

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. О. Васюк

УДК 615.218:54.062:542.8

## ВИЗНАЧЕННЯ БУСПІРОНУ В БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

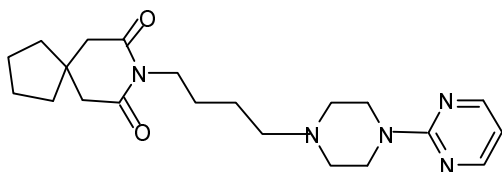
©І. Й. Галькевич

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

**Резюме:** розроблено умови ідентифікації та кількісного визначення буспірону в присутності метаболітів методом ВЕРХ на колонці ACE5 C18. Проведено порівняльну оцінку ефективності ізолювання буспірону із модельних зразків печінки підкисленою водою та підкисленим ацетонітрилом. Для очистки проб від домішок підібрано умови твердофазної екстракції на картриджах Oasis.

**Ключові слова:** буспірон, твердофазна екстракція, методи ізолювання, печінка, високоефективна рідина хроматографія (ВЕРХ).

**Вступ.** Буспірон один із анксиолітичних засобів, який тривалий період застосовується в медичній практиці для лікування станів тривоги, неврозів та соматичних розладів [1, 2]. В хімічному відношенні це 8-[4-(4піримідин-2-іл піперазин-1-іл)бутил]-8-заспіро[4,5]декан-7,9-діон:



Впливає на психофізичні властивості організму, знижує концентрацію уваги і швидкість реакції, особливо при одночасному вживанні з алкоголем чи з препаратами, що пригнічують центральну нервову систему [3]. Симптоми інтоксикації спостерігаються при прийманні буспірону у дозі вище 375 мг на добу. Летальні випадки отруєнь настають в результаті прийому буспірону із інгібіторами MAO [4,5,6].

Метаболізм буспірону відбувається в печінці під впливом ферменту цитохрому P450 [7]. Згідно з літературними джерелами, біодоступність буспірону є незначною (до 4%) і тому основна кількість прийнятої дози виводиться з сечею [8].

У джерелах літератури описано методики визначення рівня концентрації буспірону в плазмі, сечі та лікарських засобах методами високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), газової хроматографії (ГХ) та капілярного електрофорезу [9,10,11]. Проте не наведено методик ізолювання буспірону із внутрішніх органів, які поступають на дослідження в бюро судово-медичної експертизи при підозрі на отруєння лікарськими препаратами.

Тому мета роботи полягала в розробці ефективною методики ізолювання буспірону із біологічних тканин та підборі оптимальних умов визначення методом ВЕРХ у присутності метаболітів.

**Методи дослідження.** Ідентифікацію та кількісне визначення буспірону, виділеного із біологічного матеріалу, проводили методом ВЕРХ. Роботу проводили на рідинному хроматографі Waters 2690 (Separation Module). Колонка ACE 5 C18 (Silica Type, 250 мм x 4,6 мм). Температура колонки в робочому стані 25 °С. Застосовували градієнтний режим подачі рухомої фази. Рухома фаза: суміш ацетонітрилу (розчин А) та 0,1% водний розчин трифлуорацетатної кислоти (TFA) (розчин В). Співвідношення між об'ємами розчинів А та В протягом першої хвилини 95:5, з другої по двадцять хвилину 45:55, з 21 по 25 хв 10:90, і з двадцять шостої по тридцять хвилину 95:5. Швидкість рухомої фази 1 см<sup>3</sup>/хв, об'єм введеної проби 10 мкл. Детектування проводили при довжині хвилі 235 нм (матрично-діодний детектор).

Кількісне визначення проводили методом абсолютного калібрування, для чого розраховували рівняння градувальної кривої, застосовуючи програмне забезпечення приладу Empower Pro. Для побудови градувального графіку використовували стандартний зразок буспірону гідрогенхлориду (Sigma, USA). Готували стандартний розчин буспірону в метанолі із вмістом 1 мг/см<sup>3</sup>. Шляхом розведення стандартного розчину метанолом готували розчини буспірону із вмістом 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 мкг/см<sup>3</sup>.

Метанол, ацетонітрил та трифлуорацетатна кислота відповідали кваліфікації "розчинник для хроматографії".

Для розробки методики ізолювання буспірону використовували печінку трупів людей, що заги-

нули від травм. У гомогенізовані проби біологічного матеріалу масою по 25 г вносили по 25, 50, 100, 200 та 500 мкг буспірону гідрогенхлориду у вигляді водного розчину. Проби перемішували і залишали на 24 год при температурі 12 °С. Після вказаного часу проводили ізолювання.

Ізолювання буспірону із модельних зразків біологічного матеріалу проводили водою, підкисленою оксалатною кислотою, а також підкисленим ацетонітрилом. Воду, підкислену оксалатною кислотою, найчастіше використовують у вітчизняних лабораторіях бюро судово-медичної експертизи для ізолювання речовин основного та кислотного характеру із органів, а методика виконання описана в нормативних документах [12].

Ефективність методики ізолювання перевіряли на органах тварин (щурів). Для цього застосовували серію тварин масою 180–230 г, які протягом 18 год тричі отримували буспірон у дозі 6 мг/кг. Тваринам вводили водний розчин необхідної кількості препарату через зонд у шлунок. Через добу тварин декапітували під ефірним наркозом і для досліджень застосовували печінку.

**Методика ізолювання буспірону з печінки.** Проби біологічного матеріалу заливали ацетонітрилом до повного покриття твердих частинок, підкисляли насиченим розчином оксалатної кислоти до рН 2-3 (за універсальним індикатором) і настоювали протягом 30 хвилин. Під час настоювання біологічний матеріал обробляли УЗ (протягом 15 хв, частота 42 кГц та потужність 50 Вт). Рідину зливали, а біологічні зразки ще двічі настоювали з новими порціями ацетонітрилу, підкислюючи його до рН 2-3 насиченим розчином оксалатної кислоти. Під час кожного із настоювань біологічні зразки обробляли УЗ (по 15 хв).

Ацетонітрильні витяжки із кожної порції біологічного матеріалу об'єднували, центрифугували (15 хв при 5000 об/хв) та розводили дистильованою водою. Об'єми витяжки та води співвідносилися як 1:3. У кислі ацетонітрильні витяжки вносили 25 % розчин аміаку до рН 9 (за універсальним індикатором) і двічі екстрагували буспірон хлороформом. Об'єм хлороформу для однократної екстракції відповідав 1/5 об'єму водно-ацетонітрильної фази. Хлороформові екстракти об'єдну-

вали і випаровували досуха при 30 °С. Після цього сухі залишки розчиняли в 5 см<sup>3</sup> метанолу.

Експериментальними дослідженнями було встановлено, що при ізолюванні ацетонітрилом хлороформові екстракти, а також метанольні розчини сухих залишків містять пігменти, жирові та білкові компоненти, які впливають на результат визначення кількісного вмісту буспірону методом ВЕРХ. Тому метанольні розчини очищали методом твердофазної екстракції.

**Очистка метанольних розчинів методом твердофазної екстракції.** Для цього з кожної проби відбирали по 2 см<sup>3</sup> метанольних розчинів, отриманих при розчиненні сухих залишків, і випаровували їх до 0,75 см<sup>3</sup> в потоці азоту. Оскільки у більшості випадків із проб печінки отримують екстракти, що містять велику кількість жирових компонентів, які закупорюють пори сорбенту, жирову емульсію руйнували. Для цього до упарених метанольних проб (об'ємом 0,75 см<sup>3</sup>) вносили по 0,2 см<sup>3</sup> 25 % розчину амонію сульфату, доводили дистильованою водою до 2 мл та центрифугували (15 хв при 5000 об/хв). Всю рідку фазу кількісно пропускали через катриджі Oasis (30 мг), які попередньо кондиціонували 1 см<sup>3</sup> метанолу та 1 см<sup>3</sup> дистильованої води. Після пропускання досліджуваного розчину катриджі промивали 2 см<sup>3</sup> буферної суміші Бріттона–Робінсона (рН=6,85) і 1 см<sup>3</sup> дистильованої води. Сорбент висушували в потоці азоту після чого елюювали буспірон 1 см<sup>3</sup> метанолу. Метанольний елюат випаровували досуха, а сухий залишок розчиняли в 200 мкл метанолу і піддавали дослідженню методом ВЕРХ.

Паралельно проводили ізолювання буспірону із печінки щурів.

**Результати й обговорення.** Ідентифікацію буспірону в пробах проводили за УФ-спектром, характер якого наведено на рисунку 1, та часом утримування, який в описаних умовах аналізу становив (12,589 ± 0,075) хв.

При дослідженні витяжок печінки щурів одночасно з буспіроном ізолюються і 7 метаболітів, які розділяються на хроматограмі із піком буспірону (рис. 2).

Висновок про наявність метаболітів зроблено після того, як на хроматограмах отримували

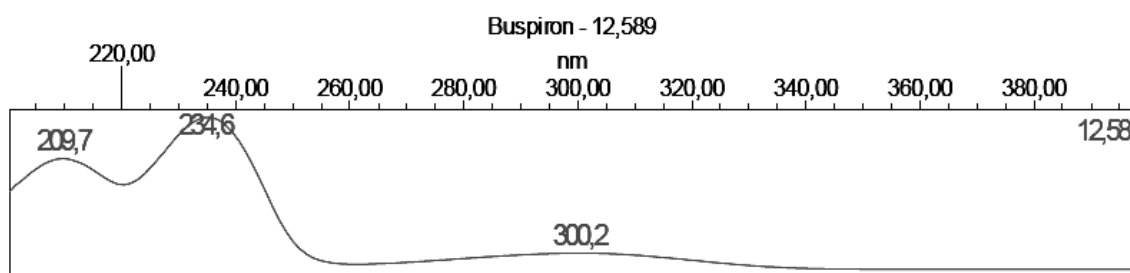


Рис. 1. УФ-спектр буспірону.

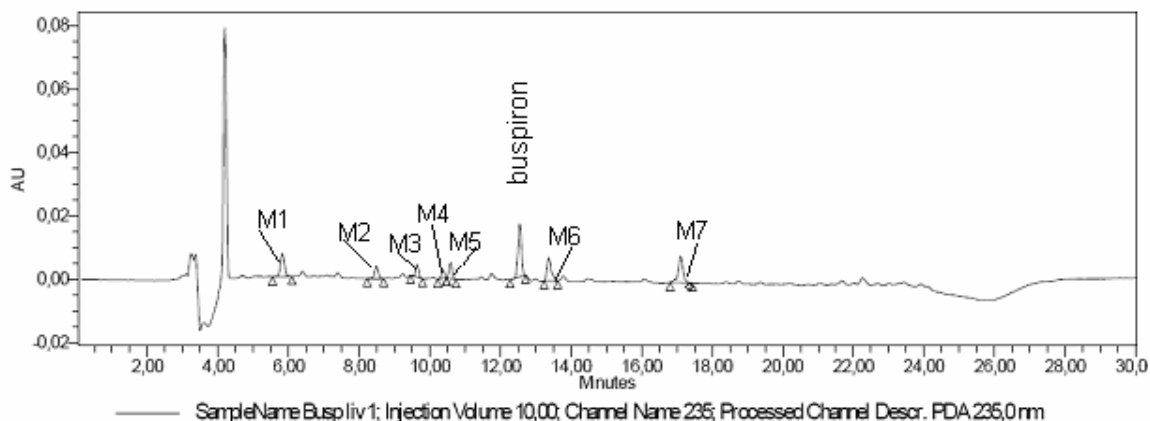


Рис. 2. Хроматограма буспірону із метаболітами, ізольованими із печінки щурів.

піки із однаковим часом утримування і однаковими УФ-спектрами при дослідженні печінки 10 дослідних тварин.

Градувальний графік для кількісного визначення буспірону в межах концентрацій 0,2–20 мкг/мл характеризується прямолінійною залежністю, яка виражається рівнянням  $Y = 3,52 \times 10^4 X - 6,21 \times 10^2$  (при  $r = 0,9998$ ), де  $Y$  – площа піку буспірону,  $X$  – концентрація буспірону, мкг/см<sup>3</sup>. Межа кількісного визначення буспірону у метанольному розчині методом ВЕРХ становить 0,2 мкг/см<sup>3</sup>, відносна похибка кількісного визначення 0,83 %.

Встановлено, що при використанні очистки на картриджах Oasis вихід буспірону із водно-мета-

нольних розчинів сухих залишків становить 99,9–100,1 %. Ступінь екстракції буспірону хлороформом при рН 9–10 відповідно становить 96–99 %.

Вода, підкислена оксалатною кислотою із модельних проб печінки, ізолює 28,9–33,6 % буспірону. Застосовуючи ацетонітрил, підкислений оксалатною кислотою, можна ізолювати 60,6–67,9 % буспірону (табл. 1).

Встановлено, що застосовуючи для ізолювання ацетонітрил, підкислений оксалатною кислотою, і підготовці проби для аналізу за описаною методикою мінімальна кількість буспірону, яку можна визначити в 1 г печінки, становить 38–40 нг, при цьому для судово-хімічного дослідження необхідно відбирати 25 г органа.

Таблиця 1. Результати ізолювання буспірону із модельних зразків печінки (середнє з п'яти паралельних визначень)

Внесено буспірону мкг до 25 г печінки	Ізолювано водою, підкисленою оксалатною кислотою		Метрологічні характеристики	Ізолювано ацетонітрилом, підкисленим оксалатною кислотою		Метрологічні характеристики
	мкг	%		мкг	%	
25	7,23	28,9	$\bar{X} = 31,22$	15,15	60,6	$\bar{X} = 64,28$
50	14,85	29,7	$S^2 = 3,71$	31,20	62,4	$S^2 = 9,07$
100	31,50	31,5	$S = 1,93$	64,20	64,2	$S = 3,0$
200	64,80	32,4	$S_x = 0,86$	132,6	66,3	$S_x = 1,35$
500	168,00	33,6	$\Delta X = 2,40$	339,5	67,9	$\Delta X = 3,74$
			$\varepsilon = 7,96$			$\varepsilon = 5,82\%$

**Висновки.** 1. Порівняно ефективність ізолювання буспірону із модельних зразків печінки двома методиками. Встановлено, що водою, підкисленою оксалатною кислотою, ізолюється (28,1–33,6) % буспірону. Підкисленим ацетонітрилом із печінки можна ізолювати 60,6–67,9 % буспірону.

2. Для підготовки проби для дослідження методом ВЕРХ опрацьовано умови їх очистки

на картриджах Oasis, ступінь вилучення буспірону із досліджуваної проби становить 99,9–100,1%.

3. Опрацьовані умови ідентифікації та кількісного визначення буспірону в методом ВЕРХ на колонці ACE 5 C18 та детектуванні при 235 нм. Межа кількісного визначення буспірону у розчинах 0,2 мкг/см<sup>3</sup>.

**Література**

1. Жмуров В. А. Большая энциклопедия по психиатрии. – 2-е изд. – 2012 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://vocabulary.ru/dictionary/978/word/virtualizacija-soznaniya>
2. Компендиум 2010 – лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К. : Морион, 2010.
3. Megna J. Ataxia from lithium toxicity successfully treated with high-dose buspirone: a single-case experimental design / J. Megna, M. O'dell // Arch. Phys. Med. Rehabil. – 2001. – Vol. 82. № 8. – P. 1145–1148.
4. Buckley N. A. Changes in fatalities due to overdose of anxiolytic and sedative drugs in the UK (1983-1999)/ N. A. Buckley, P. R. McManus // Drug Saf. – 2004. – Vol.27, № 2. – P. 135–141.
5. Catalano G. Seizures associated with buspirone overdose: case report and literature review / G. Catalano, M. C. Catalano, P. F. Hanley // Clin. Neuropharmacol. – 1998. – Vol. 21, № 6. – P. 347–350.
6. Kadota T. Acute toxicity study of buspirone hydrochloride in mice, rats and dogs / T. Kadota, S. Kawano, H. Chikazawa [et al.] // J. Toxicol. Sci. – 1990. – № 15. – P. 1–14.
7. Cytochrome P450 3A-mediated metabolism of buspirone in human liver microsomes / M. Zhu, W. Zhao, H. Jimenez [et al.] // Drug Metab. Dispos. – 2005. – Vol.33, № 4. – P. 500–507.
8. Yakugaku Zasshi. Roles of human cytochrome P450 enzymes involved in drug metabolism and toxicological studies / Zasshi Yakugaku // Source Division of Drug Metabolism. – 2000. – Vol.120, № 12. – P. 1347–1357.
9. Roman M. Quantitation of seven low-dosage antipsychotic drugs in human postmortem blood using LC-MS-MS / M. Roman, R. Kronstrand, D. Lindstedt [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2008. – Vol. 32, № 2. – P. 147–155.
10. Saar E. Identification and quantification of 30 antipsychotics in blood using LC-MS/MS / E. Saar, D. Gerostamoulos, O. Drummer [et al.] // J. Mass Spectrom. – 2010. – Vol. 45, № 8. – P. 915–925.
11. Yang Y. Quantitative estimation of circulating metabolites without synthetic standards by ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry in combination with UV correction / Y. Yang, M. F. Grubb, C. E. Luk [et al.] // Rapid Commun Mass Spectrom. – 2011. – Vol. 25, № 21. – P. 3245–3251.
12. Правила проведення судово-медичних експертиз (досліджень) у відділеннях судово-медичної токсикології бюро судово-медичної експертизи. Міністерство охорони здоров'я України від 17.01.1995 р. № 6. Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 26.07.1995 р. за № 249/785 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0248-95>.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БУСПИРОНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ****И. И. Галькевич***Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого*

**Резюме:** разработаны условия идентификации и количественного определения буспилона в присутствии метаболитов методом ВЭЖХ на колонке ACE 5 C18. Проведена сравнительная оценка эффективности изолирования буспилона из модельных образцов печени подкисленной водой и подкисленным ацетонитрилом. Для очистки проб от примесей выбраны условия твердофазной экстракции на картриджах Oasis.

**Ключевые слова:** буспирон, твердофазная экстракция, методы изолирования, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

**DETERMINATION OF BUSPIRONE IN BIOLOGICAL OBJECTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY****I. Y. Halkevych***Lviv National Medical University by Danylo Halytsky*

**Summary:** conditions of buspirone and their metabolites by HPLC identification and quantification on column ACE 5 C18 were developed. Comparative estimation of effectiveness of buspirone isolation from artificial liver samples with acidified water and with acidified acetonitrile was conducted. Conditions for the samples of purification by solid-phase extraction on Oasis cartridges are chosen.

**Key words:** buspirone, solid phase extraction, methods of isolation, high performance liquid chromatography (HPLC).