

Ewa Pufal, Przemysław Piotrowski

## Oznaczanie haloperidolu w paznokciach metodą LC-ESI-MS

## Determination of haloperidol in fingernail/toenails by LC-ESI-MS

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej CM UMK w Bydgoszczy  
Kierownik: prof. dr hab. med. Karol Śliwka

W pracy przedstawiono możliwość wykorzystania paznokci do oznaczania haloperidolu. Do wykonania oznaczeń opisanych w prezentowanej pracy zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. W toku przeprowadzonych badań opracowano metodę izolowania haloperidolu z paznokci oraz metodę jego identyfikacji. Do wykonania oznaczeń wykorzystano paznokcie pobrane od osób, które przyjmowały haloperidol co najmniej 6 miesięcy przed pobraniem. W badanych próbach stwierdzono obecność haloperidolu w następujących ilościach: paznokcie rąk –  $67,3 \pm 6,49$  pg/mg, paznokcie nóg –  $98,9 \pm 9,14$  pg/mg.

The report presents the possibility of using fingernails/toenails to determine haloperidol levels. The described determinations were performed using the method of liquid chromatography coupled with electrospray-ionization mass spectrophotometry (LC-ESI-MS). In the course of the investigation, the authors developed a method for isolating haloperidol from nails and its identification. Determinations were performed in fingernail/toenail samples originating from individuals who had been administered haloperidol at least 6 months prior to sample collection. The materials demonstrated the presence of haloperidol in the following amount: fingernails –  $67.3 \pm 6.49$  pg/mg, toenails –  $98.9 \pm 9.14$  pg/mg.

Słowa kluczowe: haloperidol, paznokcie, LC-ESI-MS

Key words: haloperidol, nails, LC-ESI-MS

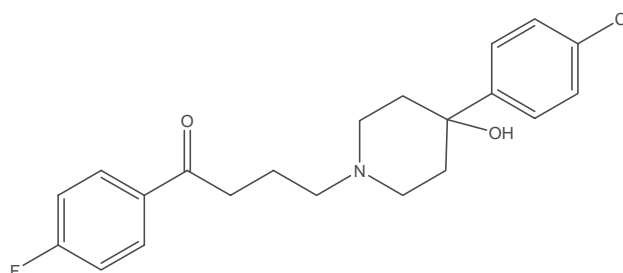
## WSTĘP

Haloperidol 4-[4-(p-chlorofenyl)-4-hydroksypiperidyno]-4-fluorobutyrofenon, pomimo wielu silnych

działań ubocznych jest wciąż najczęściej stosowanym lekiem przeciwpsychotycznym i uspokajającym z grupy pochodnych butyrofenonu.

Rys. 1. Wzór strukturalny haloperidolu.

Fig. 1. The structural formula of haloperidol.



Mechanizm jego działania związany jest przede wszystkim z hamowaniem receptorów dopaminowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Pomimo pozytywnych efektów leczniczych wykazuje liczne i silne działania niepożądane (głównie efekty pozapiramidowe). Haloperidol szybko wchłania się z przewodu pokarmowego osiągając max. stężenie we krwi po 3-6 h, w 90 % wiąże się z białkami osocza. Jego dawka toksyczna wynosi około 300 mg. Z danych literaturowych wynika, że haloperidol bywa przyczyną zatruc i jest stosowany jako substytut narkotyków. Dlatego wykorzystanie do badań takiego materiału biologicznego jak włosy czy paznokcie może być przydatne do określenia narkotycznej przeszłości osób badanych.

W dostępnym piśmiennictwie odnaleźć można prace na temat oznaczania haloperidolu w materiale biologicznym, takim jak krew i mocz [1, 4]. Brak natomiast danych o oznaczaniu haloperidolu w tzw. materiałach alternatywnych jakimi są m.in. ślina,

włosy i paznokcie. W wielu krajach badanie włosów staje się rutynową analizą stosowaną w medycynie sądowej, w medycynie komunikacyjnej i toksykologii knicznej [5]. Włosy wykorzystuje się przede wszystkim do badań substancji odurzających i psychotropowych ale również do oznaczeń innych substancji będących powszechnymi lekami [16].

Umiejętność prowadzenia analizy w wytworach naskórka otwiera nowe możliwości w dziedzinie badań kliniczno-toksykologicznych, a w szczególności w toksykologii sądowej. Wytwory naskórka, w tym między innymi włosy i paznokcie są materiałem biologicznym, który może być wykorzystany do badań za życia i po śmierci. Ponadto są materiałem, który można wykorzystać do badań toksykologicznych wiele miesięcy po zaprzestaniu zażywania leku. Obecnie powszechnie wykorzystywanym alternatywnym materiałem biologicznym są włosy. Jednak do tej pory stosunkowo niewiele, szczególnie w porównaniu z badaniami włosów, odnaleźć można doniesień na temat wykorzystywania w analizie toksykologicznej innych wytworów naskórka jakimi są paznokcie. Wyniki dotychczasowych badań nad oznaczaniem leków w paznokciach [3, 7] zachęcają do prowadzenia dalszych doświadczeń nad możliwościami, jakie daje analiza paznokci. Ponieważ haloperidol jest stosowany nie tylko jako lek ale również jako zamiennik narkotyków, dlatego też celem niniejszej pracy było opracowanie, przydatnej w toksykologii sądowej, metody oznaczania haloperidolu w materiale alternatywnym jakim są obok włosów również paznokcie.

Z danych literaturowych wynika, że najczęściej stosowaną metodą izolowania haloperidolu z prób biologicznych, takich jak krew, surowica lub mocz jest ekstrakcja ciecz-ciecz oraz ekstrakcja do fazy stałej [10]. Natomiast do oznaczeń końcowych jakościowych i ilościowych powszechnie wykorzystywano metody chromatograficzne takie jak: GC/MS, LC/DAD [8], LC/MS [4, 9].

## MATERIAŁ I METODA

### Materiał biologiczny

Materiał do badań stanowiły paznokcie rąk i nóg pobrane od 15 osób, które przyjmowały haloperidol w dawkach terapeutycznych przez okres czasu dłuższy niż 6 miesięcy (6-12 miesięcy). Pobrane próby paznokci przechowywano w temperaturze pokojowej.

### Ekstrakcja

Do ekstrakcji użyto próby paznokci rąk i nóg w ilości po 100 mg w każdej próbce. Przed analizą paznokcie myto 2 razy po 5 minut w 20 ml wody a następnie

1 raz w 20 ml acetonu w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej. Wysuszone paznokcie pocięto na małe (około 1mm) segmenty i poddano hydrolizie z użyciem 1M NaOH, przez 10 minut w temperaturze 95°C. Ekstrakcję haloperidolu z paznokci przeprowadzono mieszaniną n-heksan: chloroform (7:3 v/v).

### Analiza LC-ESI-MS

Analizę jakościową i ilościową przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego z detektorem masowym z jonizacją elektrosprej LC-ESI-MS 1100 Series firmy Agilent Technologies. Badania wykonano w następujących warunkach: kolumna Zorbax SB C-18-C8, 150 mm x 4,6; 3,5 µm, faza ruchoma: acetonitryl: 0,1 % TFA (40 : 60, v/v), przepływ fazy ruchomej: 0,6 ml/min, temp. 40°C, źródło jonów: API-ES „elektrosprej”, napięcie kapilary: 3,5 kV, temp N<sub>2</sub> 350°C, ciśnienie nebulizera 60 psi, przepływ N<sub>2</sub>. Analizę jonów przeprowadzono wykorzystując pojedynczy analizator kwadrupolowy, monitorowany jon [MH] – 376 m/z.

### Walidacja metody

Do kalibracji metody wykorzystano materiał kontrolny – paznokcie pobrane od osób (pracowników laboratorium), które nie przyjmowały leków. W tym celu do 100 mg materiału biologicznego (paznokcie) dodano odpowiednio po 2,5 ng (25 pg/mg), 10 ng (100 pg/mg), 25 ng (250 pg/mg), 50 ng (500 pg/mg), 200 ng (2 ng/mg) i 1000 ng (10 ng/mg) haloperidolu. Tak przygotowane próby poddano analizie w identycznych warunkach jak materiał badany.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

Analizę haloperidolu w paznokciach przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej z detektorem masowym. Krzywe kalibracyjne dla haloperidolu wykazywały liniowy przebieg w badanym zakresie stężeń (25 pg/mg – 10 ng/mg). Współczynnik korelacji w przypadku oznaczania haloperidolu w paznokciach wynosił 0,998. Granica wykrywalności LOD-1,0 pg. Granica oznaczalności LOQ-2,5 pg. Precyzję metody przedstawiono w tabeli I.

Opracowaną metodę wykorzystano w celu oznaczenia poziomu haloperidolu w paznokciach pobranych od osób przyjmujących haloperidol.

Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli II.

We wszystkich badanych próbach stwierdzono obecność haloperidolu. Z przeprowadzonych badań wynika, że w przypadku haloperidolu wyższe stężenie leku zaobserwowano w paznokciach nóg (średnia 98,9 pg/mg) niż w paznokciach rąk (średnia 67,3 pg/mg).

Tabela I. Precyzja metody oznaczania haloperidolu w paznokciach.

Table I. The precision of the method of fingernail/toenail haloperidol determination.

Powtarzalność w obrębie serii Recurrence within series		Powtarzalność między seriami Recurrence between series	
2,5 pg/mg (n=3)	100 pg/mg (n=3)	2,5 pg/mg (n=3x3)	100 pg/mg (n=3x3)
3,1 %	3,5 %	16,5 %	4,9 %

Tabela II. Zawartość haloperidolu w paznokciach pobranych od osób przyjmujących haloperidol.

Table II. Haloperidol concentration in the nails from patients on haloperidol.

	Stężenie średnie $\pm$ SD [pg/mg] mean concentration $\pm$ SD [pg/mg]
Paznokcie rąk (n=15) Finger nails	67,3 $\pm$ 6,49
Paznokcie nóg (n=15) Toten nails	98,9 $\pm$ 9,14

W dostępnej literaturze brak danych dotyczących oznaczania haloperidolu w paznokciach. Furii T. i inni [4], oznaczając haloperidol w surowicy stwierdzili, że po przyjęciu leku w dawkach terapeutycznych jego stężenie wahało się w granicach od 4-20 ng/ml a w dawkach wywołujących efekt toksyczny jego stężenie wynosiło 0,05 ng/ml. Stwierdzone w niniejszej pracy poziomy haloperidolu są znacz-

nie niższe. Dlatego też istotne znaczenie mają procesy izolacji i wysoka czułość aparatury analitycznej.

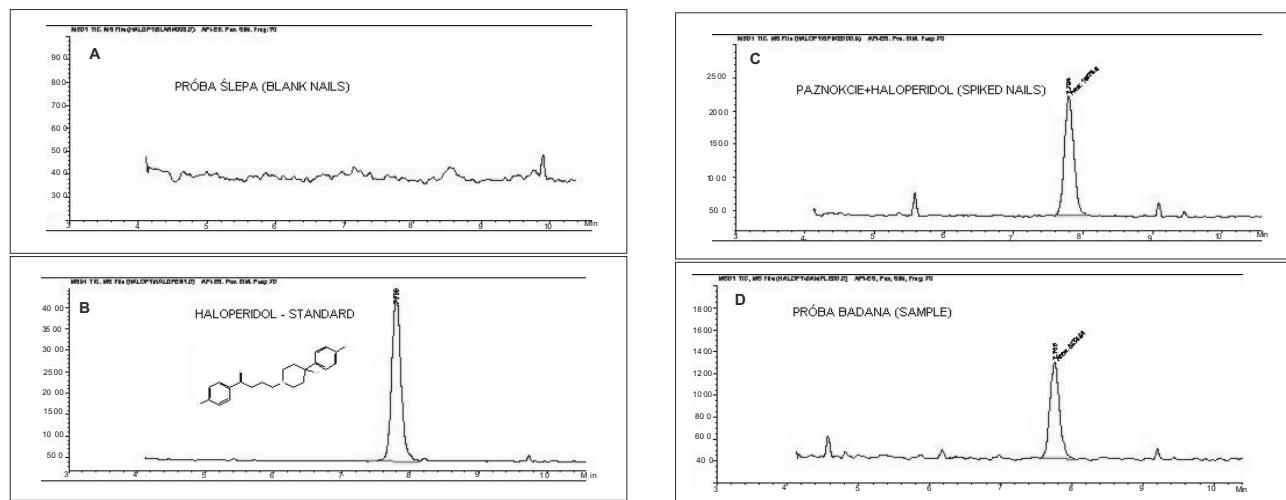
Z badań nad rozmieszczeniem leków i ich kumulowaniem się w poszczególnych tkankach wynika, że na procesy te mogą mieć wpływ zarówno własności chemiczne danego leku jak i procesy biochemiczne. Stąd też mogą wynikać różnice w rozmieszczeniu haloperidolu w paznokciach rąk i nóg.

Badając stężenia acebutololu we włosach i paznokciach [7] stwierdzono, że stężenie acebutololu we włosach (średnio 1,989 ng/mg) było nieznacznie niższe niż w paznokciach (średnio 2,221 ng/mg). Natomiast w przypadku atenololu jego zawartość we włosach (średnio 1,730 ng/mg) była znacznie wyższa niż w paznokciach (średnio 0,155 ng/mg). Okres przyjmowania leku 2 lata czy tylko 6 miesięcy nie miał wpływu na rozmieszczenie atenololu pomiędzy paznokcie i włosy. Zarówno w jednym jak i w drugim przypadku obserwowano, że stężenie leku we włosach było wyższe niż w paznokciach. Prowadząc badania nad rozmieszczeniem narkotyków we włosach i paznokciach od nóg, Cingolani i wsp. [2] stwierdzili, że cocaina i morfina są bardziej skoncentrowane w paznokciach niż we włosach. Natomiast między stężeniem 6-acetylmorfiny we włosach i paznokciach nie było istotnych różnic. Ponieważ Cingolani badał materiał biologiczny pobrany ze zwłok, a nie posiadał danych z wywiadu, trudno było określić czy na takie rozmieszczenie ksenobiotyków miał wpływ między innymi okres czasu przez jaki były one przyjmowane lub rodzaj materiału biologicznego.

W świetle prowadzonych badań wydaje się interesującym rozszerzenie ich, celem wyjaśnienia róż-

Rys. 2. Chromatografy: A – próba ślepa, B – standard haloperidol, C – paznokcie z dodatkiem haloperidolu, D – próba badana.

Fig. 2. Chromatograms: A – blank nails, B – standard haloperidol, C – spiked nails, D – sample.



nic w rozmieszczeniu leku, jak i jego metabolitów pomiędzy paznokcie rąk i nóg a dalej pomiędzy paznokcie i włosy oraz inne materiały alternatywne.

## PODSUMOWANIE

Przedstawione wyniki badań dowodzą, że paznokcie mogą być wykorzystane do oznaczania haloperidolu. Opracowana metoda LC/MS umożliwia wykrycie haloperidolu w ilości 1,0 pg i jego oznaczenie ilościowe w zakresie 2,5-100 pg. Stwierdzona ilość haloperidolu wynosiła w paznokciach rąk 57,3-78,0 pg/mg a w paznokciach nóg 80,9-109,9 pg/mg. Wykorzystanie paznokci jako materiału badawczego pozwala na zbadanie bliskiej i odległej historii używania leku a ich pobranie jest nieinwazyjne. Przydatność badań paznokci jest szczególnie ważna w sytuacji braku możliwości pobrania włosów, a zwłaszcza w odniesieniu do stwierdzenia przyjmowania ksenobiotyków w dłuższym niż pozwalają na to włosy, okresie czasu. Analiza paznokci może być wykorzystana do retrospektywnego zobrażenia przyjmowania leku zarówno w toksykologii sądowej i toksykologii klinicznej, jak również między innymi w medycynie sportowej w kontroli antydopingowej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Arinobu T., Hattori H., Iwai M., et al.: Liquid chromatographic- mass spectrometric determination of haloperidol and its metabolite in human plasma and urine. *J. of Chromatography B*, 2002, 776, 107-113.

2. Caplan Y. H., Goldberger B. A.: Alternative specimens for workplace drug testing. *J. Anal. Toxicol.* 2001, 25 (5): 396-9.

3. Cingolani M., Scavella S., Mencarelli R., Mirtella D., Frolid R., Rodriguez D.: Simultaneous detection and quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, and cocaine in toenails: comparison with hair analysis. *J. Anal. Toxicol.* 2004, 28 (2): 128-31.

4. Fujii T., Hatanaka K., et al.: Selective determination of haloperidol in human serum: surface ioni-

zation mass spectrometry and gas chromatography with surface ionization detection. *J. of Chromatography B* 1996, 687, 395-403.

5. Henderson G. L., Harkey M. R.: Analysis of hair for cocaine. NIH Publication, 1995, 91-120.

6. Kłys M., Rojek S., Moskała A.: Wykorzystanie materiałów alternatywnych w ekspertyzie toksykologicznej z zastosowaniem metody LC/APCI/MS do oceny przypadku kompleksowego zatrucia śmiertelnego klomipraminą, tianeptyną i hydroksyzyną. *Z Zagadnień Nauk Sądowych*, 2003, LV, 76-99.

7. Pufal E.: Determination of medicines in epidermis products and their usefulness in Forensic Toxicology, *Problems of Forensic Sciences*, 2002, LII, 7-20.

8. Walter S., Bauer S., Roots I., Brockmüller J.: Quantification of the antipsychotics flupentixol and haloperidol in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. of Chromatography B*, 1998, 720, 231-237.

9. Trabelsi H., Bouadballah S., Bouzouita K., Safta F.: Determination and degradation study of haloperidol by high performance liquid chromatography. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002, 29, 649-657.

10. Yasui-Furukori N., Inoue Y., Chiba M., Tateishi T.: Simultaneous determination of haloperidol and bromperidol and their reduced metabolite by liquid-liquid extraction and automatic column-switching high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography B*, 2004, 805, 175-180.

11. Trabelsi H., Bouabdallah S., Bouzouita K., Safta F.: Determination and degradation study of haloperidol by high performance liquid chromatography. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 29, 649-657.

Adres autora:

Ewa Pufal

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9  
85-094 Bydgoszcz