

Roman Wachowiak¹, Bogna Strach¹, Paweł Łopatka²

Analiza toksykologiczna wybranych pochodnych 1,4-dihydropirydyny w diagnostyce zatruc

Toxicological analysis of selected 1,4-dihydropyridine calcium channel blockers in the diagnosis of intoxications

¹ Zakład Medycyny Sądowej i

² Klinika Nadciśnienia Tętniczego Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. Z. Przybylski, prof. dr hab. Głuszek

Praca dotyczy opracowania efektywnych metod analizy jakościowo-ilościowej wybranych pochodnych 1,4-dihydropirydyny przydatnych tanatologicznej diagnostyce zatruc, jak również w terapii monitorowanej. W badaniach wykorzystano metodę chromatografii gazowej (GLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Dla celów izolacji badanych związków z materiału biologicznego zastosowano metody klasycznej ekstrakcji oraz użyto fazy stałe (SPE); Bond Elut LRC (Varian); Absolut Nexus (Varian) i STRATA C – 18 E (Phenomenex). Program badawczy dotyczył analizy najczęściej stosowanych pochodnych: nifedypina, felodypina, amlodypina, nifedypina, nimodypina, niwoldypina, nitrendypina, nisoldypina, isradypina.

This study is aimed at evaluating effective techniques of qualitative and quantitative analysis of selected 1,4-dihydropyridine calcium channel blockers, useful both for thanatological diagnosis of intoxications as well as monitoring therapy. The studies took advantage of gas chromatography (GLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Isolation of studied compounds from biological material was performed using classical and solid phase extraction procedures (SPE) such as Bond Elut LRC (Varian), Absolut Nexus (Varian), STRATA C – 18 E (Phenomenex). The program included analysis of nine of the most frequently prescribed derivatives: nifedipine, felodipine, amlodipine, nifedipine, nimodipine, nivaldipine, nitrendipine, nisoldipine, isradipine.

Słowa kluczowe: pochodne 1,4-dihydropirydyny, izolacja, analiza jakościowo-ilościowa, chromatografia GLC, HPLC

Key words: 1,4-dihydropyridine calcium channel blockers, isolation, qualitative and quantitative analysis, GLC and HPLC chromatographies

WPROWADZENIE

Kazuistyka przypadków śmierci nagłej diagnozowanych w Zakładach Medycyny Sądowej wskazuje na znaczący udział chorób układu krążenia jako przyczyny zgonu. W większości przypadków tanatologiczna ocena przyczyny śmierci, uwzględniająca także inne okoliczności towarzyszące, potwierdza często fakt długotrwałego zażywania leków związanych z przewlekłą lub ostrą niewydolnością krążeniową (choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia rytmu serca, przebyte zawały).

Kompleksowa ocena przyczyny śmierci dla tych przypadków wymaga zawsze odpowiednich badań toksykologicznych, pozwalających ustalić poziom zażywanego leku we krwi w chwili zgonu [1, 7]. Niezależnie od potrzeb toksykologii sądowej, związanych z diagnostyką chemiczną zatruc śmiertelnych daną grupą leków, na uwagę zasługuje także skuteczna profilaktyka zatruc i związana z nią terapia monitorowana. Ustalenie bezpiecznego, a zarazem

efektywnego poziomu wybranego leku w płynach ustrojowych, pozwala na racjonalne korelowanie dawki leku w zależności od oczekiwanych efektów farmakologiczno-klinicznych. Dotychczasowe metody analizy pochodnych 1,4-dihydropirydyny w materiale biologicznym dotyczyły analizy pojedynczych pochodnych, badanych metodami chromatografii gazowej (GLC) [3, 9, 14, 15, 19], cieczonej (HPLC) [4-6, 10, 16-18, 20] chromatografii gazowej i spektrometrii masowej (GC/MS) [11,12] chromatografii cieczonej i spektrometrii masowej (LC/MS) [2] oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej [3]. W procesie izolacji wybranych pochodnych 1,4-dihydropirydyny stosowano głównie klasyczną ekstrakcję typu ciecz/ciecz ze środowiska zasadowego oraz sporadycznie stałe fazy ekstrakcyjne (SPE) [4].

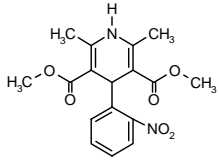
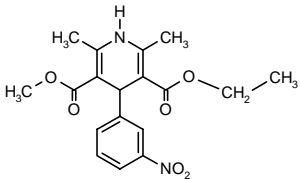
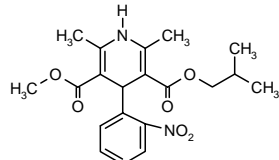
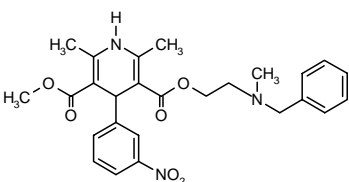
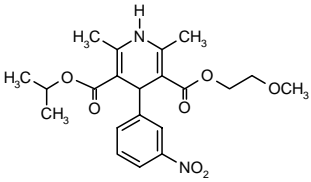
Mając na uwadze szeroką wartość diagnostyczną badań toksykologicznych, przydatnych zarówno w profilaktyce, jak i w ustalaniu przyczyny czy rodzaju zatrucia, opracowano warunki równoczesnej analizy jakościowo-ilościowej najczęściej stosowanych w lecznictwie pochodnych 1,4-dihydropirydyny. Przydatność opracowanej metody potwierdzono podczas rutynowych badań diagnostycznych próbek krwi pacjentów leczonych wybranymi pochodnymi nifedypiny.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach użyto odpowiednich substancji wzorcowych wybranych pochodnych 1,4-dihydropirydyny, których strukturę chemiczną przedstawia tabela I.

Tab. I. Struktura chemiczna badanych pochodnych 1,4-dihydropirydyny.

Tab. I. Chemical structure of examined 1,4-dihydropyridine derivatives.

Struktura chemiczna	Wzór sumaryczny	Temperatura topnienia	Masa cząsteczkowa	Nazwa
	$C_{17}H_{18}N_2O_6$	170-172°C	346.34	NIFEDYPINA (ADALAT)
	$C_{18}H_{20}N_2O_6$	150-160°C	360.36	NITRENDYPINA (BAYOTENSIN)
	$C_{20}H_{24}N_2O_6$	149°C	388.42	NISOLDYPINA (CORONIL)
	$C_{26}H_{29}N_3O_6$	180°C	479.55	NIKARDYPINA (ANTAGONIL)
	$C_{20}H_{25}N_2O_6$	125-127°C	418.50	NIMODYPINA (NIMOTOP)

z uwagi na możliwość automatycznego, powtarzalnego wprowadzania próbki za pomocą dozownika (autosamplera). Sprawdzony zakres kalibracyjnej zależności $AB=f(c)$ dotyczył przedziału 10-100 $\mu\text{g/ml}$ badanych substancji. Powyższą oznaczalność kalibracyjną uzyskano w warunkach precyzyjnego automatycznego wprowadzenia stałej objętości (20 μl) podstawowych etanolowych roztworów wzorcowych o wzrastającym stężeniu badanych pochodnych (10-100 $\mu\text{g/ml}$). Opracowana w powyższy sposób metoda analizy ilościowej okazała się szybsza, prostsza a zarazem równoznaczna parametrom dokładności i powtarzalności metody z dodawanym wzorcem wewnętrznym.

Warunki izolacji badanych związków dotyczyły surowicy krwi ludzkiej, którą obciążono stałą ilością badanego leku (0.1 mg/ml). Po okresie inkubacji (± 24 godz. temp. 20°C) każdą próbkę poddano zróżnicowanej izolacji z użyciem klasycznej ekstrakcji (ciecz/ciecz) oraz z zastosowaniem fazy stałej – wykorzystanie gotowych kolumn ekstrakcyjnych Absolut Nexus firmy Varian, Strata C 18 E Phenomenex oraz BOND ELUT LRC firmy Varian.

Warunki ekstrakcji klasycznej: 1 ml obciążonej surowicy krwi ludzkiej, zawierającej 0.1 mg badanej substancji, po doprowadzeniu do pH 12,3 poddano ekstrakcji chloroformem lub eterem (3 x 10 ml). Połączone ekstrakty po osuszeniu (Na_2SO_4) odparowano do sucha. Pozostałość po rozpuszczeniu 0,1 ml etanolu badano chromatograficznie.

Warunki ekstrakcji SPE z użyciem fazy Absolut Nexus Varian.

1 ml surowicy krwi ludzkiej zawierającej 0.1 mg badanej substancji naniesiono bezpośrednio na kolumnę i przesączono z prędkością 1 ml/min. Następnie kolumnę przemyto wodą (1 ml) i osuszono w próżni używając pompy wodnej. Desorbcję badanych związków przeprowadzono przy użyciu metanolu (1 ml). Otrzymany ekstrakt odparowano do sucha i przed badaniem chromatograficznym ponownie rozpuszczono w 0,1 ml alkoholu etylowego.

Warunki ekstrakcji SPE z użyciem fazy Strata C₁₈ –E Phenomenex.

Podczas nanoszenia rozpuszczalników i badanej próby na kolumnie Strata C₁₈ –E Phenomenex należy zachować warstwę (tzw. „lustro”) cieczy ($\pm 2\text{mm}$) nad warstwą adsorbentu. Przed przystąpieniem do izolacji konieczne jest przeprowadzenia kondycjonowania kolumny, poprzez naniesienie 1 ml metanolu i przesączenie z prędkością 1 ml/min oraz przemycie 1 ml wody (przesączenie z prędkością 1 ml/min). Na tak przygotowaną kolumnę

nanoszono 1 ml surowicy krwi ludzkiej zawierającej 0.1 mg badanej substancji i przesączono z prędkością 1 ml/min. Następnie kolumnę przemyto 1 ml 5 % roztworu wodnego metanolu i osuszono w próżni używając pompy wodnej. Desorbcję badanych związków przeprowadzono przemywając kolumnę 1 ml metanolu. Otrzymany ekstrakt odparowano do sucha i przed badaniem chromatograficznym ponownie rozpuszczono w 0,1 ml alkoholu etylowego.

Warunki ekstrakcji SPE z użyciem fazy Bond Elut LRC Varian.

Podczas nanoszenia rozpuszczalników i badanej próby na kolumnie Bond Elut LRC Varian zachowano warstwę cieczy nad adsorbentem. Przed przystąpieniem do izolacji konieczne jest przeprowadzenia kondycjonowania kolumny, poprzez naniesienie 2 ml metanolu i jego przesączenie z prędkością 1 ml/min, a następnie 2 ml wody (przesączenie z prędkością 1 ml/min) oraz 1 ml buforu fosforanowego po pH 6,1. Na tak przygotowaną kolumnę nanoszono 1 ml surowicy krwi ludzkiej zawierającej 0,1 mg badanej substancji i sączono z prędkością 1 ml/min. Następnie kolumnę przemyto kolejno 2 ml wody oraz 2 cm 0,1 molowego kwasu solnego. Desorbcję badanych związków przeprowadzono przemywając kolumnę 1 ml metanolu z amoniakiem (w stosunku 98:2) z prędkością 1 ml/min. Otrzymany ekstrakt odparowano do sucha i przed badaniem chromatograficznym ponownie rozpuszczono w 0,1 ml alkoholu etylowego.

Systematyczna analiza toksykologiczna pochodnych 1,4-dihydropirydyny – wyznaczenia indeksów retencji.

Dla celów przyspieszonej identyfikacji w przypadku ograniczonej możliwości laboratoryjnego użycia systemu GC/MS wyznaczono indeksy retencji dla badanych pochodnych. W proponowanych warunkach analizy jakościowej metodą chromatografii gazowej wyznaczono czasy retencji dla szeregu n-alkanów (C₁₆, C₁₈, C₂₀, C₂₂) oraz badanych związków. Z uzyskanych danych wykreślono zależność Kovats'a [8] $\log tr = f \ln(n \times 100)$, z której odczytano odpowiednie wartości indeksów retencji badanych pochodnych (tr – czas retencji, n – ilość atomów węgla w n – alkanach użytych do kalibracji).

Wykonanie oznaczenia w materiale biologicznym (krew).

Materiałem użytym do badań były próbki krwi osób leczonych pochodnymi 1,4-dihydropirydyny w Klinice Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Naczyń AM w Poznaniu, w warunkach terapii monitorowa-

nej. Próbkę krwi bezpośrednio po pobraniu zostały odwirowane a uzyskane osocze w ilości 1 cm³ zostało wykorzystane do izolacji odpowiedniej pochodnej na kolumnkach ekstrakcyjnych BOND ELUT firmy Varian, zgodnie z powyższym przepisem.

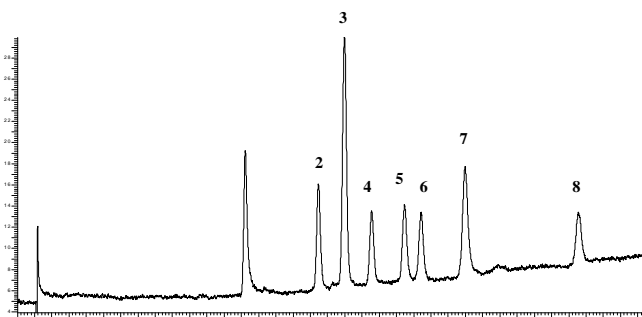
WYNIKI I DYSKUSJA

Równoczesna analiza jakościowa wybranych pochodnych 1,4-dihydropirydyny może być przeprowadzona metodą chromatografii gazowej z użyciem kolumny kapilarnej wypełnionej niepolarną fazą SPB-1. W proponowanych warunkach można dokonać rozdziału badanych związków bez konieczności tworzenia pochodnych (ryc. 1).

Ryc. 1. Rozdział chromatograficzny badanych pochodnych 1,4-dihydropirydyny metodą GLC.

Fig. 1. Chromatographic separation of examined 1,4-dihydropyridine calcium channel blockers by GLC method.

1 – lorazepam (wzorec wewnętrzny- internal standard), 2 – nifedypina, 3 – isradypina, 4 – felodypina, 5 – nitrendypina, 6 – nisoldypina, 7 – niwaldypina, 8 – nimodypina



Wyznaczone parametry indeksów retencji badanych pochodnych metodą Kovats'a pozwalają na ich szybką identyfikację, która ma szczególne znaczenie w toksykologii klinicznej. Uzyskane wartości indeksów retencji (I_r) są wyraźnie zróżnicowane dla siedmiu pochodnych, a ich wartości przedstawiono w tabeli II.

Podstawą do wykonania analizy ilościowej rozdzielonych związków był właściwy rozdział jakościowy analizowanego leku i zaproponowanego wzorca wewnętrznego, którym był lorazepam. Metoda analizy ilościowej, opartej o zastosowanie wzorca o innym czasie retencji okazała się bardzo dokładna. Ilościowa interpretacja zależności pomiędzy stężeniem oznaczonego składnika (c) a stosunkiem (R) powierzchni pików substancji oznaczonej do po-

wierzchni pików wzorca wewnętrznego ($R=f(c)$) charakteryzuje się dużą powtarzalnością. Ocena przebiegu liniowej zależności zakresu kalibracji badanych pochodnych (75-200 µg/ml) (tabela II) spełnia zależność $y=ax$ i charakteryzuje się wysokim współczynnikiem korelacji.

Tab. II. Logarytmy czasów retencji i indeksy retencji wyznaczone dla badanych pochodnych 1,4-dihydropirydyny oraz węglowodorów kalibrujących.

Tab. II. Logarithms of retention times and retention indexes of examined 1,4-dihydropyridine calcium channel blockers and hydrocarbons calibrators.

Nazwa związku Examined compound	Logarytm czasu retencji Logarithms of retention time	Indeks retencji RI Retention Index
Nifedypina	0,932	2536,74
Isradypina	0,969	2578,89
Felodypina	1,000	2611,89
Nitrendypina	1,043	2659,11
Nisoldypina	1,060	2679,00
Niwaldypina	1,106	2729,22
Nimodypina	1,206	2840,44
Hexadekan	0,072	-
Oktadekan	0,227	-
Eikozan	0,408	-
Deikozan	0,600	-

Najlepsze wyniki rozdziału uzyskano przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej, stosując gradientową zmianę fazy rozwijającej, zgodnie z proponowanym schematem i użytym systemem detekcji UV $\lambda = 240$ nm, uzyskano równoczesny rozdział wszystkich badanych związków (ryc. 2).

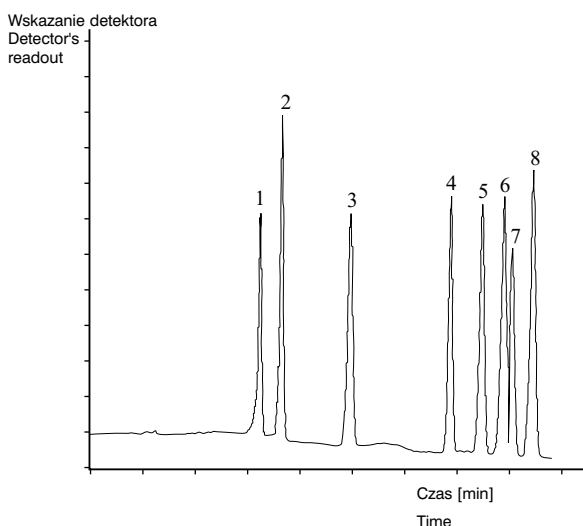
Przeprowadzona analiza ilościowa i ustalony zakres kalibracji (10-100 µg/ml) wskazuje na wyższą oznaczalność badanych związków w przypadku użycia chromatografii cieczowej. Porównawczą ocenę statystyczną powtarzalności oznaczeń badanych związków w kalibrowanych zakresach stężeń, z uży-

ciem obu metod (GLC i HPLC) przedstawiono w tabeli II.

Ryc. 2. Rozdzielność chromatograficzna (HPLC) badanych pochodnych 1,4-dihydropirydyny.

Fig. 2. Chromatographic separation (HPLC) of examined 1,4-dihydropyridine calcium channel blockers.

1 – amlodypina, 2 – nikardypina, 3 – nifedypina, 4 – isradypina, 5 – nimodypina, 6 – nisoldypina, 7 – niwaldypina, 8 – felodypina.



Uzyskane zależności wskazują, że procentowe względne odchylenie standardowe (S_r) dla oznaczeń badanych pochodnych metodą HPLC wykazuje niższe wartości aniżeli dla metody GLC. Wartość S_r dla oznaczeń badanych pochodnych nie przekracza wartości 10% i mieści się w normie ak-

ceptacji przyjętej dla rutynowych metod instrumentalnych. W ocenie porównawczej osiągnięć detekcji opracowanych metod nie bez znaczenia jest wartość progowej oznaczalności badanych związków, która jest zdecydowanie wyższa dla metody HPLC (około 12 ng/20 μ l; 0,625 μ g/ml) niż dla GLC (około 12 μ g/1 μ l; 12,5 μ g/ml).

Przeprowadzone badania odzysku pochodnych 1,4-dihydropirydyny z obciążonego osocza krwi ludzkiej, z zastosowaniem stałych faz adsorbcyjnych (tabela II.), wykazały zdecydowanie wyższe wartości wykładników izolacji aniżeli przy zastosowaniu metody klasycznej ekstrakcji typu ciecz/ciecz. Użycie standardowych dla zasad warunków izolacji (pH=12,3 chloroform/eter), wskazuje na zróżnicowane efekty odzysku w przedziałach 7,6-60,9% dla ekstrakcji chloroformem oraz 0,7-4,5% dla ekstrakcji eterem. Zastosowanie stałych faz ekstrakcyjnych (Absolut Nexus firmy Varian, Strata C 18 E Phenomenex, BOND ELUT LRC firmy Varian), a w szczególności BOND ELUT LRC, zapewnia szybki i efektywny proces izolacji, który w praktyce sprowadza się do czterostopniowego postępowania: kondycjonowanie kolumny, adsorpcji analitu z osocza, płukania i desorpcji. Najmniej zróżnicowane parametry odzysku w zakresie 47,8% (nisoldypina) do 87,2% (felodypina) uzyskano przy zastosowaniu fazy BOND ELUT LRC. Przydatność metody HPLC uznanej za bardziej precyzyjną, sprawdzono podczas rutynowej analizy nitrendypiny w próbkach krwi osób poddanych monitorowanej terapii choroby nadciśnieniowej w warunkach polipragmatyki lekowej. Proces izolacji badanych związków z osocza krwi przeprowadzono w warunkach rutynowej analizy toksykologicznej z użyciem fazy stałej BOND ELUT LRC.

Tab. III. Parametry statystyczne zakresów kalibracji oraz wydajność ekstrakcji (procent) R - współczynnik korelacji, S_r – procentowe odchylenie standardowe.

Tab. III. Statistic parameters of calibration range and extraction recovery (percentage) R-correlation coefficient, S_r – standard deviation.

Badany związek Examined compound	Parametry statystyczne zakresów kalibracji Statistic parameters of calibration range				Średnia wydajność ekstrakcji (%) n=3 Mean recovery of extraction n=3				
	Metoda GLC GLC method		Metoda HPLC HPLC method		Ekstrakcja klasyczna Classic extraction pH = 12 CHCl ₃	Ekstrakcja klasyczna Classic extraction pH = 12 ETER	ABSELUT NEXUS VARIAN	Strata C 18 E Pheno menex	BOND LRC VARIAN
	R	$S_r = \frac{s \cdot 100}{x}$	R	$S_r = \frac{s \cdot 100}{x}$					
FELODYPINA	0,9971	9,74	0,9999	3,35	46,6	4,3	29,1	99,6	87,2
AMLODYPINA	-	-	0,9998	2,36	7,6	0,7	30,3	24,7	55,5
NISOLDYPINA	0,9749	2,48	0,9999	7,14	44,1	3,6	27,2	67,0	47,8
NIKARDYPINA	-	-	0,9999	2,42	12,1	2,1	22,2	69,0	65,8
NIMODYPINA	0,9977	4,83	0,9997	4,09	39,0	4,2	39,1	81,9	62,4
ISRADYPINA	0,9833	6,10	0,9998	1,32	55,3	4,5	39,6	83,9	65,5
NIFEDYPINA	0,9836	4,34	0,9979	4,28	60,9	2,1	45,7	82,9	61,2
NIWALDYPINA	0,9707	2,14	0,9997	4,69	49,6	2,8	26,1	73,8	78,7
NITRENDYPINA	0,9947	2,36	0,9954	4,72	26,8	2,4	30,9	58,6	69,6

Uzyskane wyniki badań (tabela IV) wskazują na szerokie możliwości oznaczania badanych pochodnych, w zakresie poziomów terapeutycznych (terapia monitorowana), odbiegających znacząco od najczęściej spotykanych w toksykologii sądowej wyższych zakresów poziomów toksycznych czy śmiertelnych.

Tab. IV. Wyniki analizy wybranych brokerów kanału wapniowego ich zakresy stężeń we krwi.

Tab. IV. Analytical results of selected calcium channel blockers and their concentration range in blood.

Badany przypadek Examined case	Podany broker kanału wapniowego Administered calcium channel blocker	Leki wspomagające Adjuvant drugs	Poziom blokeru kanału wapniowego Level of blocker channel (mg/dL)
M.K. I. 56 ♀	NITRENDYPINA 2x 20 mg	ENARENAL	7.61
M.G. I. 47 ♂	NITRENDYPINA 2 x 20 mg	ATENOLOL	5.68
P.M. I. 63 ♀	NITRENDYPINA 2 x 20 mg	INDAPEN	5.41
D.W. I. 48 ♂	NITRENDYPINA 2 x 20 mg	ATENOLOL	5.15
D.J. I. 56 ♀	NITRENDYPINA 2 x 20 mg	SECTRAL	4.17
D.A. I. 48 ♀	NITRENDYPINA 2 x 20 mg	INDAPEN	2.56
W.B. I. 48 ♀	NITRENDYPINA 2 x 20 mg	DOVAX	2.39
S.A. I. 42 ♂	NITRENDYPINA 2 x 20 mg	INDAPEN	2.29
B.P. I. 52 ♂	NITRENDYPINA 2 x 20 mg	-	2.49
B.L. I. 52 ♂	NITRENDYPINA 2 x 10 mg	-	2.05
L.Z. I. 58 ♂	AMLODYPINA 2 x 5 mg	-	1.05
A.G. I. 55 ♂	AMLODYPINA 2 x 10 mg	-	2.17

Opracowana metoda umożliwiła równoczesną analizę wybranych pochodnych 1,4-dihydropirydyny w układzie monoterapii, jak również w często stosowanych złożonych układach terapeutycznych polipragmazji.

WNIOSKI:

- Szerokie stosowanie leków z grupy pochodnych 1,4-dihydropirydyny wymaga odpowiednich metod analitycznych, przydatnych w monitorowanej terapii oraz w diagnostyce chemicznej zatruc w toksykologii klinicznej i sądowej.
- Równoczesną analizę jakościowo-ilościową wybranych pochodnych 1,4-dihydropirydyny, obok innych leków stosowanych w terapii schorzeń układu krążenia w materiale biologicznym (krew), można dokonać przy użyciu metod chromatografii gazowej (GLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).
- Ocena porównawcza walidacyjnych parametrów kalibracyjnych (specyficzność, dokładność, czułość i precyzja) wyróżnia metodę HPLC, jako bardziej przydatną w analizie pochodnych 1,4-dihydropirydyny w materiale biologicznym.
- Efektywne parametry izolacji (wydajność, czystość ekstraktów, szybkość wykonania) badanych związków wskazują na preferencyjne użycie stałych faz ekstrakcyjnych (Abse-lut Nexus, Strata C 18 E, BOND ELUT LRC) w porównaniu z klasyczną metodą ekstrakcji typu ciecz/ciecz.
- Opracowana metoda analizy jakościowo-ilościowej wybranych pochodnych 1,4-dihydropirydyny może być przydatna w rutynowej diagnostyce materiału dowodowego (postacie farmaceutyczne leku), terapii monitorowanej poziomu leku, jak również w typowych przypadkach zatruc diagnozowanych w laboratoriach toksykologii klinicznej i sądowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Cosby S. K., Carson D. J. L.: A fatal case of amlodipine poisoning. *J. Anal. Tox.*, 1997, 21, 221-222.
2. Chen X., Zhong D., Yang H., Luan K., Xu H.: Quantitative determination of nitrendipine and its metabolite dehydronitrendipine in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.*, 2001, 15, 518-24.
3. Dru J. D. Y., Hsieh J. Y. K., Matuszewski B. K., Drobinska M. R.: Determination of felodipine, its enantiomers and a pyridinemetabolite in human plasma by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chrom.*, 1995, 666-259-267.
4. Fernandes C. M., Veiga F. J.: A simple method for nifedipine hydrochloride quantification in pla-

sma using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Bio-medical Chrom.*, 2003, 17, 33-38.

5. Fu C. J., Mason W. D.: A simplified method for determination of nifedipine in human plasma by high performance liquid chromatography. *Anal Letters*, 1989, 22, 2985-3002.

6. Grundy J. S., Kherani R., Foster R. T.: Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for nifedipine in human plasma utilising ultraviolet detection. *J. Chrom. B.*, 1994, 654, 146-151.

7. Koch A. R., Bogalaers D. P., Decruyenare J. M. et. al.: Fatal intoxication with amlodipine. *Clin. Tox.*, 1995, 33, 253-256.

8. Kovats E.: Gaschromatographische charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: retention indices apliphatischer halogenide, alcohole, aldehyde, und ketone. *Hell, Clin. Acta*, 1958, 41 1915-1930.

9. Lasko L. Miller A., Yeager R., Chatterji D.: Rapid GC method for quantitation of nifedypine in serum using electron capture detection. *J. Chrom. Sci*, 1983, 21 415-419.

10. Lopez J. A., Martinez V., Alonso R. M., Jimenz R. M.: High-performance liquid chromatography with amperometric detection applied to the screening of 1,4-dihydropyridines in human plasma. *J. Chrom.*, 200, 780, 105-114.

11. Martens J., Banditt P., Mayer F. P.: Determination of nifedypine in human serum by gas chromatography mass spectrometry. *J. Chrom. B.*, 1994, 660, 297-302.

12. Maurer H., Arlt J.: Screening procedure for detection of dihydropiridine calcium channel blocker metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic compounds by gas chromatography mass spectrometry after extractive methylation. *Journal of Anal. Toxicol.*, 1999, 23, 73-80.

13. Pandya K. K., Milan S., Gandhi T. P., Modi J. A., Chakravarthy B. K.: Detection and determination of total amlodipine by high-performance thin-layer chromatography: a useful technique for pharmacokinetic studies. *J. Chrom. B.* 1995, 667, 315-320.

14. Rossel M. T., Bogaert M. G., Huyghens: Determination of the calcium antagonist nimodipine in plasma by capillary gas chromatography and nitrogen detection. *J. Chrom.*, 1990, 533, 224-228.

15. Roseel M. T., Bogaert M. G.: Determination of the calcium antagonist nimodipine in plasma by capillary gas chromatography and nitrogen detection. *J. Chrom.B.*, 1990, 533, 224-228.

16. Sheridan M. E., Clarke G. S., Robinson M. L.: Analysis of nifedypine in serum using solid phase extraction and liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1989, 7, 519-522.

17. Shimooka K., Sawada, Tatematsu H.: Analysis of amlodipine in serum by a sensitive high performance liquid chromatographic method with amperometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1989, 7, 1267-1272.

18. Thongnopnua P., Kiwatwongsa T.: Quantitative analysis of nifedipine in plasma by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1994, 12,119-125.

19. Van Harten J., Lodewijks M. T., Guyt-Scholten J.W.: Gas chromatographic determination of nifedipine and one of its metabolites in plasma. *J. Chrom.* 1987, 423, 327-333.

20. Watari N., Mizumura J., Higuchi S.: Simultaneous micro determination of nifedipine in plasma using high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 1987, 420, 439-444.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM
ul. Świącickiego 6
60-781 Poznań