



SCREENING ANALYSIS OF FOURTEEN CLASSIC PSYCHOTROPIC DRUGS BY THE NON-AQUEOUS CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD

Katarzyna MADEJ, Anna MARCZYK, Michał WOZNIAKIEWICZ

Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow

Abstract

In our examinations, sixteen psychotropic drugs from the phenothiazines and tricyclic antidepressants group were studied. For the purpose of screening analysis, the separation conditions of the drugs were studied using capillary electrophoresis in a non-aqueous medium. The influence of both background electrolyte composition and the kind of medium used for dissolution of the drugs on the separation efficiency was examined. Noxiptyline was selected as the internal standard. In optimal separation conditions, the identification parameter – relative migration time (*RMT*) – and repeatability of the identification parameter for each drug tested were determined.

Key words

Phenothiazines; Tricyclic antidepressants; Screening analysis, Non-aqueous capillary electrophoresis.

Received 9 October 2005; accepted 30 December 2005

1. Introduction

Even though a number of new generation psychotropic drugs have been introduced onto the market, the classic psychotropic drugs, such as phenothiazines (PHEs) and tricyclic antidepressants (TCADs), are still frequently used in therapy. These drugs have turned out to be effective but also dangerous, especially TCADs, which are characterised by a relatively narrow “therapeutic window”. Psychotropic drugs are often overdosed and also taken with alcohol, which may result in serious poisoning or even death. It is also a well-known fact that both the above mentioned groups of drugs are frequently used together in psychiatric treatment.

Psychotropic drugs, due to their “specific” use, are often the subject of study in forensic and clinical toxicological analysis. They are usually detected and de-

termined in biological material, and thus chromatographic methods, especially HPLC and GC, are most often employed for their analysis.

Since the last decade of the previous century, capillary electrophoresis techniques have been developed dynamically in the area of drug analysis in various matrices, including biological samples.

A number of papers focusing on separation and determination of psychotropic drugs in biological fluids have also appeared [1, 2, 6, 7]. The usefulness of application of capillary electrophoresis to forensic analysis has also been presented [3, 4, 5]. A single psychotropic drug [3] or several psychotropic drugs simultaneously [4, 5] were detected and determined in whole blood samples using capillary electrophoresis, and as the reference method, high pressure liquid chromatography was applied.

The separation conditions used for screening analysis of seven phenothiazines by NACE [6] were unsatisfactory for simultaneous identification analysis of both groups: phenothiazines and tricyclic antidepressants. The aim of this work was to develop conditions for screening analysis of these two groups of drugs – PHEs and TCADs – by the non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) method.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and standards

Methanol and acetonitrile of HPLC-gradient grade were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). 85% phosphoric acid, ammonium acetate, lithium acetate, sodium acetate and glacial acetic acid of analytical grade were purchased from POCH (Gliwice, Poland). Deionised water was used. Standard drugs of pharmaceutical purity were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and Polish pharmaceutical companies.

The following drugs were included in the study:

- phenothiazines: chlorpromazine, promazine, levomepromazine, perazine, thioridazine, promethazine;
- tricyclic antidepressants: desipramine, amitriptyline, doxepin, nortriptyline, imipramine, clomipramine, nortriptyline, opipramol, noxipryline, trimipramine.

Drug stock solutions (10 mg/ml⁻¹) were prepared in methanol and stored in a refrigerator (+5 °C). Working standard drug mixtures were prepared by diluting the methanolic stock solutions with a suitable amount of acetonitrile, methanol, background electrolyte or diluted background electrolyte.

3. Experimental

3.1. Apparatus and experimental conditions

A Prince 550 air thermostated capillary electrophoresis system (Prince Technologies, Emmen, the Netherlands) with Lambda 1010 spectrophotometer (Bischoff, Leonberg, Germany) as UV-Vis detector was used. The following measurement conditions were applied:

- a bare fused silica capillary of 50 µm ID and 375 µm OD (Polymicro Technologies, Phoenix, USA), 100 cm (66 cm to the detector) long was used;
- the samples were injected by the hydrodynamic method, applying a pressure of 100 mbar for 6 s;

- ammonium acetate in acetonitrile-methanol-glacial acetic acid (50:49:1, v/v/v) was used as the starting background electrolyte, whose composition was changed during examinations. Before use, the background electrolyte was filtered with an RC15 0.45 µm filter (Merck, Darmstadt, Germany);
- drugs were detected by UV-light absorption at 254 nm.

3.2. Separation procedure

The separation procedure consisted of three steps: 1 – washing the capillary with the background electrolyte (2 min), 2 – injecting sample (6 s) and 3 – separating analytes with the background electrolyte under 30 kV (current c.a. 9 µA) (about 10 min).

Between measurements, the capillary was washed, using in sequence: 0.5 M sodium hydroxide (2 min), water (3 min), acetonitrile (2 min) and the background electrolyte (3 min).

A new capillary was conditioned by: 0.5M hydroxide sodium (5 min), water (5 min), acetonitrile (5 min) and background electrolyte (5 min). After measurements the capillary was flushed with water, methanol and then blow-dried with air and stored.

4. Results and discussion

A method for screening seven phenothiazines was developed, and the separation conditions were studied by changing three factors: quantitative composition of background electrolyte, the kind of salt cation present in the electrolyte and the kind of medium used for dilution of standard drug mixtures. The quantitative composition of the electrolyte: 20 mM ammonium acetate in the mixture: methanol-acetonitrile-glacial acetic acid (50:49:1, v/v/v) was optimised according to 22 and 23 factorial plans, presented in Figures 1 and 2. The number of peaks separated at the base line was accepted as the main optimisation criterion. From the conducted experiments, the optimal separation electrolyte was shown to be 20 mM ammonium acetate in a mixture of acetonitrile and methanol (1: 1, v/v).

Furthermore, the influence of three cations (ammonium, lithium and sodium) of acetate salt on the separation of analytes was studied. The best separation conditions were obtained using ammonium acetate in the above electrolyte of optimised composition (Figure 3).

In order to select the optimal medium for dilution of standard drug mixtures, acetonitrile, methanol and the background electrolyte were tested. Methanol and

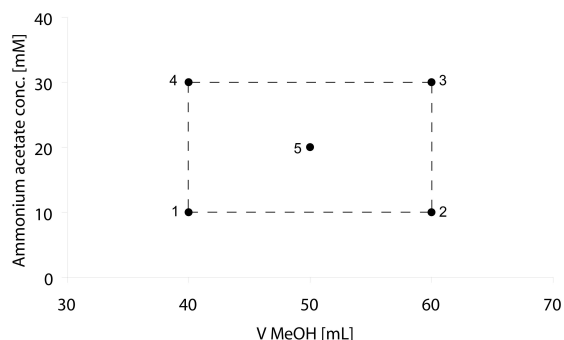


Fig. 1. Optimisation of the quantitative composition of the background electrolyte: ammonium acetate in the mixture: methanol/acetonitrile/glacial acetic acid, according to the 22 factorial plan. The content of acetic acid was constant (1 ml per 100 ml of the electrolyte).

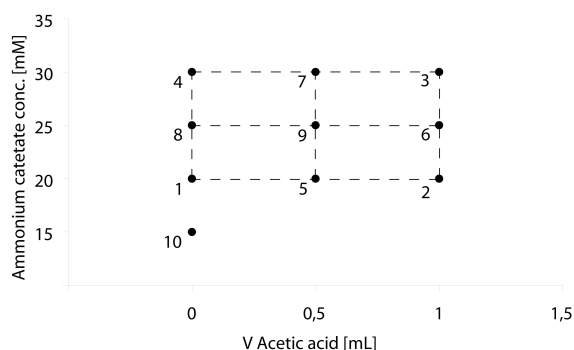


Fig. 2. Optimisation of the quantitative composition of the background electrolyte: ammonium acetate in the mixture: methanol/acetonitrile/glacial acetic acid, according to the 23 factorial plan. The content of methanol was constant (50 ml per 100 ml of the electrolyte).

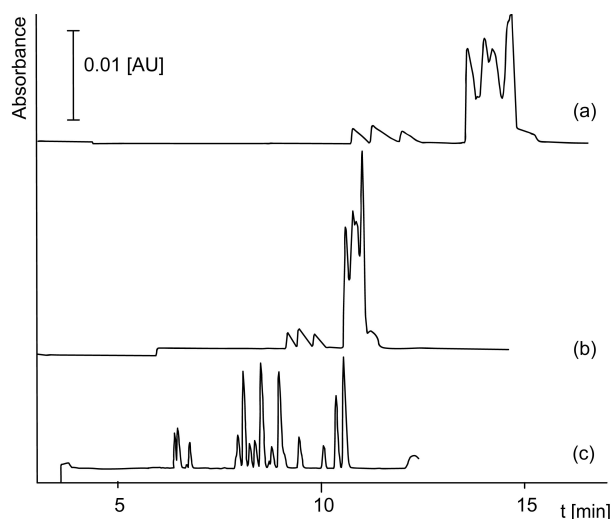


Fig. 3. Examination of the influence of salt cation present in the background electrolyte on the separation of the examined drugs: a) – sodium, b) – lithium, c) – ammonium.

acetonitrile turned out to be the best, with the latter being slight superior (Figure 4).

Finally, the following were selected as optimal conditions: background electrolyte – 20 mM ammonium acetate in acetonitrile-methanol (1:1, v/v), and acetonitrile as the medium for samples.

Screening analysis of fourteen psychotropic drugs was performed in optimal conditions (Figure 5) and, on the basis of repeated experiments, the main parameters of the proposed methods were evaluated. The relative migration times of noxyptyline, desipramine, opi-pramol, and desipramine and opi-pramol together were determined and presented in Table I. The best repeatability of migration times was ascertained for two drugs – desipramine and opi-pramol (the arithmetical mean of two relative migration times) and was a little worse for for noxyptyline (Table I). Finally, noxypty-

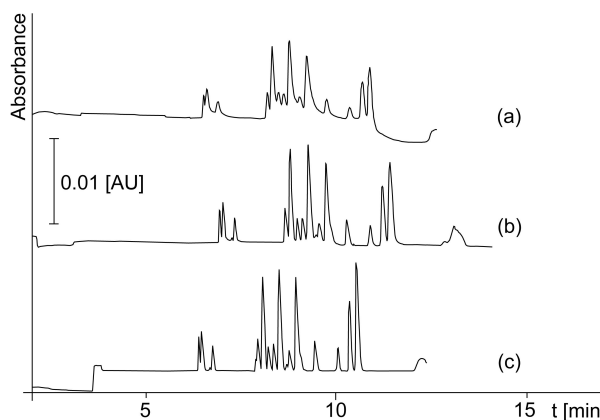


Fig. 4. Examination of the influence of the medium used for dilution of the standard drug mixture on separation of the examined compounds: a) – five times diluted background electrolyte, b) – background electrolyte, c) – methanol.

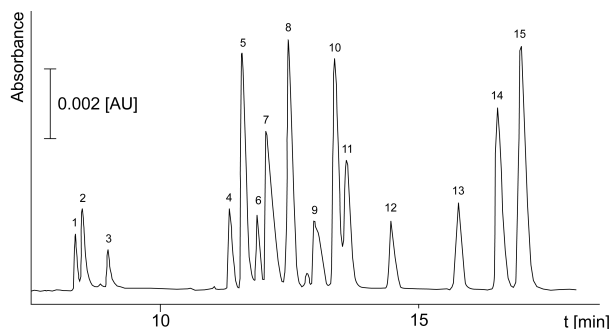


Fig. 5. Screening analysis of fourteen classic psychotropic drugs in optimal conditions: 1 – desipramine, 2 – nortryptyl-ine, 3 – nordoxepin, 4 – imipramine, 5 – levomepromazine, 6 – amitriptyline, 7 – clomipramine, 8 – promazine, 9 – doxepin, 10 – thioridazine, 11 – chlorpromazine, 12 – noxyptyline (IS), 13 – promethazine, 14 – opi-pramol, 15 – perazine.

line was selected as the internal standard. The repeatability of the identification parameter (MT in relation to noxiptyline) encompassed the range from 0.60 for desipramine to 1.16 for perazine (% RSD).

5. Summary

1. Conditions for screening analysis of fourteen classic psychotropic drugs from the phenothiazines and tricyclic antidepressants group were developed. Almost all drugs were base line separated and only one pair of drugs – thioridazine and chlorpromazine were not completely separated.
2. In the near future the proposed method will be applied to analysis of blood samples containing the examined drugs.

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, 669, 331–344.
2. Cantú M. D., Hillebrand S., Queiroz M. E. C. [et al.], Validation of non-aqueous capillary electrophoresis for simultaneous determination of four tricyclic antidepressants in pharmaceutical formulations and plasma samples, *Journal of Chromatography B* 2004, 799, 127–132.
3. Madej K., Kała M., Woźniakiewicz M., Analysis of promazine in biological fluids by HPLC and MECC with spectrophotometric detection in two cases of fatal poisoning, *Problems of Forensic Sciences* 2003, 56, 17–25.
4. Madej K., Kała M., Woźniakiewicz M., LC and non-aqueous CE determination of phenothiazines in autopsy samples, *Chromatographia* 2005, 62, 533–538.
5. Madej K., Woźniakiewicz M., Kała M., Method for screening and quantification of seven phenothiazines in whole blood samples by non-aqueous capillary electrophoresis, *Chromatographia* 2005, 61, 259–263.
6. Rodríguez-Flores J., Berzas-Nevaldo J. J., Contento-Salcedo A. M., [et al.], Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of tamoxifen, imipramine and their main metabolites in urine, *Talanta* 2005, 65, 155–162.
7. Veraart J. R., Brinkman U. A. T., Dialysis-solid-phase extraction combined on-line non-aqueous capillary electrophoresis for improved detectability of tricyclic antidepressants in biological samples, *Journal of Chromatography A* 2001, 922, 339–346.

Corresponding author

Katarzyna Madej
Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Ingardena 3
30-060 Kraków
e-mail: madejk@chemia.uj.edu.pl

ANALIZA SKRYNINGOWA CZTERNASTU KLASYCZNYCH LEKÓW PSYCHOTROPOWYCH METODĄ NACE

1. Wstęp

Pomimo wprowadzenia leków psychotropowych nowej generacji, klasyczne leki psychotropowe, takie jak fenotiazyny (PHE) i trójpierścieniowe przeciwdepresyjne (TCAD), są nadal często stosowane w terapii. Leki te okazały się skuteczne, ale także niebezpieczne, szczególnie TCAD, które charakteryzują się stosunkowo wąskim „oknem terapeutycznym”. Leki psychotropowe są często przedawkowywane, a także przyjmowane z alkoholem, co może prowadzić do bardzo poważnych konsekwencji zdrowotnych. Dobrze znany jest również fakt, że obie wyżej wspomniane grupy leków są często używane razem w leczeniu psychiatrycznym.

Leki psychotropowe, ze względu na swoją specyfikę, są często spotykane w sądowej i klinicznej analizie toksykologicznej. Zwykle wykrywa się je i oznacza w materiale biologicznym, dlatego też metody chromatograficzne, w szczególności HPLC i GC, są najczęściej stosowane do ich analizy.

Od ostatniej dekady ubiegłego wieku techniki elektroforezy kapilarnej rozwijają się dynamicznie, zwłaszcza w zakresie analizy leków w różnych matrycach, łącznie z próbkami biologicznymi. Ukazała się również pewna liczba publikacji omawiająca rozdział i oznaczanie leków psychotropowych w płynach biologicznych [1, 2, 6, 7]. Przedstawiono także użyteczność zastosowania elektroforezy kapilarnej w analizie sądowej [3, 4, 5]. Pojedynczy lek psychotropowy [3] lub jednocześnie kilka leków psychotropowych [4, 5] było wykrywane i oznaczane w próbach krwi przy użyciu metod elektroforezy kapilarnej oraz wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej jako metody odniesienia.

Celem tej pracy było rozwinięcie warunków analizy skryningowej metodą niewodnej elektroforezy kapilarnej obejmującej dwie grupy leków – PHE i TCAD.

2. Metody i materiały

2.1. Odczynniki i wzorce

Metanol i acetonitryl o czystości do chromatografii gradientowej były dostarczone przez firmę Merck (Darmstadt, Niemcy). 85% kwas fosforowy, octan amonu, octan litu, octan sodu i lodowaty kwas octowy o czystości cz.d.a. zakupiono w firmie POCH (Gliwice, Polska). Zastosowano wodę dejonizowaną. Wzorce leków były pozyskane z firmy Sigma-Aldrich (St. Louis,

Stany Zjednoczone) oraz polskich zakładów farmaceutycznych.

Wzięto pod uwagę następujące leki:

- fenotiazyny: chlorpromazyne, promazyne, lewomepromazyne, perazyne, tiorydazyne, prometazyne;
- trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne: dezypraminę, amitryptylinę, doksepinę, nordoksepinę, imipraminę, klomipraminę, nortryptylinę, opipramol, noksyptylinę, trimipraminę.

Wzorce do przechowywania (10 mg/ml^{-1}) były przygotowywane w metanolu i przechowywane w lodówce ($+5^\circ\text{C}$). Robocze wzorcowe mieszaniny leków były przygotowywane przez rozcieńczenie roztworów metanолоwych odpowiednią ilością acetonitrylu, metanolu, elektrolitu podstawowego lub rozcieńczonego elektrolitu podstawowego.

2.2. Aparatura i warunki eksperymentalne

Użyto systemu do elektroforezy kapilarnej termostatowanego powietrzem, model Prince 550 firmy Prince Technologies (Emmen, Holandia), ze spektrofotometrem Lambda 1010 firmy Bischoff (Leonberg, Niemcy) jako detektorem UV-Vis. Warunki pomiarowe były następujące:

- zastosowano niewypełnioną kapilarę kwarcową firmy Polymicro Technologies (Phoenix, Stany Zjednoczone) o średnicy wewnętrznej $50 \mu\text{m}$ i średnicy zewnętrznej $375 \mu\text{m}$, o długości 100 cm (66 cm do detektora);
- próbki były nastrzykiwane sposobem hydrodynamicznym przy zastosowaniu ciśnienia 100 mbar przez 6 s ;
- octan amonu w mieszaninie acetonitryl-metanol-lodowaty kwas octowy został użyty jako wyjściowy elektrolit podstawowy, którego skład był zmieniany podczas badań. Przed użyciem elektrolit podstawowy filtrowano za pomocą filtra RC15 $0,45 \mu\text{m}$ firmy Merck (Darmstadt, Niemcy);
- detekcja leków była prowadzona jako absorpcja światła w zakresie UV przy długości fali 254 nm ;
- procedura separacyjna składała się z trzech etapów: 1 – przemywanie kapilary elektrolitem podstawowym (2 min), 2 – nastrzyk próbki (6 s), 3 – rozdział analitów w elektrolicie separacyjnym pod napięciem 30 kV (prąd ok. $9 \mu\text{A}$) (ok. 20 min). Między pomiarami kapilara była przemywana kolejno: $0,5 \text{ M}$ wodorotlenkiem sodu (2 min), wodą (3 min), acetonitrylem (2 min) i elektrolitem podstawowym (3 min). Nowa kapilara była kondycjonowana za pomocą $0,5 \text{ M}$ wodorotlenku sodu (5 min), wody (5 min), acetonitrylu (5 min).

trylu (5 min) i elektrolitu podstawowego (5 min). Po zakończeniu pomiarów kapilarę przepłukiwano wodą, metanolem, a następnie przedmuchiwało powietrzem i tak pozostawiano.

3. Wyniki i ich dyskusja

Warunki rozdziału zastosowane do analizy skringowej siedmiu fenotiazyn metodą NACE [6] były niezadowalające w przypadku analizy identyfikacyjnej dwóch grup: fenotiazyn i trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych. Dlatego metodę tę rozwinięto, a warunki rozdziału badano, zmieniając trzy czynniki: skład ilościowy elektrolitu podstawowego, rodzaj kationu soli obecnej w elektrolicie oraz rodzaj medium użytego do rozcieńczenia standardowych mieszanin leków. Ilościowy skład elektrolitu: 20 mM octan amonu w mieszaninie metanol-acetonitryl-lodowaty kwas octowy (50:49:1, v/v/v) był optymalizowany według planów czynnikowych 2² i 2³ przedstawionych na rycinach 1 i 2. Jako główne kryterium optymalizacyjne przyjęto liczbę pików rozdzielonych do linii bazowej. Z przeprowadzonych eksperymentów optymalnym elektrolitem separacyjnym okazał się 20 mM octan amonu w mieszaninie acetonitrylu i metanolu (1:1, v/v).

Następnie zbadano i porównano wpływ trzech kationów (amonowego, litu i sodu) soli octanu na rozdział analitów. Najlepsze warunki rozdziału otrzymano, stosując octan amonu w wyżej zoptymalizowanym elektrolicie (rycina 3).

W celu wybrania optymalnego medium do rozcieńczenia wzorcowych mieszanin leków testowano acetonitryl, metanol, elektrolit podstawowy i pięć razy rozcieńczony elektrolit podstawowy. Metanol i acetonitryl okazały się najlepszymi mediami z lekką przewagą tego drugiego (rycina 4).

Ostatecznie jako optymalne warunki wybrano: elektrolit podstawowy – 20 mM octan amonu w mieszaninie acetonitryl/metanol (1:1, v/v) i acetonitryl jako medium dla próbek.

W warunkach optymalnych przeprowadzono analizę skringową czternastu leków psychotropowych (rycina 5) i na podstawie powtórzonych eksperymentów oszacowano główne parametry proponowanej metody. Względne czasy migracji noksypetyliny, dezypraminy, opipramolu oraz dezypraminy i opipramolu (razem) zostały wyznaczone i podane w tabeli I. Najlepszą powtarzalność czasów migracji stwierdzono w przypadku dwóch leków – dezypraminy i opipramolu (średnia arytmetyczna z dwóch względnych czasów migracji) i nieco gorszą dla obliczanych odnośnie do noksypetyliny (tabela I). Ostatecznie noksypetylina została wybrana jako standard wewnętrzny. Powtarzalność parametru identyfi-

kacyjnego (MT względem noksypetyliny) pokrywała zakres od 0,60 dla dezypraminy do 1,16 dla perazyliny (% RSD).

4. Podsumowanie

1. Opracowano warunki analizy skringowej dla czternastu klasycznych leków psychotropowych z grupy fenotiazyn i trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych. Prawie wszystkie leki były rozdzielone do linii bazowej i tylko jedna para leków – tiorydazy-na i chlorpromazyna – nie została całkowicie rozdzielona.
2. W najbliższej przyszłości proponowana metoda będzie zastosowana do analizy prób krwi zawierających badane leki.