

*Originalni članci/  
Original articles*

ODREĐIVANJE BUSULFANA U HUMANOM  
SERUMU METODOM GASNO-MASENE  
SPEKTROMETRIJE

DETERMINATION OF BUSULFAN IN  
HUMAN SERUM BY GAS  
CHROMATOGRAPHY-MASS  
SPECTROMETRY

**Correspondence to:**

Dipl. inž. hemije **Dragana Rančić**,  
specijalista toksikološke hemije  
Vojnomedicinska akademija,  
Centar za kontrolu trovanja, Beograd  
Crnotravska 17  
Tel: +381-11-3609481  
e-mail: gagarancic@yahoo.com

Dragana Rančić<sup>1</sup>, Anđelka Spasić<sup>2</sup>, Ljiljana Tukić<sup>3</sup>,  
Marija Elez<sup>3</sup>, Gordana Brajković<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

<sup>2</sup>Institut za sudsku medicinu, Medicinski fakultet, Beograd

<sup>3</sup>Klinika za hematologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

*Key words*

Busulfan-determination in human  
serum, Gas Chromatography-Mass  
Spectrometry (GC-MS),  
1,4-diidodobutane

*Ključne reči*

Busulfan-određivanje u humanom  
serumu, gasno-masena spektrometrija  
(GC-MS), 1,4-dijodobutan

*Apstrakt*

Busulfan je lek iz grupe alkil sulfonata koji se koristi u terapiji hronične granulocitne leukemije i transplantacije koštane srži. Održavanje optimalnih koncentracija busulfana u serumu pacijenata posle transplantacije koštane srži veoma je važno, jer niske koncentracije mogu da prouzokuju odbacivanje transplantata, dok visoke povećavaju rizik od pojave toksičnih efekata. Koncentracija busulfana u serumu najčešće se određuje metodom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS). U radu je prikazano određivanje busulfana u serumu metodom GC-MS preko derivata 1,4-dijodobutana i difenilamina kao internog standarda. Kao derivatizacioni reagens korišćen je 1 M natrijumjodid u acetonu, a vreme derivatizacije je 20 minuta na temperaturi od 70°C. Uzorci krvi su sakupljeni 0, 1, 2, 4 i 6 sati posle oralne doze tokom četiri dana. Za analizu je korišćena kapilarna kolona VF 5, a praćene su sledeće jonske mase: m/z 183 (1,4-dijodobutan) i m/z 169 za difenilamin (IS). Kalibraciona kriva je linearna u opsegu od 0,1 do 3,0 mg/L, limit kvantifikacije (LOQ) je 0.100 mg/L, a koeficijent korelacije  $r^2 > 0.9999$ . Pod ovim hromatografskim uslovima nije primećeno ometanje od strane metabolita busulfana i klonazepam ili fenobarbitona, koji se mogu koristiti kao antikonvulzivna profilaksa, što ukazuje na to da je primenjena procedura selektivna, precizna, tačna i da zbog osetljivosti i reproduktivnosti, može da se koristi za praćenje terapijskih koncentracija busulfana.

*UVOD*

I pored niza nuspojava koje se javljaju prilikom lečenja citostaticima, hemoterapija se smatra jednim od najefikasnijih načina lečenja malignih oboljenja. Hemoterapija koristi lekove-citostatike koji uništavaju ćelije tumora ili zaustavljaju njihov rast. Prema mehanizmu delovanja citostatici najčešće ometaju sintezu i/ili funkciju makromolekula (DNA, RNA, belančevine) ili funkciju ćelijskih organela koji omogućavaju deobu ćelija. Kao posledica dejstva lekova -citostatika dolazi do smrti ćelija. [1]

Busulfan (butan-1,4-diol dimetansulfonat) pripada grupi alkilirajućih citostatika i upotrebljava se za lečenje neoplazmi. Koristi se u lečenju hronične granulocitne leukemije. Busulfan pokazuje selektivno dejstvo na kostnu srž, smanju-

je stvaranje granulocita i trombocita u manjim dozama, a eritrocita u većim dozama. Slabo deluje na limfoidna tkiva i gastrointestinalni trakt. [2]

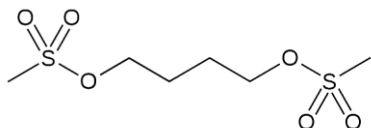
Busulfan je mali, visoko lipofilni molekul, koji lako prelazi krvno-moždanu barijeru. Nakon oralne primene lek se dobro resorbuje, a apsorpcija busulfana iz gastrointestinalnog trakta je potpuna. [3] To je dokazano u studijama sa radioaktivnim busulfanom, nakon što je intravenski ili peroralno primenjen radioaktivni 35S-busulfan, 14C-busulfan, i 3H-busulfan.

Posle apsorpcije, 32% leka vezano je za proteine plazme. Maksimalne koncentracije leka u plazmi se postižu posle 20-60 minuta. Tokom metaboličkih procesa nastaje najmanje 12 metabolita, među kojima je najznačajniji 3-hidroksitetrahidrotiofen-1,1-dioksid. Nastali metaboliti nemaju cito-

toksično delovanje. Oko 1% primenjene doze leka izlučuje se nepromenjeno urinom. [4]

Terapijski indeks busulfana je mali. Terapijske koncentracije u krvi se kreću od 0,5 do 1,7 mg/L, a toksični efekti se ispoljavaju koncentracijama većim od 4 mg/L. Busulfan je poznat pod imenom "Myleran" i "Busaflex".

Busulfan je 1,4-butandiol dimetanesulfonat. To je bela kristalna supstanca sa tačkom topljenja 114-118°C. Rastvorljiv je u vodi i acetonu, a slabo u etanolu.



Slika 1. Strukturna formula busulfana

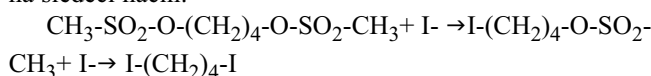
Određivanje koncentracije busulfana u serumu pacijenta, posebno dece, od velikog je značaja zbog uskog terapijskog indeksa. [5-10]

Najčešće primenjivana tehnika za određivanje busulfana u biološkim tečnostima (plazma, serum ili cerebrospinalna tečnost) je gasna hromatografija sa maseno spektrometrijskim detektorom (GC-MS) [13] mada se može primeniti i osetljivija i komplikovanija metoda tečne hromatografije sa masenom detekcijom (LC-MS) [11] [12].

Većina metoda za određivanje busulfana koje su opisane u literaturi zahtevaju njegovu prethodnu derivatizaciju. U svakom slučaju, kvantitativna analiza busulfana u biološkom matriksu zahteva osetljive i selektivne metode, koje omogućavaju određivanje opsega terapijskih koncentracija u mg/L.

Naš cilj je bio razvijanje osetljive i specifične metode gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS), koja se može primeniti za spektralnu identifikaciju i kvantifikovanje kako niskih tako i toksičnih koncentracija busulfana u uzorcima seruma. Uzorci seruma dobijeni su od pacijenta, koji je primao ovaj citostatik po odgovarajućem protokolu.

Primenjenom metodom, busulfan se derivatizacijom prevodi u 1,4-dijodobutan. Reakcija derivatizacije busulfana sa natrijum jodidom u kojoj nastaje 1,4-dijodobutan, odvija se na sledeći način:



## MATERIJAL I METODE

Uzorci seruma dostavljeni su od pacijenta A. S. sa Klinike za hematologiju, Vojnomedicinske akademije. Pacijent je bio u remisiji sa dijagnozom: AML-M2. Uzorci seruma su sakupljeni četiri dana u sledećoj farmakokinetičkoj funkciji vremena, izraženo u časovima: 0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0. U toku prvog sata od prikupljanja uzoraka, sve epruvete su bile centrifugirane 20 min na 3000 rpm., a zatim je serum odvojen i zaleđen na -40°C do analize.

Svi rastvarači su bili HPLC čistoće (etilacetat, metanol, aceton). Natrijumjodid bio je p.a. čistoće. Nabavljeni su od firme Merck (Darmstadt, Nemačka). Analitički standard busulfana, koji je korišćen za analizu, nabavljen je od firme Sigma-Aldrich.

Busulfan je određen tehnikom gasne hromatografije sa maseno-spektrometrijskim detektorom i bibliotekom GC-

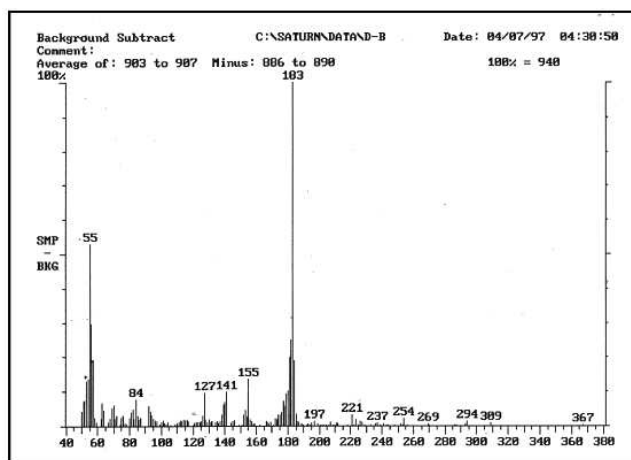
MS spektara NIST, na gasnom hromatografu (GC) Varian 3400, sa autosamplerom Varian 8100 i kapilarnom kolonom VF 5 MS, 60 m, 0,32 mm, 1 µm (Palo Alto, USA). Maseni spektrometar detektor (MS) je bio marke Varian Saturn (Palo Alto, USA).

Hromatografski uslovi su bili sledeći: temperatura injektora: 260°C; temperaturni program kolone od 80°C do 260°C imao je sledeći temperaturni režim: 80°C, 0°C min, 1 min - 260°C, 10°C min., 15 min - 260°C, 0 °C min., 20 min. Temperatura transfer linije bila je 260°C. Uslovi za izvođenje masene spektrometrije su: opseg snimanja 50-350 m/z. Brzina snimanja: 4 scan/s. Vreme hromatografske analize: 45 min. Retenciono vreme za 1,4-dijodobutan bilo je 14,9 min, a za interni standard (IS) difenilamin 19,9 min.

## Standardni rastvori

Osnovni rastvori analitičkih standarda busulfana i difenilamina imali su koncentracije mg/mL u metanolu i etilacetatu. Reagens za derivatizaciju, 1M NaJ (natrijumjodid), dobijen je rastvaranjem 1,4 g natrijumjodida u 10 mL acetona. Koncentracije za kalibracionu krivu pripremljene su razblaživanjem osnovnih rastvora i dodavanjem u kontrolne serume u opsegu očekivanih terapijskih koncentracija od 0,1 do 3,0 mg/L.

Na slici 2. prikazan je maseni spektar nastalog jedinjenja, derivatizovanog 1,4-dijodobutana, koji odgovara MS spektru 1,4-dijodobutana iz biblioteke NIST masenih spektara.



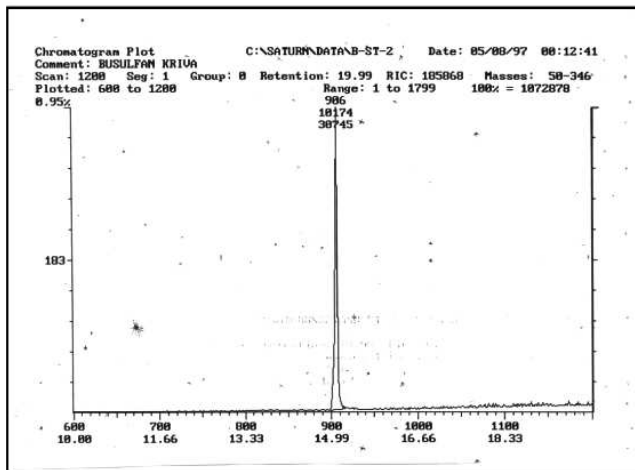
Slika 2. Maseni spektar 1,4-dijodobutana

## Priprema uzoraka

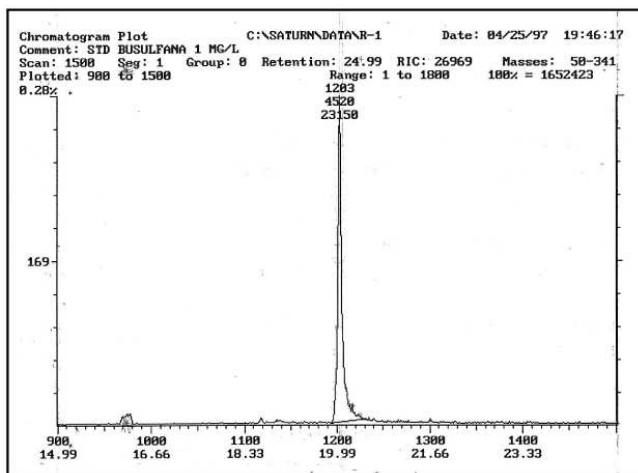
Uzorci seruma za analizu pripremani su na sledeći način: busulfan je iz 1 mL seruma ekstrahovan tečno-tečnom ekstrakcijom sa etilacetatom u kiseloj sredini (pH 3). Organska faza je odvojena i uparena do suvog ostataka. Derivatizacija je izvršena dodatkom 0,1 mL 1 M natrijum jodidom u acetonu na suvi ostatak, 20 min. na temperaturi od 70°C. Posle završene derivatizacije, uzorak je rekonstituisan u rasvoru difenilamina (DFA) u etilacetatu, koji je korišćen kao interni standard (IS). Koncentracija difenilamina bila je 5 mg/L. Injektovano je 1 µL uzorka u GC-MS.

## REZULTATI

Analiza uzoraka seruma vršena je praćenjem jonske mase m/z 183 za 1,4-dijodobutan i m/z 169 za interni standard difenilamin (slika 3 i 4).



Slika 3. Hromatogram fokusiran na jon m/z 183 za 1,4-dijodobutan



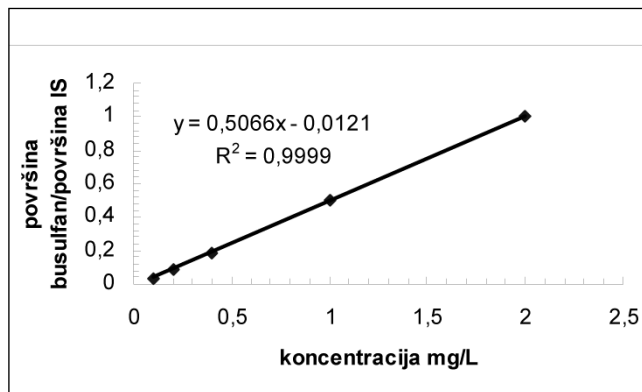
Slika 4. Hromatogram fokusiran na jon m/z 169 za interni standard

Retencionna vremena bila su:  $14,9 \pm 0,5$  min za 1,4-dijodobutan,  $19,9 \pm 0,5$  min za difenilamin. Komponente iz matriksa nisu ometale određivanje busulfana. Analizirani uzorci seruma koji potencijalno sadrže metabolite busulfana ili lekove koji mogu biti prisutni u ovakvim kliničkim uzorcima, kao što su klonazepam ili fenobarbiton, a koji se koriste kao antikonvulzivna profilaksa, pod ovim hromatografskim uslovima ne interferiraju, što ukazuje na to da je primenjena procedura selektivna za busulfan. Na slici 3. prikazan je jonski hromatogram seruma pacijenta na terapiji ovim lekom.

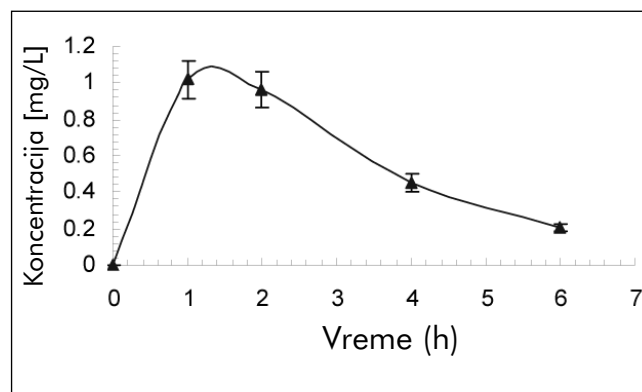
Metoda je linearna u rasponu 0,1-3,0 mg/L ( $r^2 > 0,99$ ). Limit kvantifikacije (LOQ) iznosi 0,1 mg/L. Prinosi ekstrakcije i derivatizacije iz seruma za busulfan kretali su se u rasponu od 74,5 - 83,9% za analizirane koncentracije (0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 i 3,0 mg/L).

Kalibraciona kriva, prikazana na slici br. 5, dobijena je izračunavanjem faktora iz odnosa površina hromatografskih pikova busulfan/interni standard. Jednačina prave izračunata je primenom linearne regresije i konstruisana metodom najmanjih kvadrata, sa srednjim vrednostima površine pikova za svaku koncentraciju, korišćenjem programa Excel 5. Istim programom izračunat je koeficijenti korelacije ( $r$ ) i jednačina prave  $y = a \pm bx$ .

Izračunavanje koncentracije busulfana u serumu ispitanog pacijenta vršeno je na osnovu jednačine kalibracione krive.



Slika 5. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećeni serum standardnim rastvorima busulfana



Slika 6. Srednje koncentracije busulfana u funkciji vremena u serumu pacijenta prvog dana posle oralne primene busulfana

Primenom opisane metode dobijene su koncentracije busulfana u serumu praćene u funkciji vremena, za pacijenta na per os terapiji ovim lekom.

### DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Primena tehnike gasne hromatografije sa MS detekcijom od velikog je značaja za praćenje terapijskih koncentracija busulfana u hitnim medicinskim analizama.

Primenom navedene metode izračunate koncentracije busulfana za posmatrana četiri dana su odgovarale literaturnim podacima i nisu izlazile iz uskog terapijskog opsega koji je karakterističan za busulfan<sup>[14]</sup>.

Prema prikazanim rezultatima GC-MS metode za određivanje busulfana u serumu (prinos ekstrakcije, derivatizacija, limit kvantifikacije) može se zaključiti da je metoda osetljiva i specifična i primenljiva za spektralnu identifikaciju i kvantifikovanje niskih koncentracija busulfana kod pacijenta koji je dobijao ovaj citostatik po odgovarajućem protokolu.

### Abstract

Busulfan is a chemotherapy drug that is an alkylating agent and its main use is in bone marrow transplantation. Patients who received oral busulfan achieve widely varying serum concentrations. Low concentrations predispose to graft rejection, while high levels increase the risk of toxicity. Busulfan concentration in serum was assayed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). This paper describes the conversion of busulfan to 1,4-diiodobutan, and quantification of this material by GC-MS. Blood samples were collected at 0, 1, 2, 4 and 6 hours after orally taken doses during four days. Serum samples (1 mL) were extracted with ethyl acetate. Organic phase was separated and evaporated to dryness. The derivatization was performed using 1 M sodium iodide in acetone with a reaction time of 20 min at 70°C. The analysis was carried out by GC-MS, monitoring *m/z* 183 (1,4-diiodobutan) and *m/z* 169 for diphenylamine (IS). Chromatography was accomplished using a DB5 capillary column. Calibration curves were linear from 0.1 to 3.0 mg/L. The limit of quantification (LOQ) was 0.1 mg/L. The linearity value (correlation coefficient 0.9999) was very satisfactory. Serum samples containing potential busulfan metabolites and co-administered drugs, which may be present in clinical samples, like clonazepam or phenobarbital which can be used as anticonvulsive prophylaxis, provided no response, indicating this assay procedure is selective for busulfan. The proposed GC/MS method on the capillary column under the applied chromatographic conditions is selective, precise, accurate, and, because of its sensitivity and reproducibility, it may be used for therapeutic monitoring of busulfan.

### LITERATURA

1. Vladislav M. Varagić, Milenko P. Milošević, Farmakologija, Elit-Medica, Beograd 2007.
2. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology, tenth edition. Boston:McGraw Hill; 2007.
3. Sweetman SC. Martindale - The Complete Drug Reference, 35th edition. London: The Pharmaceutical Press; 2007.
4. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3 Edition, London, Pharmaceutical press.
5. Growchow LB, Krivit W, Whitley CB, Blazer BR. Busulfan disposition in children. *Blood* 1990; 75: 1723-172.
6. Hassan M, Oberg G, Beckassy AN et al. Pharmacokinetics of high dose busulphan in relation and age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; 28: 130-134.
7. Vassal G, Gouyette A, Hartmann O et al. Pharmacokinetics of high dose busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 24: 386-390.
8. Vassal G, Deroussent A, Hartmann O et al. Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children: a clinical and pharmacological study. *Cancer Res* 1990; 50: 6203-6207.
9. Slattery JT, Sanders JE, Buckner CD et al. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 31-42.
10. Slattery JT, Clift RA, Buckner CD et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood* 1997; 89: 3055-3060.
11. Simona Pichini, Ilaria Altieri et al. High-performance liquid chromatographic-mass spectrometric assay of busulfan in serum and cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* 1992; 581:143-146.
12. Marie-Hélène Quernin et al. Quantification of busulfan in plasma by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry: Application to pharmacokinetic studies in children. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2001; 763: 61-69.
13. Hans Ehrsson, Moustapha Hassan. Determination of busulfan in Plasma by GC-MS with Selected-Ion Monitoring; *Journal of pharmaceutical sciences* 1983; 72: 1202.
14. Leanne Embree et al. Gas-chromatographic analysis of busulfan for therapeutic drug monitoring; *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (1993) 32: 137-142.