



STACKING AS A METHOD OF IMPROVEMENT OF THE QUANTIFICATION LIMIT OF DRUGS DETERMINATION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Katarzyna MADEJ, Kinga KARABINOWSKA, Michał WOŹNIAKIEWICZ

Institute of Chemistry, Jagiellonian University, Krakow, Poland

Abstract

A review of stacking methods applied to capillary electrophoresis for drugs analysis is presented in the first part of the paper. Some published examples of the application of stacking methods to improve the level of pharmaceutical specimens determination in clinical and drugs analysis for forensic purposes are also presented in this part of the paper. Results of research performed by the authors are presented in the second part of the paper. This research concerned the possibility of preconcentration of psychotropic drugs by application of capillary electrophoresis under selected conditions of stacking on a capillary. The level of achieved preconcentration of a drug in a mixture depended on the number of analytes and applied stacking conditions. The best results of preconcentration were obtained for a mixture of two analytes (13 and 16 times) when acetonitrile with 1% NaCl as a medium and electrokinetic injection were applied. Application of a hydrodynamic injection for a mixture of six drugs in acetonitrile allowed strengthening of analytical signals from 4.8 to 6.8 times for all considered compounds.

Key words

Stacking; Capillary electrophoresis; Psychotropic drugs.

Received 17 November 2006; accepted 27 December 2006

1. Introduction

The first applications of capillary electrophoresis (CE) to drugs analysis date back to the turn of the 1970s and 1980s. A technique using isotachoforesis and a plastic capillary was employed in these preliminary applications. A quartz capillary was applied for the first time in 1988 and then separation techniques such as separations like capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC or MECK) became popular.

Since the 1980's the CE method has been developed, especially in the field of theoretical research, construction of analytical equipment as well as their applications in various fields of science. This development also related to drugs analysis in pharmaceutical

specimens, as well as in biological materials – especially in biological fluids. A capillary electrophoresis, because of its analytical potential, is compared to high-performance liquid chromatography and it is very often considered as its complementary method or as a method which could replace HPLC.

All analytical techniques, including capillary electrophoresis, have positives and negatives. High resolution, small sample consumption (ca. nl), high analysis speed, low consumption of reagents and universality are among the positives of capillary electrophoresis. Among the negatives are: a relatively fast capillary degradation, especially when separation electrolytes which contains organic solvents are applied, a lack of possibility of analysis of larger volumes of a sample and, related to this, a rather low detection level when

the popular spectrophotometric detection method is applied. The second problem could be solved in the following ways:

- application of off-line methods of analytes preconcentration (extraction techniques, e.g. most often liquid-liquid extraction or solid phase extraction);
- application of various optic cells;
- application of more sensitive detectors (e.g. a fluorescence detector with laser excitation);
- application of on-line methods of preconcentration of analytes by sample stacking.

The last solution, i.e. an improvement of detection and quantification limits by application of sample stacking, was the subject of the research presented in this paper. A definition of preconcentration by sample stacking, conditions necessary for sample stacking and a short description of selected sample stacking techniques applied in drug analysis are presented in the next paragraph. Some examples of sample stacking in analysis of pharmaceutical specimens and drugs for clinical and forensic purposes are also presented. After this, the results of the research performed by the authors are presented. The aim of the research was to check the possibility of application of sample stacking methods to toxicological analysis of psychotropic drugs. Moreover, directions of further research in this field are proposed.

2. Sample stacking – a definition, conditions and review of techniques

Sample stacking is the name of a group of techniques of analytes preconcentration which rely on creation of a difference of electrophoretic speed between high and slow conduction zones, respectively for a separation electrolyte and a sample. The sample stacking phenomenon occurs on the pseudo-stationary border which is created between these zones, when sample ions move across these borders [5]. Sample stacking can be achieved when electrolytes with heterogeneous quantitative and qualitative content are applied. A very good separation of analytes can be obtained when sample volume is lower than 1–2% of capillary capacity. This can happen when standard conditions of capillary zone electrophoresis (CZE) are applied and when homogeneous electrolytes are used, i.e. electrolyte in sample, in capillary and near to electrodes have the same content. A sample whose volume is 5–50% of capillary capacity can be analysed in the case of application of heterogeneous electrolytes and then the sample zone is still sharp which can be observed in the form of well separated peaks on the electropherogram [4].

Various stacking methods can be applied in capillary electrophoresis. Isotachopheresis, normal stacking mode, field-amplified sample stacking, stacking by acetonitrile-salt mixtures and large volume sample stacking are among the most often applied in drugs analysis. Short descriptions of these methods are presented below [5].

Isotachopheresis (ITP) – in this technique a sample is located between relatively narrow electrolyte zones: the leading electrolyte (an electrolyte which is characterised by higher ions mobility than that of separated ions) and terminating electrolyte (an electrolyte which is characterised by slower ions mobility than separated ions). These techniques could be coupled with micellar electrokinetic capillary chromatography as well as with capillary zone electrophoresis. This allows us obtain significant sample stacking and also retain desired separation features of the mentioned techniques.

Normal stacking mode (NSM) – a technique that is based on hydrodynamic injection onto capillary of a sample diluted in water or diluted in basic electrolyte. When a high voltage is applied then ions in the sample zone are located in a zone of electric field which is higher than in basic electrolyte and therefore they migrate with high electrophoresis speeds. The electrophoresis speed of ions is drastically reduced when they cross a pseudo-stationary border between the sample zone and the zone of the basic electrolyte. This gives an effect that sample components are stacking into narrow segments.

Field-amplified sample stacking (FASS) is a sample stacking technique applied in capillary electrophoresis using electrokinetic sample injection. First of all, a short zone of diluted electrolyte or pure diluter is injected on the capillary. After that, the capillary is dipped in a sample solution located in a diluted basic electrolyte or in a pure diluter and then a voltage of 5–10 kV is applied. The electrical field is amplified because of difference of electrical conductivity of various mediums. This gives an effect that sample ions have electrophoretic speed significantly higher than the speed of the electroosmotic fuel. Therefore, they are pre-concentrated on the border between the diluted electrolyte and the basic electrolyte.

A stacking by acetonitrile-salt mixtures is a preconcentration technique which is based on hydrodynamic injection of a sample on a capillary. A sample is diluted in a mixture of acetonitrile and 1% salt (2:1, v/v). Inorganic ions, as they are poorly diluted in acetonitrile, migrate together with water. They leave behind a more concentrated and narrow acetonitrile zone, which contains weakly ionised organic compounds. Ions present at the front of the sample zone,

which is rich in water, are moved to a zone with a lower electrical field after an application of voltage. After that, their migration speed is immediately reduced. Ions present at the back of the acetonitrile part of the sample zone are under the influence of a higher electrical field at the same time. Finally, a very narrow sample zone is obtained.

Large volume sample stacking (LVSS) is a technique of sample preconcentration by stacking at capillary zone electrophoresis. A relatively large volume of sample, diluted in pure diluter or in diluted basic electrolyte, is hydrodynamically injected on a capillary. After this, a voltage is applied in the form of inverse polarisation (negative polarisation – a cathode is located on the side where the sample is injected). This gives the result that anions are stacking in the part of the sample zone which has a border with a basic electrolyte, which fills the rest of the capillary. Simultaneously, the diluter is removed from the capillary sample zone. A positive polarisation is switched on when the sample matrix is almost all removed from a capillary. This causes separation of anions.

Sample stacking techniques are not commonly applied in drugs analysis by CE methods at present. Several examples of application of these techniques for improvement of the limit of quantification for pharma-

ceutical specimens and drugs analysis for clinical and forensic purposes are presented in Table I.

3. Materials and methods

3.1. Analysed drugs

The following drugs were analysed: doxepin, trimipramine, amitriptyline, nortriptyline, imipramine, dezipramine and nordoxepin. Mixtures of these medicines were made by mixing of their methanol standard solutions (1 mg ml^{-1}) and diluted by a suitable medium, such that their final concentration in a mixture was $25 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. The following mixtures were created:

- doxepin + trimipramine,
- imipramine + doxepin + trimipramine,
- amitriptyline + doxepin + imipramine + nortriptyline + dezipramine + nordoxepin.

3.2. Equipment

A capillary electrophoresis apparatus PrinCE 550 (Prince Technologies, the Netherlands) with air-cooling of a capillary was connected with a spectro-photometric detector UV/VIS Lambda 1010 (Bischoff,

TABLE I. ANALYTES PRECONCENTRATION BY SAMPLE STACKING – SELECTED APPLICATIONS IN CLINICAL AND FORENSIC TOXICOLOGICAL ANALYSIS

Analyte	Analysed material	Injection method	Medium	Separation electrolyte	Stacking technique
Clozapine with metabolites (N-clozapine oxide and desmethylclozapine) [6]	Serum (schizophrenic patient's)	Electrokinetic at 6 kV for 99.9 s, followed by an aqua zone	Water	400 mM phosphoric buffer pH 3.0 with 50% (v/v) ethylene glycol	FASS
Amitriptyline with metabolite of nortriptyline [1]	Serum (volunteer who took 1 Amitriptyline pill – 125 mg)	Electrokinetic at 3 kV for 99.9 s, followed by an aqua zone	Water	Tris (1.4 M; pH 4.5) with addition of β -cyclodextrin and 50% (v/v) ethylene glycol	FASS
Flurazepam with metabolites [2]	Urine	Hydrodynamic	Water	0.05 M disodium tetraborate with addition of orthophosphoric acid (up to pH 2.2) and 0.002 M cetyltrimethylammonium bromide	LVSS
Morphine, cocaine and MDMA [3]	Hairs	Electrokinetic at 10 kV for 10 s	0.1 mM formic acid	100 mM potassium phosphate with addition of phosphoric acid up to pH 2.5	FASS

Switzerland) equipped with a deuterium lamp. Analysis was monitored and data were collected by application of Dax 6.0 software (Van Mierlo Software Consultancy, the Netherlands). A signal was collected at 210 nm.

3.3. Analytical conditions

Two separation electrolytes were used in research, i.e. (1) 80% (v/v) triethanolamine (180 mM, pH 8.2) + 10% (v/v) acetonitrile + 10% (v/v) isopropanol; (2) 50 mM 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propane-sulfonic acid (CAPSO) in a water-methanol mixture (7:3; v/v) + addition of 5 M NaOH up to obtaining pH = 9.55.

The following mediums and injections methods were applied for all selected electrolytes:

- two mediums for samples: (a) acetonitrile and (b) acetonitrile + 1% NaCl. Additionally, a third medium (c) aqua-methanol (1:1; v/v) was used for electrolyte No. 2;
- two methods of injection of sample on capillary: (I) hydrodynamic (100 mbar) and (II) electrokinetic (5 kV).

Times of injections from 12 seconds to several minutes were tested in both analysed methods. The initial time of sample injection (12 s) was selected as the time at which the sample volume was lower than 2% of the capillary capacity (a sample whose volume is lower than 2% of capillary capacity can be injected under normal electrophoresis conditions).

Separations were performed in a quartz capillary (50 μ m internal diameter) by an application of separation voltage of 30 kV, and an analytical signal was collected at 210 nm.

4. Results

Tricyclic antidepressant drugs were selected for analysis. Their two-, three-, or six-component mixtures were separated by the capillary zone electrophoresis method.

Mixtures: two-component (doxepin + trimipramine) and three-component (imipramine + doxepin + trimipramine) were electrophoretically separated by application of the following basic electrolyte: 180 mM triethanolamine (pH 8.2) and acetonitrile with isopropanol which were mixed at a volume-to-volume ratio 8:1:1. Samples of standard solutions were injected onto a capillary by the following methods: (I) and (II), by application of mediums (a) and (b) in each case as samples mediums.

The amplification factor (r) was calculated for each drug in each of the analysed mixtures. It was calculated with the aim of evaluation of efficiency of preconcentration of analytes by various stacking methods:

$$r = \frac{P_{t_{\max}}}{P_{t_{12}}}, \quad \{1\}$$

where: $P_{t_{\max}}$ – the peak area of a particular drug calculated for the maximum time of sample injection on a capillary, i.e. the time when peaks are still separated up to base line in the analysed mixture of drugs; $P_{t_{12}}$ – the peak area at the time of 12 s of sample injection which responds to a situation when the sample volume was more than 2% of capillary capacity.

Calculated coefficients (r), for each medicine in each mixture and all applied experimental conditions, are presented in Tables II and III.

After that, a mixture of six medicines (amitriptyline + doxepin + imipramine + nortriptyline + desipramine + nordoxepine) was electrophoretically separated by application of solutions (a) and (c) as mediums and application of two sample injections methods:

TABLE II. AMPLIFICATION FACTORS (r) OF ANALYTICAL SIGNAL OF TRIMIPRAMINE AND DOXEPIN WHEN THE FOLLOWING MIXTURE WAS USED AS A BASIC ELECTROLYTE: 180 mM TRIETHANOLOAMINE (pH 8.2) WITH ACETONITRILE AND ISOPROPANOL (8:1:1, v/v/v)

Injection method	Medium	Trimipramine	Doxepin
		Amplification factor (r) for $n = 3$	
Hydrodynamic	Acetonitrile	8	9
	Acetonitrile + 1% NaCl	8.5	8
Electrokinetic	Acetonitrile	13	8
	Acetonitrile + 1% NaCl	16	13

TABELA III. AMPLIFICATION FACTORS (r) OF ANALYTICAL SIGNAL FOR A MIXTURE OF THREE DRUGS (TRIMIPRAMINE + DOXEPIN + IMIPRAMINE) WHEN THE FOLLOWING MIXTURE WAS USED AS A BASIC ELECTROLYTE: 180 mM TRIETHANOLAMINE (pH 8.2) WITH ACETONITRILE AND ISOPROPANOL (8:1:1, v/v/v)

Injection method	Medium	Trimipramine	Doxepin	Imipramine
		Amplification factor (r) for $n = 3$		
Hydrodynamic	Acetonitrile	5	3.5	4
	Acetonitrile + 1% NaCl	4	3.5	4
Electrokinetic	Acetonitrile	*	*	*
	Acetonitrile + 1% NaCl	4	5	4

* – In these conditions separation was not observed for analysed drugs, however the time of injection was 12 seconds.

TABELA IV. AMPLIFICATION FACTORS (r) FOR A MIXTURE OF SIX DRUGS: AMITRIPTYLINE (Ami) + IMIPRAMINE (Imi) + DOXEPINE (Dox) + DEZIPRAMINE (Dez) + NORDOXEPIN (Nordox) + NORTRYPTYLINE (Nortr) WHEN THE FOLLOWING MIXTURE WAS USED AS A BASIC ELECTROLYTE: 50 mM CAPSO (pH 9.55) IN A WATER/METHANOL SOLUTION (7:3, v/v)

Injection method	Medium	Dox	Imi	Ami	Dez	Nordox	Nortr
		Amplification factor (r) for $n = 3$					
Hydrodynamic	Acetonitrile	3.5	3.3	4	3.2	4.2	3.2
	MeOH:water, 1:1, v/v	4.8	5.5	5.3	5.9	6.8	6
Electrokinetic	Acetonitrile	3.1	3.5	3.6	4.3	3.6	4.5
	MeOH:water, 1:1, v/v	3.6	3.4	3.7	3.7	3.7	3.4

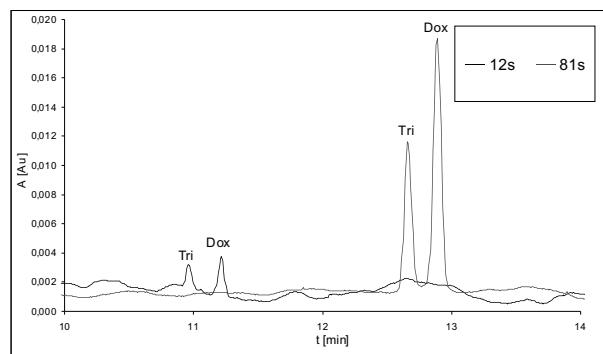


Fig. 1. Electropherogram for a mixture of two drugs: trimipramine (Tri) and doxepin (Dox) obtained under the following stacking conditions: sample medium – acetonitrile, the injection method – hydrodynamic at 100 mbar, times of sample injection are mentioned on the figure.

hydrodynamic (I) and electrokinetic (II). A CAPSO buffer (50 mM, pH 9.55) in water-methanol solution (7:3, v/v) was used as a separation electrolyte.

Calculated amplification factors (r) for each medicine are presented in Table IV.

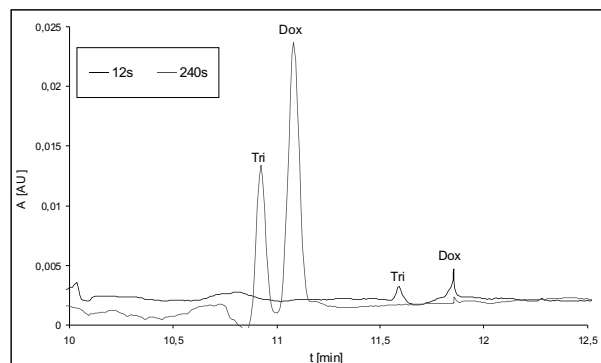


Fig. 2. Electropherogram for a mixture of two drugs trimipramine (Tri) and doxepin (Dox) obtained under following stacking conditions: sample medium – acetonitrile + 1% NaCl, injection method – electrokinetic at 5 kV, times of sample injection are mentioned on the figure.

Results of separation of medicines mixtures: two-component (doxepin + trimipramine) and three-component (imipramine + doxepin + trimipramine) were chosen as examples of obtained electropherograms (Figure 1–4).

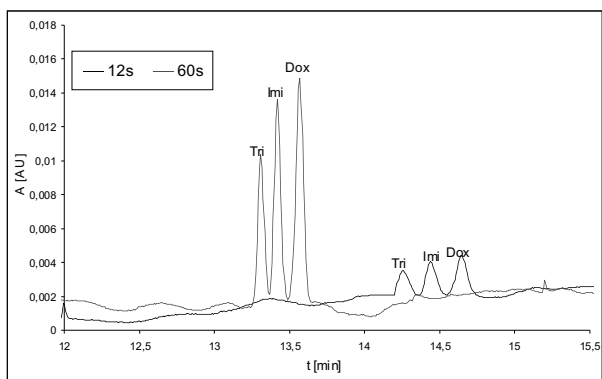


Fig. 3. Electropherogram for a mixture of three drugs: trimipramine (Tri), doxepin (Dox) and imipramine (Imi) obtained under following stacking conditions: sample medium – acetonitrile, the injection method – hydrodynamic under 100 mbar, the times of sample injection are mentioned on the figure.

5. Discussion

The highest signal amplifications (peak areas) were observed for 2-component mixtures of trimipramine and doxepin (respectively 16 and 13 times) when the separation electrolyte (1) was used, i.e. (80% (v/v) triethanolamine (180 mM, pH 8.2) in a mixture of acetonitrile 10% (v/v) and isopropanol 10% (v/v) and when 1% NaCl in acetonitrile was used as a medium and the sample was electrokinetically injected into the capillary (Table II, Figure 1). A slightly weaker signal strengthening (8–9 times) was obtained for a mixture of trimipramine and doxepin in cases where acetonitrile or 1% NaCl in acetonitrile were used as a medium and when a sample was hydrodynamically injected. The presence of NaCl in the sample medium allowed injection a larger sample volume onto a capillary without deterioration of drugs separation in the sample. This was especially possible by application of electrokinetic injection. The observed effect is a result of the technique of sample stacking in mixtures of stacking by acetonitrile-salt mixture.

A higher signals amplification was observed for the 2-component mixture than for the 3-component mixture when the same separation electrolyte, (1), was used (Table II and III). This is an effect of weak separation of the 3-component mixture in relation to the 2-component mixture. 4–5-times amplification of signal was obtained in the case of the 3-component mixture (Table III, Figure 2) when electrokinetic injection of sample was applied in 1% NaCl in acetonitrile. However, no positive results (a lack of peak separation for 12 s) were obtained when only acetonitrile was used. No significant differences were observed in the

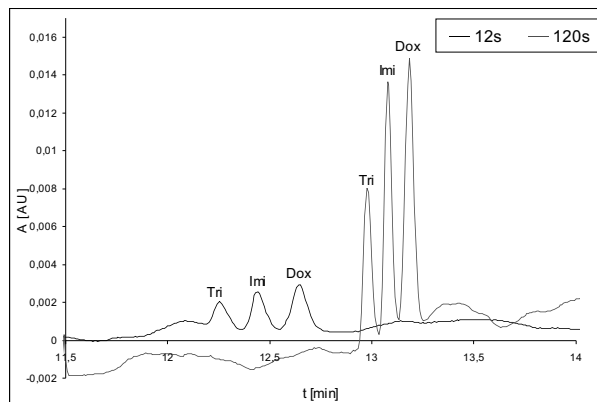


Fig. 4. Electropherogram for a mixture of three drugs: trimipramine (Tri), doxepin (Dox) and imipramine (Imi) obtained under following stacking conditions: sample medium – acetonitrile + 1% NaCl, the injection method – electrokinetic under 5 kV, the times of sample injection are mentioned on the figure.

process of preconcentration of the 3-component mixture in the case of hydrodynamic sample injection and when both mediums were applied. Calculated amplification factors were located in the range 3.5–5.

Analysis of results of signal amplification at in 6-component mixture (Table IV) when a separation electrolyte (2) was applied, i.e. 50 mM 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid (CAPSO) in a water-methanol mixture (7:3; v/v) + addition of 5 M NaOH (pH 9.55), allowed us to conclude that this was the highest strengthening (4.8–6.8 times). Moreover, this was obtained when the sample was injected by the hydrodynamic method and when the medium was water with methanol (1:1, v/v). The obtained results were due to application of the so-called normal sample stacking technique in which the sample was diluted in a solution of water with methanol and the sample was hydrodynamically injected on a capillary. Ions present in the low-conductivity zone are under the influence of a higher electric field than ions in the separation electrolyte. This happens after application of a separation voltage and then they migrate with a high electrophoretic speed. Their electrophoretic speeds are drastically reduced when the pseudo-stationary border between the sample zone and the zone of basic electrolyte is crossed. This gives a result in the form of a stacking of separated compounds, which create narrow segments.

No significant differences in amplification of analytical signals were observed for a 6-medicines mixture diluted in acetonitrile and when both injection methods were applied, i.e. hydrodynamic ($r = 3.2\text{--}4.2$) as well as electrokinetic ($r = 3.1\text{--}4.5$) (Table IV).

6. Conclusions

It can be concluded on the basis of experimental results that when suitable stacking conditions are applied (a sample medium, a basic electrolyte and an injection method) to analysis of tricyclic antidepressant drugs, then a stacking can be performed up to several times in comparison to standard conditions of capillary electrophoresis. It is estimated that an obtained amplification of a signal could allow reduction of quantification limit up to ca. 30 ng/ml. This reduction of limits of determination and quantification could help to broaden possible applications of electrophoresis to encompass determination of therapeutic concentrations of drugs in blood and serum. Moreover, it could allow application of this technique to toxicological analysis of alternative materials, such as hairs. Obtaining a higher signal amplification could be especially interesting in the case of application of 1% NaCl in acetonitrile as a sample medium, because it could provide an opportunity to determine pharmaceutical specimens immediately (after sedimentation by acetonitrile) in serum or blood, which matrix contains this salt at a similar concentration.

Until now, stacking methods on a capillary column have not been applied very often to analysis of biological material. However, this direction of capillary electrophoresis development seems to be promising.

References

1. Cheng-Chung C., Shou-Mei W., Yu-Hua H [et al.], On-line field amplified sample stacking in capillary electrophoresis for analysis of amitriptyline and its metabolite nortriptyline in plasma, *Analytical Chimica Acta* 2004, 517, 103–110.
2. McGrath G., Smyth W.F., Large-volume sample stacking of selected drugs of forensic significance by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B* 1996, 681, 125–131.
3. Tagliaro F., Manetto G., Crivellente F. [et al.], Hair analysis for abused drugs by capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking, *Forensic Science International* 1998, 92, 201–211.
4. Shihabi Z. K., Stacking in capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 2000, 902, 107–117.
5. Witkiewicz Z. Hepter J., Słownik chromatografii i elektroforezy, PWN, Warszawa 2004.
6. Yu-Hsiang H., Wei-Kung K., Hwang-Shang K. [et al.], Field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of clozapine N-oxide, and desmethylclozapine in schizophrenics' plasma, *Journal of Chromatography B* 2004, 809, 111–116.

Corresponding author

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

ZATĘŻANIE PRZEZ SPIĘTRZANIE JAKO SPOSÓB OBNIŻENIA GRANICY OZNACZALNOŚCI W ANALIZIE LEKÓW METODĄ ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ

1. Wprowadzenie

Pierwsze zastosowania elektroforezy kapilarnej (CE) do analizy leków przypadają na przełom lat 70. i 80. ubiegłego wieku. W analizach tych wykorzystywano wówczas technikę izotachoforezy oraz plastikowe kapilary. W 1988 r. zostały wprowadzone kapilary kwarcowe, a na czoło wysunęły się takie techniki separacyjne, jak strefowa elektroforeza kapilarna (CZE) i micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC lub MECK).

Od lat 80. aż do chwili obecnej następuje dynamiczny rozwój metody CE w zakresie teorii oraz aparatury pomiarowej, a także wzrasta możliwość jej zastosowania w różnych dziedzinach analizy. Rozwój ten dotyczy także analizy leków, zarówno w preparatach farmaceutycznych, jak i materiale biologicznym – szczególnie w płynach ustrojowych. Elektroforezę kapilarną, ze względu na swój potencjał analityczny, zazwyczaj porównuje się z wysokosprawną chromatografią cieczową i coraz częściej uważa się za metodę ją uzupełniającą, a nawet wymienną.

Jak każda technika analityczna, elektroforeza kapilarna, obok swoich zalet, do których należy wysoka zdolność rozdzielcza, małe zużycie próbki (rzędu nl), duża szybkość analizy, niewielkie zapotrzebowanie na odczynniki i uniwersalność, posiada również ograniczenia. Wśród nich można wymienić szybkie zużywanie się kapilary (szczególnie przy zastosowaniu elektrolitów separacyjnych, w skład których wchodzi rozpuszczalniki organiczne) oraz brak możliwości analizowania większych objętościowo próbek (i związana z tym stosunkowo niska wykrywalność przy zastosowaniu popularnej detekcji spektrofotometrycznej). Ten drugi problem może być rozwiązany w CE na kilka sposobów, do których należą:

- metody *off-line* zateżenia analitów (techniki ekstrakcji, najczęściej typu ciecz-ciecz oraz do fazy stałej);
- stosowanie różnych kształtów celek optycznych;
- stosowanie bardziej czułych detektorów (np. detektor fluorescencyjny ze wzbudzeniem laserowym);
- metody *on-line* zateżenia analitów przez spiętrzenie w kapilarze.

W niniejszej pracy skupiono się na ostatnim rozwiązaniu, tj. na obniżeniu granicy detekcji i oznaczalności poprzez wykorzystanie technik spiętrzenia analitów w kapilarze (sample stacking). W dalszej części pracy podano definicję zateżenia analitów przez spiętrzenie, warunki konieczne do uzyskania tego spiętrzenia, a następnie przegląd i zwięzły opis wybranych technik spię-

trzenia stosowanych w analizie leków. Podano również kilka przykładów zastosowania technik zateżenia związków leczniczych i narkotyków w analizie klinicznej i sądowej. Następnie przedstawiono wyniki badań własnych mających na celu rozpoznanie możliwości zastosowania zateżenia w analizie toksykologicznej leków psychotropowych ze wskazaniem kierunków dalszych badań w tej dziedzinie.

2. Zateżanie przez spiętrzenie w kapilarze – definicja, warunki, przegląd technik

Zateżanie przez spiętrzenie (sample stacking) jest to grupa technik zateżenia składników próbki w kapilarze, polegająca na wytworzeniu różnicy w prędkościach elektroforetycznych między strefami o wysokim i niskim przewodnictwie, odpowiednio elektrolitu separacyjnego i próbki. Zjawisko zateżenia przez spiętrzenie zachodzi na pseudostacjonarnej granicy powstałej między tymi strefami podczas ruchu jonów próbki poprzez tę granicę [5].

Warunkiem uzyskania spiętrzenia analitów w kapilarze jest zastosowanie elektrolitów niejednorodnych pod względem ich składu ilościowego lub jakościowego. W zwykłych warunkach elektroforezy strefowej (CZE), tzn. gdy stosujemy jednorodne elektrolity (elektrolit w próbce, kapilarze i przy elektrodach ma ten sam skład), można uzyskać bardzo dobry rozdział analitów pod warunkiem, że objętość próbki jest mniejsza od 1–2% pojemności kapilary. Natomiast w przypadku zastosowania elektrolitów niejednorodnych można wprowadzać do kapilary próbki o objętości 5–50% pojemności kapilary, a strefa próbki pozostanie ostra, co wyrazi się w dobrze rozdzielonych pikach na elektroferogramie [4].

W analizie metodą elektroforezy kapilarnej stosuje się różne techniki zateżenia przez spiętrzenie. Do częściowej wykorzystywanych technik w analizie leków należą: izotachoforeza, normalne spiętrzenie, spiętrzenie ze wzmocnieniem pola elektrycznego, spiętrzenie w mieszaninie acetonitrylu z chlorkiem sodu oraz spiętrzenie próbki o dużej objętości ze zmianą polaryzacji elektrod. Poniżej krótko opisano każdą z wymienionych wyżej technik [5].

Izotachoforeza (isotachopheresis, ITP) – technika zateżenia, w której próbkę umieszcza się między stosunkowo wąskimi strefami elektrolitów: wiodącym (elektrolit charakteryzujący się większą ruchliwością jonów niż rozdzielane) i zakończającym (elektrolit charakteryzujący się mniejszą ruchliwością jonów niż rozdzielane).

Technika ta może być łączona zarówno z micelną elektrokinetyczną chromatografią kapilarną, jak i strefową elektroforezą kapilarną, co pozwala z jednej strony na uzyskanie znacznego spiętrzenia analitów, zaś z drugiej na zachowanie możliwości separacyjnych wspomnianych wyżej technik.

Spiętrzenie normalne (normal stacking mode, NSM) – technika polegająca na hydrodynamicznym wprowadzeniu do kapilary próbki rozpuszczonej w wodzie lub w rozcieńczonym elektrolicie podstawowym. Po przyłożeniu wysokiego napięcia, jony w strefie próbki znajdują się pod działaniem silniejszego pola elektrycznego niż w elektrolicie podstawowym i tym samym migrują z dużą prędkością elektroforetyczną. Przy przekraczaniu pseudostacjonarnej granicy między strefą próbki i elektrolitu podstawowego ich prędkości elektroforetyczne nagle zmniejszają się, spiętrzając rozdzielone składniki próbki w wąskie segmenty.

Spiętrzenie ze wzmocnieniem pola elektrycznego (field-amplified sample stacking, FASS) – to technika zateżnienia próbki przez spiętrzenie w elektroforezie kapilarnej, wykorzystująca elektrokinetyczne wprowadzanie próbki. Najpierw do kapilary wprowadza się krótką strefę rozcieńzonego elektrolitu lub czystego rozpuszczalnika, a następnie po zanurzeniu kapilary w roztworze próbki w rozcieńczonym elektrolicie podstawowym lub czystym rozpuszczalniku przykłada się napięcie rzędu 5–10 kV. Dzięki różnicy w przewodnictwie elektrycznym w poszczególnych środowiskach dochodzi do wzmocnienia pola elektrycznego. W wyniku tego jony próbki uzyskują prędkość elektroforetyczną znacznie większą niż prędkość przepływu elektrosomotycznego i zostają zateżnione na granicy rozcieńzonego elektrolitu i elektrolitu podstawowego.

Spiętrzenie w mieszaninie acetonitrylu z chlorkiem sodu (stacking by acetonitrile-salt mixtures) – jest techniką zateżnienia próbki, która polega na hydrodynamicznym wprowadzeniu do kapilary próbki rozpuszczonej w mieszaninie acetonitrylu i 1% roztworu chlorku sodu (2:1, v/v). Jony nieorganiczne jako słabo rozpuszczalne w acetonitrylu migrują wraz z wodą, pozostawiając za sobą bardziej stężoną i węższą strefę acetonitrylu, zawierającą słabo zjonizowane związki organiczne. Po przyłożeniu napięcia jony znajdujące się w bogatej w wodę przedniej strefie próbki przedostają się do obszaru o niższym polu elektrycznym i nagle zmniejszają szybkość migracji. Natomiast jony znajdujące się w tylnej acetonitrylowej części strefy próbki, poddane są większej sile pola elektrycznego. W rezultacie uzyskuje się bardzo wąską strefę próbki.

Spiętrzenie próbki o dużej objętości ze zmianą polaryzacji elektrod (large volume sample stacking, LVSS) – to technika zateżnienia próbki przez spiętrzenie w strefowej elektroforezie kapilarnej, w której znaczną objętość próbki, rozpuszczonej w czystym rozpuszczalniku lub

rozcieńczonym elektrolicie podstawowym, wprowadza się hydrodynamicznie do kapilary. Następnie przyłożone zostaje napięcie z zastosowaniem polaryzacji odwróconej (polaryzacja ujemna – katoda znajduje się od strony wprowadzania próbki), w wyniku czego aniony spiętrzają się w części strefy próbki graniczącej z elektrolitem podstawowym wypełniającym resztę kapilary. Równocześnie następuje usuwanie rozpuszczalnika segmentu próbki z kapilary. Gdy matryca próbki zostanie prawie całkowicie usunięta z kapilary, polaryzację przełącza się na dodatnią, powodując rozdzielanie anionów.

Aktualnie techniki zateżnienia przez spiętrzenie nie są szeroko wykorzystywane w analizie leków metodą CE. Kilka przykładów dotyczących zastosowania tego typu technik do obniżenia granicy oznaczalności w analizie klinicznej i sądowej leków i narkotyków podano w poniższej tabeli I.

3. Materiały i metody

3.1. Badane leki

Badano następujące leki: doksepinę, trimipraminę, amitryptylinę, nortryptylinę, imipraminę, dezypraminę oraz nordoksepinę. Próbki mieszanin leków sporządzano poprzez zmieszanie metanolowych roztworów wzorcowych leków (1 mg ml^{-1}) i rozcieńczenie w odpowiednim medium tak, by stężenie końcowe leku w mieszaninie wynosiło $25 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Do badań sporządzono następujące mieszaniny:

- doksepina + trimipramina;
- imipramina + doksepina + trimipramina;
- amitryptylina + doksepina + imipramina + nortryptylina + dezypramina + nordoksepina.

3.2. Aparatura

Zestaw do elektroforezy kapilarnej PrinCE 550 z chłodzeniem kapilary powietrzem firmy Prince Technologies (Holandia) był sprzężony z detektorem spektrofotometrycznym UV/VIS Lambda 1010 firmy Bischoff (Szwajcaria), wyposażonym w lampę deuterową. Układ sterujący i zbierający dane stanowił komputer z oprogramowaniem Dax 6.0 (Van Mierlo Software Consultancy, Holandia). Sygnały zbierano przy długości fali 210 nm.

3.3. Zastosowane warunki analizy

W badaniach zastosowano dwa elektrolity separacyjne, tj. (1) 80% (v/v) trietanolamina (180 mM, pH 8,2) + 10% (v/v) acetonitrylu + 10% (v/v) izopropanolu; (2) 50 mM kwas 3-(cykloheksylamino)-2-hydroksy-1-propanosulfonowy (CAPSO) w mieszaninie woda-metanol (7:3; v/v) + dodatek 5 M NaOH do uzyskania pH 9,55.

Dla każdego z wybranych elektrolitów separacyjnych zastosowano:

- dwa środowiska (medium) dla próbek: (a) acetonitryl i (b) acetonitryl + 1% NaCl. Dodatkowo dla elektrolitu nr 2 zastosowano trzecie środowisko (c) woda-metanol (1:1; v/v);
- dwie metody wprowadzania próbki do kapilary: (I) hydrodynamiczną (100 mbar) i (II) elektrokinetyczną (5 kV).

W obu metodach testowano czasy nastryku próbek od 12 s do kilku minut. Początkowy czas nastryku próbki (12 s) ustalono jako czas, w którym objętość próbki nie przekraczała 2% pojemności kapilary (próbki o objętości mniejszej od 2% pojemności kapilary wprowadza się, stosując normalne warunki elektroforezy).

Rozdziały prowadzono w kapilarze kwarcowej o średnicy wewnętrznej 50 μm przy stosowaniu napięcia separacyjnego 30 kV, a sygnały analityczne odczytywano przy długości fali 210 nm.

4. Wyniki badań

Do badań modelowych wybrano trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne, których dwu-, trzy i sześcioskładnikowe mieszaniny wzorcowe rozdzielano metodą strefowej elektroforezy kapilarnej.

Mieszaniny: dwuskładnikową (trimipramina + doksepina) oraz trójskładnikową (trimipramina + doksepina + imipramina) rozdzielano elektroforetycznie z wykorzystaniem elektrolitu podstawowego o składzie: 180 mM trietanolaminy (pH 8,2) oraz acetonitryl i izopropanol zmieszane w stosunku objętościowym 8:1:1. Próbki roztworów wzorcowych obu mieszanin wprowadzano do kapilary metodami (I) i (II), stosując w każdym przypadku środowiska (a) i (b) jako medium próbek.

W celu oceny efektywności zatężania analitów przez spiętrzanie przy wybranych warunkach określono kryterium w postaci współczynnika wzmocnienia sygnału analitycznego (r) dla leku w badanej mieszaninie:

$$r = \frac{P_{t_{\max}}}{P_{t_{12}}}, \quad \{1\}$$

gdzie $P_{t_{\max}}$ – powierzchnia pików danego leku dla maksymalnego czasu wprowadzenia próbki do kapilary, przy którym piki w badanej mieszaninie leków są jeszcze rozdzielone do linii bazowej; $P_{t_{12}}$ – powierzchnia pików dla czasu (12 s) wprowadzenia próbki odpowiadającego objętości próbki < 2% pojemności kapilary.

Uzyskane współczynniki wzmocnienia sygnału (r) dla każdego leku w mieszaninach, w zadanych warunkach eksperymentalnych, zamieszczono w tabelach II i III.

Następnie mieszaninę sześciu leków (amitryptylina + imipramina + doksepina + dezypramina + nordoksepina + nortryptylina) poddano rozdzielaniu elektroforetycz-

nemu, stosując jako medium próbek roztwory (a) i (c) oraz dwie metody wstrzykiwania próbek do kapilary: hydrodynamiczną (I) i elektrokinetyczną (II). Jako elektrolit separacyjny zastosowano bufor CAPSO (50 mM, pH 9,55) w roztworze woda/metanol (7:3, v/v).

Otrzymane współczynniki wzmocnienia sygnału (r) dla każdego leku w mieszaninie zestawiono w tabeli IV.

Jako przykładowe elektroferogramy wybrano rozdzielanie mieszanin leków: dwuskładnikowej (trimipramina + doksepina) i trójskładnikowej (trimipramina + doksepina + imipramina) (rycyna 1 i 2).

5. Dyskusja wyników

W zbadanych przypadkach największe wzmocnienia sygnałów analitycznych (pola powierzchni pików) uzyskano dla trimipraminy i doksepiny (odpowiednio 16 i 13 razy) w ich mieszaninie dwuskładnikowej przy zastosowaniu elektrolitu separacyjnego (1), tj. 80% (v/v) trietanolaminy (180 mM, pH 8,2) w mieszaninie acetonitrylu 10% (v/v) i izopropanolu 10% (v/v); jako medium zastosowano 1% NaCl w acetonitrylu przy elektrokinetycznym wprowadzaniu próbki do kapilary (tabela II, rycyna 1). Nieco słabsze wzmocnienia sygnałów (8–9 razy) uzyskano dla mieszaniny trimipraminy i doksepiny w przypadku zastosowania jako środowiska zarówno acetonitrylu, jak i 1% NaCl w acetonitrylu oraz hydrodynamicznego nastryku. Obecność soli (NaCl) w medium próbki umożliwiła wprowadzenie większych objętości próbki do kapilary bez pogorszenia rozdzielania leków w próbce, w szczególności przy zastosowaniu elektrokinetycznej metody nastryku. Efekt ten jest wynikiem techniki tzw. spiętrzania w mieszaninach acetonitrylu z solami.

Dla tego samego elektrolitu separacyjnego (1) większe wzmocnienia sygnałów otrzymano przy mieszaninie dwuskładnikowej w porównaniu z mieszaniną trójskładnikową (tabela II i III). Spowodowane to zostało słabszym rozdziałem mieszaniny trójskładnikowej w stosunku do mieszaniny dwuskładnikowej. W przypadku mieszaniny trójskładnikowej (tabela III, rycyna 2) przy elektrokinetycznym wprowadzeniu jej do kapilary w 1% NaCl w acetonitrylu uzyskano 4–5-krotne wzmocnienia sygnału, natomiast w samym acetonitrylu nie otrzymano pozytywnych wyników (brak rozdzielania pików dla czasu 12 s). Dla hydrodynamicznej metody nastryku w przypadku obu zastosowanych mediów nie stwierdzono istotnych różnic w zatężaniu trzech leków w mieszaninie, dla których współczynniki wzmocnienia sygnałów analitycznych mieściły się w granicach 3,5–5.

Badając wzmocnienie sygnałów dla sześciuoskładnikowej mieszaniny leków (tabela IV) przy zastosowaniu elektrolitu separacyjnego (2), którym był 50 mM kwas 3-(cykloheksylamino)-2-hydroksy-1-propanosulfonowy (CAPSO) w mieszaninie woda-metanol (7:3; w/w) + do-

datek 5 M NaOH (pH 9,55), ustalono, że największe wzmocnienia (4,8–6,8 razy) uzyskano dla próbki wprowadzanej metodą hydrodynamiczną w medium, które tworzyła woda z metanolem (1:1,v/v). Uzyskane efekty wzmocnienia były wynikiem zastosowania techniki tzw. normalnego spiętrzania analitu, w której próbkę rozpuszczoną w wodzie z metanolem wprowadzono do kapilary hydrodynamicznie. Po przyłożeniu napięcia separacyjnego jony w strefie próbki o niższym przewodnictwie znajdują się pod działaniem silniejszego pola elektrycznego niż w elektrolicie separacyjnym i tym samym migrują z dużą prędkością elektroforetyczną. Przy przekraczaniu pseudostacjonarnej granicy między strefą próbki i elektrolitu podstawowego, ich prędkości elektroforetyczne nagle zmniejszają się, spiętrzając rozdzielone składniki próbki w wąskie segmenty.

Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic we wzmocnieniu sygnałów analitycznych dla mieszaniny sześciu leków rozpuszczonej w acetonitrylu zarówno w przypadku hydrodynamicznego wprowadzenia próbki ($r = 3,2-4,2$), jak i dla elektrokinetycznego wprowadzenia próbki ($r = 3,1-4,5$) (tabela IV).

6. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników eksperymentów stwierdzono, że stosując odpowiednie warunki spiętrzania (medium próbki, elektrolit podstawowy oraz metoda wprowadzania próbki do kapilary) do analizy trójpięściennych leków przeciwdepresyjnych, możliwe jest ich zateżenie od kilku do kilkunastu razy w stosunku do zwykłych warunków prowadzenia analizy metodą elektroforezy kapilarnej. Szacuje się, że uzyskane wzmocnienie sygnału pozwoli obniżyć granicę oznaczalności badanych leków przynajmniej do ok. 30 ng/ml. To obniżenie granic wykrywalności i oznaczalności związków pozwoli rozszerzyć zastosowanie elektroforezy do wyznaczania stężeń terapeutycznych leków we krwi i surowicy, a także umożliwi jej wykorzystanie w toksykologicznej analizie materiałów alternatywnych, takich jak np. włosy. Szczególnie interesujące byłoby uzyskanie większych wzmocnień sygnałów w przypadku zastosowania 1% NaCl w acetonitrylu jako medium próbki, gdyż dawałoby to możliwość oznaczania leków bezpośrednio (po strąceniu acetonitrylem) w surowicy lub krwi, których matryca zawiera tą sól w podobnym stężeniu.

Jak do tej pory techniki zateżania analitów przez spiętrzanie w kapilarze nie są często stosowane w analizie materiału biologicznego, jakkolwiek ten kierunek rozwoju metod elektroforezy kapilarnej wydaje się obiecujący.