

Ewa Pufal, Marzena Sykutera

Wykorzystanie chromatografii cieczowej z detektorem masowym (LC/MS) do oznaczania leków przeciwdepresyjnych we krwi*

Application of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) to determine antidepressants in blood samples

Z Katedry Medycyny Sądowej UMK w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

W pracy przedstawiono metodę oznaczania dwunastu leków przeciwdepresyjnych (amitryptyliny, chlorpromazyny, klomipraminy, doksepinu, fluoksetyny, lewomepromazyny, maprotyliny, paroksetyny, perazyny, promazyny, sertraliny, tiorydazyny) we krwi z użyciem chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią masową (LC/MS). Badane związki ekstrahowano z próby krwi za pomocą acetonitrylu. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę acetonitrylu i 0,1%TFA w wodzie (50:50 v/v) z przepływem 0,4 ml/min. Analizę prowadzono w trybie monitorowania pozornych jonów molekularnych [MH⁺] charakterystycznych dla analizowanych związków. Opracowaną metodę zastosowano do analizy próbek rzeczywistych pobranych od czterech osób, których zgon nastąpił wskutek samobójstwa przez powieszenie.

A simultaneous determination of twelve antidepressant drugs (amitriptyline, chlorpromazine, clomipramine, doxepin, fluoxetine, levomepromazine, maprotiline, paroxetine, perazine, promazine, sertraline, thioridazine) in blood samples was developed using high-performance liquid chromatography with mass spectrometry (LC/MS). Blood samples were extracted with acetonitrile and separated by HPLC on a reversed phase C18 column with a mobile phase consisting of

acetonitrile – 0.1% trifluoroacetic acid (50:50 (v/v) at a flow-rate of 0.4 ml/min. The analytes were determined using electrospray ionization in a single quadrupole mass spectrometer. LC-ESI-MS was performed in the selected-ion monitoring (SIM) mode using target ions. The validated method was successfully used to analyze antidepressants in blood samples collected from four victims of suicide by hanging.

Słowa kluczowe: leki przeciwdepresyjne, krew, LC/MS

Key words: antidepressants, blood samples, determination, LC/MS

WSTĘP

Ze względu na uwarunkowania społeczne i kulturowe współczesnego świata coraz więcej ludzi cierpi na depresję. Dlatego też wzrasta popularność leków antydepresyjnych. Jak informują statystyki, równoległe do wzrostu popytu na owe leki w ostatnich latach, obserwuje się stale wzrastającą liczbę zgonów w wyniku zatruć spowodowanych użyciem tych substancji. Ponadto odnotowuje się większą liczbę przypadków zgonów samobójczych, które często dotyczą osób dotkniętych depresją, osób leczonych przez dłuższy czas lekami przeciwdepresyjnymi. Zgo-

* Badania zostały sfinansowane przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu w ramach grantu UMK 36/2008 (Collegium Medicum).

ny te nie zawsze następują w wyniku celowego spożycia tych leków w dawkach śmiertelnych. Częste są przypadki, w których osoby te popełniają samobójstwo będąc pod wpływem leków lub wtedy, gdy leków nie przyjmują pomimo wskazań lekarskich.

Ważnym etapem w opiniowaniu o przyczynie zgonu jest analiza toksykologiczna zmierzająca do detekcji, identyfikacji i oznaczenia ilościowego leków we krwi pobranej w czasie sekcji zwłok. Możliwość oznaczenia leków w materiale biologicznym dzięki czułym i selektywnym metodom analitycznym, takim jak spektrometria mas w sprzężeniu z chromatografią cieczą (LC/MS), pozwala ocenić czy dana osoba zażyła lek bądź kilka leków przed śmiercią, co sprawia, że dany przypadek postrzega się w szerszym aspekcie medyczno-sądowym.

Jak wynika z danych literaturowych chromatografia cieczą, w połączeniu z detekcją mas, jest wykorzystywana do oznaczania poszczególnych leków przeciwdepresyjnych w materiale biologicznym [1-8]. Jednakże opracowane metody analityczne dotyczą głównie oznaczania tych leków w surowicy, osoczu, moczu czyli materiale biologicznym pobieranym od osób żywych. Nieliczne są jednak publikacje dotyczące oznaczania leków przeciwdepresyjnych w materiale biologicznym pobieranym w czasie sekcji zwłok tj. krew pełna czy wycinki narządów wewnętrznych. Ponadto w publikacjach tych przedstawiane są metody ukierunkowane, czyli metody oznaczania jednego, wybranego leku. W toksykologii sądowej metody te są przydatne wówczas, gdy znane są okoliczności zgonu i prowadzona jest analiza ukierunkowana. W sytuacji gdy brak jakichkolwiek informacji konieczne jest przeprowadzenie badań wielokierunkowych. W związku z tym, że materiał przekazywany do badań toksykologicznych niejednokrotnie jest dostarczany w niewielkiej ilości, istnieje potrzeba opracowania metody analitycznej pozwalającej na oznaczenie w jednym toku analitycznym więcej niż jednego leku.

Mając na uwadze powyższe, celem niniejszej pracy było opracowanie metody oznaczania wybranych leków przeciwdepresyjnych opartej na wykorzystaniu chromatografii cieczą (LC) sprzężonej ze spektrometrią mas (MS). Badaniem objęto wybrane leki z grupy fenotiazyn (chloropromazyna, levomepromazyna, perazy-na, promazyna, tiorydazyna), trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (amitryptylina, doksepina, klomipramina, maprotylina) oraz selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny (fluoksetyna, paroksetyna, sertralina).

MATERIAŁ I METODY

Substancje wzorcowe i odczynniki

Metanolowe roztwory wzorcowe leków przeciwdepresyjnych (amitryptylina, chloropromazyna, doksepina, fluoksetyna, klomipramina, levomepromazyna, maprotylina, paroksetyna, perazy-na, promazyna, sertralina, tiorydazyna) o stężeniu 1 mg/ml pochodziły z firmy Cerilliant (LGC Promochem, Warszawa, Polska). Acetonitryl, TFA, metanol, chloroform pochodziły z firmy Sigma Aldrich (Warszawa, Polska).

Materiał

Do opracowania metody użyto krew wolną od analitów (krew kontrolna), do której dodawano analizowane leki przeciwdepresyjne w ściśle określonym stężeniu, które dobierano biorąc pod uwagę zakres stężeń terapeutycznych tych leków we krwi.

Ekstrakcja

Do wyosabniania leków przeciwdepresyjnych będących przedmiotem badań zastosowano ekstrakcję ciecz-ciecz. Jako wzorzec wewnętrzny użyto temazepam. Do ekstrakcji użyto 3 ml krwi zawierającej analizowane leki w stężeniach po 100 ng/ml każdy. Ekstrakcję prowadzono z użyciem acetonitrylu (6 mL) w łaźni ultradźwiękowej przez 30 minut. Warstwę organiczną oddzielono, rozpuszczalnik organiczny odparowano do sucha w strumieniu azotu, suchą pozostałość rozpuszczono w 0,5 ml metanolu. Ekstrakt podawano na kolumnę z zastosowaniem automatycznego podajnika próbek.

Aparatura

Analizę przeprowadzono metodą chromatografii cieczą sprzężonej ze spektrometrią mas (LC/MS) przy zastosowaniu aparatu firmy Agilent Technologies serii 1100. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę acetonitrylu i 0,1% TFA w wodzie (50:50 v/v) z przepływem 0,4 ml/min w temperaturze 25°C. Parametry detektora masowego: napięcie fragmentora 70 V, napięcie kapilary 4 kV, temperatura N₂ 350°C, ciśnienie nebulizera 30 psi, przepływ gazu suszącego N₂ 10 l/min. Analizę prowadzono w trybie monitorowania pozornych jonów molekularnych [MH⁺] charakterystycznych dla analizowanych związków. Parametry chromatograficzne oznaczanych związków przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Parametry chromatograficzne analizowanych leków przeciwdepresyjnych.

Table I. Chromatographic parameters of the analyzed antidepressant drugs.

Lek przeciwdepresyjny Antidepressants	Czas retencji [min] Retention time	Monitorowany jon [m/z] Ion monitoring
Amitryptylina	6,3	278
Doksepina	5,0	280
Klomipramina	7,7	315
Chloropromazyna	7,2	319
Promazyna	5,5	285
Levomepromazyna	6,3	329
Perazyna	4,3	340
Tiorydazyna	9,4	371
Maprotylina	5,9	278
Paroksetyna	5,2	330
Fluoksetyna	6,4	310
Sertralina	7,0	306
Temazepam (IS)	9,0	301

Krzywe kalibracyjne

Krzywe kalibracyjne dla poszczególnych związków sporządzono przez dodawanie ana-

litów do krwi (krew nie zawierała związków będących przedmiotem badań), w takiej ilości, aby otrzymane stężenia wynosiły odpowiednio 1; 10; 50; 100; 500 ng/ml. Krzywe kalibracyjne wykreślono wyznaczając stosunki pól powierzchni pików wzorca i wzorca wewnętrznego w funkcji stosunku znanych stężeń wzorca i wzorca wewnętrznego.

Walidacja metody

Wszystkie obliczenia zostały wykonane przy zastosowaniu stałej kontroli metody wzorcem wewnętrznym (IS – temazepam). Granice wykrywalności (LOD), granice oznaczalności (LOQ) dla poszczególnych związków przedstawiono w tabeli II. Precyzję w seriach wewnątrz- i międzygrupowych wyrażoną w RSD obliczono na podstawie serii pięciu powtórzeń (n=5) analiz prób krwi zawierających mieszaninę analizowanych leków przeciwdepresyjnych o stężeniu 100 ng/ml. Serie powtarzano w ciągu trzech dni (p=3). Stężenie leków dobrano ze względu na wysokość stężeń terapeutycznych. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli II.

Tabela II. Parametry walidacyjne metody oznaczania leków przeciwdepresyjnych we krwi.

Table II. Validation parameters of the method of determining antidepressants in blood samples.

Lek przeciwdepresyjny Antidepressant drugs	R ²	LOD ng/ml	LOQ ng/ml	Wydajność ekstrakcji Extraction recovery [%]	CV _{wg} [%]	CV _{mg} [%]	Zakres stężeń terapeutycznych [6, 9] Therapeutic range [ng/ml]
Amitryptylina	0,993	1	20	79	3,4	10,8	80-200
Doksepina	0,999	2	10	80	4,1	8,2	50-150
Klomipramina	0,997	2	10	86	3,9	6,1	175-450
Chloropromazyna	0,953	5	10	92	5,6	11,6	30-300
Promazyna	0,999	5	10	85	3,1	8,6	100-400
Levomepromazyna	0,987	2	5	88	4,8	12,0	10-140
Perazyna	0,990	5	10	83	4,3	8,2	20-340
Tiorydazyna	0,999	5	10	89	1,2	6,2	50-200
Maprotylina	0,992	1	5	75	5,4	8,2	10-320
Paroksetyna	0,990	5	10	87	1,7	10,3	70-120
Fluoksetyna	0,971	10	20	95	2,3	7,2	150-500
Sertralina	0,989	5	10	76	5,8	8,2	20-250

Wyniki i ich omówienie

Właściwe parametry walidacji metody pozwoliły na zastosowanie jej do oznaczania leków przeciwdepresyjnych, takich jak chloropromazyna, promazyna, levomepromazyna, perazyna, tiorydazyna, amitryptylina, doksepina, klomipramina, maprotylina, fluoksetyna, paroksetyna, sertralina, we krwi.

W niniejszej pracy do ekstrakcji leków z próby krwi zastosowano acetonitryl. Wydajność ekstrakcji wyrażoną w [%] dla każdego leku z krwi przedstawiono w tabeli II. Średni odzysk badanych związków z krwi wynosił od 75% dla maprotyliny do 95% dla fluoksetyny.

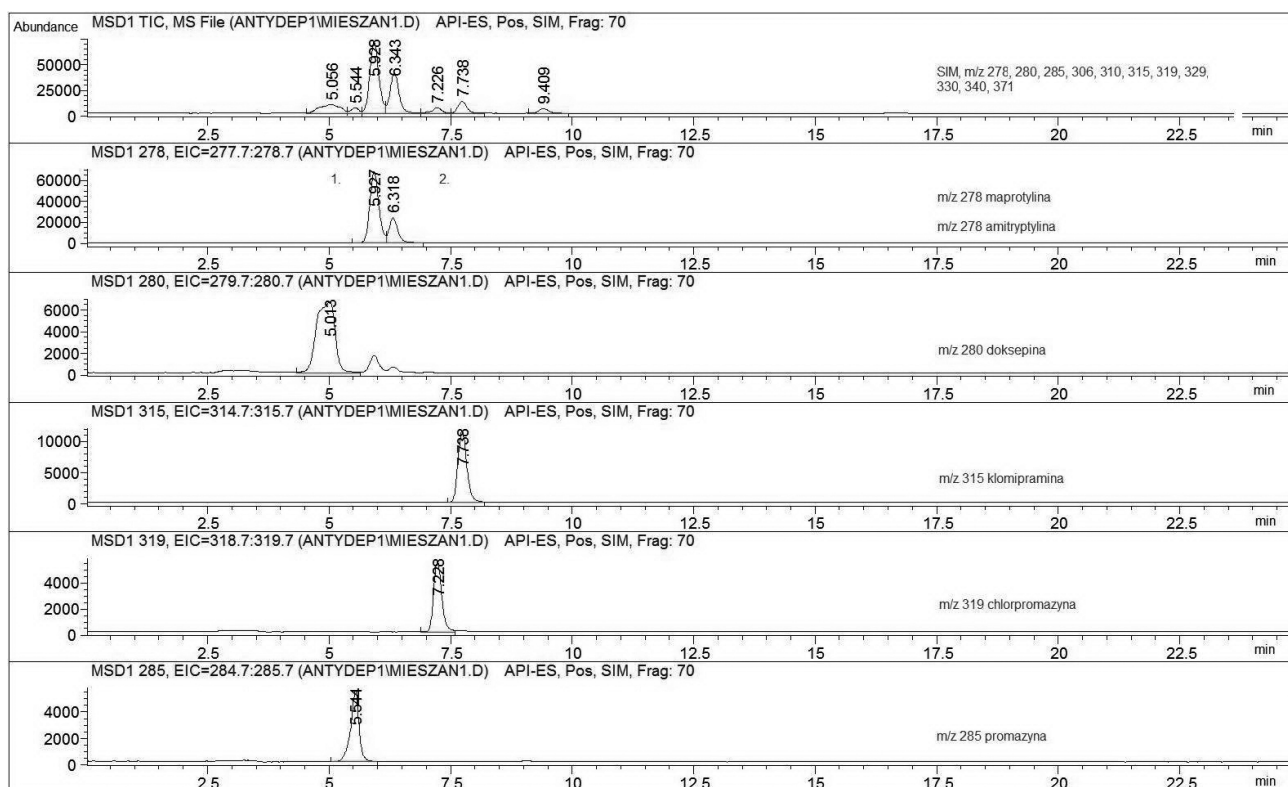
Jak wynika z danych literaturowych, acetonitryl został użyty również przez Kirchherr i Kühn-Velten

[6] do izolacji 48 leków przeciwdepresyjnych i antypsychotycznych z surowicy. Porównując wartości odzysku leków z surowicy, uzyskane przez Kirchherr i Kühn-Velten z otrzymanymi w niniejszej pracy wartościami odzysku leków z próby krwi, można stwierdzić, że tylko dla fluoksetyny otrzymano taką samą wydajność ekstrakcji (95%) zarówno

z surowicy jak i z krwi. W przypadku pozostałych leków, uzyskana przez tych autorów wydajność ekstrakcji z surowicy była wyższa, niż wydajność ekstrakcji omawianych leków z próby krwi. Jak podają autorzy [6] wydajność ekstrakcji z surowicy wynosiła od 95% dla klomipraminy i maprotyliny do 104% dla amitryptyliny i paroksetyny.

Ryc. 1. Chromatogramy masowe otrzymane w wyniku analizy próby krwi zawierającej 12 leków przeciwdepresyjnych.

Fig. 1. Mass chromatograms obtained following the analysis of a spiked blood sample with 12 antidepressant drugs.

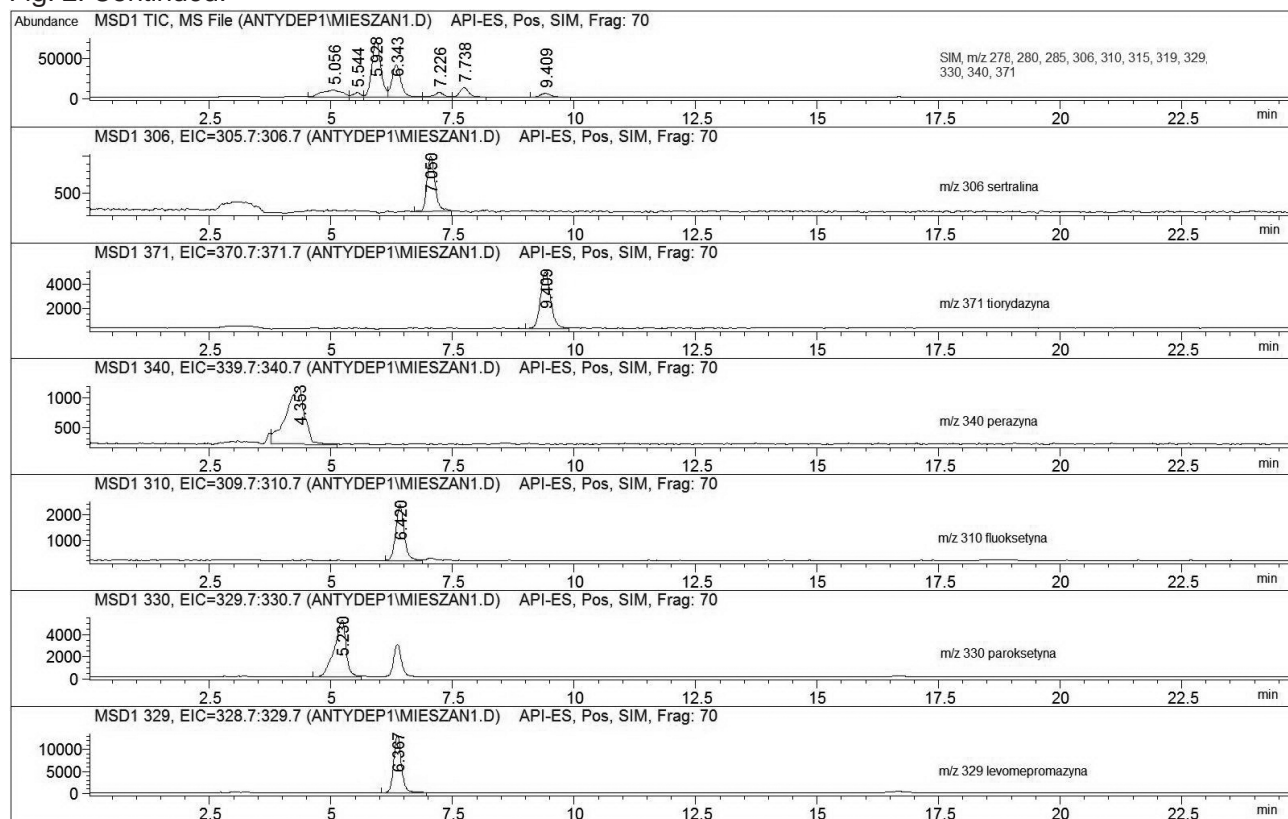


Gutteck i Rentsch [7] opisali izolację 13 leków przeciwdepresyjnych i 5 neuroleptyków, w tym amitryptyliny, klomipraminy, tiorydazyny i doxepinu, z surowicy z wykorzystaniem mieszaniny n-heksanu i dichlorometanu (4:1). Przedstawiona przez autorów wydajność ekstrakcji amitryptyliny z surowicy wynosiła 79% i była taka sama jak wydajność ekstrakcji z użyciem acetonitrylu z próby krwi, otrzymana podczas realizacji niniejszej pracy. Wydajność ekstrakcji dla klomipraminy, tiorydazyny i doxepinu z surowicy z wykorzystaniem mieszaniny n-heksanu i dichlorometanu (4:1), uzyskana przez Gutteck i Rentsch, mieściła się w granicach 60-73% i była niższa niż wartości otrzymane w przypadku ekstrakcji tych leków acetonitrylem z próby krwi, co było przedmiotem badań w tej pracy.

Badania liniowości otrzymanych krzywych kalibracyjnych wykazały, że we wszystkich przypadkach ich współczynnik determinacji był wyższy niż 0,95 w badanym zakresie stężeń. Granice detekcji (LOD) dla analizowanych leków wynosiły od 1 ng/ml dla maprotyliny i amitryptyliny do 10 ng/ml dla fluoksetyny. Wyznaczone precyzje w seriach wewnątrz grupowych nie przekraczały 5,8%, natomiast precyzje w seriach międzygrupowych dla poszczególnych analizowanych związków nie były wyższe niż 11,6%.

Chromatogramy obrazujące rozdział badanych leków dla wybranych jonów, uzyskane podczas analizy próby krwi zawierającej analizowane leki przeciwdepresyjne, przedstawiono na rycinach 1 i 2.

Ryc. 2. Kontynuacja.
Fig. 2. Continued.



Opracowaną metodę zastosowano do analizy próbek rzeczywistych pobranych od 4 osób, których zgon nastąpił wskutek samobójstwa przez powieszenie. Z podanych informacji wynikało, że osoby te mogły przyjmować leki przeciwdepresyjne. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli III. Wartości stężeń leków oznaczonych we krwi nie przekraczały stężeń terapeutycznych.

Tab. III. Stężenie leków przeciwdepresyjnych we krwi pobranej od osób, których zgon nastąpił wskutek samobójczej śmierci przez powieszenie.

Tab. III. Concentration of antidepressant drugs in blood samples taken from victims of suicide by hanging.

Przypadek Case	Nazwa leku Drug	Stężenie we krwi [ng/ml] Concentration in blood
Przypadek 1 Case 1	Chlorpromazyna	92
Przypadek 2 Case 2	Tiorydazyna Amitryptylina	96 45
Przypadek 3 Case 3	Chlorpromazyna	274
Przypadek 4 Case 4	Chlorpromazyna Amitryptylina	295 27

WNIOSKI

1. Przedstawiona w pracy prosta i szybka metoda izolacji wybranych leków przeciwdepresyjnych, z próby krwi z użyciem acetonitrylu, daje zadowalające wartości odzysku (powyżej 75%).
2. Opracowana metoda oznaczania wybranych leków przeciwdepresyjnych we krwi, z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem masowym (LC/MS), pozwala na wykrycie tych związków na poziomie 1 ng/ml w przypadku amitryptyliny i maprotyliny, 2 ng/ml w przypadku doksepiny, klomipraminy, levomepromazyny, 5 ng/ml w przypadku chlorpromazyny, promazyny, perazyny, tiorydazyny, sertraliny i paroksetyny oraz 10 ng/ml dla fluoksetyny.
3. Zaprezentowaną w niniejszej pracy metodę można rutynowo stosować do oznaczeń jakościowych i ilościowych chlorpromazyny, promazyny, levomepromazyny, perazyny, tiorydazyny, amitryptyliny, doksepiny, klomipraminy, maprotyliny, fluoksetyny, paroksetyny, sertraliny we krwi.

PIŚMIENICTWO

1. Shinozuka T., Terada M., Tanaka E.: Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS. *Forensic Sci. Int.* 2006, 162, 108-112.

2. Müller C., Vogt S., Goerke R., Kordon A., Weinmann W.: Identification of selected psychopharmaceuticals and their metabolites in hair by LC/ESI-CID/MS and LC/MS/MS. *Forensic Sci. Int.* 2000, 113(1-3), 415-421.

3. Juan H., Zhiling Z., Huande L.: Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005, 820(1), 33-39.

4. Unceta N., Gomez-Caballero A., Sanchez A., Millan S., Sampedro CM., Goicolea MA., Salles J., Barrio R. J.: Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *J Pharmaceutical Biomed. Anal.* 2008, 46, 763-770.

5. Singh S. S., Shah H., Gupta S., Jain M., Sharma K., Thakkar P., Shah R.: Liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry method for the determination of escitalopram in human plasma and its application in bioequivalence study, *J Chromatogr. B*

Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2004, 811(2), 209-215.

6. Kirchherr H., Kühn-Velten W. N. J.: Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level, single-sample approach. *Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2006, 843(1), 100-113.

7. Gutteck U., Rentsch K. M.: Therapeutic drug monitoring of 13 antidepressant and five neuroleptic drugs in serum with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41(12), 1571-1579.

8. Castro A., Fernandez M. R., Laloup M., Samyn N., Boeck G., Wood M., Maes V., Rivadulla M. L.: High-throughput on-line solid-phase extraction-liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 14 antidepressants and their metabolites in plasma. *J Chromatogr. A.* 2007, 1160, 3-12.

9. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B.: *Clark's analysis of drugs and poisons.* Pharmaceutical Press, London, Chicago, 2004.

Adres do korespondencji:
Katedra Medycyny Sądowej
UMK w Toruniu Collegium Medicum w Bydgoszczy
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz
Tel. 052 585 35 52