



## **DETERMINATION OF DESIPRAMINE AND NORTRIPTYLINE IN BLOOD BY MEANS OF THE HPLC-DAD METHOD USING 7,7,8,8-TETRACYANOQUINODIMETHANE (TCNQ) AS A DERIVATISATION AGENT**

Michał WOZNIAKIEWICZ<sup>1</sup>, Jagoda KUCZARA<sup>1</sup>, Paweł KOŚCIELNIAK<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Krakow

<sup>2</sup> Institute of Forensic Research, Krakow

### **Abstract**

The aim of present study was to develop a sensitive and reliable method of simultaneous determination of desipramine and nortriptyline in blood by means of high-performance liquid chromatography coupled with a diode array spectrophotometer (HPLC-DAD). For this purpose, a procedure based on formation of colour derivatives of these drugs with 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) was proposed. The tested drugs and the internal standard were added to blood samples, and then they were extracted by the microwave assisted liquid-liquid extraction method. The separated organic layer was evaporated and was subjected to derivatisation by TCNQ reagent dissolved in acetonitrile. Method validation was performed and the limits of detection (0.03–0.05 g/ml) and quantitation (0.09–0.18 g/ml) of both analytes were determined, as were the precision and accuracy of their determination at two concentration levels. The worked-out method allows determination of desipramine and nortriptyline present in blood at therapeutic levels.

### **Key words**

Desipramine; Nortriptyline; TCNQ; HPLC-DAD; Derivatisation.

*Received 10 July 2007; accepted 1 August 2007*

### **1. Introduction**

Although novel drugs, e.g. selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine and others), have been introduced into therapy of depressive diseases, the tricyclic antidepressant (TCA) drugs are still commonly recommended by specialists. Although it is known that these drugs have a broad spectrum of side effects and high toxicity, their therapeutic efficiency, confirmed by many years of experience, means that they are still widely used. Thus, there is still a need to develop analytical methods offering the possibility of effective detection and determination of TCA drugs,

especially in biological material, which is the most common object of toxicological examinations for forensic purposes. Because of the specific nature of the samples, separation methods like gas chromatography [5], capillary electrophoresis [1, 3] and high-performance liquid chromatography [4] are particularly recommended.

In the literature, procedures of analytical examination of TCA drugs with use of 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) dissolved in acetonitrile as a derivatisation agent are known. This compound was applied in determination of nortriptyline and desipramine, drugs containing a secondary nitrogen atom

in their chemical structure, by means of UV-VIS spectrometric methods [6] and chromatographic methods [7]. The mechanism of formation of the appropriate derivatives by secondary amines was described in detail by Hertler et al. [2] and his idea is shown in Figure 1. In the presence of TCNQ excess, only the first stage of the reaction takes place, which results in products showing strong absorption at 567 nm. The second stage of the reaction according to the suggested mechanism occurs only in the presence of a great excess of secondary amine.

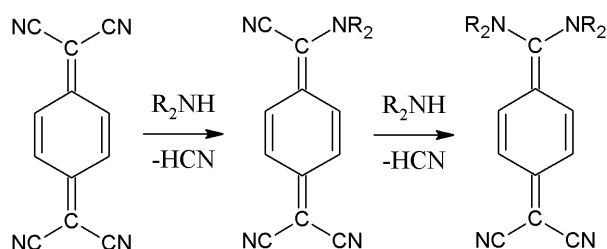


Fig. 1. The mechanism of the derivatisation reaction of secondary amines with TCNQ.

A. Oztunz et al. presented a method of detection of several TCA drugs in serum, including desipramine, nortriptyline, paroxetine, fluoxetine and maprotiline, by derivatisation of extracted analytes using TCNQ [7]. Liquid-liquid extraction into a hexane-ethyl acetate (1:1, v/v) mixture was applied for separation of analytes from the biological matrix. After extraction, the supernatant was additionally dried with anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated in a nitrogen stream. Then, the dry residue was reconstituted in a solution of TCNQ in acetonitrile and incubated at  $80^\circ\text{C}$  for 20 min. The obtained navy-blue derivatives were subjected to analysis by means of HPLC, thin-layer chromatography (TLC) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). In the HPLC method, the examined compounds were separated with use of a C18 column (250  $\times$  4 mm) and elution was performed at room temperature using water-acetonitrile (40:60, v/v) mixture. The elution time of nortriptyline was about 30 min. However, in the cited paper, a quantitative method was not developed and the limit of determination of tested drugs was not accurately determined.

In the presented paper, the above-described method [7] was modified and adapted to the analysis of blood sample spiked with nortriptyline and desipramine.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

In the study, the following standards and reagents were used: nordoxepine hydrochloride (Nord), desipramine hydrochloride (Des), nortriptyline hydrochloride (Nort) (98%, Sigma, United States), acetonitrile (HPLC gradient grade purity, Merck, Germany), 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (98%, Fluka, Germany), concentrated phosphoric acid (V) (analytical purity grade, POCh, Poland), diethylamine (99.5%, Aldrich, Germany), iso-amyl alcohol (analytical purity grade, Hempur, Poland) and methanol (HPLC gradient grade purity, Merck, Germany). All aqueous solutions were prepared with use of water purified by the reverse osmosis process.

### 2.2. Material

The studied material was blood samples spiked by standards of drugs – desipramine and nortriptyline – in methanol, which were suitably dissolved in water. Nordoxepine, at a constant concentration of 0.5 g/ml, was applied as an internal standard. The blood for studies was purchased in the blood donation centre in Krakow and was stored frozen at  $-20^\circ\text{C}$  until sample preparation for studies.

### 2.3. Sample preparation for analysis

In order to separate analytes from the biological matrix, the microwave assisted liquid-liquid extraction method was applied. For this purpose, 1 ml of blood spiked with the tested drugs and IS was placed in a Teflon 100 ml extraction vessel. Then, the Teflon vessels were placed in an ultrasound bath for about 15 min in order to ensure homogenous distribution of analytes in the sample. In the next step, the samples were alkalinised by 3 ml of 0.6 M NaOH solution, and 5 ml of extraction solvent – a mixture of n-hexane and iso-amyl alcohol (99:1, v/v) – was added. Tightly-closed Teflon vessels were placed in a MarsX microwave oven (CEM, United States) and were subjected to microwave assisted extraction according to the following temperature program: increase to  $60^\circ\text{C}$  ( $t = 2$  min), maintaining the temperature at  $60^\circ\text{C}$  ( $t = 1$  min) and cooling of extraction vessels to room temperature (about 30 min).

Then, the samples together with extraction solvent were quantitatively poured into glass vials, and the Teflon vessels were additionally rinsed by two 0.5 ml portions of extraction solvent. In order to separate the

phases completely, the solutions were centrifuged (10 min, 4500 rpm). 5 ml of organic layer was collected and poured into Eppendorf-type tubes. Then, it was vaporised to dryness in a stream of nitrogen at 45°C.

The dry residue was subjected to derivatisation. For this purpose, it was dissolved in 75  $\mu$ l of 0.2 mg/ml TCNQ solution in acetonitrile. The tightly-closed tubes were placed in a heating block at 80°C for 30 min. The colour of the derivatives obtained in the derivatisation process changed depending on the concentration, from light to dark blue.

#### 2.4. Instruments

A LaChrom liquid chromatograph (Merck, Germany) coupled to an L-7455 spectrophotometric detector (Merck, Germany) with diode-array matrix was used in the study. Separation was performed using a Spheri-5 column (C18, 100  $\times$  4.6 mm, Perkin-Elmer, United States). 10  $\mu$ l of sample was introduced each time onto the column and the analytes were eluted isocratically with a mixture of diluted solution of phosphoric (V) acid with addition of 1% (v/v) diethylamine at pH 2.3 and acetonitrile, mixed in the volumetric proportion of 40:60 (v/v). Detection of analytes was performed at 567 nm. The analysis time of a single sample amounted to 10 min.

### 3. Results and discussion

Nucleophilic substitution of TCNQ with secondary amines at elevated temperature is selective and only substances containing a secondary nitrogen atom in their structure and some primary amines undergo this reaction. This practically excludes interference from components of serum and the majority of drugs and their metabolites (that is primary amines, aminoacids and even some secondary amines [7]), because these compounds do not form a product showing absorption at 567 nm, but only, at most, complexes with a charge transfer of characteristic bands at 743 and 840 nm.

The performed experiments confirmed that components of whole blood do not cause the appearance of interfering peaks in chromatograms. The chromatograms of the blank sample (blood spiked only with internal standard) and the tested drugs (desipramine and nortriptyline) analysed at two blood concentration levels, 0.2 and 0.8  $\mu$ g/ml, are shown in Figure 2. As is seen, peaks originating from the biological matrix occur only up to about 2 min, and their number is low. This situation is different from the results of analysis

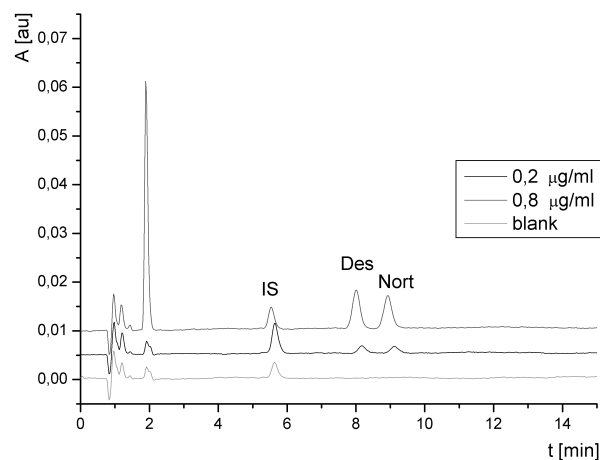


Fig. 2. Chromatograms obtained by the analysis of blood samples spiked with nordoxepine (IS) as internal standard and containing desipramine (Des) and nortriptyline (Nort) at concentrations of 0.0, 0.2 and 0.8  $\mu$ g/ml.

of serum samples [7], where numerous peaks coming from the relatively simpler matrix are seen up to about 8 min. This situation should be linked mainly to the application of different extraction processes of analytes and different chromatographic systems.

In the course of the systematic studies, the validation parameters of the worked-out method were determined, including linearity, limit of determination and quantitation, precision, accuracy and the repeatability of relative retention time. Results are presented in Table I.

Calibration was performed with the use of a linear model of the relationship between the analytical signals (the ratio of the peak heights of analyte and IS) using 10 standard samples. The values of the limit of determination ( $LOD$ ) and quantitation ( $LOQ$ ) for desipramine and nortriptyline determination in blood were calculated. For this purpose, the equations  $LOD = 3 SD/S$  and  $LOQ = 10 SD/S$  were used, where  $SD$  denotes the standard deviation of the analytical signal measured for a sample of concentration 0.2  $\mu$ g/ml ( $n = 5$ ), and  $S$  – slope of the calibration curve. The obtained values of  $LOD$  allow detection of both tested drugs in blood at therapeutic levels, which, according to the literature [8] are 0.05–0.684  $\mu$ g/ml for desipramine and 0.05–0.375 for nortriptyline. Concurrently, because of the relatively broad range of linearity of the method (from ca. 0.2 to 2.0  $\mu$ g/ml), it is possible to determine the tested drugs in blood in view of intoxications, when the concentration of each of the above-mentioned drugs in blood is usually higher than 0.5  $\mu$ g/ml [8].

TABLE I. VALIDATION PARAMETERS FOR DETERMINATION OF DESIPRAMINE AND NORTRIPTYLINE

Parameter	Desipramine	Nortriptyline
Internal standard, IS	Nordoxepine	Nordoxepine
Linearity range, g/ml ( $n = 10$ )	0.1–2.0	0.18–2.0
Calibration curve equation	$y = 2.33x - 0.014$	$y = 2.01x + 0.014$
Coefficient of determination, $R^2$	0.9996	0.9999
$LOD$ , g/ml	0.03	0.05
$LOQ$ , g/ml	0.09	0.18
$RSD\%$ (0.2 g/ml, $n = 5$ , in single series)	4.81	10.01
$RSD\%$ (0.8 g/ml, $n = 5$ , in single series)	2.86	2.80

The accuracy and precision of the worked-out method were tested at two concentration levels: 0.2 and 0.8 g/ml. For this purpose, 5 blood samples spiked with investigated drugs and IS, for both tested concentration levels, were prepared and then the samples were analysed. The results of accuracy examination for both analytes (measured as the relative error of measurement  $RE\%$ ) and repeatability of the method (measured as the standard deviation  $RSD\%$ ) were satisfactory, taking into account that biological material was analysed.

For identification of the tested analytes, their relative retention time calculated in relation to the time of IS can be used, especially when taking into account that in the examined chromatographic system their repeatability was very good (ca. 0.20%  $RSD$ ). In the worked-out method, in the case of doubt, analysis of spectra of their derivatives with TCNQ (for concentrations higher than  $LOQ$ ) can also be applied to identification of analytes. The normalised UV spectra obtained by means of a spectrophotometric detector with diode-array matrix for the derivatives of tested drugs obtained in the derivatisation process are shown in Figure 3. The spectrum of TCNQ, excess of which is eluted at ca. 1.8 min, is also shown in the figure. Lack of presence of the peak coming from the derivatisation agent should be explained by the fact that this compound does not absorb light at 567 nm.

#### 4. Summary

The performed studies confirmed the possibility of use of the derivatisation process for the determination of desipramine and nortriptyline in blood by formation of colour derivatives with TCNQ and further analysis by means of HPLC-DAD. An innovative, micro-

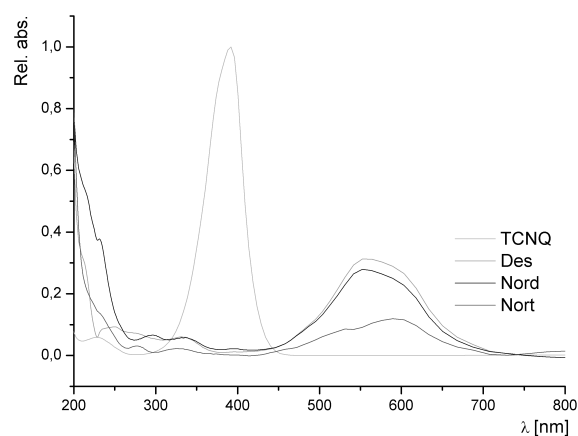


Fig. 3. UV spectra of derivatives of desipramine (Des), nortriptyline (Nort) and nordoxepine (Nord) with TCNQ and also the solution of the derivatisation reagent (TCNQ). The spectra were recorded at maxima of chromatographic peaks coming from mentioned substances.

wave assisted extraction technique, was applied to sample preparation for analysis. Thus, an original analytical method, which is sensitive only to substances containing a secondary nitrogen atom in their structure, was developed. It combines an efficient technique for isolation of analytes from the biological matrix with a derivatisation process which is selective for these compounds. In the near future, a broadening of the examined group of drugs is planned in order to include other psychotropic drugs with a secondary nitrogen atom in their structure, e.g. fluoxetine. To the best of the authors' knowledge, the described method is the first quantitative method that allows simultaneous chromatographic determination of nortriptyline and desipramine in blood with the use of derivatisation of these substances by TCNQ reagent and the application of an IS. It should be emphasised that the validation parameters of the method allow its application to

detection and determination of the tested drugs in blood at therapeutic levels. Additionally, when comparing the method and obtained results with literature data [7], a shortening of analysis time to only 10 min and also – due to the application of the microwave assisted liquid-liquid extraction method – much cleaner extracts can be observed.

#### Acknowledgements

The research project was co-financed by the European Union Structural Fund and the state budget within the framework of the Integrated Regional Operational Programme (IROP).

#### References

1. Automell 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. Hertler W. R., Hartzler H. D., Acker D. S. [et al.], Substituted quinodimethanes. III. Displacement reactions of 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane, *Journal of American Chemical Society* 1962, 84, 3387–3393.
3. Madej K., Marczyk A., Woźniakiewicz M., Non-aqueous CE screening method for 14 psychotropic drugs in whole blood samples, *Chromatographia* 2007, 65, 313–317.
4. Madej K., Parczewski A., Kała M., HPLC/DAD screening method for selected psychotropic drugs in blood, *Toxicology Mechanisms and Methods* 2003, 13, 121–127.
5. Martínez M. A., Sánchez de la Torre C., Almarza E., A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluoxetine, amitriptyline, nortriptyline, trimipramine, maprotiline, clomipramine, and trazodone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *Journal of Analytical Toxicology* 2003, 27, 353–358.
6. Oztunc A., Dokumaci N., Tahtasakal E., The use of 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane for the determination of nortriptyline and desipramine in tablets, *Farmaco* 1999, 54, 835–837.
7. Oztunc A., Onal A., Erturk S., 7,7,8,8-Tetracyanoquinodimethane as a new derivatization reagent for high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography: rapid screening for some antidepressants, *Journal of Chromatography B* 2002, 774, 149–155.
8. Winek C. L., Wahba W. W., Winek Jr. C. L. [et al.], Drug and chemical blood-level data 2001, *Forensic Science International* 2001, 122, 107–123.

---

#### Corresponding author

Paweł Kościelniak  
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii  
ul. Ingardena 3  
PL 30-060 Kraków  
e-mail: koscieln@chemia.uj.edu.pl

---

## OZNACZANIE DEZYPRAMINY I NORTRYPTYLINY WE KRWI METODĄ HPLC-DAD Z ZASTOSOWANIEM 7,7,8,8-TETRACJANOCHINODIMETANU (TCNQ) JAKO ODCZYNNIKA DERYWATYZUJĄCEGO

### 1. Wstęp

Mimo wprowadzania do terapii chorób depresyjnych nowych leków, np. należących do grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (fluoksetyny i innych), trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (TCAD) nadal są powszechnie zalecane przez specjalistów. Choć znane jest szerokie spektrum efektów ubocznych i duża toksyczność tych leków, to o ich popularności decyduje potwierdzona wieloletnim stosowaniem skuteczność terapeutyczna. W tej sytuacji nadal istnieje potrzeba rozwoju metod analitycznych oferujących możliwości efektywnego wykrywania i oznaczania leków TCAD, w szczególności w materiale biologicznym, który najczęściej jest obiektem badań toksykologiczno-sądowych. Ze względu na charakterystykę próbek do analiz polecane są szczególnie metody separacyjne, w szczególności chromatografia gazowa [5], elektroforeza kapilarna [1, 3] i wysokosprawna chromatografia cieczowa [4]. W literaturze znane są procedury analitycznego badania leków TCAD z wykorzystaniem acetonitrylowego roztworu 7,7,8,8-tetracjanochinodimetanu (TCNQ) jako odczynnika derywatyżującego. Związek ten stosowano do oznaczania nortryptyliny i dezypraminy (czyli leków zawierających w swojej chemicznej strukturze drugorzędowy atom azotu) metodami spektrometrii UV-VIS [6] oraz metodami chromatograficznymi [7]. Mechanizm tworzenia odpowiednich pochodnych przez drugorzędowe aminy opisano szczegółowo w pracy Hertlera i in. [2], a jego ideę pokazano na rycinie 1. W obecności nadmiaru TCNQ zachodzi tylko pierwszy etap reakcji, dając w rezultacie produkty wykazujące silną absorpcję przy 567 nm. Drugi etap reakcji według zaproponowanego mechanizmu zachodzi tylko w obecności dużego nadmiaru drugorzędowej aminy.

A. Oztunz i in. zaproponowali metodę wykrywania kilku leków TCAD, m.in. dezypraminy, nortryptyliny, paroksetyny, fluoksetyny i maprotyliny) w osoczu poprzez derywatazację wyekstrahowanych analitów za pomocą TCNQ [6]. Do wyosabniania analitów z matrycy biologicznej zastosowali ekstrakcję ciecz-ciecz do mieszaniny heksan-octan etylu (1:1, v/v). Po ekstrakcji supernatant był dodatkowo osuszany bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , odparowywany w strumieniu azotu, sucha pozostałość była rekonstruowana w acetonitrylowym roztworze TCNQ, a następnie inkubowana w temperaturze 80°C przez 20 min. Otrzymane pochodne barwy granatowej poddawano analizie metodami HPLC, chromatografii

cienkowsarstwowej (TLC) i wysokosprawnej chromatografii cienkowsarstwowej (HPTLC). W przypadku metody HPLC badane związki rozdzielano przy użyciu kolumny C18 (250 × 4 mm), eluując anality w temperaturze pokojowej mieszaniną wody i acetonitrylu (40:60, v/v). Czas elucji nortryptyliny wynosił ok. 30 min. W cytowanej pracy nie opracowano jednak metody ilościowej i nie wyznaczono dokładnie granicy wykrywalności badanych leków.

W niniejszej pracy dokonano modyfikacji przedstawionej powyżej metody [7], adaptując ją do analizy próbek krwi dotowanej nortryptyliną i dezypraminą.

### 2. Materiały i metody

#### 2.1. Odczynniki

W badaniach zastosowano następujące wzorce i odczynniki: chlorowodorek nordoksetyny (Nord), chlorowodorek dezypraminy (Des), chlorowodorek nortryptyliny (Nort) ( 98%, Sigma, Stany Zjednoczone), acetonitryl (cz. do chromatografii gradientowej, Merck, Niemcy), 7,7,8,8-tetracjanochinodimetan ( 98%, Fluka, Niemcy), stężony kwas fosforowy (V) (cz.d.a. POCh, Polska), dietyloamina ( 99,5%, Aldrich, Niemcy), alkohol izoamylowy (cz.d.a. Hempur, Polska) oraz metanol (cz. do chromatografii gradientowej, Merck, Niemcy). Wszystkie wodne roztwory sporządzano przy użyciu wody oczyszczonej w procesie odwrotnej osmozy.

#### 2.2. Materiał

Materiał do badań stanowiły próbki krwi dotowane odpowiednio rozcieńczonymi wodą metanolem standardami leków: dezypraminy i nortryptyliny. Jako standard wewnętrzny (IS) zastosowano nordoksetynę w stałym stężeniu 0,5 µg/ml. Krew do badań zakupiono w stacji krwiodawstwa w Krakowie i przechowywano zamrożoną w temperaturze -20°C do momentu przygotowania próbek do badań.

#### 2.3. Przygotowanie próbki do analizy

W celu wyosobnienia analitów z matrycy biologicznej zastosowano ekstrakcję w układzie ciecz-ciecz wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym. W tym celu do teflonowych naczyń ekstrakcyjnych (o objętości

100 ml) wprowadzano po 1 ml krwi dotowanej badanymi lekami oraz IS. Następnie naczynia teflonowe umieszczano w łaźni ultradźwiękowej na ok. 15 min celem zapewnienia homogenicznego rozmieszczenia analitów w próbce. W kolejnym etapie próbki alkalizowano za pomocą 3 ml 0,6 M roztworu NaOH oraz dodawano 5 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego – mieszaniny n-heksanu z alkoholem izoamylowym (99:1, v/v). Szczelnie zamknięte naczynia teflonowe umieszczano w piecu mikrofalowym MarsX (CEM, Stany Zjednoczone) i poddawano procesowi ekstrakcji wspomaganą mikrofalami według planu temperaturowego: przyrost do temperatury 60°C ( $t = 2$  min), utrzymanie temperatury 60°C ( $t = 1$  min) i ochłodzenie naczyń ekstrakcyjnych do temperatury pokojowej (ok. 30 min). Następnie próbki wraz z rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym przenoszono ilościowo do szklanych fiolek, przepłukując dodatkowo teflonowe naczynia dwoma porcjami rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (po 0,5 ml). Roztwory odwirowywano (10 min, 4500 obr./min) celem całkowitego rozdzielenia faz, po czym pobierano 5 ml fazy organicznej, przenoszono ją do próbek typu Eppendorfa i odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 45°C.

Suchą pozostałość poddawano procesowi derywatywacji. W tym celu rozpuszczano ją w 75 µl acetonitrylowego roztworu TCNQ o stężeniu 0,2 mg/ml. Szczelnie zamknięte próbki umieszczano w bloku grzejnym o temperaturze 80°C na 30 min. Uzyskane w procesie derywatywacji pochodne miały w zależności od stężenia barwę od jasno- do ciemnoniebieskiej.

#### 2.4. Aparatura

W badaniach wykorzystano chromatograf cieczowy LaChrom (Merck, Niemcy) sprzężony z detektorem spektrofotometrycznym z matrycą diodową L-7455 (Merck, Niemcy). Rozdział prowadzono za pomocą kolumny Spheri-5 (C18, 100 × 4,6 mm, Perkin-Elmer, Stany Zjednoczone). Do kolumny wprowadzano każdorazowo 10 µl próbki, a anality eluowano izokratycznie mieszaniną roztworu rozcieńczonego kwasu fosforowego(V) z dodatkiem 1% (v/v) dietyloaminy o pH = 2,3 i acetonitrylu zmieszanych w stosunku objętościowym 40:60 (v/v). Detekcję analitów prowadzono przy długości fali 567 nm. Czas analizy pojedynczej próbki wynosił 10 minut.

### 3. Wyniki i dyskusja

Reakcja substytucji nukleofilowej TCNQ z drugorzędowymi aminami w podniesionej temperaturze jest selektywna i ulegają jej jedynie substancje zawierające w swej strukturze chemicznej drugorzędowy atom azotu oraz tylko nieliczne aminy pierwszorzędowe. Wyklucza to praktycznie interferencje ze składnikami osocza, a tak-

że ze znaczną liczbą leków i ich metabolitów (czyli m.in. z aminami pierwszorzędowymi, aminokwasami i nawet niektórymi aminami drugorzędowymi [7]), związki te bowiem nie tworzą produktu wykazującego absorpcję przy 567 nm, a jedynie co najwyżej kompleksy z przeniesieniem ładunku o charakterystycznych pasmach przy 743 i 840 nm.

Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły, że również składniki pełnej krwi nie powodują pojawiania się na chromatogramach interferujących pików. Na rycinie 2 przedstawiono chromatogramy ślepej próby (próbki krwi dotowanej jedynie standardem wewnętrznym) i badanych leków (dezypraminy i nortryptyliny) analizowanych przy dwóch poziomach stężeń we krwi: 0,2 i 0,8 µg/ml. Jak widać, piki pochodzące od matrycy biologicznej występują jedynie do ok. 2 minuty, a ich liczba jest niewielka. Jest to sytuacja odmienna od wyników analizy próbek osocza [7], gdzie liczne piki pochodzące od stosunkowo prostszej matrycy widoczne są do ok. 8 minuty. Sytuację tę należy wiązać przede wszystkim z zastosowaniem odmiennego procesu ekstrakcji analitów oraz innego układu chromatograficznego.

W toku systematycznych badań wyznaczono parametry walidacyjne opracowanej metody analitycznej: liniowość, granicę wykrywalności i oznaczalności, precyzję i dokładność oraz powtarzalność względnego czasu retencji. Wyniki te zebrano w tabeli I.

Kalibrację przeprowadzono, wykorzystując liniowy model zależności pomiędzy sygnałem analitycznym (stosunkiem wysokości pików pochodzącego do analitu do pików IS) z wykorzystaniem 10 próbek wzorcowych. Obliczono wartość granicy wykrywalności ( $LOD$ ) i oznaczalności ( $LOQ$ ) dla oznaczania nortryptyliny i dezypraminy we krwi. W tym celu wykorzystano równania  $LOD = 3 SD/S$  oraz  $LOQ = 10 SD/S$ , gdzie  $SD$  oznacza odchylenie standardowe pomiaru sygnału analitycznego zmierzonego dla próbki o stężeniu 0,2 µg/ml ( $n = 5$ ), a  $S$  – nachylenie krzywej kalibracyjnej. Uzyskane wartości  $LOD$  pozwalają na wykrycie obu badanych leków we krwi na poziomach terapeutycznych, które według danych zawartych w literaturze wynoszą 0,05–0,684 µg/ml dla dezypraminy i 0,05–0,375 dla nortryptyliny [8]. Równocześnie ze względu na stosunkowo szeroki zakres liniowości metody (od ok. 0,2 do 2,0 µg/ml), możliwe jest oznaczenie badanych leków we krwi analizowanej pod kątem zatrucia, kiedy to stężenie każdego z ww. leków we krwi zazwyczaj przewyższa 0,5 µg/ml [8].

Dokładność i precyzję opracowanej metody analitycznej zbadano przy dwóch poziomach stężeń: 0,2 i 0,8 µg/ml. W tym celu sporządzono po 5 próbek krwi dotowanej badanymi lekami i IS dla obu badanych poziomów stężeń, a następnie próbki poddano analizie. Wyniki badania dokładności oznaczenia obu analitów (mierzone względny błąd pomiaru  $RE\%$ ) i powtarzalności metody (mierzonej względny odchyleniem standardowym

RSD%) były zadawalające, biorąc pod uwagę, że analizowano materiał biologiczny.

Do identyfikacji badanych analitów posłużyć może ich względny czas retencji liczony względem czasu IS, zwłaszcza że w badanym układzie chromatograficznym jego powtarzalność była bardzo dobra (wynosiła ok. 0,20% RSD). W ramach opracowanej metody, w przypadku wątpliwości, do identyfikacji analitów może być również zastosowana analiza widm ich pochodnych z TCNQ (dla stężeń przekraczających *LOQ*). Znormalizowane widma UV otrzymane za pomocą detektora spektrofotometrycznego z matrycą diodową dla pochodnych badanych leków otrzymanych w procesie derywatywacji przedstawiono na rycinie 3. Na rycinie tej pokazano również widmo TCNQ, którego nadmiar eluowany jest przy ok. 1,8 min. Brak obecności na chromatogramach piku pochodzącego od odczynnika derywatyzującego należy tłumaczyć nieabsorbowaniem światła przez ten związek przy 567 nm.

#### 4. Podsumowanie

Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość zastosowania procesu derywatywacji do oznaczania dezypraminy i nortryptyliny we krwi poprzez tworzenie ich barwnych pochodnych z TCNQ i dalszą analizę metodą HPLC-DAD. Na etapie przygotowania próbek do analizy zastosowano nowatorską technikę ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym. Tym samym opracowano oryginalną metodę analityczną, czułą jedynie na substancje mające w swojej strukturze drugorzędowy atom azotu, łączącą w sobie wydajną technikę izolacji analitów z matrycy biologicznej z procesem derywatywacji selektywnym względem tych związków. W najbliższym czasie planuje się rozszerzenie badanej grupy leków o inne leki psychotropowe mające w swojej strukturze drugorzędowy atom azotu, np. fluoksetynę.

Według wiedzy autorów, opisana metoda jest pierwszą metodą ilościową pozwalającą na jednoczesne chromatograficzne oznaczenie nortryptyliny i dezypraminy we krwi z wykorzystaniem procesu derywatywacji tych substancji odczynnikiem TCNQ oraz z zastosowaniem IS. Podkreślić należy, iż parametry walidacyjne metody pozwalają na użycie jej do wykrywania i oznaczania badanych leków we krwi w stężeniach terapeutycznych. Dodatkowo, porównując uzyskane wyniki z danymi zawartymi w literaturze [7], można zauważyć skrócenie czasu analizy do zaledwie 10 min, a także, dzięki zastosowaniu metody ekstrakcji ciecz-ciecz wspomaganą mikrofalami, otrzymanie znacznie czystszych ekstraktów.

#### Podziękowania

Projekt badawczy był współfinansowany z Europejskiego Funduszu Społecznego oraz budżetu państwa w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego.