

Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para a Determinação de Clorpromazina em Sangue por Extracção em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa

Development and Validation of an Analytical Method to Determine Chlorpromazine in Blood using Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Eugenia Gallardo¹, Mário Barroso²

¹ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Avenida do Campo Grande 376, 1749-026 Lisboa, Portugal.

² Instituto Nacional de Medicina Legal Delegação de Lisboa, Serviço de Toxicologia Forense, Rua Manuel Bento de Sousa 3, 1150-219 Lisboa, Portugal.

Resumo

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de clorpromazina em sangue total, tendo a protriptilina sido usada como padrão interno. A extracção e purificação dos analitos foi efectuada por extracção em fase sólida com colunas Oasis® HLB, e análise posterior por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa de impacto electrónico (GC/EI-MS).

Para a preparação das curvas de calibração foram fortificadas diariamente amostras de sangue branco com concentrações crescentes de clorpromazina entre 0,01 e 5 µg/mL. Foi utilizado um modelo de regressão linear, sendo os coeficientes de correlação superiores a 0,998. Os coeficientes de variação e os erros relativos foram respectivamente inferiores a 12 e 13%, cumprindo assim critérios internacionalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos. Foram também estudados os limites de detecção e quantificação, sendo de 3 e 10 ng/mL respectivamente. A interferência de outras substâncias foi excluída por análise de dez amostras brancas de sangue. O rendimento médio do método foi de 81%. Em virtude da sua simplicidade e rapidez, este método pode ser aplicado na determinação deste antipsicótico em amostras de sangue total, sendo adequado para análises de rotina no âmbito da toxicologia clínica e forense.

Palavras-chave: Clorpromazina; Extracção em fase sólida; Cromatografia gasosa/Espectrometria de massa.

Abstract

A new and sensitive method to determine chlorpromazine in whole human blood using protriptyline as the internal standard is described. The analyte and IS were extracted by solid-phase extraction using Oasis® HLB cartridges, and the extracts were analyzed by gas chromatography-electron impact ionization-mass spectrometry (GC/EI-MS).

Calibration curves were established daily in spiked blood samples between 0.01 and 5 µg/mL, in two linear ranges. The correlation coefficients were higher than 0.998. Precision and accuracy fulfilled the internationally accepted criteria (coefficients of variation were inferior to 12%, and the measured concentrations were within ±13% of the true value). Limits of detection and quantitation were respectively 3 and 10 ng/mL. No interfering substances were detected by analysis of ten blank blood samples of different origin. Mean recovery, calculated at three concentration levels, was 81%. Because of its simplicity and speed, the proposed method can be applied in the determination of this antipsychotic drug in whole blood samples, and is suitable for application in clinical and forensic toxicology routine analysis.

Key-words: Chlorpromazine; Solid-phase extraction; Gas chromatography/Mass spectrometry.

Introducao

A clorpromazina foi sintetizada em 1952, sendo ainda hoje considerada um dos compostos fenotiazinicos com maior eficacia no tratamento de transtornos psicoticos. Este farmaco pode ser administrado por via oral ou intramuscular, em doses unicas de 25-100 mg nos casos agudos ou administracoes cronicas de doses diarias de ate 2400 mg nos tratamentos de manutencao^[1].

Analogamente a outras fenotiazinas, a clorpromazina actua selectivamente bloqueando os receptores dopaminergicos pre e pos-sinapticos, bem como outros tipos de receptores (serotonergicos, histaminergicos, colinergicos e adrenergicos)^[2,3]. E rapidamente absorvida a partir do tracto gastrointestinal, sendo no entanto a sua biodisponibilidade variavel devido a existencia de um acentuado metabolismo de primeira passagem. Este composto possui uma elevada taxa de ligacao as proteinas plasmaticas (>85%), principalmente a albumina. Como consequencia da sua elevada lipossolubilidade, a clorpromazina distribui-se bem por todo o organismo, atravessando todo tipo de membranas, incluindo a barreira hemato-encefalica e a placenta^[4].

Quanto ao metabolismo, este e extremamente complexo, originando-se mais de 160 metabolitos diferentes, tendo sido isolados pelo menos 20. Menos de 1% da dose administrada e eliminada de forma inalterada na urina, e a maior parte dos metabolitos e excretada tanto na forma conjugada como nao conjugada^[1]. A clorpromazina possui uma elevada semi-vida de eliminacao, que pode variar de 8 a 35 horas^[4].

As concentracoes terapeuticas no soro estao normalmente compreendidas entre 0,03 e 0,5 µg/mL, ao passo que concentracoes entre 0,5 e 2 µg/mL sao consideradas toxicas. Estao descritos casos fatais para concentracoes superiores a 2 µg/mL^[5]. Os sintomas de toxicidade aguda associada a este composto incluem, desmaio, hipotensao, taquicardia, tremores, convulsoes e coma^[1,6]. Encontra-se ainda descrito o denominado “síndrome neuroleptico maligno”, que ocorre normalmente em pacientes do foro psiquiatrico a receber doses diarias elevadas de clorpromazina ou outras fenotiazinas. Pensa-se que o mecanismo envolve asfixia durante um ataque convulsivo, fibrilhacao ventricular ou falencia cardiovascular durante uma crise de hipotensao^[1,4].

Encontram-se descritos na literatura varios metodos para a determinacao de clorpromazina, empregando a extraccao liquido-liquido^[7-10] e a extraccao em fase solida (SPE)^[11-14], quer com cromatografia liquida quer com cromatografia gasosa.

No que respeita a SPE, tem sido utilizados varios tipos de colunas de extraccao, nomeadamente Chem Elut e

Introduction

Chlorpromazine was first synthesized in 1952 and was found to be effective in the treatment of psychotic disorders in the same year. It is still considered one of the most useful of the numerous phenothiazine derivatives available. The drug is administered by oral or intramuscular administration, in single doses of 25-100 mg for acute disturbances or in chronic daily amounts of up to 2400 mg for the maintenance of mental patients^[1].

Similarly to other phenothiazines, chlorpromazine acts by selectively blocking both pre and post synaptic dopamine receptors, as well as other receptors (serotonergic, cholinergic, adrenergic and histamine receptors)^[2,3]. It is readily absorbed from the gastrointestinal tract, however its bioavailability is variable due to considerable first pass metabolism by the liver. This compound is highly bound to plasma proteins (>85%), principally albumin, and, as it is highly lipophilic, it distributes widely throughout the body, crossing all types of membranes, including the blood-brain barrier and placenta^[4].

Chlorpromazine's metabolism is extremely complex, originating more than 160 different metabolites, from which at least 20 have been isolated. Less than 1% is excreted unchanged in the urine, and most of its metabolites are excreted as unconjugated or conjugated forms^[1]. The terminal half-life of chlorpromazine can vary from 8 to 35 hours^[4].

Serum therapeutic concentrations of chlorpromazine are usually in the range of 0.03 to 0.5 µg/mL, whereas concentrations between 0.5 and 2 µg/mL are reported to produce toxic effects. Fatalities have been associated with serum levels higher than 2 µg/mL^[5]. Symptoms of acute toxicity include fainting, hypotension, tachycardia, tremor, convulsions and coma^[1,6]. A syndrome known as “neuroleptic malignant syndrome” has occurred among psychiatric patients receiving large daily doses of chlorpromazine or other phenothiazines; the mechanism is believed to involve asphyxiation during a convulsive seizure, ventricular fibrillation or cardiovascular failure during a hypotensive crisis^[1,4].

Several methods are described for the determination of chlorpromazine, using liquid-liquid extraction^[7-10] and solid-phase extraction (SPE)^[11-14] are described, using either gas or liquid chromatography.

Concerning SPE, several types of extraction cartridges have been used, namely Chem Elut and Bond Elut Certify^[12], C8 bonded phase^[13], C18 Sep-pack^[15] and cyanopropyl cartridges^[16]. However, to the best of our knowledge, the application of Oasis HLB extraction cartridges to the determination of chlorpromazine in whole blood is not described in the literature.

This paper describes a new, rapid and sensitive method

Bond Elut Certify^[12], fase ligada em C8^[13], C18 Sep-pack^[15] e cianopropil^[16]. No entanto, tanto quanto sabemos, a aplicação das colunas de extração Oasis HLB para a determinação de clorpromazina em sangue total não está descrita na literatura.

Assim, o objectivo deste trabalho foi desenvolver uma nova metodologia analítica rápida e sensível para a determinação de clorpromazina em amostras de sangue total com extração por colunas Oasis HLB e análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massa de impacto electrónico (GC/EI-MS).

Material e Métodos

Reagentes e amostras biológicas

Os padrões analíticos cloridrato de clorpromazina e cloridrato de protriptylina foram adquiridos à Sigma Aldrich Química S.A (Sintra, Portugal). O metanol (HPLC grade) foi fornecido pela Merck Co (Darmstadt, Alemanha). Foi utilizado um sistema Milli-Q da Millipore (Molsheim, França) para a obtenção de água desionizada. Para efectuar a extração em fase sólida foram utilizadas colunas Oasis® HLB (3 mL, 60 mg) da Waters (Milford, MA, EUA), e um sistema de vácuo Vac-Elut SPS 24 acoplado a uma bomba de vácuo (AKNF) da Varian (Harbour City, CA, EUA).

Foram preparadas soluções-mãe de ambos os compostos a 1000 µg/mL, tendo sido armazenadas protegidas da luz a 4 °C. Subsequentemente foram preparadas soluções de trabalho a 50 e 5 µg/mL para a clorpromazina e a 10 µg/mL para a protriptylina [padrão interno (PI)], também em metanol.

A amostra biológica utilizada na validação do método foi sangue humano, obtido do Instituto Português do Sangue (excedente de transfusões fora do prazo de validade), que foi armazenado a -20 °C até à análise.

Equipamento e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram efectuadas num cromatógrafo de gases modelo 6890 Series acoplado a um detector selectivo de massas modelo 5973, ambos da Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemanha). Foi utilizada uma coluna capilar com 5% de fenilmetilsiloxano (Ultra 2) de dimensões 12m de comprimento x 0.25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura (J & W Scientific, Folsom, CA, EUA). O hélio foi o gás de arraste com um fluxo constante de 1 mL/min.

O programa de temperaturas do cromatógrafo foi iniciado a 150 °C durante um minuto, seguindo-se uma rampa de 20° C/minuto até aos 270 °C, que se mantiveram por cinco minutos.

As temperaturas do injector e do detector foram de 200 e 280 °C respectivamente, tendo-se trabalhado com uma razão de split de 1:5.

O detector selectivo de massa foi operado com uma

based on solid-phase extraction using Oasis HLB cartridges and gas chromatography/electron impact ionization mass spectrometry (GC/EI-MS) for the determination of chlorpromazine in whole blood samples.

Material and Methods

Reagents and biological sample

Analytical standards, chlorpromazine hydrochloride and protriptyline hydrochloride, were purchased from Sigma Aldrich Química S.A (Sintra, Portugal). Methanol (HPLC grade) was supplied by Merck Co (Darmstadt, Germany). Water was purified by a Milli-Q system obtained from Millipore (Molsheim, France). Oasis® HLB (3 mL, 60 mg) extraction cartridges were obtained from Waters (Milford, MA, USA), and a Vac-Elut SPS 24 system coupled to a vacuum pump (AKNF) were purchased from Varian (Harbour City, CA, USA).

Methanolic standard stock solutions at 1000 µg/mL were prepared and stored light protected at 4 °C. Subsequently working solutions at 50 and 5 µg/mL for chlorpromazine hydrochloride and at 10 µg/mL for protriptyline hydrochloride [internal standard (IS)] were prepared in methanol.

The biological sample used in the validation experiments was fresh human blood, which was obtained from the excess supplies of the Portuguese Institute of Blood (outdated transfusions), and was stored at -20 °C until analysis.

Instrumentation

Chromatographic analysis was performed using a 6890 Series gas chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), equipped with a model 5973 mass selective detector (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). A capillary column (12m x 0.25mm I.D., 0.25µm film thickness) packed with 5% phenylmethylsiloxane (Ultra 2), supplied by J & W Scientific (Folsom, CA, USA), was used. The carrier gas was helium at a constant flow rate of 1mL/minute.

The GC oven temperature program started at 150 °C for 1 minute, and then raised by 20 °C/min to 270 °C, where it was kept constant for 5 minutes. The injector port (split ratio 1:5) and the detector temperatures were set to 200 °C and 280 °C respectively. The mass spectrometer was operated with a filament current of 300 µA and an electron energy of 70 eV in the electron impact (EI) mode. Quantification was done in the selected ion monitoring (SIM) mode, and the monitored ions were 318, 272 and 232 for chlorpromazine, and 191, 165 and 202 for protriptyline (quantitation ions are underlined). The retention times were 5.48 and 6.52 minutes for IS and chlorpromazine respectively, obtaining a good separation of both compounds (Figure 1).

corrente de filamento de 300 μA e uma energia de 70 eV no modo de impacto electrónico (EI). A análise quantitativa foi efectuada em modo SIM (Selective Ion Monitoring), tendo sido seleccionados os iões 318, 272 e 232 para a clorpromazina, e 191, 165 e 202 para a protriptilina (os iões quantificadores encontram-se sublinhados). Os tempos de retenção foram de 5,48 para o PI e 6,52 minutos para a clorpromazina, conseguindo-se uma boa separação cromatográfica (Figura 1).

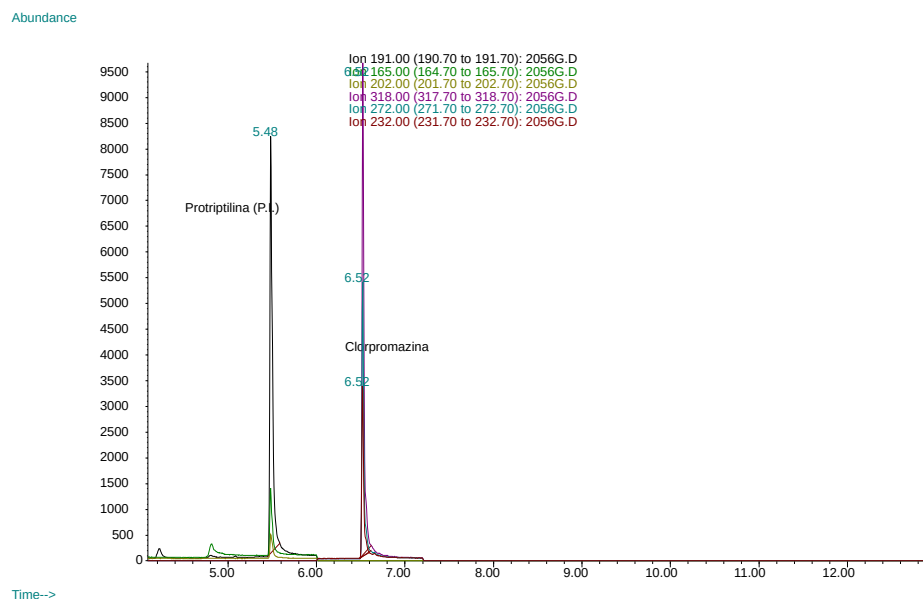


Figura 1- Cromatograma de iões da clorpromazina e protriptilina (padrão interno) em sangue.
Figure 1- Ion chromatogram of chlorpromazine and protriptyline (internal standard) in blood.

Procedimento de extracção

Adicionaram-se 50 μL de uma solução de protriptilina a 10 $\mu\text{g/mL}$ a 500 μL de sangue. Após adição de 2 mL de água desionizada, a amostra foi vigorosamente agitada por 30 segundos e sujeita a centrifugação a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. O sobrenadante foi então adicionado à coluna de extracção previamente acondicionada com 1 mL de metanol e 1 mL de água desionizada.

Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 1 mL de uma solução aquosa de metanol a 5%, tendo-se posteriormente procedido à sua secagem durante 15 minutos sob vácuo total. Procedeu-se então à recolha dos analitos com 1 mL de metanol.

Os extractos obtidos foram evaporados à secura sob uma corrente de azoto e reconstituídos em 50 μL de metanol, dos quais uma alíquota de 1 μL foi injectada no sistema cromatográfico.

Resultados e Discussão

O método descrito foi validado em termos de selectividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exactidão e recuperação absoluta, segundo as normas da Food and Drug

Extraction procedure

To a 500 μL whole blood sample were added 50 μL of a protriptyline solution at 10 $\mu\text{g/mL}$. The sample was diluted with 2 mL of distilled water, vigorously agitated for 30 seconds and centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes. The supernatant was added to an Oasis® HLB extraction cartridge, previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of deionised water.

After the sample had passed through, the column was washed with 1 mL of a 5% methanolic solution in distilled water, and was dried under full vacuum for 15 minutes. The analytes were eluted with 1 mL of methanol, which was afterwards evaporated to dryness at 40 °C under a gentle stream of nitrogen. The extract was dissolved in 50 μL of methanol, and an aliquot of 1 μL was injected in the GC.

Results and discussion

The analytical validation was performed according to the guiding principles of the Food and Drug Administration (FDA) and International Conference on Harmonization (ICH)^[26,27]. The procedures were

Administration (FDA)^[17] e da International Conference on Harmonisation (ICH)^[18].

A selectividade do método foi avaliada por análise de 10 amostras de sangue branco de diferente origem, cujos cromatogramas foram comparados com os obtidos após fortificação de amostras de sangue a baixas concentrações de analito (0,01 µg/mL). Não foram observadas quaisquer interferências de constituintes da matriz nos tempos de retenção e iões seleccionados para a clorpromazina e protriptylina.

As curvas de calibração (razão de áreas entre o analito e o PI vs. concentração do analito) foram preparadas recorrendo à fortificação de amostras de sangue branco com concentrações crescentes de clorpromazina, extraídas e analisadas pelo procedimento anteriormente descrito, entre 0,01 e 1,00 µg/mL, e 1,00 e 5,00 µg/mL. Os coeficientes de correlação foram respectivamente 0,9999 e 0,9985.

A gama de calibração foi dividida em duas gamas lineares com o objectivo de assegurar que a exactidão dos calibradores se encontrava num intervalo de ±15% da concentração aceite como verdadeira para todos os níveis de concentração [excepto para o limite inferior de quantificação (LLOQ), onde foi aceite uma variação de ±20%], de acordo com os critérios anteriormente referidos^[17,18]. Estes dados são apresentados na Tabela 1. O limite de detecção (LOD) foi definido como a mais baixa concentração de clorpromazina capaz de originar um sinal pelo menos 3 vezes superior ao sinal de ruído, e foi de 3 ng/mL. Quanto ao limite de quantificação (LOQ), este foi definido como a menor concentração de clorpromazina que pode ser medida com precisão e exactidão adequadas (coeficiente de variação de 20 % ou menos e um erro relativo de ± 20 %), tendo sido de 10 ng/mL.

validated in terms of selectivity, linearity, limits of detection and quantitation, precision, accuracy and absolute recovery.

Method selectivity was checked by analysis of 10 blank samples of different origin and comparison of the obtained chromatograms with those obtained using spiked samples at low concentrations of the analyte (0.01 µg/mL). No interfering peaks were observed at the retention times and selected ions of chlorpromazine and protriptyline.

The calibration curves (peak area ratio between analyte and IS vs. analyte concentration) were established in spiked blood samples, prepared and analyzed using the above mentioned procedure, between 0.01 and 1.00 µg/mL, and 1.00 and 5.00 µg/mL. The correlation coefficients were 0.9999 and 0.9985 respectively.

The calibration range was split in two linear ranges, in order to assure that calibrator's accuracy was within ±15% of the nominal concentration [±20% at the lower limit of quantitation (LLOQ)] for all concentration levels, according to the FDA and ICH's guidelines for bioanalytical method validation^[16,17]. Calibration data is shown in Table 1. The limit of detection (LOD) was defined as the lowest tested chlorpromazine concentration yielding a signal-to-noise ratio higher than 3, and was 3 ng/mL. The limit of quantitation (LOQ) was defined as the lowest chlorpromazine concentration that could be measured with adequate precision [coefficient of variation (CV) of 20 % or less] and accuracy (measured concentration within ± 20 % of the true value), and was found to be 10 ng/mL.

Tabela 1 - Parâmetros de linearidade.

Table 1 - Linearity data.

Gama de calibração <i>Calibration range</i>	Linearidade (n=6) <i>Linearity (n=6)</i>		
	Declive	O.O.*	Valores de r ²
	<i>Slope</i>	<i>Intercept</i>	<i>r² values</i>
0,01-1,00	0,4027	-0,0001	0,9999
1,00-5,00	0,4768	-0,0969	0,9985

*O.O.: Ordenada na origem

Estes baixos limites analíticos permitem a detecção e quantificação de concentrações terapêuticas e subterapêuticas de clorpromazina, utilizando um reduzido volume de amostra (apenas 500 µL). O uso de um volume de amostra tão pequeno é extremamente útil, especialmente em toxicologia de emergência, uma

These limits allow for the detection and quantitation of therapeutic and even sub therapeutic concentrations of chlorpromazine, using a reduced sample volume of only 500 µL. This small sample volume is extremely useful, especially in emergency toxicology, since several exams may be needed, and the sample volume is

vez que pode ser necessário efectuar várias análises e o volume de amostra disponível é frequentemente limitado. Por outro lado, a quantificação de concentrações tóxicas e letais é também possível, devido à ampla gama de calibração adoptada.

A precisão do método foi avaliada em termos de precisão intra- e interdia. Para estudar a precisão intradia, foram preparadas e analisadas no mesmo dia séries de 6 amostras fortificadas a baixas, médias e altas concentrações (0,05, 0,5 e 2,50 µg/mL). Em termos de coeficientes de variação, a precisão intradia foi inferior a 6% com uma exactidão (expressa em termos de erro relativo) inferiores a 11,1% para todas as concentrações.

Para o cálculo da precisão interdia, foram analisadas séries de 6 amostras fortificadas com as mesmas concentrações em 4 dias diferentes, durante um período de 2 meses. Neste caso, os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 5,2% com uma exactidão de inferior a 12,5% para todas as concentrações testadas.

Assim, podemos afirmar que os valores obtidos para a precisão e exactidão cumpriram plenamente os critérios de aceitabilidade preconizados pelas guias da FDA para a validação de métodos bioanalíticos (precisão = 15% e exactidão de $\pm 15\%$). Na Tabela 2 apresentam-se os dados de precisão e exactidão.

often limited. On the other hand, quantitation of toxic and lethal concentrations is also possible, due to the wide calibration range adopted.

Precision of the method was accessed in terms of both intra and interday precision. To evaluate intraday precision sets of 6 spiked samples at low, medium and high concentrations (0.05, 0.5 and 2.50 µg/mL) were prepared and analyzed in the same day. In terms of coefficients of variation, intraday precision was inferior to 6% with an accuracy (expressed in terms of trueness) inferior to 11.1% for all concentrations.

Interday precision was evaluated by analyzing sets of 6 spiked samples at the same concentration levels on 4 different days, within a 2 months period. The obtained values for interday precision were inferior to 5.2% with an accuracy of less than 12.5% for all tested concentrations.

The obtained values for precision and accuracy fell well within the limits of acceptable variability defined by the FDA's guidelines for bioanalytical method validation (precision = 15% and accuracy of $\pm 15\%$).

Table 2 resumes precision and accuracy data.

Tabela 2- Precisão e exactidão para a clorpromazina em sangue.

Table 2- Precision and accuracy for chlorpromazine in blood.

Concentração <i>Concentration</i>	Precisão intradia <i>Intraday precision</i>			Precisão interdia <i>Interday precision</i>		
	Concentração média <i>Concentration mean</i>	CV ^a (%)	Bias ^b (%)	Concentração média <i>Concentration mean</i>	CV ^a (%)	Bias ^b (%)
(µg/mL)	(µg/mL)			(µg/mL)		
0,05	0,06	1,10	11,09	0,06	1,49	12,48
0,50	0,51	5,98	2,10	0,53	4,57	5,90
2,50	2,31	3,15	-7,53	2,39	5,19	-4,34

n=6; ^aCV, coeficiente de variação; ^bBias, [(concentração medida-concentração teórica)/concentração teórica]X100

^aCV, coefficient of variation; ^bBias, [(measured concentration-nominal concentration)/nominal concentration] ×100

Finalmente foi calculada a recuperação absoluta do método por análise de 6 amostras fortificadas a 0,05, 0,5 e 2,50 µg/mL, às quais o padrão interno foi apenas adicionado após o processo de extracção e antes da análise cromatográfica propriamente dita. Os valores calculados por interpolação na curva de calibração foram comparados com as concentrações teóricas, sendo de 85,97%, 77,86% e 79,17% para as concentrações de 0,05, 0,50 e 2,50 µg/mL respectivamente.

Absolute recovery of the method was calculated by analysis of 6 spiked samples at 0.05, 0.5 and 2.50 µg/mL, in which the internal standard was only added after the cleanup procedure, and prior to chromatographic analysis. The calculated values by interpolation in the calibration curves were compared with the theoretical concentrations. Absolute recovery was 85.97%, 77.86% and 79.17% at 0.05, 0.50 and 2.50 µg/mL respectively.

Conclusões

A extração em fase sólida acoplada à GC/EI-MS mostrou ser analiticamente adequada para a determinação de clorpromazina em amostras de sangue total. A metodologia descrita permite reduzir o tempo de preparação de amostra bem como o volume da mesma, o que não constitui um problema, já que se conseguem detectar pequenas concentrações do composto, como se consegue inferir dos limites de detecção e quantificação obtidos. Por outro lado, esta técnica de extração possui algumas vantagens em relação à extração líquido-líquido, como sejam o facto de requerer menor quantidade de solventes orgânicos, com as consequentes vantagens em termos de contaminação ambiental; é mais facilmente automatizável, o que permite a análise de um maior número de amostras no mesmo intervalo de tempo; e os cromatogramas obtidos são geralmente mais limpos, conseguindo-se menores limites de detecção e quantificação.

Podemos então afirmar que o método aqui apresentado é adequado para aplicação em laboratórios de toxicologia clínica e forense, na determinação de clorpromazina em amostras de sangue total.

Conclusions

Solid-phase extraction coupled with GC/EI-MS has proven to be analytically suitable to determine chlorpromazine in whole blood samples. It offers time reduction and small sample volumes, simplicity and sensitivity for the quantitative determination of low concentrations of the compound. Furthermore, this extraction technique displays some advantages over liquid-liquid extraction, such as the fact that less organic solvents are required to accomplish the analysis, which is important in terms of environmental contamination; it's easier to automate, providing higher sample throughput; and also the obtained chromatograms are in general cleaner, which allows lower limits of detection and quantitation.

This validated methodology is appropriate for application in clinical and forensic toxicology laboratories for the determination of chlorpromazine in situations where it is involved.

Referências / References

- [1] Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 7th ed. Foster City (CA): Biomedical Publications; 2004.
- [2] Flórez J. Fármacos antipsicóticos neurolépticos. In: Flórez J, editor. Farmacología Humana. 4ª ed. Barcelona: Masson S.A.; 1997. p. 563-577.
- [3] da Silva PS. Antipsicóticos. In: Osswald W, Guimarães S, editores. Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. 4ª ed. Porto: Porto Editora; p. 119-130.
- [4] Baldessarini RJ, Tarazi FI. Drugs and treatment of psychiatric disorders: psychosis and mania. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 485-520.
- [5] Uges D. Therapeutic and Toxic Drug Concentrations List. The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) [document online] [cited 2007 Apr 25]. in: URL: http://www.tiaft.org/tmembers/ttv/ttv_ps.html.
- [6] Gisbert Calabuig J.A. Medicina legal y toxicología. 5ª ed. Barcelona: Masson S.A.; 1998.
- [7] Zhang G, Terry AV Jr, Bartlett MG. Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of the lipophilic antipsychotic drug chlorpromazine in rat plasma and brain tissue. J Chromatogr B 2007 (in press).
- [8] Mercolini L, Grillo M, Bartoletti C, Boncompagni G, Raggi MA. Simultaneous analysis of classical neuroleptics, atypical antipsychotics and their metabolites in human plasma. Anal Bioanal Chem. 2007; 388: 235-43.
- [9] Allender WJ, Archer AW, Dawson AG. Extraction and analysis of chlorpromazine and its major metabolites in post mortem material by enzymic digestion and HPLC. J Anal Toxicol. 1983; 7: 203-206.
- [10] McKay G, Hall K, Cooper JK, Hawes EM, Midha KK. Gas chromatographic-mass spectrometric procedure for the quantitation of chlorpromazine in plasma and its comparison with a new high-performance liquid chromatographic assay with electrochemical detection. J Chromatogr. 1982; 232: 275-282.
- [11] Josefsson M, Kronstrand R, Andersson J, Roman M. Evaluation of electrospray ionisation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for rational determination of a number of neuroleptics and their major metabolites in human body fluids and tissues. J Chromatogr B. 2003; 789: 151-167.
- [12] Sanchez de la Torre C, Martinez MA, Almarza E. Determination of several psychiatric drugs in whole blood

using capillary gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detection: comparison of two solid phase extraction procedures. *Forensic Sci Int.* 2005; 155:193-204

[13] Smith CS, Morgan SL, Greene SV, Abramson RK. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic method for chlorpromazine and thirteen metabolites. *J Chromatogr.* 1987; 423: 207-216.

[14] Ohkubo T, Shimoyama R, Sugawara K. Determination of chlorpromazine in human breast milk and serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1993; 614: 328-332.

[15] Ninci R, Giovannini MG, Della Corte L, Sgaragli G. Isothermal gas chromatographic determination of nanogram amounts of chlorimipramine, chlorpromazine and their N-desmethyl metabolites in plasma using nitrogen-selective detection. *J Chromatogr.* 1986; 381: 315-322.

[16] Mercolini L, Grillo M, Bartoletti C, Boncompagni G, Raggi MA. Simultaneous analysis of classical neuroleptics, atypical antipsychotics and their metabolites in human plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 388: 235-243.

[17] Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for industry, bioanalytical method validation. [document online] 2001 [cited 2006 Oct 10]. in: URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.

[18] International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical methods: Methodology ICH Q2 B. [document online] 1996 [cited 2006 Oct 10]. In: URL: http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID=4188@_MODE=GLB.