

**Министерство здравоохранения и социального развития Челябинской области**  
**Областное государственное учреждение здравоохранения**  
**«ЧЕЛЯБИНСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО**  
**СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»**

**Утверждаю:**

Начальник ОГУЗ ЧОБСМЭ, к.м.н.

\_\_\_\_\_ Е.Ф.Швед  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2009г

**Методика количественного определения галоперидола в крови и плазме**  
**методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-**  
**селективным детектированием**

**Челябинск**

**2009**

**«Методика количественного определения галоперидола в крови и плазме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием» // Челябинск, ОГУЗ «Челябинское областное бюро судебно – медицинской экспертизы», 2009, 12 с.**

**Методика разработана экспертом судебно – химического отделения ЧОБСМЭ, к.х.н. Мелентьевым А.Б. и экспертом-химиком ЧОКБ Лаврентьевой А.В.**

**Одобрено на заседании методического совета Челябинского областного бюро судебно – медицинской экспертизы, протокол № \_\_\_\_\_ от «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2009 г.**

Галоперидол (4-[4-(4-хлорфенил)-4-гидрокси-1-пиперидинил]-1-(4-фторфенил)-1-бутанон (рис.1) широко распространенный в психиатрической практике нейролептик, обладающий седативным действием и потенцирующий действие снотворных веществ и наркотических анальгетиков. Терапевтические концентрации в сыворотке крови 0,005-0,04 мкг/мл, токсические 0,05-0,1 мкг/мл [1]. Галоперидол эффективен для купирования разного рода возбуждений, особенно при маниакальных состояниях и остром бреде [2]. Однако при передозировке или злоупотреблении может приводить к тяжелым отравлениям [3]. Для судебно-химических анализов при летальных отравлениях, а также для контроля детоксикации при отравлении галоперидолом и для терапевтического мониторинга необходима чувствительная и экспрессная методика определения галоперидола в крови или плазме.

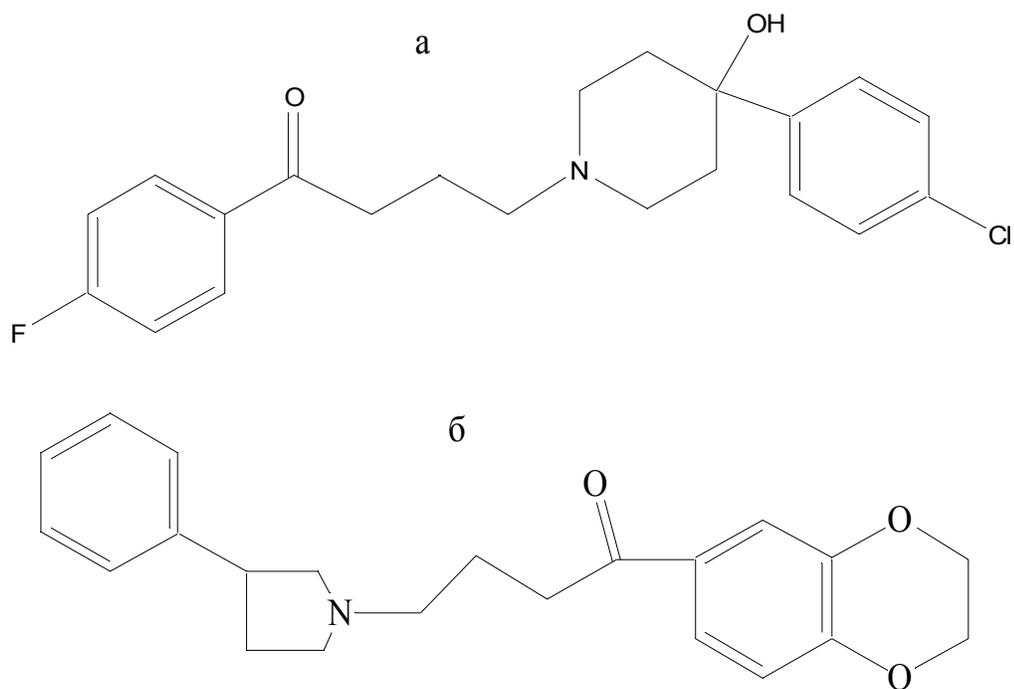


Рис.1. Структуры анализируемого вещества (а) и внутреннего стандарта (б).

Настоящая методика предназначена для количественного определения галоперидола в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием на жидкостном хроматографе 1200 фирмы Agilent Technologies. В качестве внутреннего стандарта использован пирроксан (пророксан), имеющий близкие к галоперидолу физико – химические характеристики (рис. 1 б) .

### ***Пробоподготовка крови для анализа.***

К 1 мл крови (плазмы) добавляется 50 мкл этанолового раствора внутреннего стандарта (пирроксан – 0,01 г/л), 1 мл 4М аммиачного буфера (рН=9,4) и 5 мл гептана с 2% изоамилового спирта. Содержимое встряхивается 10 минут, органический слой отделяется и фильтруется через безводный сульфат натрия в пробирку с крышкой в которую добавляется 250 мкл 0,5 % раствора муравьиной кислоты. Содержимое встряхивается 10 минут и 200 мкл нижнего водного слоя переносится в виалу для автосамплера.

### ***Хроматографический анализ.***

Образец анализируется на жидкостном хроматографе LC-MS 1200 фирмы “Agilent Technologies” с масс-спектрометрическим детектором 6120А. Условия анализа: предколонка 2,1\*12,5 мкл с сорбентом SB-C8 5 мкм, хроматографическая колонка 2,1\*150 мм с обращено-фазным сорбентом Zorbax Eclipse XDB-18 Nano-Bore 5 мкм, температура колонки 40 С. Элюенты – 0,2 % раствор муравьиной кислоты (рН=2,7) (А) и метанол (В), скорость подачи элюента 0,25 мл/мин, градиентный режим: в течение 10 мин поток элюента А меняется от 60 до 50% с и регенерация колонки в течение 3 мин 60 % элюента А. Объем вводимой пробы 10 мкл. Масс-спектрометрический детектор работает в режиме химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). Поток азота в источник ионов 5 л/мин, давление на небулайзере 20 psi, температура осушающего газа 350 С, испарителя 250 С, напряжение на капилляре 2000 вольт, ток коронного разряда 4 мка, Gain = 10, напряжение на фрагменторе 100 вольт, в режиме SIM с регистрацией положительных ионов: 376,2 (галоперидол), 338,2 (пирроксан).

В таблице 1 приведены метрологические характеристики определения галоперидола в крови по описанной выше методике, а в таблице 2 последовательность анализов с подготовкой калибровочной кривой.

Таблица 1

#### Метрологические характеристики методики

|  |       |
|--|-------|
| Предел обнаружения для галоперидола, нг/мл | 1     |
| Предел количественного определения, нг/мл  | 5     |
| Линейность, мкг/мл                         | 5÷500 |

В приложении 1 приведена хроматограмма контрольной крови, с концентрацией галоперидола 0,010 мкг/мл. Калибровочная кривая, полученная при отработке методики, приведена в приложении 2. Она описывается следующим уравнением:

$$Y = 0,012 + 2,058 * X, R = 0,9991$$

Где Y-концентрация галоперидола в мкг/мл, а X- отношение площадей пиков анализируемого вещества и внутреннего стандарта, R- коэффициент корреляции.

Таблица 2

Стандартная серия анализов калибровкой кривой

| № образца | Тип образца           |
|-----------|-----------------------|
| 1         | 500 нг\мл             |
| 2         | 200 нг/мл             |
| 3         | 20 нг/мл              |
| 4         | 5 нг/мл               |
| 5         | 0,5 нг/мл             |
| 6         | Бланк + В.С.          |
| 7         | Анализируемые образцы |

В таблице 3 приведены результаты контрольных анализов на точность и воспроизводимость.

Таблица 3

## Результаты контрольных анализов на точность и воспроизводимость

| № серии                    | Статистика | Галоперидол, нг\мл      |                           |
|----------------------------|------------|-------------------------|---------------------------|
|                            |            | Нижний контроль<br>(10) | Верхний контроль<br>(500) |
| 1                          |            | 10,5                    | 509                       |
|                            |            | 10,2                    | 551                       |
|                            |            | 13,3                    | 446                       |
|                            |            | 11,6                    | 471                       |
|                            |            | 12,6                    | 527                       |
|                            |            | 10,9                    | 522                       |
|                            | Среднее    | 11,5                    | 504                       |
|                            | Точность,% | 115                     | 100,8                     |
| Ср.кв.откл.                | 1,23       | 38,8                    |                           |
| Коэфф. Вар.%               | 10,6       | 7,7                     |                           |
|                            |            | 10,8                    | 536                       |
|                            |            | 9,4                     | 513                       |
|                            |            | 9,8                     | 445                       |
|                            |            | 8,9                     | 470                       |
|                            |            | 9,7                     | 505                       |
|                            |            | 9,3                     | 503                       |
|                            |            | 9,7                     | 495                       |
|                            |            | 96,5                    | 99                        |
|                            |            | 0,65                    | 32,5                      |
|                            |            | 6,7                     | 6,6                       |
| 2                          |            | 12,4                    | 499                       |
|                            |            | 11,0                    | 500                       |
|                            |            | 10,2                    | 507                       |
|                            |            | 10,0                    | 543                       |
|                            |            | 8,4                     | 509                       |
|                            |            | 12,00                   | 506                       |
|                            | Среднее    | 11,26                   | 516                       |
|                            | Точность,% | 112,6                   | 103,2                     |
| Ср.кв.откл.                | 0,73       | 19,9                    |                           |
| Коэфф. Вар.%               | 6,5        | 3,8                     |                           |
| <b>Генеральное среднее</b> |            | <b>10,7</b>             | <b>100,67</b>             |
| <b>Точность,%</b>          |            | <b>107</b>              | <b>100,67</b>             |
| <b>Ср.кв.откл.</b>         |            | <b>1,5</b>              | <b>2,81</b>               |
| <b>Коэфф. вар. %</b>       |            | <b>13,7</b>             | <b>2,79</b>               |

### ***Оборудование.***

1. Жидкостный хроматограф Agilent Technologies 1200 с диодно-матричным детектором.
2. Колонка Eclipse XDB-C18 5 мкм, 150\*2,1 мм
3. Предколонка SD-C8 5 мк, 12,5\*2,1 мм.
4. Набор пипеток – дозаторов.
5. Аппарат для встряхивания АБУ-6с или аналогичный.
6. Весы аналитические ВЛР-200 или аналогичные по классу точности.
7. Бытовой холодильник с морозильным отделением.

### ***Реактивы и материалы.***

1. Гептан нормальный эталонный.
2. Изоамиловый спирт чда или хч.
3. Метанол хч.
4. Этанол 95%.
5. Кислота хлористоводородная 0,1 н.
4. Сульфат натрия безводный квалификации чда.
5. Раствор галоперидола 5 мг/мл для инъекций (Сенорм, Sun Pharmaceutical Ind, Индия).
6. Таблетки пирроксана 0,015 г фирмы «Фармакон»
7. Муравьиная кислота хч.
8. Вода деионизированная.
9. Аммиак водный концентрированный чда.
10. Аммония хлорид хч.

### *Инструкция по стандартным операционным процедурам.*

- Приготовление 4М аммиачного буфера. К 214 г хлорида аммония, взвешенного на технических весах в стеклянном стакане емкостью 1 л, добавляется 700 мл дистиллированной воды и стакан подогревается с периодическим перемешиванием жидкости до полного растворения реактива. Затем добавляется 180 мл концентрированного раствора аммиака и объем доводится до 1 л дистиллированной водой. Проверяется рН среды  $9,4 \pm 0,1$ . При необходимости рН корректируется растворами аммиака или 1н раствором соляной кислоты.
- Приготовление 0,5 % раствора муравьиной кислоты. К 80 мл деионизированной воды в мерной колбе на 100 мл добавляется 0,5 мл муравьиной кислоты и объем воды в колбе доводится до метки.
- Приготовление 0,2 % раствора муравьиной кислоты. К 400 мл деионизированной воды в мерной колбе на 500 мл добавляется 1 мл муравьиной кислоты и объем воды в колбе доводится до метки.
- Приготовление раствора внутреннего стандарта: Стандартный раствор пирроксана с концентрацией 3 мг/мл приготавливается из двух таблеток лекарственного средства, содержащих по 15 мг пирроксана каждая. Таблетки гомогенизируются в ступке с 2 мл смеси этанола и 0,1 н раствора хлористоводородной кислоты (1:1 по объему), суспензия переносится в фильтровальную воронку с бумажным фильтром, которая помещена в мерный цилиндр объемом 10 мл. Ступка с пестиком промываются 4 раза смесью этанола и хлористоводородной кислоты порциями по 2 мл и растворы фильтруются через бумажный фильтр, объем фильтрата доводится этанолом до 10 мл.  
Раствор с концентрацией 0,1 мг/мл готовится добавлением в пробирку с 970 мкл этанола 33,5 мл раствора пирроксана с концентрацией 3 мг/мл.  
Рабочий раствор с концентрацией 0,01 мг/мл готовится разведением 1:9 раствора с концентрацией 0,1 мг/мл этанолом. Все растворы пирроксана хранятся в холодильнике при 2-4°C.
- Стандартные растворы анализируемого соединения: Стандартный раствор галоперидола с концентрацией 1 мг/мл готовится добавлением в пробирку с 800 мкл этанола 200 мкл раствора с концентрацией 5 мг/мл. Стандартный раствор хранится в морозильной камере холодильника.
- Приготовление рабочих растворов для калибраторов: Рабочие растворы для калибраторов готовятся из стандартного раствора анализируемого соединения каждые раз заново.

Рабочий раствор с концентрацией галоперидола 0,1 мг/мл готовится добавлением в пробирку с 900 мкл этанола 100 мкл стандартного раствора с концентрацией 1 мг/мл. Рабочие растворы с концентрациями 0,01 и 0,001 мг/мл готовятся последовательным разведением раствора с концентрацией 0,1 мг/мл этанолом 1:9.

- Приготовление калибраторов: Для приготовления калибраторов используют схему, приведенную в таблице 4.

Таблица 4.

Схема приготовления калибраторов.

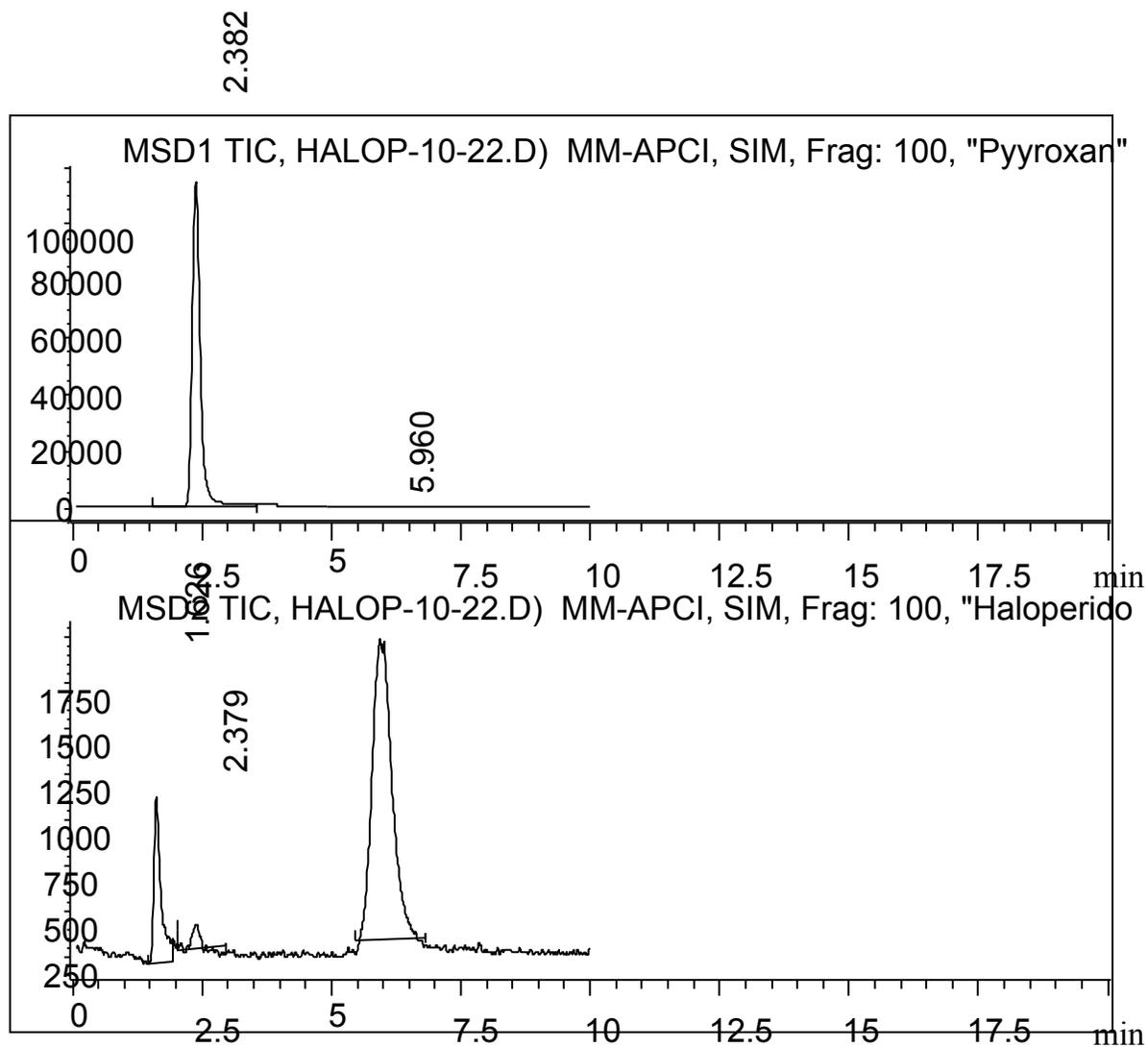
| № п/п | Название пробы | Калибровочная концентрация в крови, нг/мл | Концентрация рабочего раствора, мг/мл | Объем рабочего раствора на 1 мл крови, мкл |
|-------|----------------|---|---------------------------------------|--|
| 1     | Бланк          | 0   | 0                                     | 0  |
| 2     | Точка 1        | 1   | 0,001                                 | 1  |
| 3     | Точка 2        | 5   | 0,001                                 | 5  |
| 4     | Точка 3        | 20  | 0,001                                 | 20   |
| 5     | Точка 4        | 200                                       | 0,01                                  | 20   |
| 6     | Точка 5        | 500                                       | 0,01                                  | 50   |

К 1 мл "холостой" крови во флаконе на 14 мл добавляется соответствующее количество одного из рабочих растворов (по таблице 4). После этого пробы проходят все процедуры пробоподготовки и анализа, предусмотренные методом вместе с анализируемыми образцами. По результатам анализов калибраторов строится калибровочная кривая. Коэффициент корреляции калибровочной кривой должен быть не менее 0,99, а свободный член уравнения для расчета концентрации близок к нулю, все концентрации калибровочной кривой должны отличаться от целевых не более, чем на 20%. В точке "Бланк" анализируемое соединение не должны обнаруживаться. В точке 1 отношение сигнал/шум должно быть не менее 4/1.

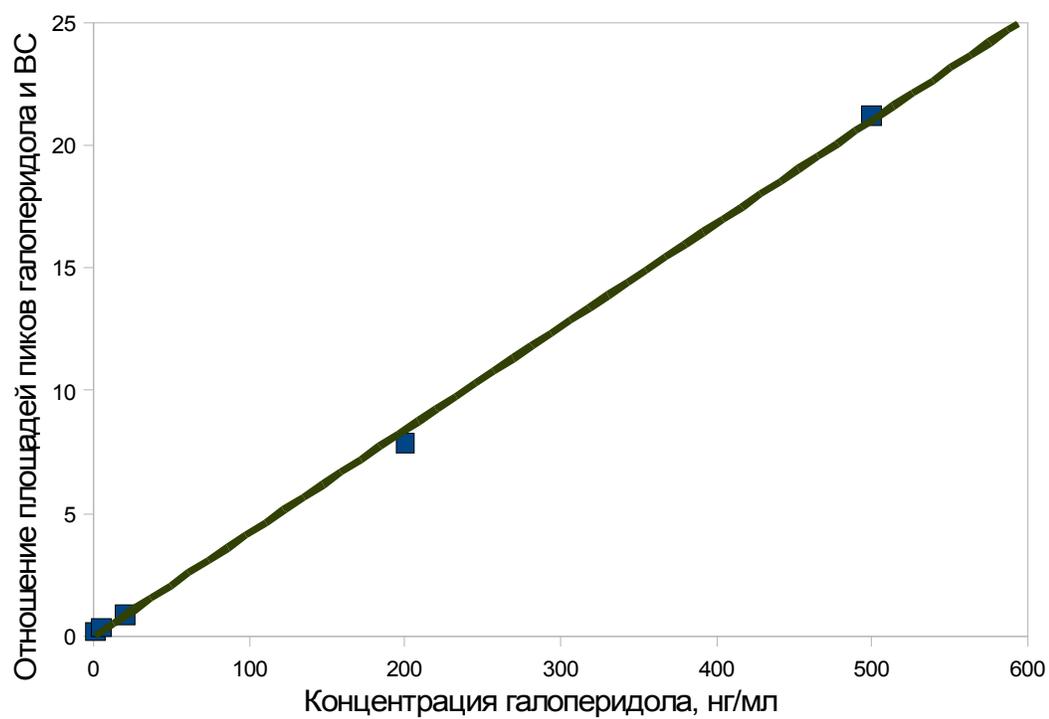
Так как данная методика не используется в рутинных анализах, то целесообразно калибровать прибор заново, каждый раз с применением 2-х точечной калибровки с концентрациями галоперидола 5 и 200 нг\мл. Рабочие растворы для перекалибровки готовятся каждый раз заново из исходного раствора теофиллина по описанной выше процедуре.

## Литература

1. *Uges D.R.A.* // TIAFT bulletin of the international association of forensic toxicologist – 1996. – Vol.26. N 1. – Supplement.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В 2-х томах. Т.1. - 9-е изд., М.: Медицина, 1984. – 624 с.
3. Маркова И.В., Афанасьева В.В., Цибулькина Э.К. Клиническая токсикология детей и подростков. С-Петербург.: Интермедика, 1999. - 400 с.



Хроматограмма экстракта контрольной крови с концентрацией галоперидола 10 нг/мл. Время удерживания пирроксана 2,38 мин., галоперидола 5,96 мин.



Калибровочная кривая для галоперидола в крови