



APPLICATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY TO DETERMINATION OF BENCYCLANE IN BIOLOGICAL SAMPLES

Przemysław PIOTROWSKI, Marzena SYKUTERA, Ewa PUFAL, Karol ŚLIWKA

Chair and Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz

Abstract

This paper presents a method of determination of bencyclane by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) in biological samples. This developed method was used to determine the concentration of bencyclane in a biological specimen collected during autopsy from the body of young female who had committed suicide by ingestion of an unknown quantity of Halidor[®]. As a result of the performed experiment, the following concentrations of bencyclane were determined: blood 3.8 µg/ml, liver 2.8 µg/g, kidney 3.8 µg/g, brain 4.1 µg/g. This method allows qualitative and quantitative analysis of bencyclane in biological samples and thus may be routinely used in forensic toxicology.

Key words

Bencyclane; Biological samples; LC-MS.

Received 22 November 2005; accepted 30 December 2005

1. Introduction

Bencyclane (3-[(1-benzylcycloheptyl)-oxy]-N,N-dimethylpropylamine, molecular mass = 289 amu), is an active ingredient of Halidor[®] and Fludilat[®]. It is a vasodilator and acts spasmolytically on smooth muscles. It is mainly used for treatment of peripheral and cerebral circulation disorders as well as in gastrointestinal and urinary system spasms. Adverse effects include headaches and dizziness, hallucination, sleeplessness and speech disorders. Bencyclane is readily absorbed from the gastrointestinal tract. Its biological half-life is 8–12 hours. The maximal daily therapeutic dose is 600 mg [6].

The basic analysis which should be performed in cases where acute or fatal intoxication is suspected is determination of the drug in blood. However, there are no literature reference data on therapeutic and toxic

bencyclane levels in blood. No fatal intoxication cases have been mentioned either. The available literature describes determination of bencyclane only in urine of patients who were administered this drug in therapeutic doses. Determination was performed using gas chromatography coupled with mass spectrometry [4]. Bencyclane was also measured in serum by GC-NPD [1] and GC-FID [3]. The usefulness of infrared spectrophotometry in qualitative analysis of bencyclane in pharmaceutical preparations and spiked internal organ tissues was also studied [2]. However, no papers on determination of bencyclane by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry have been published. Therefore the aim of this study was to develop a method for determination of bencyclane in *post-mortem* material with the application of high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

The presented method was applied to qualitative and quantitative determination of bencyclane in *post-mortem* specimens collected from the corpse of a young female who had committed suicide by intake of an unknown quantity of Halidor®. Empty packages of this drug were found near the corpse of the woman in her flat. The Department of Forensic Medicine was informed of previous suicide attempts by the deceased.

On the basis of the autopsy and the histopathological examination results of the internal organ tissues, circulatory and respiratory failure was assumed as the cause of death. However, no direct cause of this failure was determined. In order to find the direct cause of death, blood, liver, kidney and brain tissues were collected for toxicological analyses.

2. Materials and methods

Peripheral blood samples, liver, kidney and brain tissues constituted the materials for analysis. Blood lyophilisate (LGC Promochem) and bencyclane-free liver, kidney and brain tissues were also used for preparing standard samples. For determination of bencyclane, biological material was extracted with acetonitrile in an ultrasound bath for 2 hours. Internal organs tissues were homogenised beforehand. The extracts were evaporated under nitrogen at 40 C. The

residues were reconstituted in methanol. Standard samples were made by fortification of blank blood, liver, kidney and brain with bencyclane to achieve a concentration of 3 µg/ml (µg/g). These samples were prepared in order to evaluate the extraction efficiency.

Qualitative and quantitative analyses were performed using a liquid chromatograph coupled with a mass spectrometer equipped with a quadruple mass analyser (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). For chromatographic separation, a Zorbax Eclipse XDB – C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm) column was used. The mobile phase consisted of acetonitrile (55% v/v) and 0.1% trifluoroacetic acid (45% v/v). The flow of the mobile phase was 0.5 ml/min. The mass spectrometer was operated in atmospheric pressure electrospray ionisation mode (API-ES). The detector worked in positive ionisation mode. The mass detector parameters were as follows: fragmentor voltage 70 V, capillary voltage 4 kV, nitrogen flow rate 13 l/min, nitrogen temperature 250 C, nebulizer pressure 30 psig. The analysis was carried out in selected ion monitoring mode. A pseudomolecular ion of $m/z = 290$ was monitored.

3. Results

Figure 2 shows example LC-MS chromatograms of bencyclane standard (A), extract of bencyclane-free

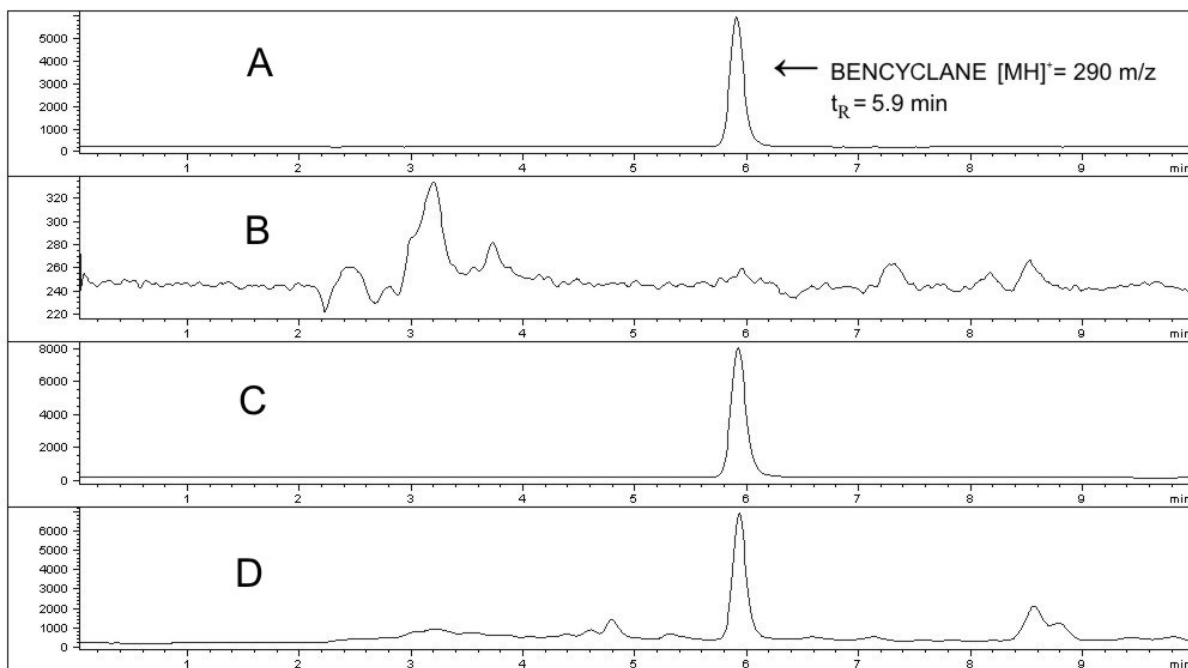


Fig. 1. LC-MS chromatograms of: a – bencyclane standard; b – extract of blank blood; c – extract of blood spiked with bencyclane; d – natural blood sample extract.

blank blood sample (B), blood sample spiked with bencyclane (C) and extract of blood specimen taken from the body of the deceased (D). The retention time of bencyclane under the described conditions was 5.9 min.

Validation parameters of the presented method of bencyclane determination are shown in Table I. The linearity of the calibration curve was determined in the range of 0.06–12.5 µg/ml. The value of the correlation coefficient R^2 was 0.997. The limit of detection was 0.006 µg/ml. Recoveries of bencyclane from biological material are presented in Table II. The developed method was applied to determination of bencyclane in a biological specimen collected from the corpse of a female who ingested an unknown quantity of Halidor[®]. The achieved results are presented in Table III.

TABLE I. VALIDATION PARAMETERS

Linearity [R^2]	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]	Intra day precision [CV%] ($n = 3$, 3 µg/ml)	Day to day precision [CV%] ($n = 3$, 3.3 µg/ml)
0.997	0.006	0.06–12.5	7.8	8.2

TABLE II. RECOVERY VALUES OF BENCYCLANE FROM BIOLOGICAL SAMPLES

Biological samples ($n = 3$)	Mean recovery of bencyclane [%]
Blood	89.9 ± 1.8
Liver	71.2 ± 2.2
Kidney	89.2 ± 1.0
Brain	83.7 ± 4.3

TABLE III. CONCENTRATION OF BENCYCLANE IN BIOLOGICAL SAMPLES

Biological sample	Concentration of bencyclane [µg/ml, µg/g]
Blood	3.80
Liver	2.80
Kidney	3.80
Brain	4.10

4. Discussion

From the relevant literature, it transpires that solvents such as isooctane [1] and a mixture of dichloromethane, isopropanol and ethyl acetate (1:1:3) [4] have been used for the extraction of bencyclane. Bencyclane has only been extracted from urine and serum, but no recovery measurement results are presented. Moreover, there is a lack of information on the extraction method of this substance from *post-mortem* material such as blood and internal organ tissues. In our study, bencyclane was extracted from blood, liver, kidney and brain tissues with acetonitrile. The performed experiments show that the recoveries of bencyclane from biological samples achieved with acetonitrile extraction are higher than 71.2%.

The final stage measurements were performed by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The presented method is selective and enables the detection of bencyclane at a level of 0.006 µg/ml and quantification within a wide range of concentrations. The developed method was applied to toxicological analysis of blood, liver, kidney and brain tissues collected from the corpse of a female who had committed suicide by ingestion of an unknown quantity of the drug Halidor[®].

Because there is a lack of scientific reports on intoxication by this drug, it is impossible to compare the results with literature data. Therefore, it is also impossible to evaluate unequivocally whether the determined concentrations of bencyclane correspond to a toxic or lethal dose intake.

5. Summary

The presented method of isolation of bencyclane gives satisfactory recovery values (above 71.2%). The developed method of determination of bencyclane allows detection of this compound at a level of 0.006 µg/ml and quantification in a range of 0.06–12.5 µg/ml.

The method presented in this paper can be applied routinely to qualitative and quantitative analysis of bencyclane in biological material.

References:

1. Lohmann A., Diekmann N., Walters R. [et al.], Determination of bencyclane in human plasma by means of capillary gas chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection, *Journal of Chromatography* 1991, 564, 283–288.
2. Makarenko T. F., Voronova N.V., Use of infrared spectrophotometry to detect mixtures of halidor and baralgin in the internal organs of a cadaver, *Sudiebnno Medicinskaja Ekspertiza* 1985, 28, 55–56.
3. Marzo A., Treffner E., Quadro G. [et al.], Gas liquid chromatographic evaluation of bencyclane in biological samples for pharmacokinetic and bioavailability investigations: comparison of two analytical methods, *Journal of Chromatography* 1985, 343, 77–84.
4. Maurer H., Pflieger K., Screening procedure for the detection of alkanoloamine antihistamines and their metabolites in urine using computerized gas chromatography – mass spectrometry, *Journal of Chromatography* 1988, 428, 43–60.
5. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlewska A., *Leki współczesnej terapii*, Fundacja Büchnera, Warszawa 1994.

Corresponding author

Przemysław Piotrowski
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Akademii Medycznej im. Ludwika Rydygiera
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz
e-mail: kizmedsad@amb.bydgoszcz.pl

ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKTOREM MASOWYM DO OZNACZANIA BENCYKLANU W MATERIALE BIOLOGICZNYM

1. Wstęp

Bencyklan (3-[(1-benzylcykloheptylo)-oksy]-N,N-dimetylopropyloamina, masa cząsteczkowa = 289) jest składnikiem czynnym preparatów Halidor® i Fludilat®. Jest to lek o działaniu spazmolitycznym na mięśnie gładkie oraz rozszerzającym naczynia krwionośne. Stosowany jest głównie w zaburzeniach krążenia obwodowego i mózgowego oraz w stanach skurczowych przewodu pokarmowego oraz dróg moczowych. Spośród działań niepożądanych wymienić należy bóle i zawroty głowy, halucynacje, omamy, bezsenność oraz zaburzenia mowy. Bencyklan szybko wchłania się z przewodu pokarmowego. Biologiczny okres jego półtrwania wynosi 8–12 godzin. Maksymalna dzienna dawka terapeutyczna wynosi 600 mg [6]. Podstawowym badaniem w przypadku podejrzeń zatruc ostrych i śmiertelnych jest oznaczenie stężenia leku we krwi. Natomiast w dostępnej literaturze przedmiotu brakuje danych odnośnie do stężeń terapeutycznych oraz toksycznych bencyklanu we krwi. Nie odnotowano również zatruc śmiertelnych tym lekiem.

Jak wynika z dostępnego piśmiennictwa, bencyklan oznaczano dotychczas jedynie w moczu osób przyjmujących ten lek w dawkach terapeutycznych. Oznaczenia przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas [4]. Bencyklan oznaczano również w surowicy metodą GC-NPD [1] oraz GC-FID [3]. Prowadzono także badania nad przydatnością spektrofotometrii w podczerwieni do jakościowej analizy bencyklanu w preparatach farmaceutycznych i wycinkach narządów wewnętrznych wzbogaconych bencyklanem [2].

Brakuje natomiast doniesień na temat oznaczania bencyklanu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. W związku z tym, celem prezentowanej pracy było opracowanie metody oznaczania bencyklanu w materiale sekcyjnym z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas.

Przedstawioną metodę wykorzystano do oznaczenia jakościowego i ilościowego bencyklanu w materiale sekcyjnym pobranym ze zwłok młodej kobiety, która w celach samobójczych spożyła nieznaną ilość leku Halidor®. Przy zwłokach kobiety ujawnionych w mieszkaniu znaleziono puste opakowania po tym leku. Z informacji przekazanych do zakładu medycyny sądowej wynikało, że denatka w przeszłości podejmowała próby samobójcze. W oparciu o wyniki badania sekcyjnego zwłok oraz

wyniki badań histopatologicznych wycinków narządów wewnętrznych przyjęto, że przyczyną zgonu była niewydolność krążeniowo-oddechowa. Nie określono jednak bezpośredniej przyczyny tejże niewydolności. W celu wyjaśnienia przyczyny zgonu do badań toksykologicznych zabezpieczono krew oraz wycinki wątroby, nerki i mózgu.

2. Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły próby krwi obwodowej, wycinki wątroby, nerki i mózgu. Wykorzystano również liofilizat krwi (LGC Promochem) oraz wolne od bencyklanu wycinki wątroby, nerki i mózgu do przygotowania prób modelowych.

W celu oznaczenia bencyklanu materiał biologiczny ekstrahowano acetonitrylem w łaźni ultradźwiękowej przez 2 godziny. Wycinki narządów wewnętrznych uprzednio homogenizowano. Otrzymane ekstrakty odparowano w strumieniu azotu w temperaturze 40 C. Pozostałość rozpuszczono w metanolu.

Próby modelowe przygotowano przez obciążenie krwi referencyjnej oraz wycinków wątroby, nerki i mózgu bencyklanem w taki sposób, by otrzymać stężenie 3 µg/ml (µg/g). Próby przygotowano w celu oceny wydajności ekstrakcji.

Analizę jakościową i ilościową przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas wyposażonym w analizator kwadropolowy (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy). Do przeprowadzenia analizy chromatograficznej wykorzystano kolumnę chromatograficzną Zorbax Eclipse XDB – C18 (150 4,6 mm, 5 µ). W skład fazy ruchomej wchodził acetonitryl (55% v/v) oraz 0,1% wodny roztwór kwasu trifluoroctowego (45% v/v). Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,5 ml/min. W spektrometrze mas zastosowano metodę jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym pod ciśnieniem atmosferycznym (API-ES). Detektor pracował w trybie jonizacji dodatniej. Parametry detektora masowego były następujące: napięcie fragmentora 70 V, napięcie kapilary 4 kV, przepływ N₂ 13 l/min, temperatura N₂ 250 C, ciśnienie nebulizera 30 psig. Analizę przeprowadzono w trybie monitorowania pojedynczych jonów. Monitorowano jon pseudomolekularny o wartości $m/z = 290$.

3. Wyniki

Na rycinie 2 przedstawiono przykładowe chromatogramy uzyskane w wyniku analizy LC-MS wzorca bencyklanu (A), ekstraktu próby modelowej krwi niezawierającej bencyklanu (B), ekstraktu próby modelowej krwi obciążonej bencyklanem (C) oraz ekstraktu krwi pobranej ze zwłok (D). Czas retencji bencyklanu w opisanych warunkach wynosił 5,9 min.

Parametry walidacyjne prezentowanej metody oznaczania bencyklanu przedstawiono w tabeli I. Liniowość krzywej kalibracyjnej bencyklanu badano w zakresie stężeń 0,06–12,5 µg/ml. Współczynnik korelacji R^2 wynosił 0,997. Limit wykrywalności wynosił 0,006 µg/ml. Wartości odzysku bencyklanu z badanego materiału biologicznego przedstawiono w tabeli II. Opracowaną metodę wykorzystano w celu oznaczenia poziomu bencyklanu w materiale biologicznym pobranym ze zwłok kobiety, która spożyła nieznaną ilość leku Halidor®. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli III.

4. Dyskusja wyników

Jak wynika z danych zawartych w literaturze przedmiotu, do izolowania bencyklanu stosowano takie rozpuszczalniki, jak izooktan [1], a także mieszaninę dichlorometanu, izopropanolu i octanu etylu (1:1:3) [4]. Bencyklan ekstrahowano jedynie z moczu i surowicy, nie podając jednak wartości odzysku. Ponadto brak jest danych na temat sposobu izolowania tej substancji z materiału sekcyjnego takiego jak krew oraz wycinki narządów wewnętrznych.

W niniejszej pracy bencyklan izolowano z krwi oraz wycinków wątroby, nerki i mózgu przy użyciu acetonitrylu. Przeprowadzone badania dowodzą, że zastosowanie acetonitrylu do ekstrakcji bencyklanu zapewnia odzysk tego związku z prób biologicznych powyżej 71,2%.

Do oznaczeń końcowych w prezentowanej pracy zastosowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem masowym. Przedstawiona metoda jest selektywna i umożliwia wykrycie tego związku na poziomie 0,006 µg/ml oraz na jego ilościowe oznaczenie w szerokim zakresie stężeń.

Opracowaną metodę wykorzystano do przeprowadzenia badań toksykologicznych krwi oraz wycinków wątroby nerki i mózgu pobranych ze zwłok kobiety, która spożyła nieznaną ilość leku Halidor®. Z uwagi na brak doniesień dotyczących zatruc tym lekiem, otrzymanych wyników nie można skonfrontować z danymi zawartymi w literaturze. W związku z tym nie ma również możliwości jednoznacznej oceny, czy oznaczone stężenia bencyklanu odpowiadają przyjęciu tego leku w dawce toksycznej czy też śmiertelnej.

5. Podsumowanie

Przedstawiona metoda izolowania bencyklanu z materiału biologicznego daje zadowalające wartości odzysku (powyżej 71,2%). Opracowana metoda oznaczania bencyklanu pozwala na wykrycie tego związku na poziomie 0,006 µg/ml oraz na ilościowe oznaczenie w zakresie 0,06–12,5 µg/ml.

Zaprezentowaną w niniejszej pracy metodę można rutynowo stosować do oznaczeń jakościowych i ilościowych bencyklanu w materiale biologicznym.