

І.Й. Галькевич, Б.С. Зіменковський, Я.Г. Тарнавська

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ІЗОЛЮВАННЯ БУПРОПІОНУ НА ДВОХ ТИПАХ КОЛОНКАХ ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,
м. Львів, Україна

e-mail: galkirin@meduniv.lviv.ua

Резюме: У роботі наведено експериментальні дані, які характеризують ступінь вилучення бупропіону із витяжок печінки, використовуючи очистку на колонках *Isolute* та колонках з Н-клинотилолітом. Опрацьовані умови підготовки клинотилоліту для очистки біологічних проб. Підібрані оптимальні елюенти для ізолювання та реекстракції бупропіону з колонок для твердо фазної екстракції. Для ідентифікації та кількісного визначення бупропіону опрацьовано умови методу ГХ-МС.

Ключові слова: бупропіон, ізолювання, печінка, твердофазна екстракція, колонка *Isolute*, Н-клинотилоліт, ГХ-МС.

Вступ. Бупропіон (відомий під назвами амфebutамон, велбутрин та зібан) нетиповий антидепресант другого покоління. Фармакологічна дія пояснюється підвищенням рівня дофаміну, норадреналіну та блокуванням нікотинових рецепторів, що дозволяє застосовувати його також для лікування нікотинової залежності¹. За хімічною будовою відноситься до класу похідних амінокетону, тобто за структурою подібний до меткатінону, диетилпропіону та інших амфетамінів. У хімічному відношенні це (±)-1-(3-хлорфеніл)-2-[(1,1-диметилетил)аміно]-1-пропанону гідрогенхлорид.

Відомі випадки смертельних отруєнь бупропіоном в результаті передозування та ряд токсичних проявів при прийомі з іншими антидепресантами^{5,7,9}. Проте в цих випадках для визначення вмісту бупропіону використовувались як об'єкти аналізу сеча та кров.

Для визначення бупропіону у фармацевтичних препаратах, а також у біологічних рідинах описано ряд методик, що ґрунтуються на кількісному визначенні методами спектрофотометрії, високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та газової хроматографії (ГХ) з різними варіантами детектування, електрохімічними, тощо^{2,4,6,8}. Ці методики характеризуються різною чутливістю та селективністю. При підготовці біологічних проб для аналізу в основному запропоновано методи рідинної екстракції та осадження білкових домішок електролітами. Проте в останні роки в практиці хімічного і токсикологічного аналізу все ширше застосовується метод твердофазної екстракції (ТФЕ) для очистки

складних біологічних систем. З цією метою використовують модифіковані синтетичні сорбенти, які дозволяють очищати проби та визначати досліджувані компоненти високочутливими тандемними методами, зокрема ВЕРХ з мас-спектрометрією та ГХ-МС. Особливо велика увага приділяється пошуку нових сорбентів, які є доступними та дешевими, оскільки необхідно проводити серійні дослідження, зокрема серед групи цеолітів.

Мета дослідження: розробка оптимальних умов ізолювання бупропіону із тканини печінки; оцінка ефективності очистки витяжок із бупропіоном на колонках *Isolute* та колонках з Н-клинотилолітом; вибір оптимальних елюентів; опрацювання умов ідентифікації та кількісного визначення бупропіону методом ГХ-МС, з метою впровадження у практику токсикологічного та судово-хімічного аналізу.

Матеріали та методи дослідження. Для виготовлення стандартних розчинів застосовували бупропіону гідрогенхлорид (*Sigma, USA*). Всі реагенти та реактиви, які використовувались для ізолювання та промивки сорбентів у колонках твердофазної екстракції відповідали кваліфікації х.ч. чи ч.д.а. Для розчинення сухих залишків використовували метанол кваліфікації для HPLC (*Merck*).

У роботі використовували печінку трупів людей, що загинули від травм, яку зберігали при -20°C.

Очистку витяжок проводили на колонках *Isolute 101* (500 mg/ml, *Biotage, Sweden*) та колонках, заповнених Н-клинотилолітом. Використовували клинотилоліт із Сокирниць-

кого родовища Закарпатської області (Україна, ТУ У 14.5-00292540.001-2001) із наступним хімічним складом у масових відсотках: SiO_2 – 71,5; Al_2O_3 – 13,1; Fe_2O_3 – 0,9; TiO_2 – 0,5; CaO – 3,44; MgO – 0,68; P_2O_5 – 0,014, K_2O – Na_2O – 3,03; масове співвідношення $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ 5,5).

Підготовка Н-форми клиноптилоліту та виготовлення сорбційних колонок. Клиноптилоліт розмелювали на кульовому млині і просіювали через сита, щоб відібрати фракцію 0,10-0,12 мм. Сорбент промивали дистильованою водою для усунення пилу, після чого настоювали протягом 6 год. з розчином 1 М HCl для отримання Н-форми. Виходили із розрахунку 20 мл розчину кислоти на 1 г сорбенту. Після модифікації сорбент промивали дистильованою водою до негативної реакції на хлорид іони і висушували при 60°C . Модифікований клиноптилоліт зберігали в ексікаторі. Для виготовлення колонок використовували медичні шприци ємністю 5 cm^3 , між фільтри яких поміщали по 1 г сорбенту.

Спосіб ізолювання бупропіону з печінки. Для оцінки ефективності ізолювання бупропіону готували модельні проби, які містили по 10 г гомогенізованої печінки. В кожну пробу біологічного матеріалу вносили по 50, 100, 150, 200, та 250 мкг бупропіону гідрохлориду у вигляді водного розчину. Готували по п'ять паралельних серій. Суміші перемішували і проводили ізолювання та очистку. Другу серію біологічного матеріалу досліджували через 24 год. після внесення бупропіону. Протягом цього часу зразки біологічного матеріалу зберігали при температурі 5°C .

В кожну порцію біологічного матеріалу вносили дистильовану воду із розрахунку 2 мл на 1 г органу і підкисляли розчином 1 М HCl до рН 2-3 (за універсальним індикатором). Проби герметично закривали і збовтували протягом 60 хв. у струшувачі, після чого центрифугували (5000 об/хв. протягом 20 хв.). До центрифугатів вносили розчин 0,2 М NaOH до рН 6-7 (за універсальним індикатором) і піддавали очистці на колонках.

Очистка проби на колонці Isolute 101. Перед внесенням проби колонки стабілізували, пропускаючи через них по 8 мл метанолу та по 5 мл фосфатного буферного розчину з рН 7,2 із швидкістю 2 мл/хв. Після цього пропускали досліджувані витяжки із швидкістю 1 мл/хв. Промивали колонки 10 мл дистильованої води та 5 мл метанольно-водного розчину (1:9). Сорбент висушували в потоці азоту і елюювали бупропіон 10 мл етилацетату, швидкість пропускання якого 0,5 мл/хв. Органічну фазу випаровували в потоці азоту

при 40°C , а сухий залишок розчиняли в 2 мл метанолу.

Очистка проби на колонці з Н-клиноптилолітом. Сорбційні колонки промивали 4 мл 0,1 М HCl в метанолі та 5 мл води із швидкістю 1 мл/хв. Після чого пропускали всю досліджувану витяжку із швидкістю 0,5 мл/хв. Сорбент в колонці промивали 5 мл дистильованої води та 5 мл водно-метанольного розчину (1:1) і підсушували в потоці азоту протягом 60 сек. Елюювали бупропіон 5 мл 0,1 М HCl в метанолі. Елюати випаровували в потоці азоту при 40°C , а сухі залишки кількісно розчиняли в 2 мл метанолу.

Метанольні розчини досліджували методом ГХ-МС.

Умови хроматографічного аналізу. Газохроматографічний аналіз проводили на хроматографі *Agilent 6890 N*, оснащеному мас-селективним детектором серії 5978 *BMSD Agilent* та електронною іонізацією. Вольтаж 400 В, а сканування проводили в режимі від 40-500 атомних одиниць маси (m/z). Колонка капілярна *HP-1 (Methyl Siloxane)*, довжиною 30 м, внутрішнім діаметром 0,25 мм та товщиною плівки нерухомої фази 0,25 μm . Початкова температура колонки 60°C , витримка 2 хв., з подальшим підвищенням температури $20^\circ\text{C}/\text{хв}$ до 300°C та витриманням кінцевої температури протягом 15 хв. Температура інжектора 250°C , джерела іонів 230°C , квадроупля 150°C . Газ-носії – гелій, подавався в режимі постійного потоку – 1,1 мл/хв, початковий тиск на колонці 17,0 psi . Об'єм введеної проби 1 μL .

Валідаційна оцінка методики ізолювання та очистки бупропіону при визначенні методом ГХ-МС. Методика була валідована, відносно наступних параметрів: правильності та точності, для проведення якої у проби печінки вводили по п'ять різних концентрацій бупропіону і проводили ізолювання та очистку на двох типах колонок для ТФЕ. При цьому визначали стандартне відхилення (*S.D.*) та відносне стандартне відхилення (*R.S.D.*) для серії вимірювань. Збіжність та внутрішньолабораторну точність результатів аналізу перевіряли в день отримання елюатів і через 24 год. зберігання трупного матеріалу. Визначали межу виявлення та межу кількісного визначення бупропіону, як у стандартних метанольних розчинах так і в пробах, отриманих при ізолюванні з печінки. Визначали також сумарний вихід бупропіону з колонок *Isolute 101* та з Н-клиноптилолітом. При визначенні валідаційних характеристик користувалися методиками, наведеними в *Bioanalytical Method Validation*³.

Результати дослідження та їх обговорення. Ідентифікували бупропіон за мас-спектрами, шляхом порівняння із мас-спектром стандартного зразку, а також за часом утримування ($9,580 \pm 0,009$ хв.). Для бупропіону найхарактернішими є сигнали із 44, 100,

57, 111, 139, 75 та 224 одиниць m/z . Хроматограма бупропіону, після очистки на двох видах колонок була ідентичною. Характер хроматограми та мас-спектр бупропіону наведе-ні на рис.1 та 2.

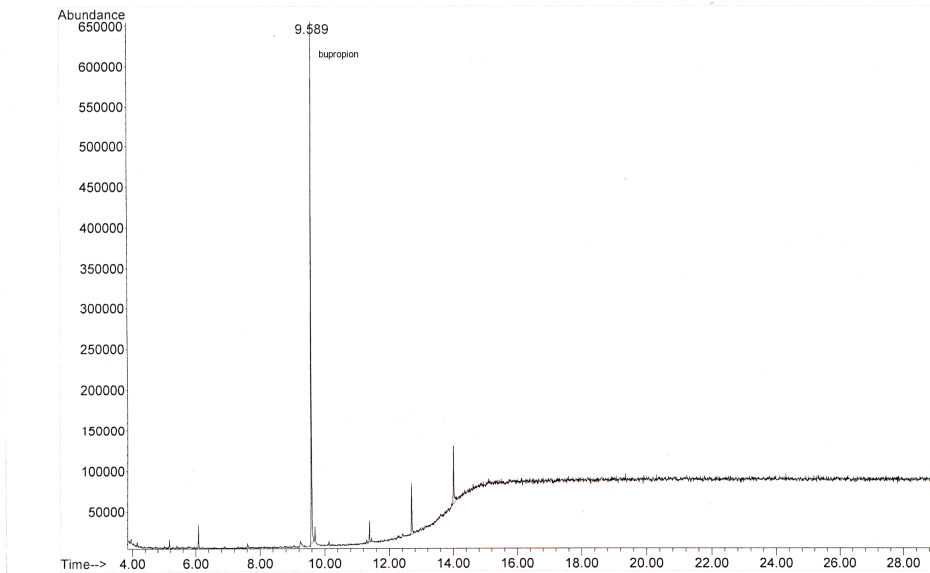


Рис. 1. Хроматограма бупропіону (колонка з Н-клинотилолітом)

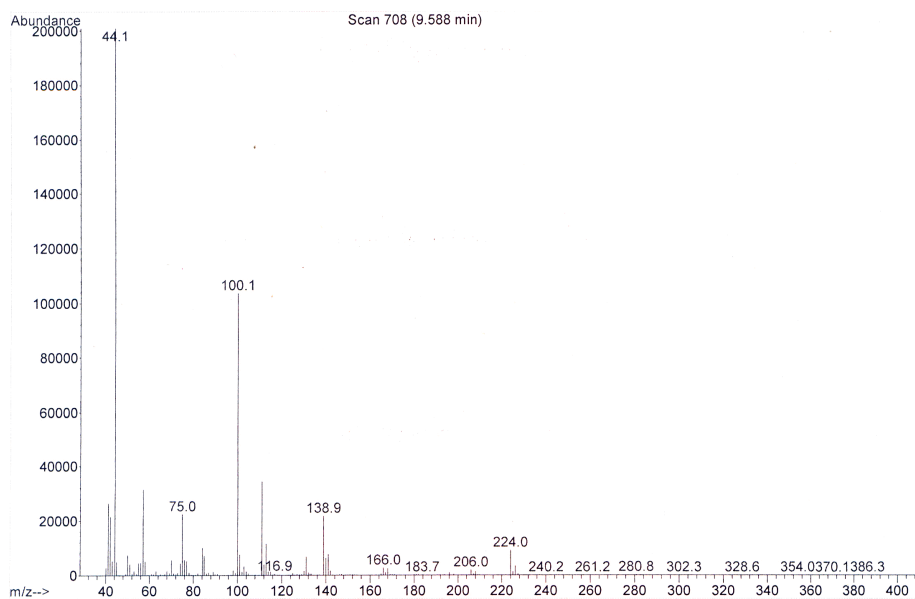


Рис.2. Мас-спектр бупропіону

Кількість бупропіону у пробах біологічного матеріалу визначали за рівнянням градувального графіку, побудованого методом абсолютної калібровки, яке описується залежністю $Y = 1,44 \cdot 10^5 X - 1,53 \cdot 10^4$ (коефіцієнт кореляції $r = 0,9991$), де Y – площа хроматографічного піку, X – концентрація бупропіону, мкг/мл. Встановлено, що лінійна залежність спостерігається в межах концентрацій 1–

25 мкг/мл. Межа виявлення бупропіону за мас-спектром 0,4 мкг/мл (співвідношення шум-сигнал не вище 1:3), а межа кількісного визначення у розчинах – 1 мкг/мл (співвідношення шум-сигнал не перевищує 1:5).

У таблиці 1 наведено результати аналізу витяжок із печінки, після очистки на колонках з двома сорбентами, які характеризують

точність та відтворюваність методик очистки бупропіону.

Як показують отримані результати, в день приготування модельних проб на колонках *Isolute* можна виділити 80,8–87,3% бупропіону, а на колонках з Н-клинотилолітом ізолюється 76,9–87,6% цього препарату, внесеного до гомогенізованої печінки. Через добу ізолюється 75,8–82,9% бупропіону з допомо-

гою колонок *Isolute* та 74,8–86,2% на колонках з Н-клинотилолітом. Максимальна внутрішньо серійна відносна похибка не перевищує 4,70% (в день виготовлення проб) і 11,3% (при дослідженні проби через 24 год.) на колонках *Isolute*. На колонках з Н-клинотилолітом ці похибки відповідно не перевищують 6,5% та 8,4%.

Таблиця 1. Результати точності та відтворюваності методик очистки бупропіону (n=5 для кожної серії концентрацій)

Колонка	Внесено бупропіону до 10 г печінки	1-ий день			2-ий день		
		Визначено препарату		R.S.D., %	Визначено препарату		R.S.D., %
		мкг ± S.D.	%		мкг ± S.D.	%	
Isolute	50	40,4±1,8	80,8	4,50	37,9±4,3	75,8	11,3
	100	82,1±2,3	82,1	2,81	76,7±6,0	76,7	7,8
	150	126,0±3,4	84,0	2,73	118,2±9,0	78,8	7,6
	200	169,0±7,9	84,5	4,66	160,3±8,7	80,2	5,4
	250	218,2±6,4	87,3	2,91	207,3±8,9	82,9	4,3
Н-клинотилоліт	50	38,5±3,0	76,9	7,9	37,4±3,1	74,8	8,4
	100	78,3±5,1	78,3	6,5	76,9±4,9	76,9	6,4
	150	125,0±6,1	83,3	4,9	119,8±4,7	79,9	4,7
	200	170,8±10,3	85,4	6,0	164,3±5,6	82,5	3,4
	250	218,9±5,5	87,6	2,5	215,5±9,2	86,2	4,3

Межа кількісного визначення бупропіону методом ГХ-МС після очистки на колонках *Isolute* чи колонках з Н-клинотилолітом становить 0,3 мкг бупропіону в 1 г тканини

печінки, що дозволяє використовувати ці методики в практиці судово-хімічного аналізу для діагностики отруєнь бупропіоном.

Висновки:

1. Розроблено умови визначення бупропіону методом ГХ-МС на капілярній колонці НР-1.
2. Розроблено умови очистки витяжок із печінки методом твердофазної екстракції на колонках *Isolute* та колонках з Н-клинотилолітом. Ступінь очистки дозволяє

ефективно ідентифікувати бупропіон за мас-спектрами. Мінімальна детектована кількість 0,3 мкг бупропіону в 1 г тканини печінки.

3. На колонках *Isolute* вихід бупропіону із становить 75,8–87,3%, а на колонках з Н-клинотилолітом 74,8–87,6%.

Література:

1. *Boshier A.* Evaluation of the safety of bupropion (Zyban) for smoking cessation from experience gained in general practice use in England in 2000 / *A. Boshier, L.V. Wilton, S.A. Shakir* // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2003. – V. 59, №10. – P. 767-773.
2. *Cooper T.B.* Determination of bupropion and its major basic metabolites in plasma by liquid chromatography with dual-wavelength ultraviolet detection / *T.B. Cooper, R.F. Suckow, A. Glassman* // *J. Pharm. Sci.* – 1984. – V.73, №8. – P. 1104-1107.
3. Guidance for industry Bioanalytical Method Validation: US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2001. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.fda.gov/com>
4. *Hu L.* Determination of bupropion and its main metabolite in rat plasma by LC-MS and its application to pharmacokinetics / *L. Hu, Z. Wang, R. Xu* // *Pharmazie.* -2011. – V. 66, №12. – P. 924-928.
5. *Humayun F.* A fatal case of bupropion (Zyban) hepatotoxicity with autoimmune features: Case report / *F. Humayun, T.M. Shehab, J.A. Tworek* // *J. Med. Case Reports.* – 2007. – №1. – P. 88.
6. *Loboz K.K.* HPLC assay for bupropion and its major metabolites in human plasma / *K.K. Loboz, A.S. Gross, J. Ray* // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2005. – V.823, №2. – P.115-121.
7. *Mercerolle M.* A fatal case of bupropion (Zyban) overdose / *M. Mercerolle, R. Denooz, G. Lachâtre*

-
- // J. Anal. Toxicol. – 2008. – V.32, №2. – P.192-196.
8. *Parekh J.M.* Sensitive, selective and rapid determination of bupropion and its major active metabolite, hydroxybupropion, in human plasma by LC-MS/MS: application to a bioequivalence study in healthy Indian subjects / *J.M. Parekh, D.K. Sutariya, R.N.Vaghela* // Biomed. Chromatogr. – 2012. – V.26, №3. – P. 314-326.
9. *Ramcharitar V.* Bupropion and alcohol fatal intoxication: case report / *V. Ramcharitar, B.S. Levine, B.A.Goldberger* // Forensic Sci. Int. – 1992. – V.56, №2. – P.151-156.
-

УДК 615.214.24:543.05:543.544.5.068.7

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАНИЯ БУПРОПИОНА НА ДВУХ ВИДАХ КОЛОНОК ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

И.И. Галькевич, Б.С. Зименковский, Я.Г. Тарнавская

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г.Львов, Украина

Резюме: В работе наведены экспериментальные данные, которые характеризуют степень изолирования бупропиона из печени, используя очистку вытяжек на колонках *Isolute* и колонках с H-клиноптилолитом. Разработаны условия подготовки клиноптилолита для очистки биологических проб. Выбраны оптимальные элюенты для изолирования и реэкстракции бупропиона с колонок для твердофазной экстракции. Для идентификации и количественного определения бупропиона разработаны условия метода ГХ-МС.

Ключевые слова: бупропион, изолирование, печень, твердофазная экстракция, колонка *Isolute*, H-клиноптилолит, ГХ-МС.

UDC 615.214.24:543.05:543.544.5.068.7

COMPARATIVE ESTIMATION OF EFFICIENCY OF BUPROPION ISOLATION ON TWO TYPES OF COLUMNS FOR SOLID-PHASE EXTRACTION

I.Y. Halkevych, B.S. Zimenkovsky, J.G. Tarnavska

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Summary: Experimental data on efficiency of bupropion isolation from liver with extracts purification on *Isolute* and H-klinoptilolite columns are presented. Conditions of H-klinoptilolite preparation for biological samples purification are elaborated. Optimal eluents for bupropion isolation and re-extraction on SPE columns are chosen. GC-MS technique for bupropion identification and quantitative determination are worked out.

Keywords: bupropion, isolation, liver, solid phase extraction, *Isolute*, H-klinoptilolite, GC-MS.

Надійшла до редакції 15.07.2013 р.