l 0,01% kwasu fosforowego. Warstwa wodna była dzielona na dwie części. Jedna część była analizowana metodą HPLC, a druga odparowywana do sucha, rozpuszczona w 50 μ l 0,01 M roztworu STDC i badana metodą MECC.

Do próbek sekcyjnych krwi i moczu dodawano 5 μ g imipraminy i traktowano je w wyżej podany sposób.

WYNIKI

Próbki przesłane do badań dla celów sądowych z dwóch przypadków śmiertelnego zatrucia promazyiną analizowano jednocześnie dwiema metodami: HPLC i MECC w warunkach zestawionych w tabeli I.

Wyniki oznaczeń promazyny uzyskane tymi metodami podano w tabeli II.

Opracowano i poddano walidacji metodę MECC do oznaczania promazyny względem imipraminy jako standardu wewnętrznego, stosując kontrolną krew (lub kontrolny moczu) z dodatkiem roztworów wzorcowych. Uzyskano następujące stężenia promazyny we krwi: 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 $\mu\text{g/ml}$ i w moczu: 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 $\mu\text{g/ml}$. Imipramina była dodawana do badanych próbek w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$.

Parametry walidacyjne, takie jak precyzja parametru identyfikacyjnego (powtarzalność względnych czasów retencji, R_i i migracji, M_i), precyzja parametru ilościowego (powtarzalność stosunków pól powierzchni pików promazyny i imipraminy, A_p/A_i), granica oznaczalności (LOQ), zakres liniowości (LOL) i współczynnik korelacji (r^2) były wyznaczane i porównywane dla obu metod (tabela 3). Ilość próby krwi (z przypadku II) była niewystarczająca, aby oznaczyć w niej promazynę metodą MECC. Otrzymane chromatogramy i elektroforegramy zostały porównane i przedstawione na rycinach 2 i 3.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Stężenia promazyny w próbach krwi i moczu oznaczone dwiema metodami: HPLC i MECC były porównywalne.

LOQ dla promazyny we krwi uzyskana metodą MECC była wyższa niż LOQ uzyskana metodą HPLC, aczkolwiek czułość metody MECC pozwala zastosować ją do badania płynów biologicznych w przypadkach zatrucia promazyną, ponieważ stężenie toksyczne promazyny we krwi wynosi ponad 1 $\mu\text{g/ml}$. Powtarzalność parametrów identyfikacyjnego i ilościowego dla obu metod była porównywalna (tabela I). Zakresy liniowości obu metod badania w przedziałach stężeń: 0,125–2,0 $\mu\text{g/ml}$ dla HPLC i 1,25–5,0 $\mu\text{g/ml}$ dla MECC, a współczynniki korelacji (r^2) były większe niż 0,996.

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione fakty, można wyciągnąć wniosek, że metoda MECC może być stosowana w analizie toksykologicznej promazyny i może być uznana za uzupełniającą metodę dla HPLC. Jest całkiem prawdopodobne, że inne leki, strukturalnie podobne do promazyny, mogą być również oznaczane opracowaną metodą MECC.