



І.Й. Галькевич¹, Я.Г. Тарнавська², Ю.І. Бідниченко¹

Ідентифікація буспірону та його метаболітів у сечі методом газової хроматографії з мас-селективним детектором

¹Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,

²Львівське обласне бюро судово-медичної експертизи

Ключові слова: буспірон, метаболізм буспірону, твердофазна екстракція, сеча.

Розроблено умови розділення та ідентифікації буспірону та його 8 метаболітів у сечі методом ГХ-МС на капілярній колонці HP-1 methylsiloxane. За мас-спектрами виконано ідентифікацію метаболітів. Для очистки сечі використано метод твердофазної екстракції.

Идентификация буспирина и его метаболитов в моче методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором

И.И. Галькевич, Я.Г. Тарнавская, Ю.И. Бидниченко

Разработаны условия разделения буспирина и его 8 метаболитов в моче методом ГХ-МС на капиллярной колонке HP-1 methylsiloxane. По масс-спектрам проведена идентификация метаболитов. Для очистки мочи предложены условия твердофазной экстракции.

Ключевые слова: буспирон, метаболизм буспирина, твердофазная экстракция, моча.

Identification of buspirone and its metabolites in urine by gas chromatography with mass selective detector

I.Y. Halkevych, J.G. Tarnavska, Y.I. Bidnychenko

The conditions of buspirone and their 8 metabolites separation and identification using GC-MS methods on HP-1 methylsiloxane column were studied. The metabolites were identified on mass-spectra. The conditions of urine purification using solid phase extraction were proposed.

Key words: buspirone, metabolism of buspirone, solid phase extraction, urine.

Одним із засобів, що використовується в психіатричній практиці для лікування станів тривоги та неврозів, є буспірон [1,2], який належить до групи анксиолітичних препаратів. Буспірон характеризується високою спорідненістю з пресинаптичними 5 HT_{1A} рецепторами і є частковим антагоністом постсинаптичних 5HT_{1A} рецепторів [3–5]. Препарат не призначають одночасно з бенздіазепінами та іншими седативними засобами. Вживання алкоголю чи соку грейпфрута при лікуванні буспіроном зумовлює підвищення його концентрації в крові та виникнення побічних ефектів, що характеризуються появою симптомів отруєння [6].

Зі спеціалізованої літератури відомо, що буспірон інтенсивно метаболізує в печінці під впливом цитохрому P 450, а інгібітори цього ферменту підвищують біодоступність буспірону. При метаболізмі утворюється його активний метаболіт 1-[2-піримідиніл]-піперазин (1-PP) [7–9]. Біодоступність буспірону складає до 4%, і тому більша частина препарату виводиться з сечею як у незміненому вигляді, так і у вигляді метаболітів.

Проте при дослідженні сечі тварин (щурів), які отримували цей препарат, досліджувані проби містили ще ряд продуктів метаболізму, виявлені протягом хіміко-токсикологічного аналізу.

Мета роботи

Розшифрування структур метаболітів буспірону за мас-спектрами з метою їх ідентифікації, а також використання методу твердофазної екстракції для очистки від супутніх домішок і концентрування буспірону і його метаболітів при ізолюванні з сечі.

Матеріали і методи дослідження

Органічні розчинники, які використовували для виготовлення розчинів та екстракції твердою фазою відповідали кваліфікації «х.ч.» чи «ч.д.а.». Для виготовлення розчинів буспірону гідроген хлориду застосовували стандартний зразок (Sigma, USA).

Очистку біологічної рідини (сечі) проводили методом твердофазної екстракції на картриджах Oasis HLB 30 mg (Waters, USA).

Протягом роботи використовували сечу щурів, які отримували водну суспензію буспірону. Для виготовлення водної суспензії використовували таблетки буспірону гідрогенхлориду по 5 мг. Також використовували сечу пацієнтів, які отримували цей препарат з лікувальною метою.

Для встановлення факту прийому буспірону та вивчення шляхів метаболізму цього препарату використовували метод газової хроматографії з мас-селективним детектором. Газохроматографічний аналіз виконано на газовому хроматографі Agilent 6890 N, оснащеному детектором серії 5978 BMSD Agilent та електронною іонізацією. Аналіз проводили при вольтажі 400 В, а сканування виконано в режимі 40–500 атомних одиниць маси (m/z). Використовували капілярну колонку HP-1 Methyl Siloxane довжиною 30 м, внутрішнім діаметром 0,25 мм та товщиною плівки нерухомої фази 0,25 мкм. Початкова температура колонки – 60°C, витримка – 2 хв, з подальшим підвищенням температури зі швидкістю 20°C/хв до 300°C та витриманням кінцевої температури протягом 3,0 хв.

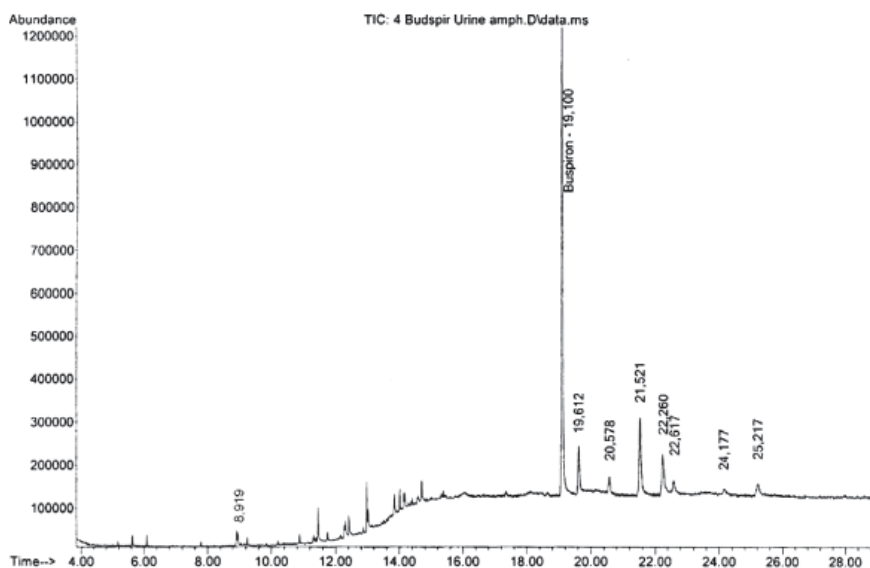


Рис. 1. Хроматограма сечі тварин, які отримували буспірон.

Застосовували режим постійного потоку газу-насія (аргон) 1,1 мл/хв. Об'єм введеної проби – 1 мкл.

Підготовка проб сечі для аналізу методом ГХ/МСД. Для ідентифікації застосовували сечу щурів, яким досліджуваній препарат вводили протягом одного дня. Загальна кількість введеного препарату одній тварині становила 5 мг. Водну суспензію буспірону вводили тваринам per os. Сечу збирали протягом 24 годин.

Відбирали по 2 мл сечі з кожної проби та пропускали через картридж Oasis (30 мг), які попередньо кондиціонували 1 мл метанолу та 1 мл води. Сечу пропускали зі швидкістю 0,5 мл/хв. Після цього картридж промивали 2 мл суміші, яка складалась з 25% розчину аміаку, метанолу та води, взятих в об'ємному співвідношенні 1:1:8. Потім сорбент промивали 2 мл водно-метанольного розчину (9:1). Сорбент висушували в потоці азоту й елювали буспірон та його метаболіти 1 мл метанолу.

Органічний розчинник випаровували досуха, сухі залишки розчиняли в 200 мкл метанолу та застосовували для хроматографічного аналізу. Характер хроматограми наведено на рис. 1.

Результати та їх обговорення

Ідентифікацію буспірону і його метаболітів проводили за часом утримування та мас-спектрами. Для цього вибирали піки на хроматограмі, які повторювались при дослідженні сечі, взятої від 5 різних тварин, але були відсутніми на хроматограмах контрольних зразків сечі. Після цього провели попередню ідентифікацію метаболітів за їх молекулярними іонами, співвідношенням зі структурними формулами та за характерною дефрегрентацією молекулярного іону під дією електронного заряду. На основі отриманих результатів проаналізовано шляхи метаболізму буспірону. Схему можливих шляхів метаболізму буспірону наведено на рис. 2.

Встановлено, що крім відомого та описаного в спеціалізованій літературі метаболіту 1-PP на хроматограмі і за мас-спектрами виявлено ще 7 метаболітів. Аналогічні метаболіти спостерігали на хроматограмах сечі пацієнтів, які отримували цей препарат у терапевтичній дозі. При аналізі хроматограм і мас-спектрів встановлено, що мас спектр активного метаболіту 1-PP характеризується сигналами при 122, 96, 148, 79, 164 та 53 а.о.м. Ці ж

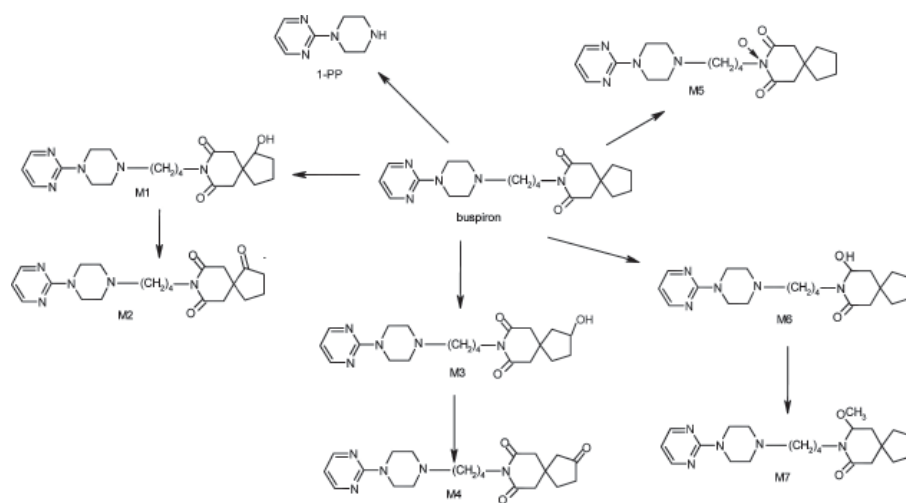


Рис. 2. Схема біотрансформації буспірону.

Мас-спектральні характеристики буспірону і його метаболітів

Сполука	Час утримування, хв	Мол. маса	Характерні іони (відносна інтенсивність, %)							
			122 (98)	96 (47)	108 (40)	79 (30)	164 (26)	53 (20)	135 (14)	148 (13)
1-PP	8,919±0,009	164	122 (98)	96 (47)	108 (40)	79 (30)	164 (26)	53 (20)	135 (14)	148 (13)
буспірон	19,100±0,014	385	177 (100)	277 (77)	265 (66)	148 (37)	122 (35)	207 (17)	290 (9)	385 (7)
M-1	20,578± 0,020	401	207 (100)	281 (67)	177 (20)	290 (14)	355 (12)	148 (10)	122 (9)	401 (4)
M-2	22,617± 0,031	399	207 (100)	281 (47)	192 (14)	355 (10)	265 (9)	177 (8)	148 (8)	399 (5)
M-3	22,260± 0,018	401	207 (100)	281 (82)	177 (47)	295 (41)	122 (16)	148 (16)	355 (9)	401 (4)
M-4	24,174±0,025	399	207 (100)	281 (50)	192 (14)	355 (12)	265 (8)	177 (7)	148 (7)	399 (6)
M-5	19,612±0,008	401	207 (100)	281 (87)	177 (62)	295 (48)	306 (26)	148 (22)	355 (9)	401 (5)
M-6	25,217± 0,015	387	207 (100)	281 (67)	177 (18)	295 (16)	355 (11)	265 (10)	306 (2)	387 (7)
M-7	21,521±0,009	401	207 (100)	177 (87)	291 (77)	281 (66)	122 (33)	310 (16)	355 (12)	401 (11)

сигнали спостерігали на мас-спектрах буспірону та його метаболітів, що виписувались на хроматограмі після піку буспірону. Отримані результати показують, що в організмі буспірон піддається I та II фазі біотрансформації, яка проходить за азаспіро [4,5]декан-7,9-діоновим циклом. Значне зростання інтенсивності сигналу із m/z при 207 а.о.м та 295 а.о.м. і поява інтенсивного сигналу при 306 а.о.м. свідчить, що пройшов процес N-оксидування атома нітрогену в азаспіро [4,5]декан-7,9-діоновому циклі (M-5). Метаболіту M-6 і його метильованому похідному M-7 відповідають піки на хроматографі з часом утримування 25,217 хв та 21,521 хв. Піки на хроматограмах з часом утримування 20,578 хв. та 22,260 хв. характерні для продуктів гідроксилування, що пройшли в положеннях 1 і 2 азаспіро [4,5]декан-7,9-діонового циклу (M-1,

M-3), а їх окислені похідні (M-2 і M-4) за таких умов хроматографічного аналізу виписуються при 22,617 хв та 24,174 хв.

Мас-спектральні характеристики ідентифікованих сполук і час утримування наведено в таблиці 1.

Висновки

Розроблено умови ідентифікації буспірону і його метаболітів у сечі методом газової хроматографії на капілярній колонці HP-1 Methylsiloxane. Для очистки біологічної проби розроблено умови твердофазної екстракції на картриджах Oasis.

Виявлено 7 метаболітів буспірону, які не описано в спеціалізованій літературі. Розшифровано їх структуру та визначено газо-хроматографічні характеристики цих сполук.

Список літератури

1. Арана Джордж Фармакотерапія психических расстройств / Джордж Арана, Джеральд Розенбаум. – М.: МИА, 2007. – 800 с.
2. Бурчинський С.Г. Нові аспекти фармакотерапії психосоматичної патології / С.Г. Бурчинський // Ліки. – 2004. – №5–6. – С. 28–32.
3. Cottraux J. A controlled study of cognitive behaviour therapy with buspirone or placebo in panic disorder with agoraphobia / J. Cottraux, I.D. Note, C. Cungi [et al] // Br. J. Psychiatry. – 2005. – Vol. 167, №5. – P. 635–641.
4. Dimitriou E.C. Buspirone augmentation of antidepressant therapy / E.C. Dimitriou, C.E. Dimitriou // J. Clin. Psychopharmacol. – 1998. – Vol. 18, №6. – P. 465–469.
5. Ros S. Potentiation strategies for treatment-resistant depression / S. Ros, L. Aguera, J de la Gandara J. [et al] // Acta Psychiat. Scand. – 2005. – Vol. 428. – P. 14–24.
6. Pollack M.H. Comorbid anxiety and depression / Pollack M.H. // J. Clin. Psychiat. – 2005. – Vol. 66. – P. 22–29.
7. Gammans R.E. Metabolism and disposition of buspirone / R.E. Gammans, R.F. Mayol, J.A. LaBudde // The American Journal of Medicine. – 1996. – Vol. 80. – P. 41–51.
8. Kivistö K.T. Determination of buspirone and 1-(2-pyrimidinyl)-piperazine (1-PP) in human plasma by capillary gas chromatography / K.T. Kivistö, J. Laitila, K. Mårtensson [et al] // Ther. Drug Monit. – 1999. – Vol. 21, №3. – P. 317–321.
9. Odontiadis J. Simultaneous quantitation of buspirone and its major metabolite 1-(2-pyrimidinyl)piperazine in human plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection / J. Odontiadis, M.J. Franklin // Pharm. Biomed. Anal. – 1996. – Vol. 14, №3. – P. 347–351.

Відомості про авторів:

Галькевич І.Й., доцент, докторант каф. токсикологічної та аналітичної хімії ЛНМУ ім. Данила Галицького.
Тарнавська Я.Г., зав. відділення судово-медичної токсикології КЗЛОР Львівського обласного бюро судово-медичної експертизи.
Бідниченко Ю.І., к. фарм. н., доцент каф. токсикологічної та аналітичної хімії ЛНМУ ім. Данила Галицького.

Надійшла в редакцію 30.04.2013 р.