

Ewa Pufal, Marzena Sykutera, Przemysław Piotrowski

Opracowanie metody oznaczania leków przeciwdepresyjnych w paznokciach i jej wykorzystanie w toksykologii sądowej*

Development of a method for determining antidepressant drugs in nails and its usefulness in forensic toxicology

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

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

W pracy przedstawiono możliwość wykorzystania materiału alternatywnego do oznaczania leków przeciwdepresyjnych na przykładzie flupentixolu. W pierwszym etapie badań opracowano metodę izolowania flupentixolu z paznokci oraz metodę jego identyfikacji. Paznokcie pozyskano od osób, które przyjmowały flupentixol w terapeutycznych dawkach co najmniej przez okres 12 miesięcy. Paznokcie pobierano po upływie 4, 6, 7, 8 i 10 miesięcy po zaprzestaniu przyjmowania leku. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem masowym. Przeprowadzone badania wykazały, że po 4 miesiącach po zaprzestaniu terapii stężenie flupentixolu w paznokciach wynosiło w granicach 0,086-0,109 ng/mg, po upływie 6 miesięcy wynosiło 0,036-0,042 ng/mg, po upływie 7 miesięcy wynosiło 0,018-0,021 ng/mg a po 8 miesiącach 0,020-0,022 ng/mg. Po upływie 10 miesięcy po zakończeniu terapii nie stwierdzono obecności flupentixolu w paznokciach.

The report presents the possibility of using alternative material in determinations of antidepressants taking as exemplified by flupentixol. At the first stage of the study, the method of flupentixol isolation from nails and its identification were elaborated. Determinations were performed in fingernail/toenail samples originating from individuals who had been administered flupentixol in therapeutic doses for at least 12 months before sample collection. The nails were obtained 4, 6, 7, 8 and 10 months after discontinuing the drug

administration. The determinations were made by liquid chromatography coupled with electrospray-ionization mass spectrophotometry (LC-ESI-MS). The study showed that 4 months after discontinuing the drug, the nail flupentixol concentration was within the range of 0.086-0.109 ng/mg, after 6 months, the drug level was 0.036-0.042 ng/mg, after 7 months, it was 0.018-0.021 ng/mg and after 8 months – 0.020-0.022 ng/mg. Ten months after discontinuation of therapy, flupentixol was no longer found in nails.

Słowa kluczowe: flupentixol, paznokcie, oznaczanie, LC-ESI-MS

Key words: flupentixol, nails, determination, LC-ESI-MS

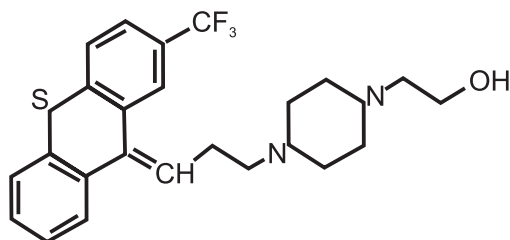
WSTĘP

Flupentiksol (ryc. 1) jest pochodną tioksantenu działającą silnie psychotycznie, aktywizująco i przeciwlękowo. Aktywny farmakologicznie jest izomer cis(Z)-flupentiksol. Przeciwpowrotne działanie flupentiksolu wynika z jego wpływu blokującego receptory dopaminergiczne i wyzwalającego wtórne zmiany w innych układach neuroprzekaźnikowych. Biodostępność flupentiksolu po podaniu doustnym wynosi około 40%, a maksymalne stężenie w surowicy występuje po około 4 godzinach. Metabolity pozbawione są aktywności neuroleptycznej. Wy-

* Badania zostały sfinansowane przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu w ramach grantu UMK 01/2007 (Collegium Medicum).

dalanie następuje z kałem, ale małe ilości wydalane są wraz z moczem. Biologiczny okres półtrwania flupentiksolu wynosi około 35 godzin. Flupentiksól występuje również w formie o przedłużonym działaniu (fluanksol depot), której wydłużony okres półtrwania wynosi około 3 tygodni. Do najczęściej występujących działań ubocznych stwierdzanych w czasie terapii flupentiksolem należy możliwość wystąpienia złośliwego zespołu neuroleptycznego, który charakteryzuje się hipertermią, sztywnością mięśniową, zaburzeniami świadomości oraz zaburzeniami wegetatywnymi. W niektórych przypadkach objawy te mogą stać się niebezpieczne dla życia. Flupentiksól oraz fluanksol depot są lekami bardzo często stosowanymi przez pacjentów cierpiących na depresję, schizofrenię, apatię oraz w leczeniu różnego rodzaju psychoz.

Ryc. 1. Wzór strukturalny flupentiksolu.
Fig. 1. The structural formula of flupentixol.



Z danych literaturowych wynika, że flupentiksól bywa przyczyną zatrucia. Natomiast osoby, które pomimo przepisania leku nie przyjmują go i na skutek pogłębiającej się w takiej sytuacji depresji popełniają samobójstwo. W dostępnym piśmiennictwie odnaleźć można prace na temat oznaczania flupentiksolu w materiale biologicznym takim jak krew, surowica, mocz [1, 2]. Wykorzystanie włosów w analizie toksykologicznej staje się coraz bardziej popularne a wyniki tych badań są z powodzeniem wykorzystywane do retrospektywnego zobrażenia przyjmowania leku [3]. Brak natomiast danych o oznaczaniu flupentiksolu w materiale alternatywnym jakim są między innymi paznokcie, które w przypadku braku włosów mogą też być wykorzystane do stwierdzenia przyjmowania leków w przeszłości. Dlatego, celem przedstawionej pracy było opracowanie metody oznaczania flupentiksolu, jako przedstawiciela leków przeciwdepresyjnych, w paznokciach.

MATERIAŁ I METODY

Materiał

Materiał do badań stanowiły paznokcie pobrane od osób, które przyjmowały flupentiksól w dawkach terapeutycznych przez okres 12

miesiący. Do badań pobierano nie mniej niż 50 mg materiału biologicznego. Paznokcie pobierano po upływie 4, 6, 7, 8, i 10 miesięcy od chwili zakończenia terapii. Pobrane próby paznokci przechowywano w temperaturze pokojowej.

Ekstrakcja

Próbki paznokci przed ekstrakcją poddano dekontaminacji z użyciem wody destylowanej a następnie acetonu. Procedurę przeprowadzono w łaźni ultradźwiękowej. Wysuszone paznokcie pocięto na drobne segmenty i poddano hydrolizie z użyciem 1M NaOH przez 10 minut w temperaturze 95°C. Ekstrakcję flupentiksolu przeprowadzono z użyciem n-heksanu.

Analiza LC-ESI-MS

Analizę jakościową i ilościową flupentiksolu przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu ciekłego sprzężonego z detektorem masowym z jonizacją elektrosprej (LC-ESI-MS) firmy Agilent Technologies 1100 Series. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Eclipse XDB C18 (150 x 4,6mm, 5 μm). Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę acetonitrylu-TFA (50:50 v/v) z przepływem 0,5 ml/min w temperaturze 25°C. Parametry detektora masowego: napięcie fragmentatora 70V, napięcie kapilary 4 kV, temperatura N₂ 350°C, ciśnienie nebulizera 30 psi, przepływ gazu suszącego 13 L/min.

Analizę flupentiksolu prowadzono w opcji monitorowania wybranego jonu (SIM) [MH⁺] 435 m/z. Czas retencji dla flupentiksolu t_R = 4,7 min.

Walidacja metody

Do kalibracji metody wykorzystano materiał kontrolny – paznokcie pobrane od osób, które nie przyjmowały flupentiksolu. Przygotowano próby wzorcowe paznokci zawierające flupentiksól o stężeniu 1 pg/mg, 2 pg/mg, 20 pg/mg, 200 pg/mg, 1 ng/mg, 2 ng/mg. Tak przygotowane próby poddano analizie w identycznych warunkach jak próby badane.

Wyniki i omówienie

Oznaczanie flupentiksolu w paznokciach przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii ciekłej z detektorem masowym. Krzywa kalibracyjna dla flupentiksolu wykazywała liniowy przebieg w badanym zakresie stężeń (2 pg/mg-2 ng/mg). Współczynnik korelacji wynosił 0,991. Granica wykrywalności (LOD) flupentiksolu w paznokciach kształtowała się na poziomie 1pg/mg, natomiast granica oznaczalności LOQ = 2 pg/mg. Precyzję metody przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Precyzja oznaczania flupentiksolu w paznokciach.

Table I. The structural formula of flupentixol.

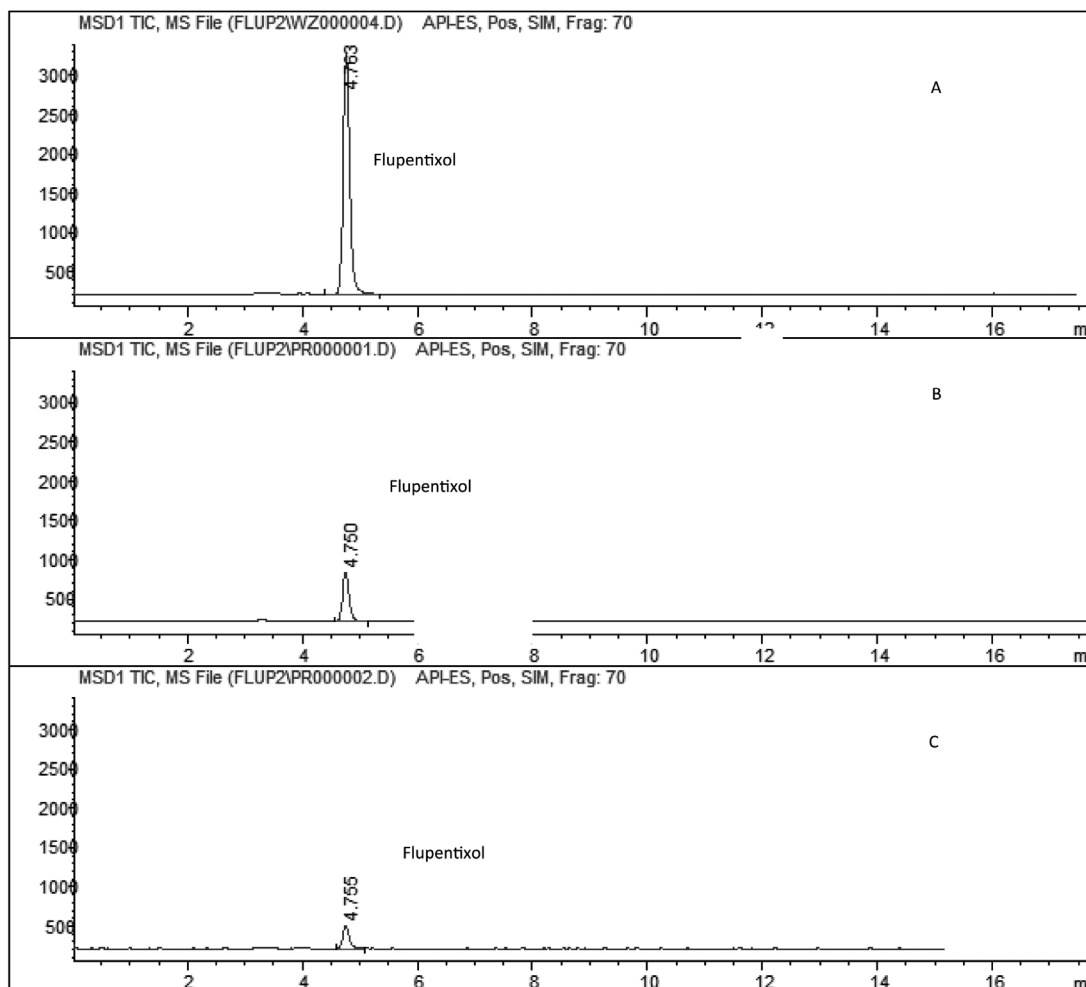
Powtarzalność w obrębie serii Recurrence within series		Powtarzalność między seriami Recurrence between series	
2 pg/mg (n=3)	200 pg/mg (n=3)	2 pg/mg (n=3, p=3)	200 pg/mg (n=3, p=3)
4,2%	2,4%	9,1%	4,2%

Na ryc. 2 przedstawiono przykładowe chromatogramy, uzyskane w wyniku analizy ekstraktów wzorcowego roztworu flupentiksolu, ekstraktu prób paznokci, do których dodano znaną ilość flupentiksolu oraz ekstraktu prób paznokci pobranych od osoby, która przyjmowała flupentixol.

Chemiczno-toksykologiczne badania wytworów naskórka, takich jak włosy i paznokcie zarówno zakresie toksykologii sądowej jak i klinicznej, stają się coraz bardziej popularne i coraz bardziej znaczące [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. We włosach jak i w paznokciach, w przeciwieństwie do krwi i moczu, leki lub ich metabolity pozostają przez dłuższy czas przez co dają możliwość retrospektywnej kontroli przyjmowania leków (Drug Monitorings). Poza tym paznokcie podobnie jak włosy o wiele wolniej ulegają procesom rozkładu w czasie przechowywania niż inne próby biologiczne. Podczas gdy analiza toksykologiczna włosów staje się coraz bardziej popularna, to tylko nieliczne doniesienia przedstawiają wyniki badań toksykologicznej analizy paznokci rąk i nóg [5, 6, 7]. Jak wynika z danych literaturowych dotychczas opracowano metody wykrywania

Ryc. 2. Chromatogramy masowe otrzymane w wyniku analizy: A. wzorca flupentiksolu, B. paznokci z dodatkiem flupentiksolu, C. paznokci pobranych od osoby, która przyjmowała flupentixol.

Fig. 2. Mass chromatograms obtained following the analysis: A. standard flupentixol, B. nails spiked with flupentixol, C. nails originating from a flupentixol-administered patient.



i oznaczania flupentiksolu w surowicy i plazmie, pobranych od osób, które przyjmowały ten lek w dawkach terapeutycznych [1, 2, 3].

Opracowaną metodę wykorzystano do oznaczania poziomu flupentiksolu w paznokciach pobranych od osób przyjmujących flupentiksol. Uzyskane wyniki zebrano w tabeli II. W wyniku przeprowadzonych badań, po upływie 4 miesięcy po zaprzestaniu terapii, stwierdzono w paznokciach stężenie flupentiksolu w granicach 0,086-0,109 ng/mg, po 6 miesiącach po zaprzestaniu terapii stwierdzono w paznokciach stężenie flupentiksolu w granicach 0,036-0,042 ng/mg, po upływie 7 miesięcy 0,018-0,021 ng/mg, po upływie 8 miesięcy 0,020-0,022 ng/mg. Flupentiksolu w paznokciach nie stwierdzono po upływie 10 miesięcy po zakończeniu terapii.

Tabela II. Zawartość flupentiksolu w paznokciach pobranych od osób przyjmujących flupentiksol.

Table II. Flupentixol concentration in the nails from patients on flupentixol.

Czas po zakończeniu terapii Time after end of therapie	Flupentiksol [ng/mg]
4 miesiące 4 months	0,86-0,109
6 miesięcy 6 months	0,036-0,042
7 miesięcy 7 months	0,018-0,021
8 miesięcy 8 months	0,020-0,022
10 miesięcy 10 months	Nie stwierdzono, Not detected

Wyniki dalszych systematycznych badań nad oznaczaniem innych substancji w paznokciach mogą okazać się przydatne w sytuacjach, gdy w danym przypadku włosów brakuje. Analiza paznokci podobnie jak analiza włosów może być wykorzystana w analizie retrospektywnej w toksykologii sądowej.

WNIOSKI

1. Przedstawione wyniki badań dowodzą, że paznokcie mogą być wykorzystywane do oznaczeń flupentiksolu.
2. Opracowana metoda LC/MS umożliwia wykrycie flupentiksolu w paznokciach na poziomie 1pg/mg i jego oznaczenie ilościowe w zakresie 2 pg/mg-2 ng/mg.

3. Wykorzystanie paznokci jako materiału badawczego pozwala na zbadanie bliskiej i odległej historii zażywania leku.
4. Pobieranie prób paznokci do badań jest metodą nieinwazyjną. Próby nie wymagają szczególnych warunków przechowywania i transportu.

PIŚMIENNICTWO

1. Kirchherr H., Kuhn-Velten W. N.: Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2006, 843 (1), 100-113.
2. 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.
3. Weinmann W., Müller C., Vogt S., Frei A.: LC-MS-MS analysis of the neuroleptics clozapine, flupentixol, haloperidol, penfluridol, thioridazine and zuclopenthixol in hair obtained from psychiatric patients. *J. Anal. Toxicology* 2002, 26(5), 303-307.
4. Ulrich S.: Sensitive gas-liquid chromatographic method for the assay of the neuroleptic drug cis(Z)-flupentixol. *J. Chrom. B.* 1995, 668, 31-40.
5. Pufal E.: Badania nad oznaczaniem leków w wytworach naskórka i ich przydatność w toksykologii sądowej. *Problems of Forensic Sciences*, 2002, 52, 7-20.
6. Pufal E.: Oznaczanie ksenobiotyków w wytworach naskórka i ich przydatność w toksykologii sądowej. *Problems of Forensic Sciences*, 2004, 54, 5-17.
7. Pufal E., Piotrowski P., Śliwka K.: Bestimmung von Ticlopidin in Kopfhaaren, Fingernägeln und Zehennägeln. XIV. Mosbacher Symposium der GTFCh, 14-16.04.2005, Mosbach, Germany (Posterpräsentation).
8. Pufal E., Piotrowski P.: Oznaczanie Haloperidolu w paznokciach metodą LC-ESI-MS. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 2006, 56, 187-190.

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