



STABILITY OF TICLOPIDINE IN HUMAN BIOLOGICAL SAMPLES

Ewa PUFAL¹, Przemysław PIOTROWSKI¹, Gertrud ROCHHOLZ², Cornelia FRANZELIUS²,
Karol ŚLIWKA¹

¹ *Chair and Department of Legal Medicine, Collegium Medicum of the Nicolaus Copernicus University in Toruń,
Bydgoszcz, Poland*

² *Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Germany*

Abstract

The influence of light, temperature and time of storage on the concentration of the anticoagulant agent ticlopidine in biological material was investigated. For this purpose, spiked blood samples as well as hair and nail samples from patients treated with ticlopidine were stored in glass containers at +25°C and +4°C. Half of them were stored in the absence of light by covering the containers with aluminium foil. The samples were analysed before storage, after 14 days and again after 60 days. For isolation of ticlopidine from biological material, a liquid-liquid extraction procedure with n-hexane was used, achieving an extraction recovery of more than 80%. Ticlopidine determination was carried out by LC-ESI-MS. A statistically significant difference in ticlopidine concentration was observed in blood samples stored for 60 days with access of light at +25°C. No significant differences in ticlopidine concentrations were found in other analysed samples.

Key words

Drug stability, Biological samples, LC-MS

Received 23 April 2008; accepted 30 May 2008

1. Introduction

Storage experiments in forensic toxicology are generally performed to evaluate optimised storage conditions for biological samples. Empirical knowledge on the stability of drugs under different conditions is also helpful if samples which have been subjected to extreme conditions such as elevated temperature or a long time of storage have to be analysed. Therefore it is important to have stability data on all drugs currently on the market. Since the stability of a given drug also depends on the matrix it is stored in, various biological materials should be analysed. Usually blood samples are used for the assessment of acute drug poisonings, while hair and nails are analysed if long-term use or abuse of drugs has to be evaluated.

Ticlopidine is a platelet-inhibiting drug which is mainly used to prevent ischemic strokes as well as coronary and brain vessel thromboses in cases of hypersensitivity to other antithrombotic agents (especially acetylsalicylic acid).

The aim of the study was to evaluate the stability of ticlopidine in blood, hair, and nails under different storage conditions. The influence of light, temperature and time of storage was investigated.

2. Material and methods

For the preparation of blood samples, ticlopidine-free postmortem blood was spiked with ticlopidine to give a final concentration of 20 ng/ml. For each sample, a 2 ml portion was used.

It is not possible to incorporate substances into hair or nail matrix by adding them externally. Therefore, instead of spiking samples, hair and nails from patients who had received ticlopidine in therapeutic doses for at least 6 months were used. These samples were mixed together, washed with distilled water and methanol, finely cut, homogenised and divided into 100 mg portions.

Some of the prepared blood, hair and nail samples were analysed on the day of preparation (day 0, $n = 7$). These samples were also used to determine the recovery. A further 42 samples of the different materials were stored in closed glass-tubes under the following conditions: 4°C or 25°C in the dark (tubes covered with aluminum foil) or 25°C with access of daylight. The stored samples were analysed after 14 and 60 days of storage ($n = 7$ for each storage condition).

Ticlopidine extraction was performed using a method described by Pufal et al. [3]. Borate-buffer pH = 9.4 (2 ml) was added to 2 ml of blood and extracted for 3 hours with 7 ml of n-hexane in an ultrasonic bath. 100 mg portions of hair and nail samples were extracted analogously. The extracts were evaporated to dryness, reconstituted in 100 μ l of methanol and analysed via LC-MS with electrospray ionization (API-ESI-MS) in the following conditions, previously described by Pufal et al. [3]. The isocratic separation of ticlopidine was performed on a Zorbax Eclipse XDB C-18 column. Acetonitrile and 0.1% TFA (80/20) were used as a mobile phase with flow rate 0.3 ml/min. The following parameters of the mass spectrometer were used: drying gas temperature – 250°C, N₂ flow – 10 l/min, nebulizer pressure – 60 psi, capillary voltage 4 kV. The analyses were performed in SIM mode ($m/z = 264$ [MH]⁺). An external standard was used for quantitation of ticlopidine.

The results were statistically analysed using the two-sided (two-tailed) t-Student test for independent samples. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

Results are presented in Figures 1 to 3. A statistically significant though slight decrease in concentration of ticlopidine was observed only in the case of blood samples that had been stored for 60 days at 25°C with access of light. In all of the other samples, no statistically significant change in ticlopidine concentration was observed, although the mean values generally showed a slight decline from day 0 to day 60.

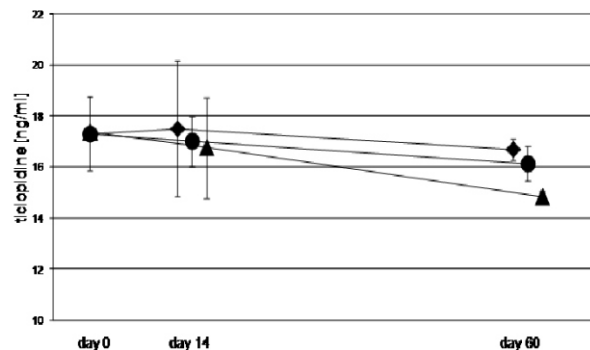


Fig. 1. Stability of ticlopidine in blood samples (▲ – exposed to light, at 25°C, ● – protected against light, at 25°C, ◆ – protected against light, at 4°C).

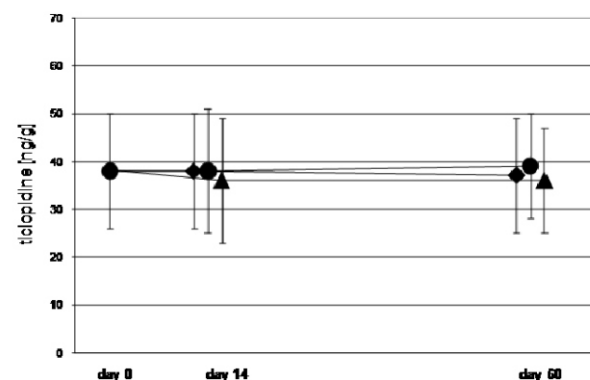


Fig. 2. Stability of ticlopidine in hair samples (▲ – exposed to light, at 25°C, ● – protected against light, at 25°C, ◆ – protected against light, at 4°C).

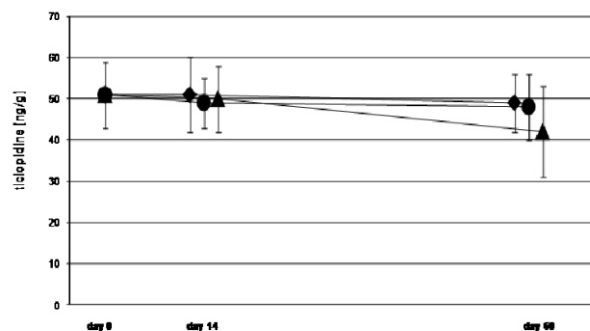


Fig. 3. Stability of ticlopidine in nails samples (▲ – exposed to light, at 25°C, ● – protected against light, at 25°C, ◆ – protected against light, at 4°C).

4. Discussion

Up to now only a few studies on the stability of ticlopidine under different storage conditions have been published. Methanolic solutions of ticlopidine were shown to be stable for a period of 3 months at

a temperature of -20°C [2]. Also, no loss of ticlopidine could be observed in human plasma samples stored at the same temperature for a period of 4–6 weeks [4]. Dal Bo et al. showed that the concentration of ticlopidine in human plasma did not change significantly either over 24 hours at room temperature or after three cycles of freezing and defrosting of samples [1]. There is, however, a lack of studies dealing with the stability of ticlopidine in different biological samples. In particular, hair and clipped or excised nails (the latter in postmortem cases) have proven to be valuable materials in clinical and forensic toxicology for the estimation of long-term use or abuse of drugs.

In this study, the stability of ticlopidine in blood, hair, and nails was investigated after the samples had been stored for 14 or 60 days, at 4°C or 25°C in the dark or 25°C with access of light. The mean concentrations of ticlopidine generally showed a slight decline from day 0 to day 60. This effect was most pronounced in those samples which had been stored at 25°C with access of light. However – with the exception of blood samples that had been stored for 60 days at 25°C with access of light – this decrease was not statistically significant.

5. Conclusions

The data from this study show that ticlopidine is a very stable substance. Even if blood samples are not stored under optimum conditions (e.g. deep frozen or refrigerated) useful results can be obtained for at least 60 days. Furthermore, the results suggest that hair and nails can be stored at room temperature, but preferably should be protected against light to minimise loss of ticlopidine.

References

1. Dal Bo L., Verga F., Marzo A., Ambrosoli L., Poli A., Determination of ticlopidine in human plasma by high-performance liquid chromatography and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B* 1995, 665, 404–419.
2. Lagané A., Bellagamba G., D'Ascenzo G. [et al.], Evaluation of ticlopidine in human serum and plaque by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 1997, 354, 87–95.
3. Pufal E., Piotrowski P., Śliwka K., Bestimmung von Ticlopidin in Kopfhaaren, Fingernägel und Zehennägel. XIV. Mosbacher Symposium der GTFCh, Mosbach, 14–16.04.2005.
4. Rona K., Ary K., Gachalyi B., Klebovich I. [et al.], Liquid chromatographic method for the determination of ticlopidine in human plasma, *Journal of Chromatography B* 1997, 693, 393–398.

Corresponding author

Ewa Pufal
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej CM UMK
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
PL 85-094 Bydgoszcz
tel. 052 585 3552, fax 052 585 3553
e-mail: majpufal@go2.pl

STABILNOŚĆ TIKLOPIDYNY W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM

1. Wprowadzenie

Jednym z rodzajów eksperymentów wykonywanych dla celów toksykologii sądowej jest ocena optymalnych warunków przechowywania próbek biologicznych. Oparta na eksperymentach wiedza na temat stabilności leków w różnych warunkach jest również pomocna, jeśli próbki, które mają być analizowane, były poddane ekstremalnym warunkom, takim jak podwyższona temperatura lub długi czas przechowywania. Dlatego istotne jest posiadanie danych na temat stabilności wszystkich leków znajdujących się aktualnie w obiegu. Ponadto analizowane powinny być różne rodzaje próbek biologicznych, ponieważ stabilność konkretnego leku zależy również od matrycy, w której się on znajduje. Do oceny ostrego zatrucia stosuje się zwykle analizę krwi, natomiast włosy i paznokcie są analizowane, gdy ocenia się długotrwałe stosowanie lub nadużywanie leków.

Tiklopidyna jest lekiem hamującym agregację płytek, który jest używany głównie w celu przeciwdziałania udarom niedokrwiennym, jak również zakrzepicom tętnicy wieńcowej i naczyń mózgowych w przypadkach nadwrażliwości na inne substancje przeciwkrzepliwe (szczególnie kwas acetylosalicylowy).

Celem badań była ocena stabilności tiklopidyny w krwi, włosach i paznokciach podczas przechowywania w różnych warunkach. Badano wpływ światła, temperatury i czasu przechowywania.

2. Materiał i metody

Do przygotowania próbek krwi wykorzystano krew sekcyjną nie zawierającą tiklopidyny, do której dodano tiklopidynę w ilości koniecznej do uzyskania stężenia 20 ng/ml. Do każdej próbki wykorzystano 2 ml krwi.

W przypadku próbek włosów i paznokci nie ma możliwości „wbudowania” substancji w ich strukturę, dlatego, zamiast dodawania tiklopidyny do próbek, wykorzystano włosy i paznokcie pacjentów przyjmujących ten lek w dawkach terapeutycznych przez co najmniej 6 miesięcy. Próbki te zmieszano ze sobą, umyto wodą destylowaną i metanolem, drobno pocięto, ujednorodniono i podzielono na porcje po 100 mg.

Część z przygotowanych próbek krwi, włosów i paznokci poddano analizie w dniu przygotowania (dzień 0, $n = 7$). Próbki te zostały również wykorzystane do określenia odzysku. Kolejne 42 próbki różnych materiałów były przechowywane w zamkniętych szklanych pojemnikach w następujących warunkach: 4°C lub 25°C

w ciemności (pojemniki pokryte folią aluminiową) lub 25°C z dostępem światła dziennego. Przechowywane próbki były analizowane odpowiednio po 14 i 60 dniach ($n = 7$ dla każdego warunków przechowywania).

Ekstrakcja tiklopidyny była wykonywana zgodnie z metodą opisaną przez Pufal i in. [3]. Bufor boranowy o pH = 9,4 (2 ml) dodawano do 2 ml krwi i prowadzono ekstrakcję 7 ml n-heksanu przez 3 godziny w łaźni ultradźwiękowej. Analogicznie ekstrahowano 100 mg porcje włosów i paznokci. Ekstrakty odparowywano do sucha, rozpuszczano w 100 ml metanolu i analizowano za pomocą metody LC-MS z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (API-ESI-MS) w warunkach opisanych poprzednio przez Pufal i in. [3]. Rozdział izokratyczny tiklopidyny wykonano na kolumnie Zorbax Eclipse XDB C-18. Jako fazę ruchomą zastosowano acetonitryl i 0,1% TFA (80/20). Szybkość przepływu wynosiła 0,3 ml/min. Zastosowano następujące parametry spektrometru masowego: temperatura gazu osuszającego – 250°C, przepływ N₂ – 10 l/min, ciśnienie nebulizera – 60 psi, napięcie kapilary – 4 kV. Analizy były prowadzone w trybie SIM ($m/z = 264$ [MH]⁺). W analizie ilościowej tiklopidyny zastosowano standard zewnętrzny.

Wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą dwustronnego testu t-Studenta dla próbek niezależnych. Różnice uznawano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

3. Wyniki

Wyniki przedstawiono na rycinach 1 do 3. Statystycznie istotny spadek stężenia tiklopidyny stwierdzono jedynie w przypadku próbek krwi, które były przechowywane przez 60 dni w 25°C z dostępem światła. We wszystkich pozostałych próbkach nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian stężenia tiklopidyny, mimo że średnie wartości ogólnie wykazywały słaby spadek od dnia 0 do dnia 60.

4. Dyskusja

Dotychczas opublikowano niewiele prac dotyczących stabilności tiklopidyny w różnych warunkach przechowywania. Wykazano stabilność roztworów metanolo- wych tiklopidyny przez okres 3 miesięcy w temperaturze –20°C [2]. Nie stwierdzono również strat tiklopidyny w próbkach ludzkiego osocza przechowywanego w tej samej temperaturze przez okres 4–6 tygodni [4]. Dal Bo i in. wykazali, że stężenie tiklopidyny w ludzkim osoczu

nie zmienia się istotnie zarówno przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, jak i po trzech cyklach zamrażania i odmrażania próbek [1]. Brak jest jednak badań na temat stabilności tiklopidyny w różnych materiałach biologicznych. Zwłaszcza włosy i paznokcie stanowią wartościowy materiał w toksykologii klinicznej i sądowej do oceny długotrwałego przyjmowania lub nadużywania leków.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań stabilności tiklopidyny we krwi, włosach i paznokciach po przechowywaniu próbek przez okres 14 lub 60 dni, w 4°C lub 25°C w ciemności lub 25°C z dostępem światła. Średnie stężenia tiklopidyny zasadniczo wykazywały słaby spadek od dnia 0 do dnia 60. Efekt ten był najbardziej wyraźny dla próbek przechowywanych w temperaturze 25°C z dostępem światła. Jednak, z wyjątkiem prób krwi, które były przechowywane przez 60 dni w temperaturze 25°C z dostępem światła, spadek ten nie był statystycznie istotny.

5. Wnioski

Wyniki niniejszych badań wskazują, że tiklopidyna jest bardzo stabilną substancją. Nawet jeśli próbki krwi nie są przechowywane w optymalnych warunkach (np. głębokie zamrożenie, względnie przechowywanie w lodówce), można uzyskać użyteczne wyniki przez co najmniej 60 dni. Ponadto wyniki zdają się wskazywać, że włosy i paznokcie mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej, jednak wówczas wskazana jest ich ochrona przed światłem w celu minimalizacji strat tiklopidyny.