

El antidepresivo amitriptilina en suero: extracción, análisis y cuantificación en serie por cromatografía líquida de alta presión

Ma. de la Luz Navarro*
Miguel Angel Santini*
Araceli Guameros*
Ma. del Carmen Lara*
Juan Ramón de la Fuente*
Alejandro Bayón*

Abstract

In this work we present an "on line" HPLC method for the extraction, separation and measurement of amitriptyline and nortriptyline in serum. The precolumn used was packed with Corasil/Bondapack, C18 support and the analytical column was a μ -Bondapack C18; the mobile phase giving the best results (resolution) was triethylamine 30 mM pH 5/Acetonitrile (67/33). Doxepin was used as an internal standard. The sensitivity of the method was better than 10 ng/injection and interassay variation was 4.3% for amitriptyline.

This method, although slightly more expensive than those using batch extraction procedures is faster and more reproducible, allowing the automatization of the analysis.

Resumen

Se presenta un método para la determinación por cromatografía líquida de alta presión del antidepresivo tricíclico amitriptilina y su metabolito nortriptilina, en suero, empleando doxepina como estándar interno.

La purificación de la muestra se lleva a cabo haciéndola pasar por una precolumna montada en el sistema cromatográfico. El soporte cromatográfico empleado es C18 y la fase móvil es trietilamina 30 mM pH 5/ACN (67/33). La sensibilidad obtenida es de menos de 10 ng por inyección y el coeficiente de variación intraensayo para suero es de 4.3% para amitriptilina.

El método presentado aquí, aunque resulta ligeramente más costoso que los procedimientos tradicionales de extracción, es más rápido y más reproducible, permitiendo la automatización del análisis.

Introducción

Los antidepresivos tricíclicos han sido ampliamente empleados en la práctica psiquiátrica para el tratamiento de la depresión endógena. Sin embargo, y debido en gran medida a las variaciones interindividuales de los procesos farmacocinéticos a los que están sometidos estos medicamentos, la respuesta clínica presenta amplias variaciones. Se ha propuesto que esta respuesta se encuentra más correlacionada con los niveles plasmáticos de estos fármacos que con la dosis ingerida. De hecho se sugiere que los niveles en sangre proporcionan un indicador exacto y útil para la dosificación de cada paciente⁽¹⁹⁾.

*Unidad de Desarrollo de Técnicas Analíticas para la Investigación en Psiquiatría y Neuroquímica IMP-UNAM e Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

En condiciones terapéuticas la concentración de estos medicamentos en el plasma es baja, en el intervalo de 20 a 500 μ g/ml⁽¹⁾. Para la medición de estos niveles se han empleado métodos como dilución isotópica⁽¹⁰⁾ y radio-inmunoanálisis⁽²¹⁾ que implican trabajar con material radiactivo y la necesidad, en el caso del radio-inmunoanálisis, de contar con los anticuerpos específicos para cada compuesto. Un método sensible y específico para la medición de los antidepresivos tricíclicos está dado por el acoplamiento de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas^(4,7); sin embargo, este método es caro y no se encuentra fácilmente a disposición. También se ha empleado la cromatografía de gases con detectores específicos, como el Detector de Nitrógeno/Fósforo^(2, 5, 6) o el Detector de Captura de Electrones en combinación con la formación de derivados halogenados^(11, 12, 13). La cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) con detección por absorción en el ultravioleta, elimina la necesidad de formación de derivados para la detección de los antidepresivos tricíclicos y permite la determinación de metabolitos no volátiles^(3, 8, 14, 15, 20, 23, 24).

Exceptuando la dilución isotópica y el radioinmunoanálisis, todos los otros métodos mencionados requieren uno o varios pasos de purificación previos al empleo del sistema cromatográfico, ya sea que se trate de extracciones a varios pH^(2, 7, 11, 20), del paso de la muestra a través de una columna de celulosa^(12,13) o bien del empleo de pequeñas columnas empacadas comercialmente como Sep-pak o Bon-elut C18^(3, 18).

La mayoría de los autores que emplean CLAP usan columnas de sílica, cuyo empleo rutinario resulta problemático; sólo algunos autores emplean columnas de fase reversa C18^(8, 20) C8⁽¹⁶⁾ o CN⁽¹⁵⁾.

El método que aquí describimos contempla la purificación en serie de la muestra (suero), mediante el uso de una precolumna que además la concentra; posteriormente los antidepresivos se separan en una columna de fase reversa. Empleando este método, el suero sólo necesita filtrarse para evitar posibles obstrucciones en la precolumna o en la columna analítica, antes de ser introducido al sistema cromatográfico. Este método fue optimizado para emplearse en la determinación de amitriptilina (AMT) y nortriptilina (NT) usando doxepina como estándar interno.

Desarrollo Metodológico y Experimental

Material y equipo

Se empleó un Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (Waters Ass.) compuesto por los siguientes módulos: dos bombas, una de ellas modelo 510 y la otra modelo M45, un inyector universal modelo U6K, un detector de ultravioleta de longitud de onda variable modelo 490, una unidad de control y programación de flujos modelo 680 AGC, un módulo de datos modelo 730 y las columnas μ -Bondapack C18 (3.9 mm X 30 cm) y μ -Bondapack CN (3.9 mm X 30 cm), también de Waters Ass.

El acetonitrilo (ACN) y el metanol (MeOH) —ambos grado HPLC— que se emplearon, así como la trietilamina (TEA), se obtuvieron de Merck; el fosfato de sodio monobásico se obtuvo de Sigma Chemical Co.; el hidróxido de amonio, el fosfato de sodio dibásico y el ácido fosfórico se obtuvieron de J. T. Baker. Los filtros Millex HV de 0.45 μ m de poro, los Sep-packs C18 y el empaque Corasil/Bondapack C18 se obtuvieron de Millipore. La amitriptilina (AMT) fue obsequiada por los Laboratorios MSD. La nortriptilina (NT) fue donada por los Laboratorios Eli Lilly, y la Doxepina por los laboratorios Ciba Geigy. El agua fue purificada por medio de un equipo de purificación de agua Milly-Q. Todos los solventes empleados fueron filtrados a través de membranas de 0.45 o 0.50 μ m de poro. El material de vidrio que se usó fue silanizado⁽⁹⁾.

Montaje experimental

Los módulos de cromatografía de líquidos se dispusieron y conectaron como se muestra en el diagrama de la figura 1. La unidad de control y programación de flujos es capaz de controlar a las dos bombas, a la válvula selectora de solventes y a la válvula selectora de

FIGURA 1

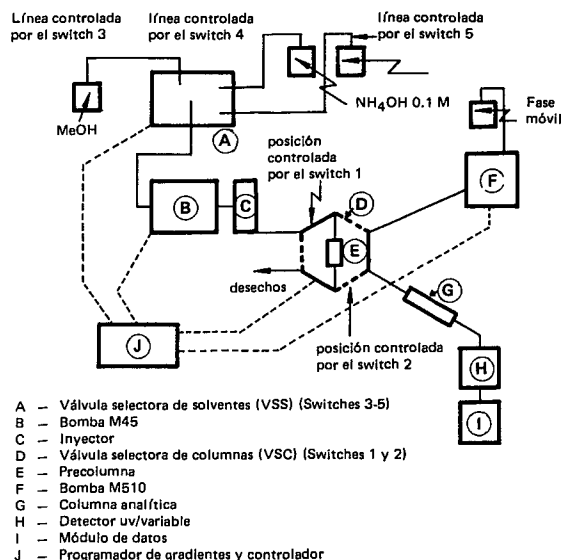


FIGURA 1. Configuración del equipo necesario para la purificación en línea de los antidepresivos tricíclicos.

columnas, permitiendo la programación tanto del porcentaje con que cada bomba contribuye al flujo total, como de la apertura y cerrado de las diferentes válvulas.

El programa empleado, listado en la tabla I, involucra las siguientes acciones: La bomba B alimenta al sistema con la fase móvil, mientras que la bomba A introduce el resto de los solventes. Antes de introducir la muestra al sistema, y hasta el minuto 5 después de su introducción, la bomba A hace pasar NH₄OH 0.1 M por la precolumna, mientras que por la columna analítica está pasando la fase móvil. En estas condiciones se introduce la muestra al sistema, y los antidepresivos

TABLA I

PROGRAMA DE GRADIENTE				PROGRAMA DE EVENTOS			ACCIONES RESULTANTES	
Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%A (M45)	%B (M510)	Switch No.	Acción	Válvula Correspondiente y Acción Involucrada	Bomba A	Bomba B
0.00	4	50	50	4	on	VSS se abre la línea de NH ₄ OH 0.1 M	NH ₄ OH. 0.1 M a 2 ml/min por la precolumna	Fase móvil a 2 ml/min, por la columna principal
0.10				4	off			
5.00	4	50	50			VSS se abre la línea de MeOH/H ₂ O 50/50	MeOH/H ₂ O (50/50) a 5 ml/min, por la precolumna	
5.01	7	71	29	5	on			
5.11				5	off			
7.00	7	71	29			VSC. Se invierte la ruta del flujo (Bomba B alimenta precolumna y columna principal) VSS. Se abre la línea de MeOH	MeOH a 0.5 ml/min, para VSC y al desecho.	Fase móvil a 2 ml/min, por la precolumna y por la columna principal.
7.01	2.5	20	80	2	on			
7.02				3	on			
7.11				2	off			
7.12				3	off			
9.00	2.5	20	80			VSC. Cambia la ruta del flujo a su posición original (Bomba A alimenta a precolumna y Bomba B a columna principal)	MeOH a 3 ml/min por la precolumna	Fase móvil a 2 ml/min por la columna principal
9.01	5	60	40	1	on			
9.11				1	off			
13.00				4	on	VSS se abre la línea de NH ₄ OH 0.1 M	NH ₄ OH 0.1 M a 3 ml/min por la precolumna	
13.10				4	off			

VSS. Válvula selectora de solventes

VSC. Válvula selectora de columnas

se retienen en la precolumna. Al minuto 5 se cierra la línea del NH_4OH y empieza a pasar por la precolumna $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50); esta mezcla eluye parte de los contaminantes del suero. Al minuto 7 cambia la posición de la válvula selectora de columnas y empieza a pasar la fase móvil tanto por la precolumna como por la columna analítica, llevándose a los antidepresivos de la 1a. hacia la 2a. Al minuto 9 cambia nuevamente la posición de la válvula selectora de columnas, y mientras que por la columna analítica continúa pasando la fase móvil, que termina de eluir a los antidepresivos, la precolumna se lava con MeOH hasta el minuto 13 en que empieza a pasar NH_4OH 0.1 M para que la precolumna esté lista para la siguiente inyección.

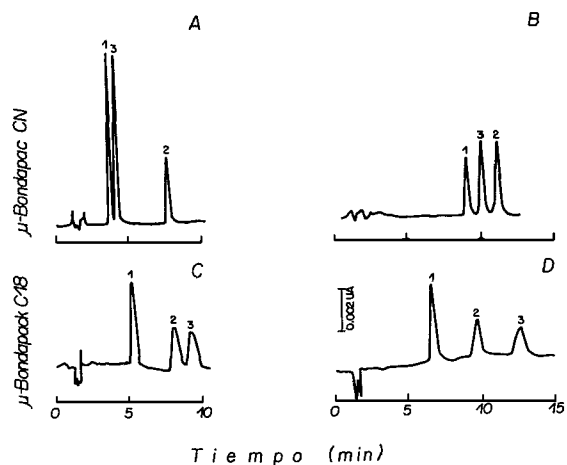


Figura 2. Comparación de la separación de los antidepresivos: 1) doxepina, 2) nortriptilina y 3) amitriptilina.
Fase Móvil
A) $\text{ACN}/\text{MeOH}/\text{Buffer}$ fosfatos 10 mM pH 7 (60/15/25).
B) ACN/Buffer fosfatos 10 mM pH 7 (70/30).
C) ACN/TEA 30 mM pH 4 (33/67).
D) ACN/TEA 30 mM pH 5 (33/67).

*Tamaño de partícula 10 μm
UA. Unidades de absorbancia.

Elección del soporte cromatográfico y del eluyente (fase móvil)

Para la separación de AMT, NT y doxepina (empleada como estándar interno) se probaron dos tipos de fases estacionarias: μ -Bondapack C18 y μ -Bondapack CN.

Para la separación de los antidepresivos se reprodujeron las condiciones reportadas por P. Koteel⁽¹⁵⁾. En estas condiciones la resolución entre AMT y NT no era óptima y sus tiempos de retención no eran lo suficientemente grandes para permitir que eluyeran antes los contaminantes del suero (Fig. 2a.). Se decidió aumentar la polaridad de la fase móvil, obteniéndose así la separación mostrada en la figura 2b, en que aún no se logra una resolución a nivel de línea base.

Para la columna de C18 nos basamos en el método reportado por Millipore⁽⁸⁾; como fase móvil empleamos TEA 30 mM a diferentes pH, mezclada con ACN en varias proporciones. En la figura 2c y 2d se muestran dos combinaciones diferentes. La figura 2d muestra la separación más satisfactoria; además, los tiempos de re-

tención obtenidos dejan espacio para la elución de suero (fig. 6a). Esta fase móvil, TEA 30 mM llevada a pH de 5 con ácido fosfórico y en una proporción de 67 por 33 de ACN, permite además una rápida elución de los antidepresivos de la precolumna (figura 3a y 3b).

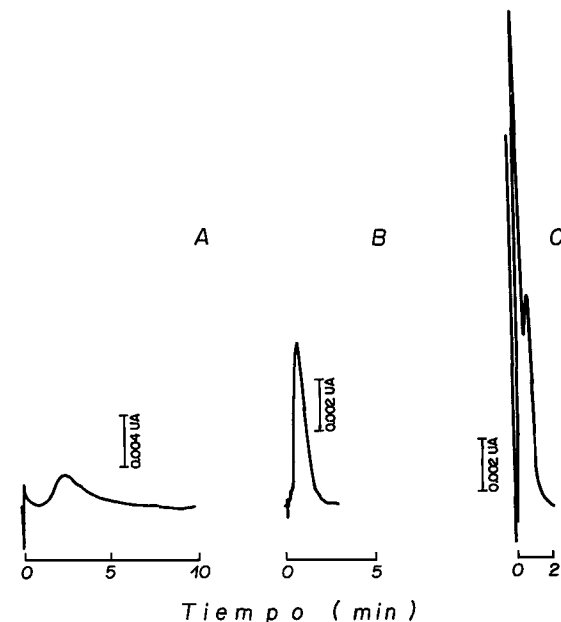


Figura 3. Perfil de elución de los antidepresivos tricíclicos a través de la precolumna.

A) Empaque Sep-pak C18. Fase móvil: ACN/Buffer fosfatos 10 mM pH 7 (70/30). Flujo 2 ml/min.
B) Empaque Sep-pak C18. Fase móvil: ACN/TEA 30 mM pH 5 (33/67). Flujo 2 ml/min.
C) Empaque Corasil/Bondapack C18. Fase móvil: ACN/TEA 30 mM pH 5 (33/67). Flujo 2 ml/min.

UA. Unidades de absorbancia.

Elección de la precolumna

Inicialmente se empleó como empaque el contenido de un Sep-pak C18. Sin embargo, éste, al ser de granulometría relativamente grande (80 μm), no soportaba bien la presión a que era sometido y se fraccionaba llegando a tapar la tubería; para resolver el problema, este empaque se sustituyó por Corasil/Bondapack C18, de granulometría más pequeña (50 μm). Además, este último empaque favorece la separación de los antidepresivos aún en la precolumna. Compárense los perfiles de elución mostrados en las figuras 3b y 3c; en 3b se observa un solo pico, mientras que en 3c ya hay una ligera separación. En cuanto a la capacidad de la precolumna para concentrar la muestra, en las figuras 5a y 5b puede apreciarse que se puede inyectar un ml de muestra sin pérdida de la resolución.

Optimización de los programas de flujos

Cargado de la muestra en la precolumna. Se probaron diferentes tiempos de cargado de la muestra en la precolumna (3, 5 y 7 min.), así como diferentes solventes

de cargado (H_2O y NH_4OH 0.1 M), encontrándose que un tiempo de 5 minutos y una solución de NH_4OH 0.1 M resultaban adecuados.

Elución de la muestra de la precolumna. Cargada la muestra en la precolumna, ésta se somete a un lavado con $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50/50) y posteriormente se le hace pasar la fase móvil (TEA 30 mM, pH 5/ACN 67/33). El tiempo de elución de los antidepresivos de la precolumna, empleando esta fase móvil, es de aproximadamente un minuto (ver figura 3c); para asegurar su completa elución se pasa la fase móvil por la precolumna durante dos minutos y posteriormente se lava con MeOH . Después se le hace pasar NH_4OH 0.1 M para que esté lista para la siguiente inyección (programa mostrado en la tabla I).

FIGURA 4

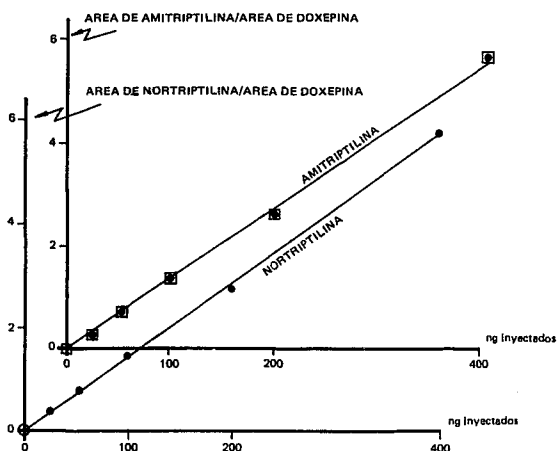


Figura 4. Curvas de calibración para AMT y NT empleando doxepina como estándar interno. Columna μ Bondapak C18. Fase móvil: ACN/TEA 30 mM pH 5 con ácido fosfórico (33/67); vol. de inyección 25 μl , $\lambda = 240$ nm. 0.05 unidades de absorbancia (UA) a escala completa. Flujo 2 ml/min. Las curvas se corrieron empleando el sistema esquematizado en la figura 1 y los programas listados en la tabla I.

Sensibilidad y reproducibilidad del método

En la figura 4 se muestran las curvas de calibración obtenidas para AMT y NT empleando el sistema optimizado descrito en la figura 1 y los programas listados en la tabla I.

Véase que de 10 a 400 ng hay una respuesta lineal del detector y que la recta pasa por el origen, lo que significa que no hay pérdida de los antidepresivos en la columna; esto además se confirma por el hecho de que las muestras fueron inyectadas de menor a mayor concentración y, enseguida, de mayor a menor concentración y no se observó el fenómeno de histéresis. En esta misma figura puede observarse que la sensibilidad es menor a 10 ng.

En la tabla II se muestran los coeficientes de variación intra e interensayo obtenidos para estándares en concentraciones de 50 ng/inyección de AMT y NT y 100 ng/inyección de doxepina.

TABLA II

COEFICIENTES DE VARIACION (%)

	Intraensayo		Interensayo	
	AMT	NT	AMT	NT
En agua*:	3.7-5.7 (n=3)	1.1-4.3 (n=3)	7.9 (n=3)	4.3 (n=3)
En suero:	4.3 (n=4)	3.7 (n=4)		

En todos los casos la cantidad de AMT y de NT es de 50 ng/inyección.

*Los estándares en agua se inyectaron por triplicado en tres ocasiones diferentes.

Resultados obtenidos usando suero humano como vehículo y criterio de especificidad del ensayo

En la figura 6 se muestran los cromatogramas obtenidos con un blanco de suero y con un suero que fue incubado con los estándares de AM, NT y doxepina. Nótese que en el blanco de suero no hay picos que interfieran con la elución de los antidepresivos.

En cuanto a la especificidad del ensayo, nótese que los cromatogramas están obtenidos para dos longitudes de onda: 240 y 214 nm; la relación:

$$\frac{\text{área del pico a 240 nm}}{\text{área del pico a 214 nm}}$$

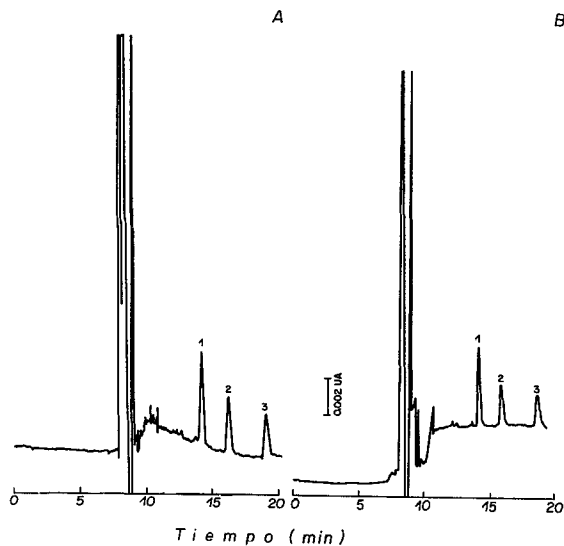


Figura 5. Comparación de los volúmenes de inyección. Las condiciones cromatográficas empleadas son las referidas en la Fig. 4.

A) Inyección de 50 ng de AMT y NT y 100 ng de doxepina en 25 μl .

B) Inyección de 50 ng de AMT y NT y 100 ng de doxepina en 1000 μl .

1) Doxepina, 2) nortriptylina, 3) amitriptylina.

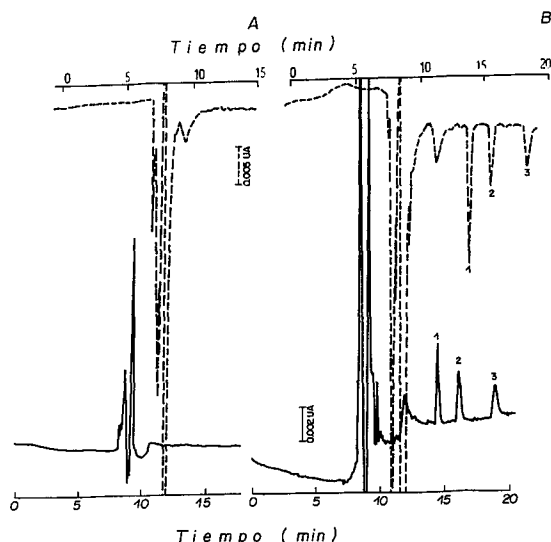


Figura 6. Perfil de elución de AMT, NT y doxepina empleando suero humano como vehículo. Las condiciones cromatográficas son las referidas en la Fig. 4.
A) Inyección de 200 μ l de suero filtrados por un Millex-HV de 0,45 μ m de poro.
B) Inyección de un ml de suero (1:1) incubado 30 min a 37°C con 50 ng de AMT y NT y 100 ng de doxepina, filtrado por un Millex-HV de 0,45 μ m de poro. 1) Doxepina, 2) nortriptilina, 3) amitriptilina.

es un parámetro de identificación y pureza del antidepresivo, ya que ésta es característica del espectro de absorción de cada compuesto.

Conclusiones

El empleo de válvulas para la purificación y análisis en serie de muestras de origen biológico permite la inyección directa de la muestra al sistema sin necesidad de pretratamiento y facilitando la automatización del análisis (17, 22).

El método aquí propuesto representa una herramienta útil para la determinación de AMT y NT en suero. El tiempo total de análisis por muestra es menor de 30 minutos e implica solamente filtrar el suero e introducirlo al sistema cromatográfico. La sensibilidad y variabilidad obtenidas son semejantes a las reportadas por otros autores (6, 23), y permitirán determinar los niveles endógenos de AMT y NT en los pacientes que estén bajo este tratamiento.

REFERENCIAS

1. AMSTERDAM J, BRUNSWICK D, NENDELS J: The clinical application of tricyclic antidepressant pharmacokinetics and plasma levels. *Am J Psychiatry* 137: 653-662, 1980.
2. BAILEY DN, JALTOW PI: Gas chromatographic analysis for therapeutic concentrations of amitriptyline and nortriptyline-plasma with use of a nitrogen detector. *Clin Chem* 22: 777-781, 1976.
3. BEIRLE FA, HUBARD RW: Liquid chromatographic separation of antidepressant drugs: I Tricyclics. *Therapeutic Drug Monitoring* 5: 279-292, 1983.
4. BIGGS J, HOLLAND WH, CHANG S, HIPPS PP, SHERMAN W: Electron beam ionization mass fragmentographic analysis of tricyclic antidepressants in human plasma. *J Pharm Sci* 65: 261-268, 1976.
5. Bulletin 782A Supelco, Inc.
6. DAWLING S, BRAITHWAITE RA: Simplified method for monitoring tricyclic antidepressant therapy using gas-liquid chromatography with nitrogen detection. *J Chromatogr* 146: 449-456, 1978.
7. DUBOIS JP, KUNG W, THEOBALD W, WIRZ B: Measurement of clomipramine in biological fluids by selective ion monitoring and pharmacokinetics of clomipramine. *Clin Chem* 22: 892-897, 1976.
8. FROST BA: QA-1™ Analyzer tricyclic antidepressants method book preliminary manual. Millipore 1984.
9. GARRET ER, HUNT CA: Physicochemical properties, solubility and protein binding of 9 -tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci* 63: 1056, 1974.
10. HAMMER W, BRODIE BB: Applications of isotopic derivative technique to assay of secondary amines: estimates of desipramine acetylation with 3 H-acetic anhydride. *J Pharmacol Exp Ther* 157: 503-507, 1967.
11. HARTVIG P, HANDL W, VESSMAN J, SVAHN CM: Electron capture of tertiary amines as pentafluorobenzyl carbamates. *Anal Chem* 48: 390-393, 1976.
12. HARTVIG P, NASLUND B: Simultaneous determination of plasma amitriptyline and nortriptyline as trichloroethyl carbamates by electron-capture gas chromatography. *J Chromatogr* 133: 367-371, 1977.
13. HARVIG P, STRANBERG S, NASLUND B: Determination of plasma amitriptyline by electron capture gas chromatography after oxidation to anthraquinone. *J Chromatogr* 118: 65-74, 1974.
14. KNOX JH, JURAND J: Separation of tricyclic psychosedative drugs by high speed ion pair partition and liquid-solid adsorption chromatography. *J Chromatogr* 103: 311-326, 1975.
15. KOTEEL P, MULLINS RE, GADSEN RH: Sample preparation and liquid chromatographic analysis for tricyclic antidepressants in serum. *Clin Chem* 28: 462-466, 1982.
16. KRAAK JC, BIJSTER P: Determination of amitriptyline and some of its metabolites in blood by high pressure liquid chromatography. *J Chromatogr* 143: 499-512, 1977.
17. LECAILLON JB, SOUPART C, ABADIE F: Determination of Metoprolol in human plasma by column switching high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 16: 158-161, 1982.

18. NARASIMHCHARI N: Evaluation of C18 Sep-pack cartridges for biological sample clean-up for tricyclic antidepressant assays. *J Chromatogr* 225: 189-195, 1981.
19. ORSULAK P J, SCHILDKRAUT J J: Guidelines for therapeutic monitoring of tricyclic antidepressant plasma levels. *Therapeutic Drug Monitoring* 1: 199-208, 1979.
20. PROELSS HF, LOHMAN HJ, MILES DG: High performance liquid chromatographic simultaneous determination of commonly used tricyclic antidepressants. *Clin Chem* 24: 1948-1953, 1978.
21. ROBINSON JD, RISBY D, RILEY G, WYNNE AHERNE G: A radioassay for the determination of combined amitriptyline and nortriptyline concentrations in microliter samples of plasma. *J Pharmacol Exp Ther* 205: 499-502, 1978.
22. ROTH W, BESCHKE K, JAUCH R, ZIMMER A, KOSS FW: Fully automated highperformance liquid chromatography. A new chromatograph for pharmacokinetic drug monitoring by direct injection of body fluids. *J Chromatogr* 222: 13-22, 1981.
23. VANDEMERK FL, ADAMS RF, SCHMIDT GJ: Liquid chromatographic procedure for tricyclic drugs and their metabolites in plasma. *Clin Chem* 24: 87-91, 1978.
24. WATSON ID, STEWART MJ: Assay of structured drugs and their metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 134: 182-186, 1977.