

## Semplice metodo cromatografico per il dosaggio della clozapina del siero con estrazione in fase solida

**Mario Zilli**

Lab. Analisi, P.O. S. Polo, A.S.S. n. 2 "Isontina", v. Galvani 1, Monfalcone (GO)

### ABSTRACT

**In our laboratory we needed to investigate a method in order to replace the liquid-liquid extraction of serum samples for clozapine determination**

We took advantage of the newly available Strata X SPE columns (Phenomenex, CA, USA). We changed and optimised the suggested procedure in the following way: a) the sample loading and elution were performed strictly by gravity; b) the columns was washed with a strenghter eluent; c) no drying of the SPE column was needed before the final elution; c) we discarded the first 200 microlitres of eluent and held the next 500. Afterwards we submitted the reconstituted extract to HPLC under the following conditions: UV detector was set at 241 nm; the mobile phase was 15% Acetonitrile in Phosphate/Triethylamine buffer pH 2.1. We found this method easy to perform and reliable for routine analysis, and it allows us avoiding manipulation of volatile organic solvents.

### RIASSUNTO

Nel nostro Laboratorio volevamo convertire il precedente metodo di estrazione della Clozapina nel siero umano da liquido-liquido ad estrazione in fase solida. Ci siamo avvantaggiati delle colonne di recente produzione. Strata X (Phenomenex, CA, USA), rielaborando ed ottimizzando la procedura suggerita dal Produttore. Le principali differenze consistevano nel percolare il campione strettamente per gravità, nell' aumentare la forza del primo lavaggio, nel non portare a secco la colonnina prima della eluizione, nell'eluire per gravità e nello scartare i primi 200 µl di eluato. Dopodichè abbiamo sottoposto l'estratto portato a secco e ricostituito ad HPLC nelle seguenti condizioni: detector U.V. regolato a 241 nm; la fase mobile consisteva di Acetonitrile al 15% in tampone Fosfato/Trietilamina. Noi abbiamo giudicato questo metodo facile da eseguire e adatto all'analisi di routine, senza complesse apparecchiature e senza

### INTRODUZIONE

La Clozapina è un farmaco usato in molti Ospedali per il trattamento di pazienti psichiatrici. Noi usavamo nel nostro Laboratorio, per il dosaggio della Clozapina, un metodo che si ispirava a un lavoro in cui però si faceva uso di un'estrazione liquido-liquido con solventi organici [1]. Per evitare ciò noi abbiamo ricercato un metodo basato sull'estrazione in fase solida (SPE), ovvero con colonnine specifiche. Abbiamo trovato in letteratura molti metodi con estrazione sia in fase liquida che in fase solida, e con apparecchiature di complessità più o meno rilevante [2-10]. Disponendo di colonnine SPE di recente produzione abbiamo voluto testarle per gli scopi che sci prefiggevamo. Il metodo che ne è risultato ci sembra semplice, veloce e con buone caratteristiche di accuratezza, riproducibilità, linearità e resa di estrazione.

### MATERIALI E METODI

Tutti i reagenti erano di grado analitico o cromatogra-

fico e sono stati acquistati dalla Merck (Daremstadt, Germania). Le Colonnine SPE erano le Phenomenex Strata X da 1 ml (Torrance, CA, USA). La Clozapina è stata fornita dalla Sandoz (Milano, Italia) e la Triprolidina dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). L'apparecchiatura usata era un "System Gold" Beckman equipaggiato con una pompa binaria modello 126 ed un detector U.V. "Diode-Array" modello 128 regolato a 241 nm. Le iniezioni sono state eseguite manualmente tramite un iniettore Rheodyne 7125 fornito di loop da 50 µl. La separazione è stata effettuata su una colonna (Sigma-Aldrich/Supelco, Milano, Italia). La fase mobile consisteva di una miscela di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> all'85%/Trietilamina/Acqua/A-cetonitrile nelle proporzioni 10/5/70/15 (v/v/v/v), ed il flusso era regolato a 1 ml/min.

La preparazione del campione avveniva come segue:

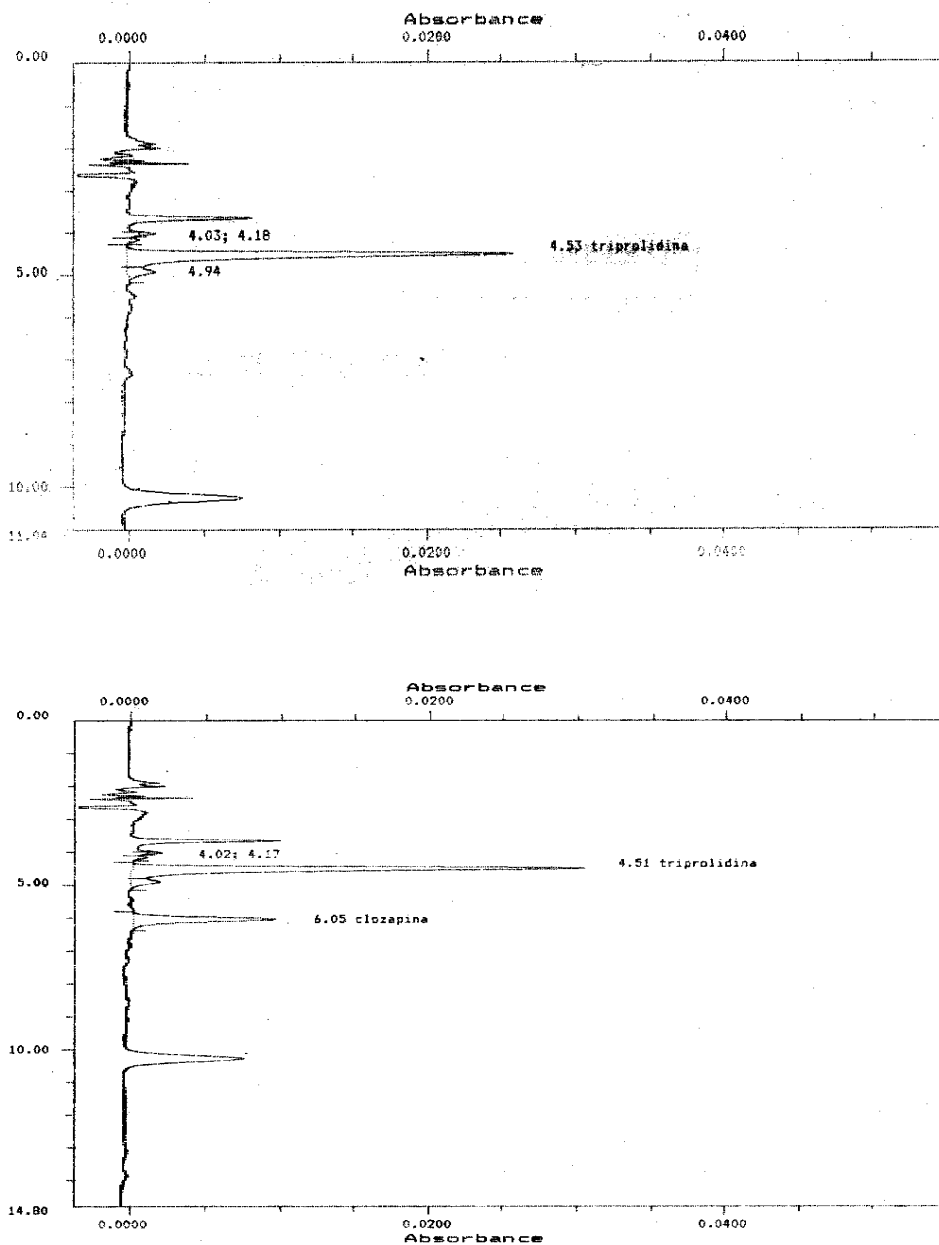
1) una curva standard veniva preparata aggiungendo 100, 200, 400 e 600 ng di Clozapina ad altrettante aliquote di 500 µl ciascuna di un pool di sieri umani esenti dal farmaco; ogni campione incognito consisteva pure di

500  $\mu$ l; a tutto venivano aggiunti 500  $\mu$ l di una soluzione di tampone fosfato 0.1 M pH 6.2 e 1000 ng di Triprolidina (lo Standard Interno).

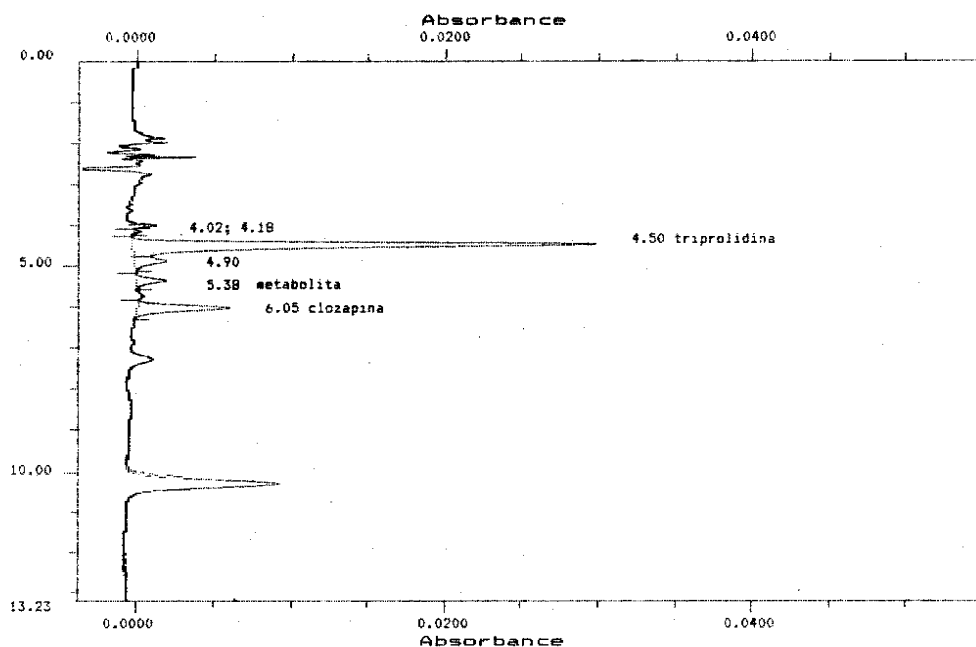
2) Ogni colonna SPE viene dapprima condizionata con 1 ml di Metanolo seguito da 1 ml di acqua, quindi viene introdotto il campione o standard preparato come descritto; si lava con 1 ml di Metanolo al 10% in acqua e si eluisce con una miscela di Ammoniaca 25% al 2% (v/v) in Metanolo: di quest'ultima però si scartano i primi 200  $\mu$ l e si trattengono i successivi 500. Questi vengono portati a secco e ricostituiti con 200  $\mu$ l di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Si iniettano 50  $\mu$ l.

## RISULTATI

La Fig. 1 mostra il cromatogramma di un pool di siero umano non aggiunto (a) e aggiunto di Standard Interno e di 400 ng/ml di Clozapina (b). La Fig. 2 mostra invece un cromatogramma di un paziente in trattamento con Clozapina. La tabella I mostra i risultati in termini di ripetibilità nella serie e giorno dopo giorno. La linearità fu esplorata fino a 1200 ng/ml ( $r = 0.9999$ ) ed è risultata migliore di quella del metodo di estrazione liquido-liquido. Il recupero è superiore al 98%. Il limite di sensibilità è inferiore a 20 ng/ml quando siano iniettati 50  $\mu$ l. Non abbiamo trovato necessario portare a secco le colonnine



**Figura 1**  
cromatogramma di un pool di sieri umani non aggiunto (a) e aggiunto di standard interno e di 400 ng/ml di clozapina.



**Figura 2**  
cromatogramma di un paziente in terapia con clozapina.

**Tabella 1**

Aggiunto (ng/ml)	Nella serie		Giorno dopo giorno	
	Trovato (media $\pm$ s.d.)	n	Trovato (media $\pm$ s.d.)	n
200	203.5 $\pm$ 9.2	10	205.6 $\pm$ 12.5	15
400	395.1 $\pm$ 12.2	10	390.6 $\pm$ 15.7	15
800	797.8 $\pm$ 17.6	10	803.9 $\pm$ 25.8	15
1200	1203.5 $\pm$ 23.6	10	1199.8 $\pm$ 27.0	7

SPE fra il lavaggio e l'eluizione. Per quanto riguarda il lavaggio stesso, benchè il produttore consigli di eseguirlo con una percentuale di Metanolo del 5%, non abbiamo riscontrato significative perdite di farmaco fino al 30%. Perdite si riscontrano invece se il campione viene applicato con un flusso troppo veloce, quindi è sconsigliabile applicare un vuoto da sotto o una pressione da sopra, ma è preferibile che il campione venga lasciato percolare per la sola gravità. Infine abbiamo riscontrato l'uscita su ogni campione o Standard di un picco ignoto intorno ai 10 minuti, sicchè è necessario attendere un tempo corrispondente prima di una nuova iniezione.

## DISCUSSIONE

Noi giudichiamo il presente metodo molto semplice e affidabile, e perciò adatto all'analisi di routine anche per laboratori che non dispongono di sofisticate apparecchiature cromatografiche. Esso non richiede la manipolazione di solventi organici, ed un'ora è sufficiente per portare a termine l'estrazione.

## BIBLIOGRAPHY

- Volpicelli SA, Centorrino F, Puopolo PR, Kando J, Frankenburg FR, Baldessarini RJ, Flood JM. Determination of Clozapine, Norclozapine, and Clozapine-N-Oxide in Serum by Liquid Chromatography. Clin. Chem. 1993; 39/8; 1656-1659..
- Ulrich S, Kruggel S, Weigmann H, Hiemke C. Fishing for a drug: solid-phase microextraction for the assay of clozapine in human plasma. J. Chromatogr. B Biom. Sci. Appl. 1999;731(2); 231-240.
- Lierena A, Berecz R, NorbertoMJ, de la Rubia A. Determination of clozapine and its N-desmethyl metabolite by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J. Chromatogr. B Biom. Sci. Appl. 2001; 755(1-2); 349-354.
- Liu YY, van Troostwijk LJ, Guchelaar HJ. Simultaneous determination of clozapine, norclozapine and clozapine-N-oxide in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Biomed. Chromatogr.2001; 15(4); 280-286.

5. Kollroser M, Schober C. Direct injection high performance liquid chromatography ion-trap mass spectrometry for the quantitative determination of olanzapine, clozapine and N-desmethylclozapine in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2002;16(13); 1266-1272.
6. Mosier KE, Song J, McKay G, Hubbard JW, Fang J. Determination of clozapine, and its metabolites N-desmethylclozapine and clozapine N-oxide in dog plasma using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003; 783(2); 377-382.
7. Titier K, Bouchet S, Pehourcq F, Moore N, Molimard M. High performance liquid chromatographic method with diode-array detection to identify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. *Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003; 788(1); 179 -185.
8. Frahnert C, Rao ML, Grasmader K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by high performance liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003; 794(1); 35-47.
9. Garay Garcia L, Forfar-Bares I, Pehourcq F, Jarry C. Simultaneous determination of four antipsychotic drugs in plasma by high-performance liquid chromatography. Application to management of acute intoxications. *Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003;795(2); 257-264.
10. Zhou Z, Li X, Xie Z, Cheng Z, Peng W, Wang F, Zhu R, Li H. Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004;802(2); 257-262.