



APPLICATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION IN ISOLATION OF PSYCHOTROPIC DRUGS FROM BIOLOGICAL MATERIAL

Renata WIETECHA-POSŁUSZNY¹, Michał WOZNIAKIEWICZ¹, Aneta GARBACIK¹,
Paweł KOŚCIELNIAK^{1,2}

¹ Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Krakow, Poland

² Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

The aim of the presented research was to work out a complete analytical procedure for the determination of selected tricyclic anti-depressant drugs (TCAD) in blood, encompassing the liquid-liquid extraction supported by the microwave-assisted extraction (MAE), and evaluation of the validation parameters of the method of determination of these drugs by high performance liquid chromatography. The research covered optimisation of conditions of extraction of the analysed compounds – amitriptyline, imipramine, doxepine, nortriptyline, desipramine, nordoxepine, clomipramine (IS) – from aqueous solutions by classical liquid-liquid extraction (LLE), supported by microwaves. Apparatus conditions of the microwave process were also optimised. The HPLC-DAD technique was used in the evaluation of the efficiency of the extraction process. On the basis of these results, an extraction procedure was developed, encompassing application of a mixture of hexane and isoamyl alcohol (99:1, v/v) as an extraction solvent and performance of microwave extraction at 60°C for 3 minutes. The procedure was applied in the extraction of selected psychotropic drugs in blood. The complete method of TCAD drugs determination in blood was validated and validation parameters for each compound were determined: detection limit (0.03–0.09 g/ml), quantification limit (0.11–0.22 g/ml), repeatability for two different concentrations (0.2 g/ml: 4.28–18.05 RSD%; 0.8 g/ml: 2.43–10.18 RSD%) and linearity (0.15–2.00 g/ml). It was found that liquid-liquid extraction supported by microwaves allows a higher extraction efficiency (80–100%) to be obtained than classical liquid-liquid extraction (60–70%), and that all drugs are extracted at the same level.

Key words

Liquid-liquid extraction (LLE); Microwave-assisted extraction (MAE); Psychotropic drugs; Biological material.

Received 26 September 2007; accepted 7 October 2007

1. Introduction

Microwave-assisted liquid-liquid extraction (MAE) is a relatively new technique used in toxicological analysis. Such a method of sample preparation, in the opinion of several authors, allows effective extraction of various chemical compounds, including medicines and drugs, from complex biological matrices.

Current analytical methods allow us to determine very low concentrations of determined compounds, but the analytical process is generally burdened by an expensive and time consuming process of sample preparation. Various extraction procedures are used with the aim of isolating organic compounds. Their dynamic development has been observed since the first application of a Soxhlet extraction in 1879. This method

is characterised by high consumption of extraction solvent and a long extraction process. These factors have caused growth in research into other techniques of isolation of analytes from a sample matrix [9].

In 1986, Ganzler et al. published the first paper which described application of microwaves to analytes extraction from organic samples. They described extraction of raw fats and additives from food and pesticides from soil by application of microwave-assisted extraction. Their experiments showed a different heating process kinetics in comparison to the classical approach and the results of the extraction process were characterised by a higher extraction efficiency than application of the Soxhlet technique or super-fluid extraction (SFE) [6]. From that moment many researchers began experiments with the aim of studying possibilities of application of MEA as a new extraction technique.

The main application of microwave-assisted liquid-liquid extraction turned out to be isolation of analytes from soil, sediments, ashes and plants [1, 2, 7, 10, 11, 12]. In the literature, only a few papers have been noted on isolation of active compounds from pharmaceutical species as well as medicines and drugs (together with their metabolites) from blood, plasma and serum.

Franke et al. [5] worked out a method of isolation of six xenobiotics from plasma and serum by application of the microwave focusing system and open containers. The authors also compared the developed procedure with classical liquid-liquid extraction (LLE) and LLE at increased temperature (80°C). The performed research on samples spiked with determined compounds did not show MAE to have significant advantages in comparison with the LLE technique. In the case of lidocaine, diazepam and methadone, the obtained efficiency values were lower than in the case of LLE. The recovery values of determined compounds obtained for extraction at an increased temperature were only at the level of several percent, which could suggest that in the MAE technique, the mechanism of transport of analytes from the sample to the extraction solvent is not solely caused by a temperature increase. The authors used the worked out procedure with the aim of extraction of lidocaine, methadone, propoxyfene, norpropoxyfene, diazepam and nordiazepam from samples collected during a post-mortem examination, in which these compounds had been previously detected. Performed analyses showed that the obtained results of determination were in general higher than in the case of application of classical liquid-liquid extraction. The authors put forward the hypothesis that the reason for such a situation could be

the breaking of bonds between these compounds and plasma proteins because of the application of microwaves. This hypothesis, however, has not yet been confirmed.

Microwave-assisted extraction was also applied in order to isolate drugs and their metabolites from urine and plasma. Fernandez et al. [3, 4] carried out optimisation of microwave-assisted extraction of morphine, codeine, 6-acetylmorphine, cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, EDDP and methadone from the mentioned materials. The authors took into account the kind of solvent, sample pH and duration of sample exposure to microwaves during performed optimisation in the case of extraction from urine. The temperature was kept at a constant level of 100°C during the whole process. The results obtained by the authors confirmed the usefulness of the worked-out procedure in the isolation of analysed drugs and their metabolites.

Hoang et al. presented other applications of MAE to the extraction of active components from various forms of solid medicines [7]. This group of researchers optimised the MAE procedure, taking into account the following factors: the extraction solvent, time and temperature, on the basis of a model compound called Compound A (Merck & Co, USA) presented in tables. The obtained optimal conditions were used in the isolation of sodium montelukast (this medicine is used in the treatment of bronchial asthma) from various forms of Singulair®. Obtained recovery results were compared to results obtained by the application of classical extraction methods. The authors emphasised that MAE offers a very short extraction time especially in comparison to classical techniques (over four times shorter) and it allows preparation of a large number of samples at the same time.

The aim of the research presented in this paper was to attempt to apply microwave-assisted liquid-liquid extraction to isolation of psychotropic medicines: nortryptiline, nordoxepine, imipramine, amitryptiline, doxepine and desipramine in blood. The accuracy of the optimised extraction method was also evaluated during the performed research. This was done by estimation of validation parameters of the method of determination of analysed medicines from a biological matrix by HPLC.

2. Materials and methods

The following standards were used in the research: nordoxepine (Nord), nortryptiline (Nort) (Sigma, USA), desipramine (Des), imipramine (Imi),

amitriptyline (Ami), doxepine (Dox), clomipramine (IS) (Aldrich, Germany). In the course of the research, working standards were obtained by dilution of a suitable amount of each compound in methanol in such a way that the concentration was 1 mg/ml. If it was necessary, other standard solutions were obtained by dilution with deionized water or methanol. The following compounds were also used in the research: acetonitrile, methanol (Merck, Germany), dimethylamine (Aldrich, Germany), concentrated phosphoric acid (V), n-hexane, isoamyl alcohol, 30% sodium hydrate, 32% hydrochloric acid, cyclohexane (analytical pure), ethyl acetate (pure), acetone (analytical pure), toluene (analytical pure) (POCh, Poland). Deionised water (conductivity < 1 S/cm) was used in the analysis.

The following apparatus was applied in the preparation of blood samples and determination of selected drugs in biological material:

- an oven for microwave-assisted extraction (MarsX, CEM, USA) equipped with a 14-position rotor for GreenChem[®] extraction containers, including one control container used to control the temperature of the process; a shaker (Kavalier, Sklarny, Czechoslovakia), which was applied in liquid-liquid extraction; an ultrasonic bath (Polsonic, Poland), which was used to ensure the homogeneity of biological material;
- a liquid chromatograph (LaChrom D-7000, Merck-Hitachi, Germany), equipped with an autosampler and a diode-array spectrophotometric detector; analytes were separated by the application of the chromatographic column Spheri-5 C18, 100 × 4.6 mm, Perkin-Elmer, USA. The mobile phase was a 1:1 v/v mixture of phosphate buffer (pH = 2.35) with addition of diethylamine (0.1%) and acetonitrile. The flow of the mobile phase was 1 ml/min, and detection was carried out at $\lambda = 254$ nm.

Two extraction procedures (LLE and MAE) were used in the research to extract the above mentioned drugs from aqueous solutions and after that from blood.

The LLE extraction procedure was as follows: 1 ml of aqueous solution of each of the six drugs was collected (the concentration of each drug was 0.2 g/ml) and placed in four 22-ml vials, and a “blank sample”, i.e. 1 ml of water, was also prepared; 3 ml of NaOH 0.6 M was added to each vial and mixed. After that, 5 ml of extraction solvent was added. Vials were tightly closed with an aluminium crown cap with a PTFE plug and were gently shaken for 10 minutes in a shaker. After that they were centrifuged for 10 minutes (3500 rpm) with the aim of phases separation. Next 4 ml of organic phase was collected. The solvent was evaporated at 45 °C in a nitrogen atmosphere. Next, dry residues were diluted in 250 μ l of extraction solvent, and re-extracted for 2 minutes into 50 μ l 0.05% H₃PO₄ with added IS (4 g/ml). After evaporation (10 min, 4500 rpm), the aqueous phase was collected for analysis. It was directly injected onto a chromatographic column by auto-sampler application.

MAE extraction was performed according to the following procedure: 1 ml of aqueous solution of each of the six drugs was collected (the concentration of each drug was 0.2 g/ml) and placed in 4 extraction containers. A “blank sample” – 1 ml of water – was also prepared. 3 ml of 0.6 M NaOH was added to each vial and mixed. After that 5 ml of extraction solvent was added. Containers were tightly closed and placed in a microwave oven. A suitable procedure was selected (Table I). After extraction, containers were left to cool to a temperature of ca. 27°C and next the content of each container was transferred to vials, finished by washing containers with 1 ml of extraction solvent. After centrifugation for 10 min (3500 rpm), 5 ml of organic phase was collected, and then analysis was performed according to the LLE extraction procedure.

TABLE I. MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION PROCEDURES

Abbreviations	Extraction procedure	Extraction temperature	Extraction time
MAE 15%	Microwave-assisted extraction with application of 15% of 300 W*	Not measured**	1 min
MAE 50	Microwave-assisted extraction with a temperature ramp	50°C	Temperature ramp: 2 min Extraction: 1 min
MAE 60		60°C	
MAE 70		70°C	

* The effective power was 45 W during the whole extraction process.

** Due to equipment limitations.

TABLE II. A COMPARISON OF EXTRACTION EFFECTIVENESS WHEN USING MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION AND LIQUID-LIQUID EXTRACTION TECHNIQUES

Extraction solvent	Medicine method	Nordoxepine [%]	Nortryptoline [%]	Desipramine [%]	Amitryptiline [%]	Imipramine [%]	Doxepine [%]
n-hexane – isoamyl alcohol 99:1 (v/v) [8]	LLE	64.4	74.3	53.1	50.0	95.1	73.8
	MAE 15%	45.9	79.8	39.4	41.9	102.2	81.6
	MAE 50	48.5	88.4	43.7	59.6	85.7	77.3
	MAE 60	73.1	107.3	71.2	97.8	101.9	91.5
	MAE 70	74.1	106.6	73.5	98.7	101.3	90.7
Ethyl acetate – cyclohexane 1:1 (v/v) [2]	LLE	24.3	86.7	26.4	28.9	94.4	86.2
	MAE 15%	23.2	90.8	24.6	29.7	98.0	90.7
	MAE 50	61.0	83.9	37.5	56.1	116.5	89.0
	MAE 60	20.3	97.4	23.6	27.5	102.4	94.6
	MAE 70	62.3	87.9	45.4	62.5	120.5	94.4
Toluene – isoamyl alcohol – n-hexane 76:4:20 (v/v/v) [2,5]	LLE	89.6	115.3	54.3	73.7	118.4	89.8
	MAE 50	105.0	–	96.0	102.3	128.8	95.5
	MAE 60	52.4	139.3	37.6	35.8	36.6	29.8
n-hexane – acetone 3:1 (v/v) [2]	LLE	48.0	53.3	42.8	48.7	53.2	70.0
	MAE 15%	45.4	50.1	42.6	57.8	49.8	67.3
	MAE 50	38.4	47.7	34.0	42.0	54.0	51.8
	MAE 60	47.9	51.4	42.4	52.8	56.6	55.6

“–” a lack of a peak on a chromatogram.

3. Results

3.1. Optimisation research

Preliminary optimisation research was performed on aqueous solutions of the six TCAD drugs. To this end, 5 ml methanol 1 mg/ml solution of each drug was placed in a 25 ml volume flask and filled up to 25 ml with deionised water. The concentration of the drug in the final solution was 0.2 mg/ml. The prepared solutions were subjected to both LLE and MAE, applying four different (from a chemical point of view) extraction mixtures (Table II). The main criterion of selection of extraction mixtures was their ability to absorb microwaves, i.e. mixtures which contain polar compounds such as acetone and ethyl acetate at high concentrations.

A five-point calibration curve was constructed on the basis of drug standards at the following concentrations: 5; 2.5; 1.25; 0.625 and 0.3125 mg/ml. Standards were obtained by appropriate dilution of the 20 mg/ml aqueous drugs solution.

Results showing the extraction effectiveness [%] of the analysed group of TCAD drugs obtained by the LLE and MAE methods are presented in Table II. An example chromatogram showing separation of the six analysed TCAD and the IS, and comparing extraction results obtained by LLE and MAE 60 and also a mixture of ethyl acetate-cyclohexane as an extraction solvent, is presented in Figure 1.

On the basis of obtained results, it was concluded that application of microwaves to the extraction of selected drugs from the TCAD group has an important positive influence on increasing efficiency of extraction in comparison with classical liquid-liquid extraction (Figure 1). A selection of the best conditions of extraction of analysed compounds from their aqueous solution was made on the basis of obtained values of extraction efficiency. The optimal conditions of extraction assisted by microwaves were: extraction by the mixture n-hexane – isoamyl alcohol (99:1, v/v) at 60°C for 3 minutes.

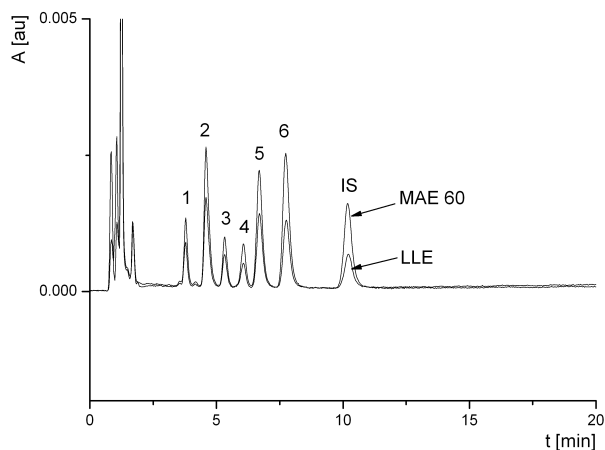


Fig. 1. A comparison of the effectiveness of extraction of nordoxepine (1), nortryptiline (2), desipramine (3), amitryptiline (4), imipramine (5), doxepine (6) and clomipramine. (IS) by LLE and MAE 60 procedure with application of ethyl acetate – cyclohexane mixture.

4. Validation research

The optimised extraction method was used for extraction of analysed TCAD from human blood. Samples of blood spiked with aqueous solutions of analysed drugs were prepared directly in Teflon extraction containers with the aim of creating a four-point calibration curve. The following concentrations were obtained: 2.00; 1.00; 0.50 and 0.125 g/ml of each drug in blood. The IS concentration in each sample was constant (2.00 g/ml). After this, the Teflon containers were placed in an ultrasonic bath for 20 minutes, with the aim of ensuring sample homogeneity, and next they were subjected to the optimised procedure of microwave extraction.

Validation of the method of determination of the six TCAD drugs in blood was carried out. Precision and accuracy were analysed at two different concentration levels: 0.2 g/ml ($n = 5$, only one analytical run) and 0.8 g/ml ($n = 4$, only one analytical run). Example chromatograms illustrating results obtained after extraction of the analysed drugs in blood are presented in Figure 2. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of the analysed analytes were calculated on the basis of formulas:

$$LOD = \frac{3SD_{0.2}}{a} \quad \{1\}$$

$$LOQ = \frac{10SD_{0.2}}{a} \quad \{2\}$$

where: $SD_{0.2}$ – standard deviation of the analytical signal obtained during analysis of 5 samples spiked

with analysed compounds at 0.2 g/ml concentration, a – the slope of the calibration curve.

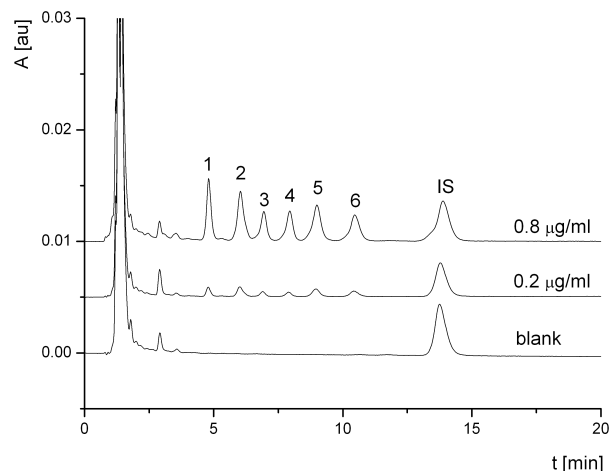


Fig. 2. Chromatograms of extracts of a mixture of analysed medicines in control blood samples and in a blank sample.

The reproducibility of the relative retention time was analysed in two runs ($n_1 = 5$ and $n_2 = 4$), on two different days. A statistical analysis by the t-Student test did not reveal important differences between values of relative retention times determined within each analytical run for each of the analysed TCAD. The reproducibility of the analytical signal (the ratio of the analyte peak height to the internal standard peak height, H/HIS) was analysed by determination of the relative standard deviation for 5 (0.2 g/ml) and 4 (0.8 g/ml) samples analysed by the selected method. The accuracy of the worked out procedure was examined by an analysis of the above mentioned blood samples after they had been spiked by an analyte solvent (two different concentrations were used). Such a procedure was used because of a lack of suitable reference material. The accuracy was calculated as follows:

$$RE = \left| \frac{\mu - c}{\mu} \right| 100\% \quad \{3\}$$

where: c – found concentration value, μ – theoretical true concentration value. Determined validation parameters are presented in Table III.

It could be concluded, on the basis of validation results, that the limit of detection of analysed drugs was in the range from 0.09 g/ml (for doxepine) to 0.3 g/ml (for nordoxepine). The repeatability of the analytical signal is higher for a level of 0.8 g/ml and varies from 2.43% (for doxepine) to 10.18% (for desipramine). The recovery percentage for the higher concentration of analysed drugs was higher in comparison with the

TABLE III. VALIDATION PARAMETERS

Parameter	Nord	Nort	Des	Ami	Imi	Dox
Linearity, g/ml	0.15–2.00	0.16–2.00	0.15–2.00	0.11–2.00	0.11–2.00	0.09–2.00
Slope, <i>a</i>	0.64	0.69	0.46	0.48	0.68	0.58
Intersection, <i>b</i>	0.05	0.11	0.03	0.03	0.11	0.09
Determination coefficient, <i>R</i> ²	0.9993	0.9973	0.9986	0.9986	0.9981	0.9979
<i>LOD</i> , g/ml	0.09	0.05	0.06	0.05	0.03	0.03
<i>LOQ</i> , g/ml	0.30	0.16	0.22	0.18	0.11	0.09
A reproducibility of a relative retention time in a one analytical run, <i>RSD</i> %	0.19	0.10	0.09	0.21	0.09	0.16
A reproducibility of a relative retention time between various analytical runs, <i>RSD</i> %	0.28	0.32	0.33	0.27	0.19	0.30
A reproducibility of analytical signal (<i>H</i> / <i>H</i> _S) on 0.2 g/ml level (<i>n</i> = 5), <i>RDS</i> %	18.05	8.65	13.04	11.25	5.49	4.28
A reproducibility of analytical signal (<i>H</i> / <i>H</i> _S) on 0.8 g/ml level (<i>n</i> = 4), <i>RDS</i> %	7.76	3.45	10.18	9.40	5.23	2.43
<i>RE</i> 0.2 g/ml, %	89.0	101.6	84.1	82.8	101.4	97.8
<i>RE</i> 0.8 g/ml, %	101.2	103.9	95.2	97.2	100.8	103.5

0.2 g/ml level. This stems from the fact that blood is a very complex biological material and when analysed drugs are present at a low concentration, then matrix interferences have a greater influence on the obtained results.

5. Conclusions

The procedure of microwave-assisted extraction of psychotropic drugs, i.e. nordoxepine, nortryptiline, amitryptiline, imipramine, doxepine and desipramine in aqueous solutions was optimised during the performed preliminary research. In the next step, tests were performed on samples of human blood, spiked with TCAD and validation of the method of determination of these drugs was also carried out in this type of matrix.

Results obtained by application of the new extraction procedure, encompassing microwave-assisted extraction at 60°C, with a mixture of n-hexane–isoamyl alcohol (99:1, v/v), are evidence that microwave-assisted extraction is a competitive technique relative to liquid-liquid extraction (MAE efficiency was 80–100% whilst LLE efficiency was 60–70%). An-

other positive feature of this method is the fact that all drugs are extracted at the same level (above 70%), which was confirmed by results obtained for particular drugs. This method allowed reduction of time of extraction (to 3 minutes) thanks to application of the characteristic and specific process of extraction mixture heating.

The performed research showed that application of microwaves to extraction of tricyclic antidepressant drugs from blood samples is effective and in the future could be used in routine toxicological analysis for forensic purposes. At this stage of research, however, additional experiments are required aimed at analysis of various control samples and reference materials in order to check the reliability of the developed analytical procedure.

References

1. Chee K. K., Wong M. K., Lee H. K., Microwave-assisted solvent elution technique for the extraction of organic pollutants in water, *Analitca Chimica Acta* 1996, 330, 217–227.

2. Eskilsson C. S., Björklund E., Analytical-scale microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A* 2000, 902, 227–250.
3. Fernandez P., Lago M., Lorenzo R. A. [et al.], Microwave-assisted extraction and HPLC-DAD determination of drugs of abuse in human plasma, *Journal of Analytical Toxicology* 2007, 31, 388–393.
4. Fernandez P., Lago M., Lorenzo R. A. [et al.], Microwave-assisted extraction of drugs of abuse from human urine, *Journal of Applied Toxicology* 2007, 27, 373–379.
5. Franke M., Winek C. L., Kingston H. M., Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation, *Forensic Science International* 1996, 81, 51–59.
6. Ganzler K., Salgo A., Valko K., Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography, *Journal of Chromatography A* 1986, 371, 299–306.
7. Hoang T. H., Sharma R., Susanto M. [et al.], Microwave-assisted extraction of active pharmaceutical ingredient from solid dosage forms, *Journal of Chromatography A* 2007, 1156, 149–153.
8. Lerena A. L., Berecz R., Norberto M. J. [et al.], Determination of clozapine and its N-desmethyl metabolite by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B* 2001, 755, 349–354.
9. Letellier M., Budzinski H., Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analysis* 1999, 27, 259–271.
10. Pallaroni L., Holst C., Eskilsson C. S. [et al.], Microwave-assisted extraction of zearalenone from wheat and corn, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002, 37, 161–166.
11. Saim N., Dean J. R., Abdullah P. Md. [et al.], Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressured and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction, *Journal of Chromatography A* 1997, 791, 361–366.
12. Sporning S., Bøwadt S., Svensmark B. [et al.], Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxhlet extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil, *Journal of Chromatography A* 2005, 1090, 1–9.

Corresponding autor

Renata Wietecha-Posłuszny
Pracownia Chemii Sądowej
Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Ingardena 3
PL 30-060 Kraków
e-mail:wietecha@chemia.uj.edu.pl

ZASTOSOWANIE EKSTRAKCJI WSPOMAGANEJ PROMIENIOWANIEM MIKROFALOWYM DO WYOSABNIANIA LEKÓW PSYCHOTROPOWYCH Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

1. Wstęp

Współczesne metody analityczne pozwalają wyznaczyć bardzo małe stężenia oznaczanych związków, jednak proces analizy obarczony jest na ogół kosztownym i długotrwałym procesem przygotowania próbki. Do izolacji związków organicznych stosowana jest szeroka gama technik ekstrakcyjnych, wciąż dynamicznie rozwijanych od czasu pierwszego zastosowania ekstrakcji Soxhleta w 1879 roku. Metodę tę charakteryzuje duże zużycie rozpuszczalnika ekstrakcyjnego oraz długi czas trwania procesu. Powyższe czynniki spowodowały więc rozkwit badań nad poszukiwaniem innych technik pozwalających na izolację analitów z matrycy próbki [9].

Ekstrakcja ciecz-ciecz wspomagana mikrofalami (MAE) jest stosunkowo nową techniką wykorzystywaną w badaniach toksykologicznych. Jednocześnie tego typu przygotowanie próbki, zdaniem wielu autorów, zapewnia skuteczne wyosabnianie różnych substancji chemicznych, w tym leków i narkotyków, ze skomplikowanych matryc biologicznych.

Pierwszą pracą opisującą zastosowanie promieniowania mikrofalowego do ekstrakcji analitów z próbek organicznych była publikacja Ganzlera i in. z 1986 roku. Przedstawili oni ekstrakcję surowych tłuszczów i dodatków z pożywienia oraz pestycydów z gleb przy pomocy ekstrakcji wspomaganej mikrofalami. Przeprowadzone przez nich doświadczenia ukazały odmienną kinetykę procesu ogrzewania próbki w porównaniu do konwencjonalnego sposobu, a wyniki ekstrakcji odznaczały się większą wydajnością niż przy zastosowaniu ekstrakcji technikami Soxhleta czy ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym (SFE) [6]. Od tego momentu liczne grupy badaczy rozpoczęły doświadczenia mające na celu zbadanie możliwości MAE jako nowej techniki ekstrakcyjnej.

Ekstrakcja ciecz-ciecz wspomagana promieniowaniem mikrofalowym znalazła głównie zastosowanie w wyosabnianiu analitów z gleb, osadów dennych, popiołów i roślin [1, 2, 7, 10, 11, 12]. W literaturze przedmiotu odnotowano zaledwie kilka publikacji poświęconych izolacji substancji aktywnych z preparatów farmaceutycznych, a także narkotyków i leków (wraz z ich metabolitami) z krwi, osocza i surowicy.

Franke i in. [5] opracowali metodę izolacji sześciu ksenobiotyków z surowicy i krwi, wykorzystując tzw. mikrofalowy system skupiający oraz naczynia otwarte. Autorzy dokonali również porównania opracowanej me-

tody z klasyczną ekstrakcją ciecz-ciecz (LLE) oraz ekstrakcją LLE w podwyższonej temperaturze (80°C). Analizy obejmujące próbki surowicy dotowanej badanymi substancjami nie wykazały znaczącej przewagi ekstrakcji MAE nad techniką LLE, a w przypadku lidokainy, diazepamu i metadonu, otrzymane wydajności były niższe niż w przypadku ekstrakcji LLE. Odzysk badanych związków uzyskany przy ekstrakcji w podwyższonej temperaturze był zaledwie na poziomie kilku procent, co sugeruje, iż w technice MAE mechanizm przechodzenia analitów z próbki do rozpuszczalnika ekstrakcyjnego nie jest spowodowany jedynie podniesieniem temperatury. Opracowaną metodę autorzy zastosowali również do ekstrakcji lidokainy, metadonu, propoksyfenu, norpropoksyfenu, diazepamu i nordiazepamu z próbek pobranych w czasie sekcji zwłok, w których wcześniej wykryto te substancje. Wykonane analizy wykazały, że uzyskane wyniki oznaczeń były na ogół wyższe niż w przypadku stosowania klasycznej ekstrakcji ciecz-ciecz. Autorzy postawili hipotezę, iż przyczyn takiego stanu rzeczy można upatrywać w zrywaniu wiązań tych substancji z białkami osocza dzięki działaniu promieniowania mikrofalowego. Hipoteza ta jednak nie została dotychczas potwierdzona.

Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym została również zastosowana do wyosabniania narkotyków i ich metabolitów z moczu i osocza. Fernandez i in. [3, 4] przeprowadzili optymalizację ekstrakcji wspomaganej mikrofalami morfiny, kodeiny, 6-acetylmorfiny, kokainy, benzoilokogoniny, kokaetylenu, EDDP oraz metadonu ze wspomnianych materiałów. W przypadku ekstrakcji analitów z moczu, autorzy przeprowadzili optymalizację procesu, biorąc pod uwagę rodzaj rozpuszczalnika oraz pH próbki i czas ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe. Temperaturę procesu utrzymywano na stałym poziomie 100°C. Otrzymane przez autorów rezultaty potwierdziły użyteczność opracowanej metody do izolacji badanych narkotyków i ich metabolitów.

Kolejne zastosowania metody MAE do ekstrakcji składników aktywnych z różnych form stałych leków przedstawili Hoang i in. [7]. Zespół ten, wykorzystując ekstrakcję modelowego związku o nazwie Compound A (Merck & Co, Stany Zjednoczone) z tabletek, zoptymalizował procedurę MAE, uwzględniając takie czynniki, jak rozpuszczalnik ekstrakcyjny oraz czas i temperatura ekstrakcji. Uzyskane warunki optymalne zostały zastosowane do izolacji montelukastu sodowego (lek stosowany

w terapii astmy oskrzelowej) z różnych form preparatu Singulair®. Okazało się, że wyniki odzysku były porównywalne z wynikami uzyskiwanymi za pomocą tradycyjnych metod ekstrakcyjnych. Autorzy podkreślili jednak, iż MAE wymaga bardzo krótkiego czasu ekstrakcji, zwłaszcza w porównaniu z technikami tradycyjnymi (ponad czterokrotne skrócenie procesu) oraz umożliwia jednoczesne przygotowanie dużej liczby próbek.

Celem przedstawionych w niniejszej pracy badań była próba zastosowania techniki ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym do izolowania modelowych leków psychotropowych: nordoksepinu, nortryptyliny, imipraminy, amitryptyliny, doksepinu oraz dezypraminy z krwi. W ramach wykonanych prac badawczych oceniono również dokładność zoptymalizowanej metody ekstrakcyjnej poprzez wyznaczenie parametrów walidacyjnych oznaczania badanych leków wyizolowanych z matrycy biologicznej za pomocą techniki HPLC.

2. Materiały i metody

W badaniach wykorzystano następujące wzorce: nordoksepina (Nord), nortryptylina (Nort) (Sigma, Stany Zjednoczone), dezypramina (Des), imipramina (Imi), amitryptylina (Ami), doksepina (Dox), klomipramina (IS) (Aldrich, Niemcy). W trakcie badań wykorzystywano wzorce robocze sporządzone przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości każdej substancji w metanolu tak, by jej stężenie wynosiło 1 mg/ml. Wzorce te dalej rozcieńczano w zależności od potrzeby wodą dejonizowaną lub metanolem. W trakcie badań wykorzystano również odczynniki: acetonitryl, metanol (Merck, Niemcy), dimetyloamina (Aldrich, Niemcy), stężony kwas fosforowy (V), n-heksan, alkohol izoamyłowy, wodorotlenek sodu 30%, kwas solny 32%, cykloheksan cz.d.a., octan etylu cz., aceton cz.d.a., toluen cz.d.a. (POCh, Polska). W badaniach wykorzystywano wodę dejonizowaną o przewodnictwie < 1 S/cm.

Do przygotowywania próbek krwi oraz oznaczania badanych leków w materiale biologicznym stosowano następującą aparaturę:

- piec do ekstrakcji wspomaganą mikrofalami (model MarsX firmy CEM, Stany Zjednoczone), wyposażony w 14-pozycyjny rotor na naczynia ekstrakcyjne GreenChem®, w tym jedno naczynie kontrolne do kontroli temperatury procesu; wytrząsarkę Kavalier (firmy Sklarny, Czechosłowacja), którą stosowano do ekstrakcji ciecz-ciecz; łąźnię ultradźwiękową (firmy Polsonic, Polska), którą wykorzystywano do zapewnienia homogeniczności próbek materiału biologicznego;
- chromatograf cieczowy model LaChrom D-7000 (firmy Merck-Hitachi, Niemcy), wyposażony w auto-

matyczny podajnik próbek oraz detektor spektrofotometryczny z matrycą diod; rozdział analitów prowadzono na kolumnie chromatograficznej Spheri-5 C18, 100 mm × 4,6 mm (firmy Perkin-Elmer, Stany Zjednoczone). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina buforu fosforanowego (pH 2,35) z dodatkiem dimetyloaminy (0,1%) i acetonitrylu w stosunku objętościowym 1:1. Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min, a detekcję prowadzono przy długości fali analitycznej = 254 nm.

W badaniach zastosowano dwie procedury ekstrakcji LLE i MAE obejmujące ekstrakcję wspomnianych leków z roztworów wodnych, a następnie z krwi. Procedura ekstrakcyjna LLE polegała na pobraniu po 1 ml wodnego roztworu sześciu leków (stężenie każdego z leków wynosiło 0,2 g/ml) do 4 fiolek o pojemności 22 ml oraz sporządzeniu „ślepej próby” z 1 ml wody; do każdej fiołki dodawano 3 ml 0,6 M NaOH i mieszano, a następnie 5 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego. Fiołki szczelnie zamykano kapslami aluminiowymi z korkiem z PTFE i łagodnie wytrząsano przez 10 min na wytrząsarce, po czym, celem rozdzielenia faz, odwirowywano przez 10 min (3500 rpm). Pobierano po 4 ml fazy organicznej. Rozpuszczalnik odparowywano w strumieniu azotu w temperaturze 45°C. Następnie suchą pozostałość rozpuszczono w 250 µl rozpuszczalnika ekstrakcyjnego i przez 2 min reekstrahowano do 50 µl 0,05% H₃PO₄ z dodanym wzorcem wewnętrznym (4 g/ml). Po odwirowywaniu (10 min, 4500 rpm) do pomiaru pobierano fazę wodną, którą następnie bezpośrednio wprowadzano na kolumnę chromatograficzną za pomocą automatycznego podajnika próbek.

Ekstrakcja MAE była prowadzona według następującej procedury: pobierano po 1 ml wodnego roztworu sześciu leków (stężenie każdego z leków wynosiło 0,2 g/ml) do 4 naczyń ekstrakcyjnych; równocześnie sporządzano „ślepej próbę” z 1 ml wody. Do każdego naczynia dodawano 3 ml 0,6 M NaOH i mieszano, a następnie dodawano 5 ml ekstrahenta. Naczynia szczelnie zamykano i kierowano do pieca mikrofalowego, po czym wybierano odpowiednią procedurę (tabela I). Po zakończeniu procesu ekstrakcji naczynia pozostawiano w piecu do ochłodzenia (do ok. 27°C), a następnie zawartość naczyń ekstrakcyjnych przenoszono do fiolek, przemycając naczynia 1 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego. Po odwirowywaniu przez 10 min (3500 rpm) pobierano po 5 ml fazy organicznej, a następnie postępowano tak samo, jak w przypadku ekstrakcji LLE.

3. Wyniki

3.1 Badania optymalizacyjne

Wstępne badania optymalizacyjne prowadzono przy użyciu wodnych roztworów sześciu leków z grupy TLPD. W tym celu pobierano po 5 l roztworu metanolowego każdego leku o stężeniu 1 mg/ml do kolby o pojemności 25 ml i dopełniano do kreski wodą dejonizowaną. Stężenie każdego leku w tym roztworze wynosiło 0,2 g/ml. Tak sporządzane roztwory poddawano ekstrakcji LLE i równocześnie MAE dla czterech różnych (pod kątem chemicznym) mieszanin ekstrakcyjnych (tabela II). Głównym kryterium wyboru mieszanin ekstrakcyjnych była ich zdolność do absorbowania promieniowania mikrofalowego, czyli zastosowano mieszaniny zawierające składniki polarne, jak aceton i octan etylu w dużych ilościach.

Pięciopunktową krzywą kalibracyjną sporządzano przy użyciu wzorców leków o stężeniach 5; 2,5; 1,25; 0,625 i 0,3125 g/ml. Wzorce otrzymywano poprzez odpowiednie rozcieńczenie wodnego roztworu leków o stężeniu 20 g/ml. Wyniki przedstawiające wydajności ekstrakcji [%] badanych leków z grupy TLPD otrzymane metodami LLE i MAE zebrano w tabeli II. Przykładowy chromatogram przedstawiający rozdział badanych sześciu TLPD i IS, porównujący ekstrakcję z wykorzystaniem procedur LLE i MAE 60 oraz mieszaniny octan etylu – cykloheksan jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, przedstawiono na rycinie 1.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż zastosowanie promieniowania mikrofalowego do ekstrakcji badanych leków z grupy TLPD zdecydowanie korzystnie wpływa na wzrost wydajności ekstrakcji w porównaniu do klasycznej ekstrakcji ciec-z-ciecz (rycina 1). Na podstawie uzyskanych wydajności ekstrakcji dokonano również wyboru najlepszych warunków ekstrakcyjnych do izolacji badanych substancji z ich wodnych roztworów. Optymalne warunki ekstrakcji wspomagananej mikrofalami to ekstrakcja w temperaturze 60°C przez 3 min mieszaniną n-heksan – alkohol izoamyłowy (99:1, v/v).

4. Badania walidacyjne

Zoptymalizowaną metodę ekstrakcyjną zastosowano do ekstrakcji badanych leków z grupy TLPD z próbek krwi ludzkiej. W celu sporządzenia czteropunktowej krzywej kalibracyjnej przygotowano bezpośrednio w teflonowych naczyniach ekstrakcyjnych próbki krwi dotowanej wodnymi roztworami badanych leków. Otrzymano stężenia: 2,00; 1,00; 0,50 i 0,125 g/ml każdego leku we krwi. Stężenie IS w próbkach było stałe (2,00 g/ml). W dalszej kolejności naczynia teflonowe umieszczano w łaźni ultradźwiękowej na 20 min celem

zapewnienia homogeniczności próbki, a następnie podawano zoptymalizowanej procedurze ekstrakcji mikrofalowej.

Przeprowadzono walidację metody oznaczania sześciu leków z grupy TLPD we krwi. Precyzję i dokładność metody zbadano na dwóch poziomach stężeń: 0,2 g/ml ($n = 5$, w jednej serii) oraz 0,8 g/ml ($n = 4$, w jednej serii). Przykładowe chromatogramy przedstawiające uzyskane wyniki ekstrakcji badanych leków z krwi zestawiono na rycinie 2. Granicę wykrywalności (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ) badanych analitów wyznaczono ze wzorów:

$$LOD = \frac{3SD_{0,2}}{a}, \quad \{1\}$$

$$LOQ = \frac{10SD_{0,2}}{a}, \quad \{2\}$$

gdzie: $SD_{0,2}$ – odchylenie standardowe sygnału analitycznego przy analizie 5 próbek dotowanych badanymi substancjami w stężeniu 0,2 g/ml; a – nachylenie krzywej kalibracyjnej.

Powtarzalność względnego czasu retencji zbadano w dwóch seriach ($n_1 = 5$ i $n_2 = 4$) w różnych dniach. Analiza statystyczna testem t-Studenta nie wykazała istotnych różnic wartości względnych czasów retencji wyznaczonych dla każdej serii dla wszystkich badanych TLPD. Powtarzalność sygnału analitycznego (stosunek wysokości pików pochodzącego od analitu do pików pochodzącego od standardu wewnętrznego, H/H_{IS}) zbadano przez wyznaczenie względnego odchylenia standardowego dla 5 (0,2 g/ml) i 4 (0,8 g/ml) próbek analizowanych wybraną metodą. Ze względu na brak odpowiedniego materiału referencyjnego, dokładność opracowanej metody zbadano poprzez analizę wspomnianych próbek krwi z dodatkiem analitu, również na dwóch poziomach stężeń. Dokładność wyznaczono w oparciu o wzór 3.

$$RE = \left| \frac{\mu - c}{\mu} \right| 100\%, \quad \{3\}$$

gdzie: c – wyznaczona wartość stężenia; μ – teoretyczna wartość rzeczywista. Wyznaczone parametry walidacyjne metody zestawiono w tabeli III.

Podsumowując wyniki walidacji, stwierdzono, że granica oznaczalności badanych leków we krwi mieści się w zakresie od 0,09 g/ml (dla doksepiny) do 0,3 g/ml (dla nordoksepiny). Powtarzalność sygnału analitycznego jest wyższa dla poziomu 0,8 g/ml i oscyluje od 2,43% (dla doksepiny) do 10,18% (dla dezypraminy). Procent odzysku na wyższym poziomie stężeń badanych leków był większy w porównaniu z poziomem 0,2 g/ml. Wynika to z faktu, iż krew jest bardzo skomplikowanym materiałem biologicznym i przy niskich stężeniach ba-

danych leków we krwi interferencje pochodzące od matrycy w większym stopniu rzutują na otrzymane wyniki.

5. Podsumowanie i wnioski

W przeprowadzonych badaniach pilotażowych zoptymalizowano procedurę ekstrakcji wspomaganą mikrofalami do wyosabniania leków psychotropowych, tj. nordoksetyny, nortryptyliny, amitryptyliny, imipraminy, dokoksetyny oraz dezypraminy dla roztworów wodnych wspomnianych wyżej leków. W kolejnym etapie badań testy wykonano również przy użyciu próbek krwi ludzkiej dotowanej TLPD oraz przeprowadzono walidację metody oznaczania tych leków w tego typu matrycy.

Wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu nowej procedury ekstrakcyjnej obejmującej ekstrakcję mikrofalową w temperaturze 60°C mieszaniną n-heksan – alkohol izoamylowy (99:1, v/v) świadczą, iż ekstrakcja wspomaganą mikrofalami jest techniką konkurencyjną w stosunku do ekstrakcji ciecz-ciecz (wydajność MAE rzędu 80–100%, LLE rzędu 60–70%). Dodatkowym atutem tej metody jest fakt, że wszystkie leki ekstrahują się w równym stopniu (powyżej 70%), czego dowodem są wyniki otrzymane dla poszczególnych leków. Metoda ta także dzięki charakterystycznemu i specyficznemu procesowi ogrzewania mieszaniny ekstrakcyjnej umożliwia znaczne skrócenie czasu ekstrakcji (który wynosi 3 minuty).

Wykonane badania udowodniły, że użycie promieniowania mikrofalowego do ekstrakcji trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych z krwi jest skuteczne i w przyszłości może znaleźć zastosowanie w rutynowych analizach toksykologiczno-sądowych. Na tym etapie badań wymagane są jednak dodatkowe doświadczenia mające na celu analizę różnorodnych próbek kontrolnych oraz materiałów odniesienia w celu sprawdzenia wiarygodności opracowanego postępowania analitycznego.