



PRELIMINARY DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR THE ANALYSIS OF ORAL CAVITY FLUID FOR SELECTED PSYCHOTROPIC DRUGS

Agnieszka MOOS¹, Renata WIETECZA-POSŁUSZNY¹, Michał WOŹNIAKIEWICZ¹, Viktoria BRODE^{1,2},
Paweł KOŚCIELNIAK^{1,3}

¹ Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Kraków, Poland

² Faculty of Chemistry and Mineralogy, University of Leipzig, Leipzig, Germany

³ Institute of Forensic Science, Kraków, Poland

Abstract

The work is concerned with the development of methods for the analysis of alternative biological material – fluid from the oral cavity, for tricyclic psychotropic drugs (TCAs): imipramine, doxepin, nortriptyline, desipramine, nordoxepin and clomipramine. The oral cavity fluid samples were prepared for analysis using only the single step of centrifugation at a reduced temperature (5 min, 16,000 rpm, 4°C). Measurements were performed using a capillary electrophoresis system with spectrophotometric detection in the ultraviolet light range (UV-CE). The chemical and instrumental conditions of the method were optimized and its validation parameters were determined. It was shown that using the developed procedure it is possible to detect the studied drugs at concentrations of several tens of ng/ml, determine them with an average precision of about 10% (*RSD*) and with a satisfactory recovery level (except for clomipramine). The obtained results were compared with those obtained by liquid chromatography coupled with spectrophotometric detection (HPLC-UV), with the use of microextraction by packed sorbent (MEPS). To the authors' best knowledge, this study is the first described example of an effective direct analysis of oral cavity fluid samples by CE without a prior stage of TCA drugs extraction from the biological matrix.

Key words

Fluid from oral cavity; TCAs; Capillary electrophoresis; HPLC-UV; Microextraction MEPS.

Received 20 August 2013; accepted 15 November 2013

1. Introduction

Psychotropic drugs are a group of compounds that have a significant impact on the human body. They exhibit a calming or stimulating effect, and can affect mood, behaviour and way of thinking [17]. These drugs are used in a number of psychiatric disorders, such as schizophrenia or depression. In the latter disease, one of the applied groups of drugs is tricyclic antidepressants (TCAs). This group has more than 20 compounds of heterogeneous structure, the core of which is based on a seven-membered ring connected

to two benzene rings and an alkyl chain [12]. TCA drugs are absorbed from the gastrointestinal tract and metabolized in the liver.

The aforementioned group of drugs includes, amongst others: amitriptyline (Ami), imipramine (Imi), doxepin (Dox) with its metabolite – nordoxepin (Nord), nortriptyline (Nort), desipramine (Des) and clomipramine (Clo). These drugs, used in the treatment of depression, can cause many side effects such as insomnia, anxiety, impaired concentration, changes in blood pressure, nausea, dizziness or skin reactions. There may also be complications, manifesting as fear,

seizures, myocardial ischemia, tachycardia and many others [13].

Chromatographic techniques are most commonly used for the determination of drugs of the TCA group [11]. The Bakke group developed a method of liquid chromatography with spectrophotometric detection (HPLC-UV) for determination of substances including Dox and Imi in human plasma [2], using the technique of solid phase extraction (SPE), and achieving a low limit of detection (*LOD*) at 1–2 ng/ml. For the same biological material, Shinozuka et al. developed a method of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) for the determination of 20 antidepressants, obtaining a chromatographic separation of analytes in 30 min [15]. The Ito group undertook to develop a procedure for analysis of urine samples for TCA drugs by gas chromatography coupled with MS detection (GC-MS), using the dispersive liquid-liquid microextraction technique (DLLME) for sample preparation [8].

Examples of determination of TCA drugs using electrophoretic techniques are becoming more and more common. In 2004, the Delmar Cantu group developed a procedure for determining Imi, Ami and their metabolites using a non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) method in samples of human plasma, with application of liquid-liquid extraction (LLE) [5]. Galeano-Diaz applied capillary electrophoresis (CE) to the determination of Ami, Imi, Dox, and Clo and their metabolites in human serum samples using the technique of sample concentrating by stacking in a capillary [7]. Elhamili and his group introduced an innovative combination of electrophoresis and mass spectrometry (CE-ESI-TOF-MS) for application to the analysis of plasma samples for Imi, Clo, Des and norclomipramine (Norclo) after extraction by SPE [6].

Few works concern the use of electrophoretic techniques for the determination of psychotropic drugs in alternative materials. An example is research by Acedo-Valenzuela concerning determination of Imi, Ami, Clo, Dox and their metabolites in human milk [1]. Prior to analysis, samples were subjected to the LLE extraction technique, and at the separation stage, concentration by the stacking technique was applied. The McClean group presented an analysis of hair for the content of another group of psychotropic drugs – benzodiazepines (BZD), and compared the results with those obtained by LC-MS [9]. On the basis of that study, it was concluded that the CE method allows much better separation of the studied drugs, but the LC-MS assay allows for determination at lower drug concentration levels.

The present work focused on the analysis of fluid samples from the oral cavity, selecting the following TCA antidepressants as model compounds for the development of the proposed research methodology: Imi, Dox with its metabolite Nord, Nort, Des and Clo. From the point of view of clinical and forensic analyses, oral cavity fluid – an alternative biological material – has a number of advantages compared to traditional materials (blood and urine). First of all, sample acquisition is easier, does not violate the donor's intimacy, can be carried out by staff with no medical training, and is non-invasive and therefore less stressful. Additionally, due to the constant secretion of biological fluids, samples may be acquired at any time (if the analytical procedure or treatment of the patient does not require otherwise) [16]. Therefore, the development of new methods for the determination of drugs in this material is an important and current challenge.

This work concerned the development of a method for the determination of the above-mentioned group of TCA drugs and their metabolites in oral cavity fluid by CE-UV. Unlike in other procedures proposed for the determination of psychotropic drugs in biological materials, an attempt at determination without the prior use of extraction techniques for the isolation of analytes from oral cavity fluid was performed. The developed method was compared in terms of validation parameters with the HPLC-UV method using a microextraction technique with packed sorbent (MEPS) [10]. The present research, furthermore, constituted a preliminary study conducted with spectrophotometric detection, which was carried out as a preparatory step that would help towards creating the full CE method (under development), before coupling it with a more sensitive detector – a mass spectrometer. A full CE method is necessary because of the low concentrations of TCA drugs present in the oral cavity fluid. In a paper written under the direction of de Castro [4], analysis of fluid samples collected from the oral cavity of patients treated with Ami was presented. The range in which the drug was detected in the examined samples was 20.2–33.1 ng/ml. A study concerning the presence of psychotropic drugs in oral cavity fluid from drivers, including Dox, was presented by Chudzikiewicz's group [3]. The concentration range in which the drug was detected was 3.7–14.0 ng/ml.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

The material consisted of oral cavity fluid samples, which were collected from three volunteers aged 24–35 years. The samples were collected, without prior stimulation, into separate polypropylene tubes and stored therein at 4°C until the final analysis (no longer than 24 h). The volunteers declared that they had not taken any medication containing the tested substances in the last three months. From 3 to 8 ml of the fluid was collected from each person.

Standards of seven compounds belonging to the TCAs group and their metabolites were used in the study: Ami, Imi, Dox, Nort, Des, Nord and Clo, supplied by Sigma Aldrich, Germany. The other used reagents were: β -cyclodextrin (Sigma Aldrich, Germany), methanol (Merck, Germany), 30% sodium hydroxide (POCH, Poland) and a set of three reagents included in the CEofix Method Development Kit (Analisis, Belgium): two background electrolytes used in electrophoretic separation (the first contained a polyanionic modifier and a 75 mM phosphate buffer at pH 2.5, the second – a polyanionic modifier and a 50 mM phosphate buffer, pH 6.2), and a polycation-containing initiator, responsible for changing the electrical characteristics of the double layer of the inner surface of the capillary. This allowed maintaining of the electroosmotic flow despite performing measurements in acidic background electrolyte. Deionized water (18.2 M Ω ·cm, TOC < 5 ppb) was obtained from a laboratory (Millipore, Germany).

2.2. Equipment and measurement conditions

Measurements were performed using a capillary electrophoresis system (PA 800 Plus, Beckman Coulter, USA), achieving separation of analytes in a quartz capillary with a total length of 60 cm (effective length: 50 cm) and an internal diameter of 75 microns. During the separation, a voltage of 25 kV was applied to the ends of the capillary, maintaining a constant measuring temperature and temperature of the samples segment at 30°C. The sample was introduced into the capillary hydrodynamically, applying a pressure of 0.5 psi for 5 seconds. The background electrolyte was a 75 mM phosphate buffer at pH 2.5 with addition of 10 mM β -cyclodextrin. Before each analysis, the capillary was conditioned by passing a 0.5 M NaOH solution through it at 20 psi according to the sequence: flushing (0.5 min), etching (4 min), washing (0.5 min). The analysis was carried out as follows: flushing with ini-

tiator (0.5 min, 20 psi), flushing with separation buffer (0.5 min, 20 psi), sample introduction (0.5 psi/0.5 s), water introduction (0.1 psi/10 s for pre-concentration of the sample in the capillary tube by stacking), separation (25 kV, 18 min), and final rinsing with 0.5 M NaOH and water (each run: 0.5 min, 20 psi). Electropherograms were recorded at a wavelength of 254 nm.

2.3. Sample preparation

The fluid samples from the oral cavity were spiked with all of the studied drugs (Imi, Dox, Nort, Des, Nort, and Clo) in such a way that the concentration of each analyte was 0.35, 0.75 or 1.25 mg/ml (Ami was used as an internal standard – IS). The samples were then centrifuged at reduced temperature (4°C) at 16,000 rpm for 5 min. Finally, the supernatant was collected and centrifuged again under the same conditions. Samples prepared in such a way were measured by CE.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of analytes separation method

Optimization studies were performed using samples containing analytes at a concentration of 1250 ng/ml.

The influence of two parameters on the separation of analytes was tested: electrolyte pH (phosphate buffer at pH 2.5 and 6.2) and the addition of β -cyclodextrin (four concentrations: 5, 10, 15 and 20 mM) for each pH, as a result requiring the carrying out of eight consecutive experiments. The pH values were chosen to shorten the migration time of the analytes in the chosen environment by positively ionizing them, to enhance the stability of polyions present in the initiator and in the background electrolyte (which also affected the acceleration of the flow of analytes) and to ensure the best solubility of β -cyclodextrin. The addition of β -cyclodextrin to the background electrolyte was aimed at improving the separation of the assayed drugs (the separation mechanism in this case consisted in the formation of permanent inclusion compounds of β -cyclodextrin molecules with the drugs and was based on their degree of complexation [14]).

The effect of electrolyte pH on the electrophoretic separation process of the studied analytes is shown in Figure 1. Much better results were obtained at pH 2.5. Under these conditions, not only was a stable baseline achieved, but also (above all) a very good separation of all studied drugs. This is particularly evident in the

case of Nord, Clo and Dox (peaks number 3, 4 and 5, respectively), whose electrophoretic mobility at pH 6.2 are sufficiently similar for the peaks to clearly overlap in the obtained electropherograms.

Moreover, the effect of β -cyclodextrin concentration on the analyte separation process was found to be significant, as is shown in Figure 2.

Application of β -cyclodextrin at a concentration of 20 mM failed to separate Nord and Clo (peaks 3 + 4 in Figure 2). At a concentration of 15 mM, a partial separation of these substances was observed, while in the case of a 10 mM concentration – separation of all analytes was achieved, thus enabling quantitative analysis. The smaller content of β -cyclodextrin (5 mM) caused a loss of resolution and, therefore, the concentration of 10 mM was considered to be optimal.

Lastly, the effect of temperature on the process of separation of the studied drugs was examined. For this purpose, measurements were performed at temperatures of 20, 25 and 30°C (higher temperatures were not used because they contribute to an increase in the electrical current flowing through the capillary and the formation of gas micro-bubbles, causing interference with the analytical signal). The obtained electrophoretic profiles are shown in Figure 3. There was no significant effect of temperature on the electrophoretic

separation of peaks, but with increasing temperature the drug migration times were shortened. The increase in the molecular mobility of individual analytes should be primarily associated with a decrease in the viscosity of the background electrolyte. For further studies, a temperature of 30°C was chosen.

In conclusion, the optimal conditions for the separation of the studied group of drugs were: background electrolyte comprising a polyanionic modifier and 75 mM phosphate buffer at pH 2.5, 10 mM addition of β -cyclodextrin, and 30°C as the separation temperature.

3.2. Evaluation of the efficiency of the sample preparation for the analysis

Using the developed analytical procedure, determinations of TCA drugs in samples of oral cavity fluid were performed. Each time, quantitative analysis was carried out using calibration curves obtained on the day of the analysis. Five series of analyses were performed in identical, optimal conditions. IS was added after the centrifugation step of the biological material, just before the analysis. The sample preparation efficiency was calculated as the ratio of the experimental concentration (i.e. determined during analysis) to

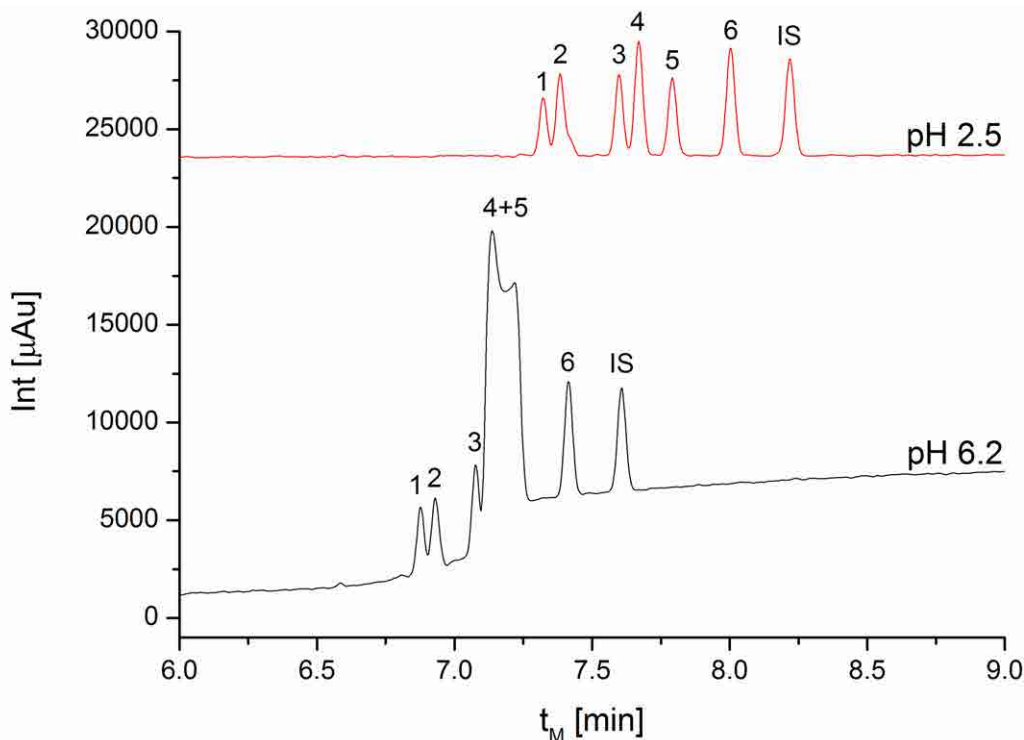


Fig. 1. The separation of analytes with different background electrolyte pH (constant concentration of β -cyclodextrin: 10 mM): 1 – Des, 2 – Imi, 3 – Nord, 4 – Clo, 5 – Dox, 6 – Nort, IS – Ami; concentration of each TCA drug: 5 μ g/ml.

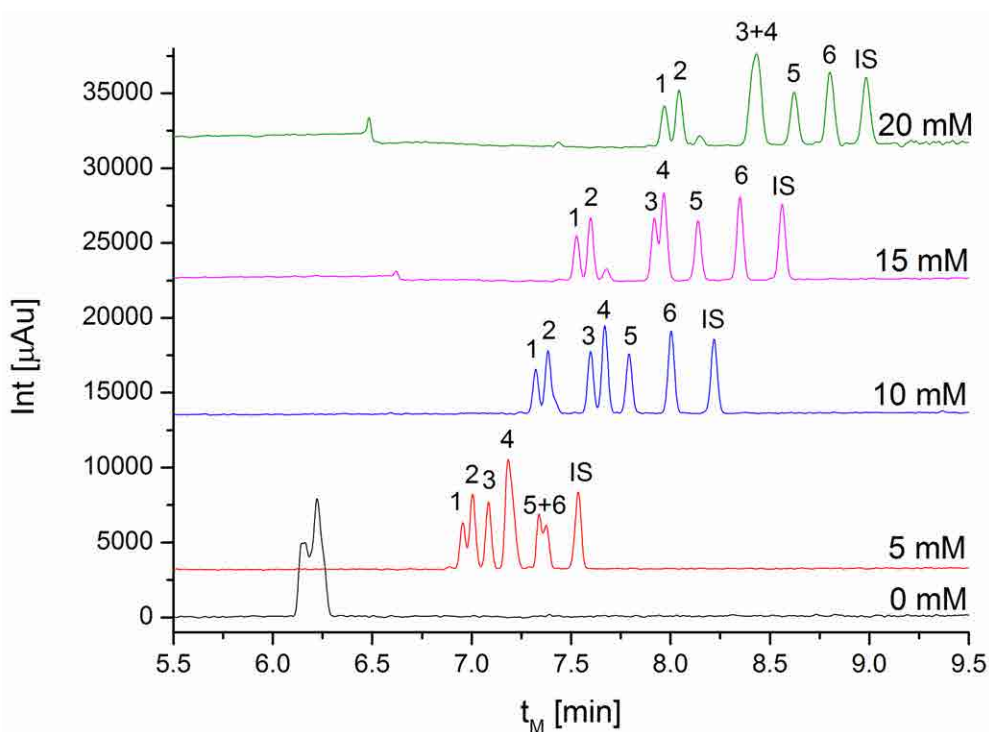


Fig. 2. Comparison of drugs mixture separation in background electrolyte (pH 2.5) with different β -cyclodextrin concentrations (0, 5, 10, 15, 20 mM): 1 – Des, 2 – Imi, 3 – Nord, 4 – Clo, 5 – Dox, 6 – Nort, IS – Ami; concentration of each TCA drug was 5 μ g/ml.

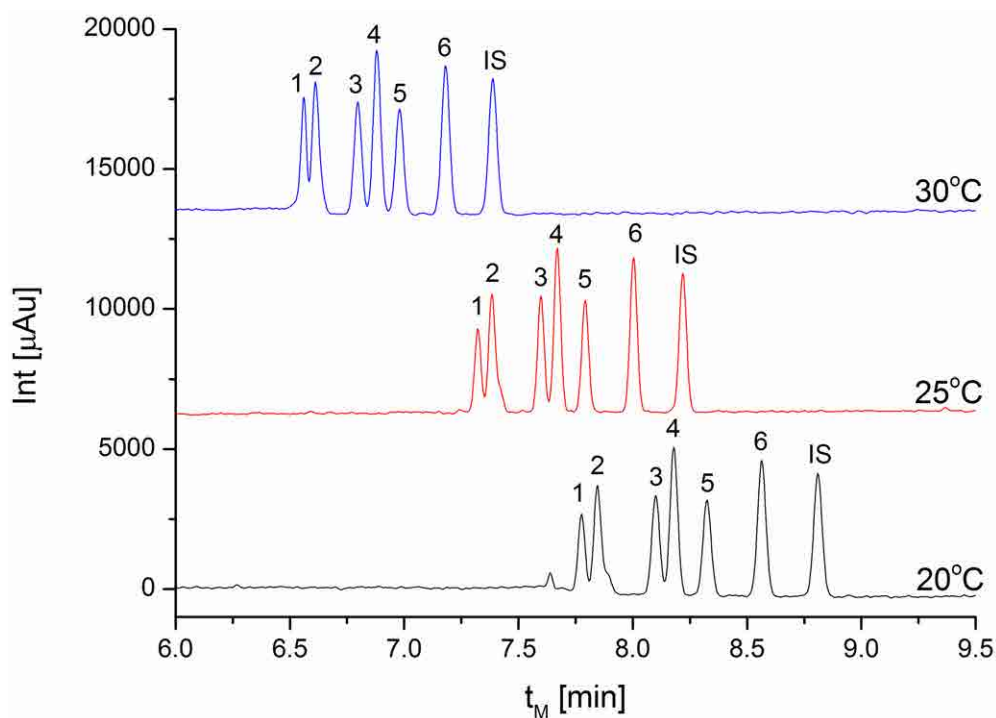


Fig. 3. Separation of analytes at different capillary temperature levels: 20, 25 and 30°C: 1 – Des, 2 – Imi, 3 – Nord, 4 – Clo, 5 – Dox, 6 – Nort, IS – Ami; concentration of each TCA drug was 5 μ g/ml.

the theoretical concentration of the same drug, which had been added to the oral cavity fluid sample prior to analysis (1250 ng/ml); this value was expressed as a percentage. The results were compared with analogous results obtained by the HPLC-UV method with application of the MEPS technique [10]. The calculated values are given in Table I.

As can be clearly seen, the CE-UV procedure is characterized by higher values of efficiency, which attests to the much smaller loss of analyte during sample preparation for analysis when using this method.

3.3. Validation of the method

The developed and optimized analytical method for CE-UV was validated. The following validation parameters were determined: linearity range, limit of detection (*LOD*) and of quantification (*LOQ*), along with precision and accuracy of determinations of each of the analytes. The obtained values are summarized in

Table II. For comparison purposes, Table III contains the values obtained for the MEPS/HPLC-UV method.

It was found that the calibration curves of all analyzed analytes are characterized by a satisfactory linearity in the range from the *LOQ* (60.6–223.1 ng/ml) to 1250 ng/ml ($R^2 > 0.9944$ for Imi, Dox, Des and Nort; $R^2 > 0.9797$ for Nord and Clo). This range covers a range of higher concentrations than the range obtained in the case of MEPS/HPLC-UV. It can thus be stated that the developed method has greater potential in terms of the range of analytical determination of the studied drugs.

LOD and *LOQ* parameters were determined as three ($LOD = 3 SD/a$) and ten times ($LOQ = 10 SD/a$) the ratio of the standard deviation of the analytical signal (peak area) for a given analyte at a concentration of 350 ng/ml to the value of the slope of the calibration curve. *LOD* limits were on average several dozen ng/ml (only Des can be detected at a concentration below 20 ng/ml). The values were about an order of magnitude greater than the *LOD* and *LOQ* obtained

TABLE I. VALUES OF EFFICIENCY OF SAMPLE PREPARATION OF MEPS/HPLC-UV AND CE-UV METHODS, $n = 5$

Method	Efficiency [%]						
	Ami	Imi	Dox	Nort	Des	Nord	Clo
CE-UV	IS	98.2 ± 2.3	90.6 ± 7.2	103.4 ± 1.2	93.1 ± 5.3	111.6 ± 2.3	79.5 ± 13.2
MEPS/HPLC-UV	38.4 ± 1.1	46.3 ± 0.9	55.4 ± 1.7	49.9 ± 2.7	55.4 ± 3.3	56.7 ± 2.2	IS

TABLE II. VALUES OF VALIDATION PARAMETERS OF THE CE-UV METHOD, $n = 4$

Parameter	Ami	Imi	Dox	Nort	Des	Nord	Clo
Linearity [ng/ml]		<i>LOQ</i> – 1250					
<i>LOD</i> [ng/ml]		67.0	47.8	79.5	18.2	99.7	66.5
<i>LOQ</i> [ng/ml]	IS	223.1	159.2	264.7	60.6	332.0	221.5
Precision, <i>RSD</i> [%]		10.5	11.8	12.6	1.7	8.4	5.1
Accuracy, <i>RE</i> [%]		3.9	-3.7	12.7	4.0	12.5	25.1
Accuracy range [%]		-6.9–5.4	-11.8–4.3	-0.3–27.9	2.8–6.0	1.6–16.5	19.6–31.5

TABLE III. VALUES OF VALIDATION PARAMETERS OF THE MEPS/HPLC-UV METHOD, $n = 4$

Parameter	Ami	Imi	Dox	Nort	Des	Nord	Clo
Linearity [ng/ml]	<i>LOQ</i> – 200						
<i>LOD</i> [ng/ml]	6.4	7.5	9.4	4.2	9.4	1.1	
<i>LOQ</i> [ng/ml]	21.3	25.0	31.3	14.0	31.3	3.7	
Precision, <i>RSD</i> [%]	6.9	7.5	2.9	0.9	3.7	8.2	IS
Accuracy, <i>RE</i> [%]	2.1	-8.2	-6.6	-3.9	7.5	-12.8	
Accuracy range [%]	-3.4–12.2	-14.6–1.0	-9.3–3.8	-4.5–3.2	3.0–10.6	-19.4–3.2	

using the MEPS/HPLC-UV method for the same group of drugs.

The precision of this method was examined on the basis of the reproducibility of the results of the test for four samples of oral cavity fluid, which were spiked with the studied drugs at a concentration of 350 ng/ml. The results (Table II) show that the CE-UV method is characterized by a satisfactory precision (*RSD* values do not exceed 13%, the number of samples $n = 4$), which is only slightly lower than that achieved using the MEPS/HPLC-UV method. The possibility of Des determination with a repeatability of less than 2% is noteworthy.

The accuracy of the CE-UV method was defined in terms of the relative error (*RE*), the determined analyte concentration being compared to the concentration (350 ng/ml) at which the analyte was present (when added) at the beginning of the analytical procedure. Nearly all analytes were determined with a relative error of no more than 13%, comparable to that which characterizes the MEPS/HPLC-UV method. It can therefore be assumed that the components of the matrix-rich sample of fluid from the oral cavity did not have a significant impact on the determination of most of the studied analytes. This effect was more prominent only in the case of Clo, which was determined with a relative error of more than 25%.

4. Summary

The performed studies allowed us to conclude that the developed method for CE-UV is suitable for the direct determination of Imi, Dox, Nort, Dezy and Nord in oral cavity fluid. Its particular advantages are simplicity and rapidity of biological material preparation (without the need for extraction of the analytes), which significantly shortens the sample preparation step (down to 10 min). Additionally, this limits the risk of losing a substantial portion of the analyte. Another advantage of this method is the very small injection volume of the sample during analysis, which permits multiple repetition of measurements. Furthermore, a significant reduction in the consumption of chemical reagents results in lower cost of the procedure and makes it more environmentally friendly. Omission of the extraction step also contributes to a reduction in the analysis costs.

A disadvantage of the CE-UV method is low detector sensitivity (lower than the mentioned MEPS/HPLC-UV method) and thus the achieved high *LOD* values prevent the detection of the above mentioned drugs present in the oral cavity fluid at levels reported

in the cited literature [3, 4]. Therefore, further steps will be taken in future research towards a suitable modification of the developed procedure (e.g. by using a mass spectrometer as the detector).

Acknowledgements

The research was carried out within the framework of the project: Interdisciplinary Doctoral Studies “Molecular Science for Medicine”, co-financed by the European Union under the European Social Fund – Human Capital Operational Programme 2010–2015. The authors would also like to thank the Ministry of Science and Higher Education for help in funding the research under the Iuventus Plus project, grant no. 060071 IP 2011.

References

1. Acedo-Valenzuela M. I., Mora-Diez N., Galeano-Diaz T. [et al.], Determination of tricyclic antidepressants in human Breast milk by capillary electrophoresis, *Analytical Science* 2010, 26, 699–702.
2. Bakkali A., Corta E., Ciria J. I. [et al.], Solid-phase extraction with liquid chromatography and ultraviolet detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma, *Talanta* 1999, 49, 773–783.
3. Chudzikiewicz E., Adamowicz P., Kała M. [et al.], Possibilities of using saliva for testing drivers for estazolam, doxepin, and promazine, *Problems of Forensic Sciences* 2005, 62, 166–177.
4. de Castro A., Concheiro M., Quintela O. [et al.], LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentration in both matrices, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008, 183–193.
5. Delmar Cantu M., Hillebrand S., Costa Queiroz M. E. [et al.], Validation of non-aqueous capillary electrophoresis for simultaneous determination of four tricyclic antidepressants in pharmaceutical formulations and plasma samples, *Journal of Chromatography B* 2004, 799, 127–132.
6. Elhamili A., Samuelsson J., Bergquist J. [et al.], Optimizing the extraction, separation and quantification of tricyclic antidepressant drugs in human plasma with CE-ESI-TOF-MS using cationic-coated capillaries, *Electrophoresis* 2011, 32, 647–658.
7. Galeano-Diez T., Acedo-Valenzuela M. I., Mora-Diez N. [et al.], Response surface methodology in the development of a stacking-sensitive capillary electrophoresis method for the analysis of tricyclic antidepressants in human serum, *Electrophoresis* 2005, 26, 3518–3527.

8. Ito R., Ushiro M., Takahashi Y. [et al.], Improvement and validation the method using dispersive liquid-liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of tricyclic antidepressants in human urine samples, *Journal of Chromatography B* 2011, 879, 3714–3720.
9. McClean S., O’Kane E., Hillis J. [et al.], Determination of 1,4-benzodiazepines and their metabolites by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using ultraviolet and electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1999, 838, 273–291.
10. Moos A., Wietecha-Posłuszny R., Woźniakiewicz M. [et al.], Zastosowanie mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie do izolacji leków psychotropowych z płynu z jamy ustnej na potrzeby toksykologii sądowej, XXVIII Konferencja Toksykologów Sądowych, Szklarska Poręba, 18–20 maja 2011 r. [conference materials].
11. Plenis A., Bączek T., Modern chromatographic and electrophoretic measurements of antidepressants and their metabolites in biofluids, *Biomedical Chromatography* 2010, 25, 164–198.
12. Pużyński S., Depresje i zaburzenia afektywne, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
13. Pużyński S., Leki psychotropowe, Podręczny poradnik terapii, Springer PWN, Warszawa 1996.
14. Shih-Chung L., Chen-Wen W., Capillary electrophoretic separation of tricyclic antidepressants using a polymer-coated capillary and β -cyclodextrin as an electrolyte additive, *Journal of Separation Science* 2008, 31, 3921–3929.
15. Shinozuka T., Terada M., Tanaka E., Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method, *Forensic Science International* 2006, 162, 108–112.
16. Szydłarska D., Grzesiuk W., Kupstas A. [et al.], Ślina jako materiał diagnostyczny, *Forum Medycyny Rodzinnej* 2008, 2, 454–464.
17. Zejc A., Gorczyca M., Chemia leków, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009.

Corresponding author

Agnieszka Moos
Uniwersytet Jagielloński
Wydział Chemii
ul. Ingardena 3
PL 30-060 Kraków
e-mail: agnieszka.moos@uj.edu.pl

WSTĘPNE OPRACOWANIE METODY ANALIZY PŁYNU Z JAMY USTNEJ NA ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH LEKÓW PSYCHOTROPOWYCH

1. Wstęp

Leki psychotropowe stanowią grupę związków, które w znaczący sposób oddziałują na organizm człowieka. Wykazują działanie uspakajające, stymulujące, mogą wpływać na nastrój, zachowanie czy sposób myślenia [17]. Leki te są stosowane w licznych schorzeniach psychiatrycznych, takich jak schizofrenia czy depresja. W przypadku ostatniej z wymienionych przypadłości jedną ze stosowanych grup leków są trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (TLPD). Grupa ta liczy ponad 20 związków o niejednorodnej budowie, której podstawę stanowi siedmioczłonowy pierścień połączony z dwoma pierścieniami benzenowymi i łańcuchem alkilowym [12]. Leki TLPD są wchłaniane z przewodu pokarmowego i metabolizowane w wątrobie.

Do wspomnianej grupy leków należą m.in. amitryptylina (Ami), imipramina (Imi), doksepina (Dox) z metabolitem – nordokspina (Nord), nortryptylina (Nort), dezypramina (Des) i kломipramina (Clo). Leki te, stosowane w terapii stanów depresyjnych, mogą wywoływać wiele objawów niepożądanych, takich jak bezsenność, niepokój, zaburzenia koncentracji, zmiany ciśnienia krwi, nudności, zawroty głowy czy odczyny skórne. Mogą wystąpić również powikłania objawiające się przez lęk, napady drgawkowe, niedotlenienie mięśnia sercowego, tachykardię i wiele innych [13].

Najczęściej do oznaczania leków z grupy TLPD stosuje się techniki chromatograficzne [11]. Bakkali z zespołem opracowali metodę chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV) do oznaczania m.in. Dox i Imi w ludzkim osoczu [2], wykorzystując technikę ekstrakcji do fazy stałej (SPE) i uzyskując niską granicę wykrywalności (*LOD*) na poziomie 1–2 ng/ml. Dla tego samego materiału biologicznego Shinozuka i współpracownicy opracowali metodę chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS) do oznaczania 20 leków przeciwdepresyjnych, uzyskując rozdział chromatograficzny analitów w czasie 30 min [15]. Grupa Ito podjęła się opracowania procedury obejmującej analizę metodą chromatografii gazowej z detekcją MS (GC-MS) próbek moczu pod kątem oznaczania leków TLPD, wykorzystując jako technikę przygotowania próbek dyspersyjną mikroekstrakcję ciecz-ciecz (DLLME) [8].

Coraz częściej spotyka się przykłady oznaczania leków TLPD z wykorzystaniem technik elektroforetycznych. W roku 2004 zespół Delmar Cantu opracował procedurę oznaczania Imi, Ami i ich metabolitów, wykorzystując niewodną elektroforezę kapilarną (NACE) w próbkach ludzkiego osocza z zastosowaniem ekstrak-

cji ciecz-ciecz (LLE) [5]. Galeano-Diaz zastosowała elektroforezę kapilarną (CE) do oznaczania Ami, Imi, Dox, Clo i ich metabolitów w próbkach ludzkiej surowicy z wykorzystaniem techniki zateżania próbki przez spiętrzanie w kapilarze (tzw. *stacking*) [7]. Elhamili wraz z zespołem przedstawił nowatorskie połączenie elektroforezy ze spektrometrią mas (CE-ESI-TOF-MS) w zastosowaniu do analizy próbek osocza na zawartość Imi, Clo, Des i norklomipraminy (Norclo) po ich ekstrakcji SPE [6].

Nieliczne prace dotyczą zastosowania technik elektroforetycznych do oznaczania leków psychotropowych w materiałach alternatywnych. Przykładem jest praca Acedo-Valenzuela dotycząca oznaczania Imi, Ami, Clo, Dox i ich metabolitów w mleku kobiety [1]. Przed analizą próbki były poddawane ekstrakcji techniką LLE, a na etapie rozdzielania wykorzystano proces zateżania próbki przez spiętrzanie. McClean z zespołem przedstawił analizę włosów na zawartość innej grupy leków psychotropowych – benzodiazepin (BZD), porównując uzyskane wyniki z otrzymanymi metodą LC-MS [9]. Na podstawie badań stwierdzono, że metoda CE pozwala na uzyskanie znacznie lepszego rozdzielania badanych leków, jednakże LC-MS daje możliwość oznaczenia leków na niższych poziomach stężeń.

W przedstawionej pracy skupiono się na analizie próbek płynu z jamy ustnej, wybierając następujące TLPD jako związki modelowe do rozwoju proponowanej metody badawczej: Imi, Dox z metabolitem Nord, Nort, Des i Clo. Z punktu widzenia analiz klinicznych i sądowych płyn z jamy ustnej – alternatywny materiał biologiczny – posiada wiele zalet w porównaniu do materiałów klasycznych (krew, mocz). Przede wszystkim pobieranie próbek jest łatwiejsze, nie narusza intymności dawcy, może być przeprowadzone przez personel bez przygotowania medycznego, jest nieinwazyjne, a przez to mniej stresujące. Dodatkowo, ze względu na ciągłość wydzielenia tego płynu biologicznego, próbki można pobierać o każdej porze (jeśli procedura analityczna ani leczenie pacjenta nie przewiduje inaczej) [16]. Opracowanie nowych metod oznaczania leków w tym materiale jest zatem zadaniem ważnym i aktualnym.

Niniejsza praca dotyczy opracowania metody oznaczenia wymienionej wyżej grupy leków TLPD i ich metabolitów w płynie z jamy ustnej metodą CE-UV. W odróżnieniu od innych procedur proponowanych do oznaczania leków psychotropowych w materiałach biologicznych, podjęto próbę oznaczania badanych analitów bez zastosowania technik ekstrakcyjnych do ich izolacji z płynu z jamy ustnej. Opracowaną metodę porówna-

no pod względem parametrów walidacyjnych z metodą HPLC-UV z zastosowaniem techniki mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie (MEPS) [10]. Praca niniejsza opisuje wstępne badania prowadzone z detektorem spektrofotometrycznym, których dokonano jako przygotowania do rozwoju opracowywanej metody CE przed połączeniem z czulszym detektorem – spektrometrem mas. Jest to zabieg konieczny ze względu na niskie poziomy stężenie leków TLPD występujące w płynie z jamy ustnej. W pracy napisanej pod kierownictwem de Castro [4] przedstawiono analizę próbek płynu z jamy ustnej pobranych od pacjentów, którym podawano Ami. Zakres, w jakim wykryto wymieniony lek w przeanalizowanych próbkach, to 20,2–33,1 ng/ml. Badania dotyczące obecności leków psychotropowych w płynie z jamy ustnej kierowców, w tym Dox, przedstawił zespół Chudzikiewicz [3]. Zakres stężeń, w jakim wykryto wymieniony lek, to 3,7–14.0 ng/ml.

2. Materiały i aparatura

2.1. Materiały i odczynniki

Materiał do badań stanowiły próbki płynu z jamy ustnej, które pobierano od trzech wolontariuszy w wieku 24–35 lat. próbki te były pobierane bez wcześniejszej stymulacji do oddzielnych polipropylenowych probówek i w taki sposób przechowywane w temperaturze +4°C do czasu ich analizy (nie dłużej niż 24 h). Wolontariusze zadeklarowali, że w okresie ostatnich 3 miesięcy nie przyjmowali preparatów zawierających badane substancje. Każdorazowo pobierano od 3 do 8 ml płynu od każdej osoby.

W badaniach zastosowano wzorce siedmiu związków należących do grupy TLPD i ich metabolitów: Ami, Imi, Dox, Nort, Des, Nord i Clo dostarczone przez Sigma Aldrich, Niemcy. Pozostałe użyte odczynniki to: β -cyklodekstryna (Sigma Aldrich, Niemcy), metanol (Merck, Niemcy), 30% wodorotlenek sodu (POCH, Polska) oraz zestaw trzech odczynników wchodzących w skład CE-ofix Kit Method Development (Analis, Belgia): dwa elektrolity podstawowe stosowane w procesie rozdzielania elektroforetycznego (pierwszy zawierał modyfikator polianionowy i 75 mM bufor fosforanowy o pH 2,5, drugi – modyfikator polianionowy i 50 mM bufor fosforanowy o pH 6,2) oraz inicjator zawierający polikationy, odpowiedzialny za zmianę charakterystyki elektrycznej warstwy podwójnej na wewnętrznej powierzchni kapilary. Pozwoliło to na utrzymanie przepływu elektroosmotycznego pomimo prowadzenia pomiarów w kwasowym elektrolicie podstawowym. Wodę dejonizowaną (18,2 M Ω ·cm, TOC < 5 ppb) otrzymywano w laboratorium (Millipore, Niemcy).

2.2. Aparatura i warunki pomiarowe

Pomiary wykonywano przy użyciu systemu do elektroforezy kapilarnej (PA 800 Plus, Beckman Coulter, Stany Zjednoczone), dokonując rozdzielania analitów w kapilarze kwarcowej o długości całkowitej 60 cm (długość efektywna 50 cm) i średnicy wewnętrznej 75 μ m. W trakcie rozdzielania na końcach kapilary przykładano napięcie o wartości 25 kV, utrzymując stałą temperaturę pomiaru i temperaturę segmentu z próbkami na poziomie 30°C. Próbkę wprowadzono do kapilary hydrodynamicznie, stosując ciśnienie 0,5 psi przez 5 s. Elektrolytem podstawowym był 75 mM bufor fosforanowy o pH 2,5 z dodatkiem 10 mM β -cyklodekstryny. Przed każdą analizą kapilarę kondycjonowano, przepłukując ją 0,5 M roztworem NaOH pod ciśnieniem 20 psi według sekwencji: płukanie (0,5 min), wytrawianie (4 min), płukanie (0,5 min). Analizę prowadzono następująco: płukanie inicjatorem (0,5 min, 20 psi), płukanie buforem separacyjnym (0,5 min, 20 psi), wprowadzenie próbki (0,5 psi/0,5 s), wprowadzenie wody (0,1 psi/10 s w celu wstępnego załadowania próbki w kapilarze przez spiętrzanie), rozdzielanie (25 kV, 18 min), końcowe płukanie 0,5 M NaOH i wodą (każdorazowo 0,5 min, 20 psi). Elektroferogramy rejestrowano przy długości fali 254 nm.

2.3. Przygotowanie próbek

Próbki płynu z jamy ustnej były wzbogacane wszystkimi badanymi lekami (Imi, Dox, Nort, Des, Nort, Clo) w taki sposób, że stężenie każdego analitu wynosiło 0,35, 0,75 lub 1,25 μ g/ml (Ami była używana jako wzorzec wewnętrzny – IS). Próbki były następnie wirowane w obniżonej temperaturze (+4°C) z szybkością 16 000 obr./min przez 5 min. Na koniec zbierano ciecz z nad osadu i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Tak przygotowane próbki poddawano pomiarom metodą CE.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Optymalizacja metody rozdzielania analitów

Badania optymalizacyjne wykonano przy użyciu próbek zawierających anality w stężeniu 1250 ng/ml.

Sprawdzono wpływ na rozdzielanie agalitów dwóch kolejnych parametrów: pH elektrolitu podstawowego (bufory fosforanowe o pH 2,5 oraz 6,2) oraz dodatk β -cyklodekstryny (cztery wartości stężeń: 5, 10, 15, 20 mM) dla każdego pH, przeprowadzając w efekcie osiem kolejnych doświadczeń. Wybór wartości pH miał na celu skrócenie czasu migracji analitów przez ich dodatnie zjonizowanie w wybranym środowisku, zapewnienie większej stabilności polijonów obecnych w ini-

cjatorze i elektrolicie podstawowym (co również miało wpływ na przyspieszenie przepływu analitów) oraz jak najlepszą rozpuszczalność β -cyklodekstryny. Dodatek β -cyklodekstryny do elektrolitu podstawowego miał na celu polepszenie rozdzielczości oznaczanych leków (mechanizm rozdzielania polega w tym przypadku na tworzeniu trwałych kompleksów inkluzyjnych β -cyklodekstryny z cząsteczkami leków i opiera się na stopniu ich skompleksowania [14]).

Wpływ odczynu elektrolitu podstawowego na proces rozdzielania elektroforetycznego badanych analitów przedstawiono na rycinie 1. Znacznie lepsze wyniki osiągnięto przy pH 2,5. W tych warunkach uzyskano nie tylko stabilną linię bazową, ale przede wszystkim bardzo dobre rozdzielanie wszystkich badanych leków. Jest to szczególnie widoczne w przypadku Nord, Clo, Dox (odpowiednio piki numer 3, 4 i 5), których ruchliwości elektroforetyczne przy pH 6,2 są na tyle zbliżone, że uzyskane na elektroferogramach piki wyraźnie się nakładają.

Wpływ stężenia β -cyklodekstryny na proces rozdzielania badanych analitów był znaczący, co przedstawiono na rycinie 2.

Stosując β -cyklodekstrynę o stężeniu 20 mM, nie udało się rozdzielić Nord i Clo (piki 3 + 4 na rycinie 2). Przy stężeniu 15 mM można było zaobserwować częściowe rozdzielanie tych substancji, a w przypadku stężenia 10 mM – rozdzielanie wszystkich analitów umożliwiające przeprowadzenie analizy ilościowej. Mniejsza zawartość β -cyklodekstryny (5 mM) powoduje spadek rozdzielczości i na tej podstawie stężenie 10 mM uznano za optymalne.

W ostatniej kolejności sprawdzono, w jaki sposób temperatura pomiaru wpływa na proces rozdzielania badanych leków. W tym celu wykonano pomiary w temperaturach 20, 25 oraz 30°C (wyższych temperatur nie stosowano, bowiem sprzyjają one zwiększeniu natężenia prądu elektrycznego przepływającego przez kapilarę oraz tworzeniu się mikropęcherzyków gazów zakłócających sygnał analityczny). Uzyskane profile elektroforetyczne przedstawiono na rycinie 3. Nie zaobserwowano istotnego wpływu temperatury na rozdzielanie pików elektroforetycznych, jednak wraz ze wzrostem temperatury czasy migracji leków uległy skróceniu. Zwiększenie ruchliwości cząsteczek poszczególnych analitów należy przede wszystkim wiązać ze spadkiem lepkości środowiska elektrolitu podstawowego. Do dalszych badań wybrano temperaturę 30°C.

Podsumowując, za optymalne warunki metody rozdzielania wybranej grupy leków uznano: elektrolit podstawowy zawierający modyfikator polianionowy i 75 mM bufor fosforanowy o pH 2,5, 10 mM, dodatek β -cyklodekstryny oraz 30°C jako temperaturę rozdzielania.

3.2. Ocena wydajności procesu przygotowania próbki do analizy

Stosując opracowaną procedurę analityczną, wykonano oznaczenia leków TLPD w próbkach płynu z jamy ustnej. Każdorazowo analizę ilościową prowadzono w oparciu o linie kalibracyjne uzyskane w danym dniu analizy. Wykonano 5 serii analiz w identycznych, optymalnych warunkach. IS dodawano po zakończeniu etapu wirowania materiału biologicznego, bezpośrednio przed analizą. Wydajność procesu przygotowania próbki obliczano jako stosunek stężenia doświadczalnego (tj. wyznaczonego podczas analizy) oznaczanego leku do stężenia teoretycznego tego samego leku, który został dodany do próbek płynu z jamy ustnej przed analizą (1250 ng/ml); wartość tę wyrażono w procentach. Otrzymane wyniki porównano z analogicznie wyznaczonymi wynikami uzyskanymi metodą HPLC-UV z zastosowaniem techniki MEPS [10]. W tabeli I zestawiono obliczone wartości.

Jak można zauważyć, wyraźnie większymi wartościami wydajności charakteryzuje się procedura z wykorzystaniem metody CE-UV, co świadczy o znacznie mniejszych stratach analitów w trakcie przygotowywania próbek do analizy tą metodą.

3.3. Walidacja metody

Opracowaną i zoptymalizowaną metodę analityczną CE-UV poddano walidacji. Wyznaczono następujące parametry walidacyjne: zakres liniowości, granice wykrywalności (*LOD*) i oznaczalności (*LOQ*) oraz precyzję i dokładność oznaczeń każdego z analitów. Uzyskane wartości zestawiono w tabeli II. Dla porównania w tabeli III zamieszczono wartości uzyskane dla metody MEPS/HPLC-UV.

Stwierdzono, że wykresy kalibracyjne wszystkich rozpatrywanych analitów charakteryzują się zadowalającą liniowością w zakresie od *LOQ* (60,6–223,1 ng/ml) do 1250 ng/ml ($R^2 > 0,9944$ dla Imi, Dox, Nort i Des; $R^2 > 0,9797$ dla Nord i Clo). Zakres ten obejmuje przedział wyższych stężeń od tego, jaki uzyskano w przypadku metody MEPS/HPLC-UV. Można zatem powiedzieć, że opracowana metoda ma większy potencjał analityczny pod względem zakresu oznaczalności badanych leków.

Parametry *LOD* i *LOQ* wyznaczono jako odpowiednio trzy- (*LOD* = 3 SD/a) i dziesięciokrotną (*LOQ* = 10 SD/a) wartość stosunku odchylenia standardowego sygnału analitycznego (powierzchni pod pikiem) dla danego analitu w stężeniu 350 ng/ml do wartości nachylenia wykresu kalibracyjnego. Granice *LOD* wyniosły przeciętnie kilkadziesiąt ng/ml (jedynie Des można wykryć w stężeniu poniżej 20 ng/ml). Uzyskane wartości były o około rząd wielkości większe niż wartości *LOD*

i *LOQ* przy zastosowaniu metody MEPS/HPLC-UV dla tej samej grupy leków.

Precyzję opracowanej metody zbadano na podstawie powtarzalności wyników oznaczenia analitów w czterech próbkach płynu z jamy ustnej dotowanych badanymi lekami w stężeniu 350 ng/ml. Uzyskane wyniki (tabela II) dowodzą, że metoda CE-UV charakteryzuje się zadowalającą precyzją (wartości *RSD* nie przekraczają 13%, liczba próbek $n = 4$), nieznacznie jedynie gorszą od osiągniętej w przypadku metody MEPS/HPLC-UV. Na uwagę zasługuje możliwość oznaczenia Des z powtarzalnością mniejszą od 2%.

Dokładność oznaczeń metody CE-UV określano za pomocą błędu względnego (*RE*), przy czym wyznaczone stężenie analitu odnoszono do stężenia (350 ng/ml), w jakim analit był obecny po dodaniu go na początku procedury analitycznej. Prawie wszystkie analizy zostały oznaczone z błędem względnym nieprzekraczającym 13%, porównywalną z tą, jaka charakteryzuje metodę MEPS/HPLC-UV. Można zatem przypuszczać, że składniki bogatej matrycy próbek płynu z jamy ustnej nie miały znaczącego wpływu na oznaczenie większości badanych analitów. Wpływ ten ujawnił się w większym stopniu jedynie w przypadku Clo, która została oznaczona z błędem względnym przekraczającym 25%.

4. Podsumowanie

Po przeprowadzonych badaniach stwierdzono, iż opracowana metoda CE-UV nadaje się do bezpośredniego oznaczania Imi, Dox, Nort, Dezy, Nord w płynie z jamy ustnej. Szczególnymi jej zaletami są: proste i szybkie przygotowanie materiału biologicznego (bez potrzeby ekstrakcji analitów), co znacznie skraca etap przygotowania próbek (do 10 min). Dodatkowo pomaga to ograniczyć ryzyko utraty znacznej części analitu. Kolejną zaletą opracowanej metody jest bardzo mała objętość nastrzyku próbki podczas analizy, co umożliwia wielokrotne powtórzenie pomiarów. Ponadto znaczne zmniejszenie zużycia odczynników chemicznych skutkuje mniejszymi kosztami procedury i sprawia, że jest ona bardziej przyjazna środowisku. Obniżeniu kosztów analizy przyczynia się również pominięcie etapu ekstrakcji.

Wadami opracowanej metody CE-UV jest niska czułość detektora (niższa niż w przypadku przytoczonej metody MEPS/HPLC-UV) i tym samym uzyskana wysoka granica *LOD* niepozwalająca na wykrycie ww. leków obecnych w płynie z jamy ustnej na poziomach raportowanych w cytowanych pracach [3, 4]. Dlatego też w dalszych badaniach zostaną podjęte kolejne kroki w kierunku odpowiedniej modyfikacji opracowanej procedury (np. poprzez zastosowanie spektrometru mas jako detektora).

Podziękowania

Badania zostały wykonane w ramach projektu pod nazwą Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego – Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2010–2015. Autorzy dziękują również za pomoc Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego w finansowaniu badań w ramach projektu Iuventus Plus, grant nr IP 2011 060071.