

## ВЭЖХ-МС МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ОКСИПИРИДИНА

П. А. Баранов<sup>1, 2</sup>, С. А. Апполонова<sup>1</sup>, М. А. Дикунец<sup>1</sup>, Г. М. Родченков<sup>1</sup>,  
А. К. Сариев<sup>2</sup>, В. П. Жердев<sup>2</sup>

Разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометром (ВЭЖХ-МС) для определения 2-этил-6-метил-3-оксипиридина (ЭМО) в моче человека. Проведено сравнение различных способов экстракции ЭМО из образцов мочи после его приема внутрь в форме препарата мексидол. Проведена оценка показателей извлечения ЭМО из мочи человека и влияния эффекта матрицы. Результатом исследования стала разработка процедуры твердофазной экстракции с последующей модификацией исследуемого соединения дансилхлоридом. Процент извлечения ЭМО составил  $48,1 \pm 3,4$  %, влияние эффекта матрицы —  $99,4 \pm 4,1$  %. Получены и описаны МС и МС/МС спектры 2-этил-6-метил-3-оксипиридина и 3-оксипиридина и их дансильных производных с использованием масс-спектрометра типа “ионная ловушка” и электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении в режиме регистрации положительных ионов.

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, мексидол

### ВВЕДЕНИЕ

В ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН разработан препарат мексидол (2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат), используемый в настоящее время в медицинской практике [1, 2, 5]. Исследования фармакокинетики мексидола в клинике проводили с использованием метода ВЭЖХ-УФ. Изучение экскреции мексидола у человека показало, что препарат выводится в неизменном виде и в виде конъюгированного метаболита [3, 4].

Современный подход биохимических и фармакокинетических исследований предполагает использование высокочувствительных и высокоселективных методов анализа, таких как ВЭЖХ-МС и ГХ-МС (газовая хроматография). Оптимизация процесса пробоподготовки является одной из основных задач при разработке аналитического метода. В ряде случаев использование твердофазной экстракции (ТФЭ) и микроэкстракции, а также способов концентрирования и модификации исследуемых соединений позволяет избежать негативных влияний со стороны биологической матрицы, увеличить процент извлечения из биологических образцов и уменьшить нижний предел обнаружения веществ [6].

Нами разработан ВЭЖХ-МС/МС метод определения 2-этил-6-метил-3-оксипиридина в моче человека, проведено сравнение различных способов экстракции 2-этил-6-метил-3-оксипиридина из образцов мочи после его приема внутрь в форме препарата мексидол

(разовая доза 500 мг). Результатом исследования стала ВЭЖХ-МС/МС методика определения 2-этил-6-метил-3-оксипиридина с применением ТФЭ с последующей модификацией исследуемого соединения дансилхлоридом (ДНХ).

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Реактивы.** Субстанции 2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцината (ВФС 42-2797-96) и 3-оксипиридина (внутренний стандарт) были предоставлены отделом химии НИИ фармакологии. Использовали: метанол фирмы “Merck”, маркировка LiChrosolv (Darmstadt, Германия); ацетат аммония, трет-бутил-метилловый эфир, муравьиная и уксусная кислоты фирмы “Sigma-Aldrich” (St. Louise, MO, США); этилацетат фирмы “Борис” (Россия); эфир диэтиловый фирмы ОАО “Медхимпром” (Россия); сульфат аммония фирмы “Panreac” (Barcelona, Испания); бикарбонат натрия и гидроксид натрия фирмы “Химмед” (Россия). Деионизованная вода была получена с помощью системы Millipore Milli-Q (Millipore, Milford, MA, США). Для получения производных был использован дансилхлорид фирмы “Льюэкс” (Россия).

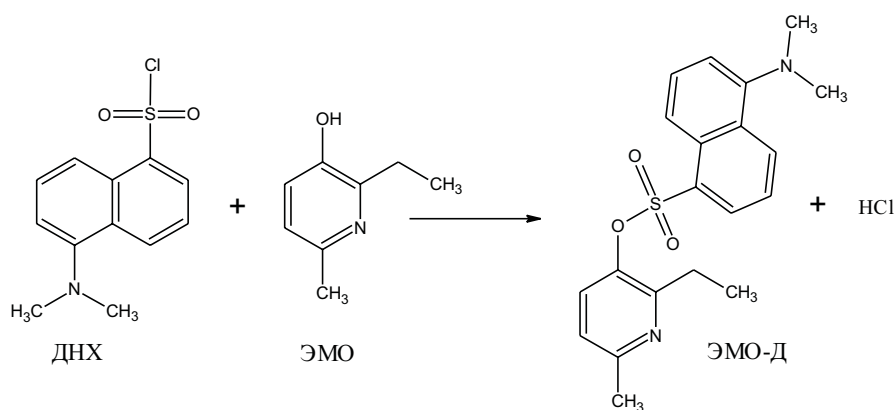
**Приготовление стандартных и рабочих растворов.** Стандартный раствор 2-этил-6-метил-3-оксипиридина (1 мг/мл) готовили растворением точной навески в точном объеме метанола. Рабочие растворы получали разбавлением исходного раствора с помощью микрошприца (Hamilton, Австралия) и автоматического дозатора переменного объема модели 1179501A (Oxford Laboratories, Англия). В ходе анализа дополнительно проводили реакцию дериватизации 2-этил-6-метил-3-оксипиридина и 3-оксипиридина с ДНХ.

#### Пробоподготовка биологической жидкости

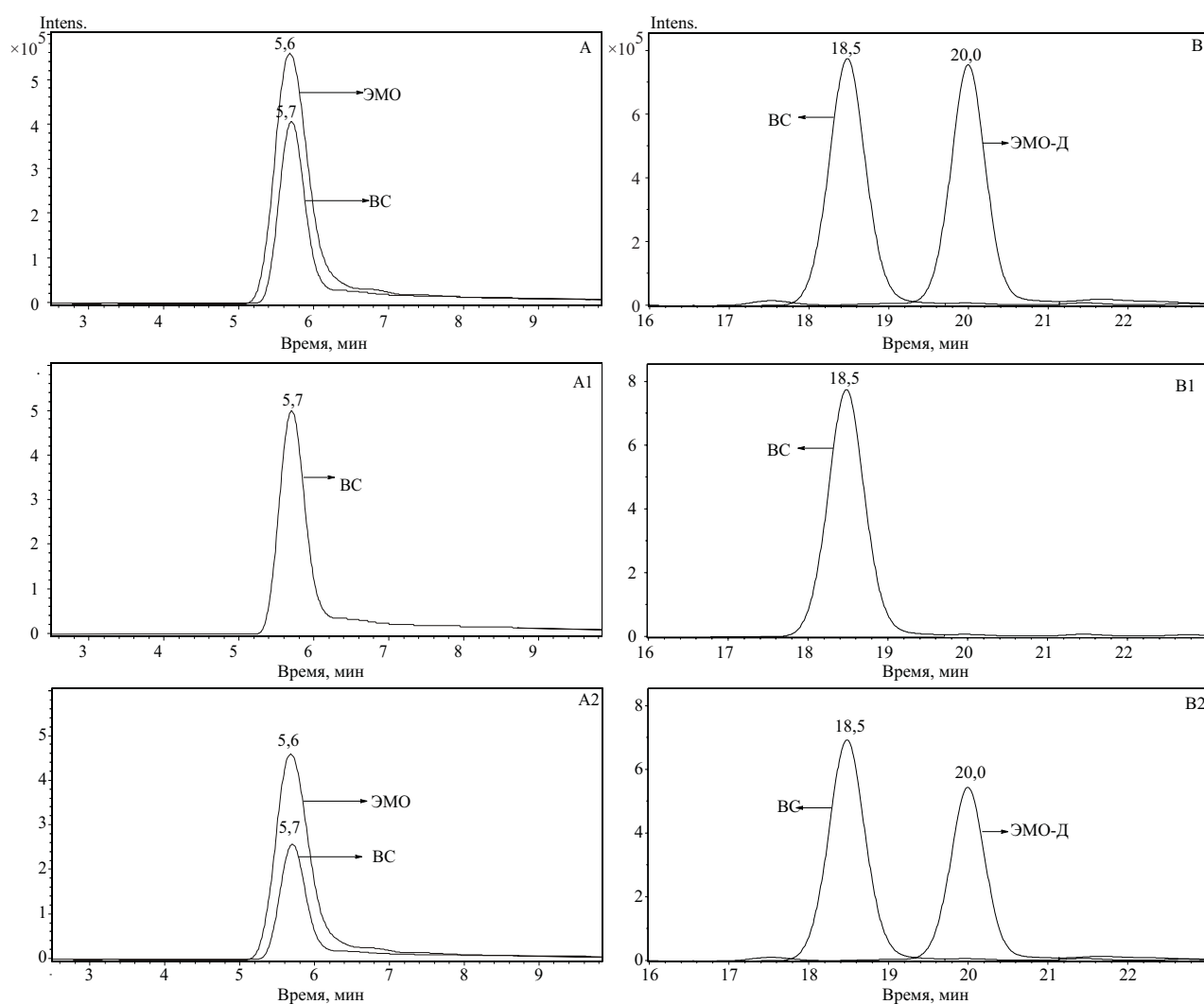
**Жидкость-жидкостная экстракция.** При жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) к 1 мл мочи до-

<sup>1</sup> Лаборатория конного допинга и новых методов анализа (зав. — С. А. Апполонова) ФГУП “Антидопинговый центр”, Москва, 105005, Елизаветинский переулок, 10.

<sup>2</sup> Лаборатория фармакокинетики (зав. — В. П. Жердев) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, 125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8.



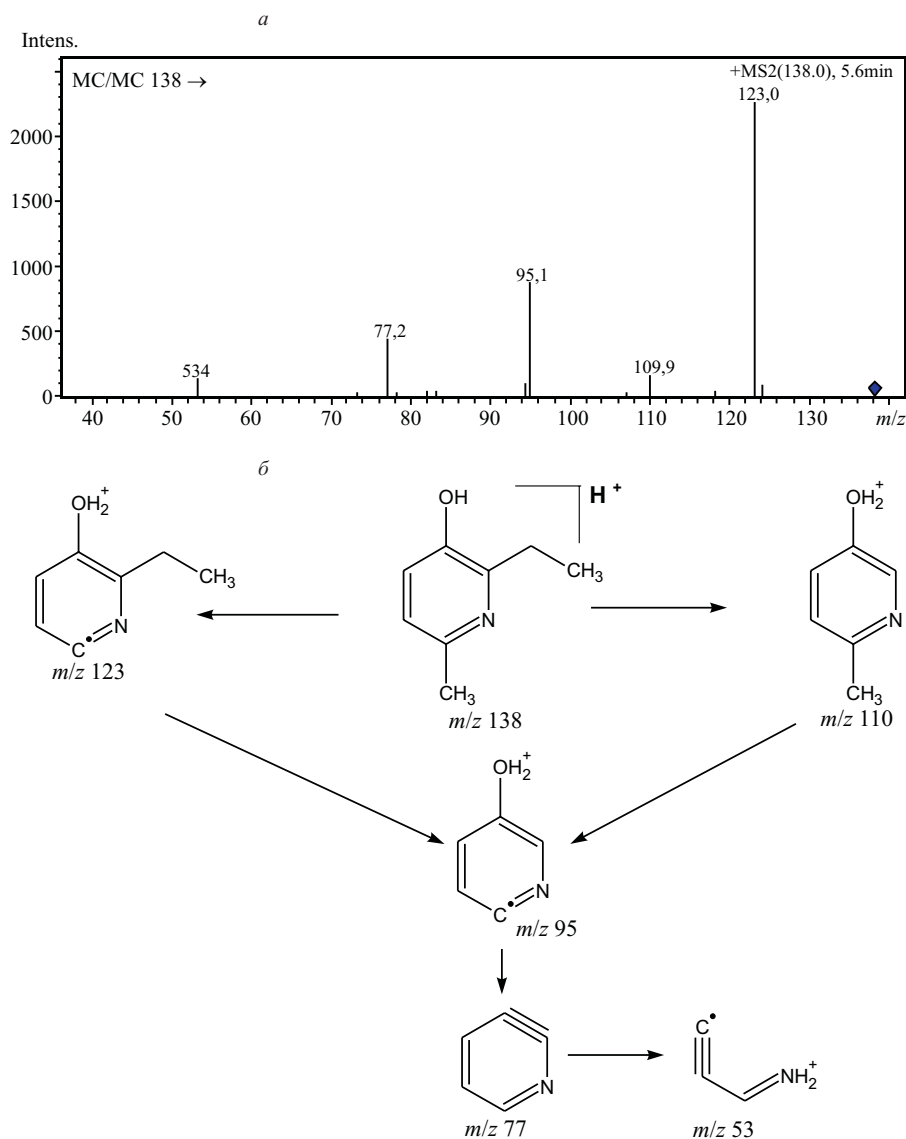
**Рис. 1.** Схема дериватизации 2-этил-6-метил-оксипиридина (ЭМО) дансилхлоридом (ДНХ) с получением дансильного производного (ЭМО-Д).



**Рис. 2.** Масс-хроматограмма стандартного раствора ЭМО (А), ЭМО-Д (В), экстракта бланковой мочи (А1, В1) и экстракта мочи после приема мексидола (А2, В2). ВС – внутренний стандарт.

бавляли 20 мкл внутреннего стандарта (3-оксипиридин), 100 мг сульфата аммония и 5 мл экстрагента. В качестве экстрагентов использовали этилацетат, диэтиловый эфир и смесь этилацетата и диэтилового эфи-

ра (1:1). Сравнение эффективности извлечения анализируемого соединения из пробы проводили при трех значениях уровня рН мочи (4,0; 7,0 и 9,0). Экстракцию проводили в автоматическом экстракторе фирмы



**Рис. 3.** МС/МС спектр (а) и возможный путь фрагментации протонированного иона  $[M+H]^+$  2-этил-6-метил-3-оксипиридина (ЭМО), б.

“Glas-Col” (Terre Haute, IN, США) в течение 10 мин при 60 об./мин. После экстракции образцы центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 мин, отбирали супернатант и высушивали его в токе азота. К сухому остатку добавляли 100 мкл подвижной фазы (А:В; 85:15) и вводили 50 мкл образца в ВЭЖХ-МС систему.

**Твердофазная экстракция.** ТФЭ проводили на колонках Strata-X 8B-S100-TAK C18-E (33 мкм, 30 мг) фирмы “Phenomenex” (Torrance, CA, США) с использованием вакуумного экстрактора “System 48” фирмы “Cerex, The Nest Group” (Southborough, MA, США). Колонку предварительно активировали пропуском через нее 3 мл метанола и кондиционировали 3 мл деионизованной воды, затем пропускали 1 мл мочи с добавлением 20 мкл внутреннего стандарта (3-оксипиридин). После пропускания образца колонку промывали 2 мл деионизованной воды, элюирование проводили 2 мл экстрагента (трет-бутил-метилловый эфир, диэ-

тиловый эфир, этилацетат). Элюированную фракцию высушивали в токе азота, сухой остаток растворяли в 100 мкл подвижной фазы. Образец объемом 50 мкл вводили в ВЭЖХ-МС систему.

**Дериватизация.** Для получения дансильных производных 2-этил-6-метил-3-оксипиридина и 3-оксипиридина (внутренний стандарт) к сухому остатку (после ЖЖЭ или ТФЭ), полученному после высушивания супернатанта в токе азота, добавляли 100 мкл буферного раствора бикарбоната натрия (рН 10,5) и 100 мкл раствора ДНХ в ацетоне (1 мг/мл). Полученную смесь выдерживали 20 мин при температуре 60 °С, охлаждали и объемом 10 мкл вводили в систему ВЭЖХ-МС.

**Оборудование.** Хромато-масс-спектрометрический анализ выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе модели 1100 фирмы “Agilent Technologies” (США) с насосом высокого давления в режиме градиентного элюирования, оснащенный дегазато-

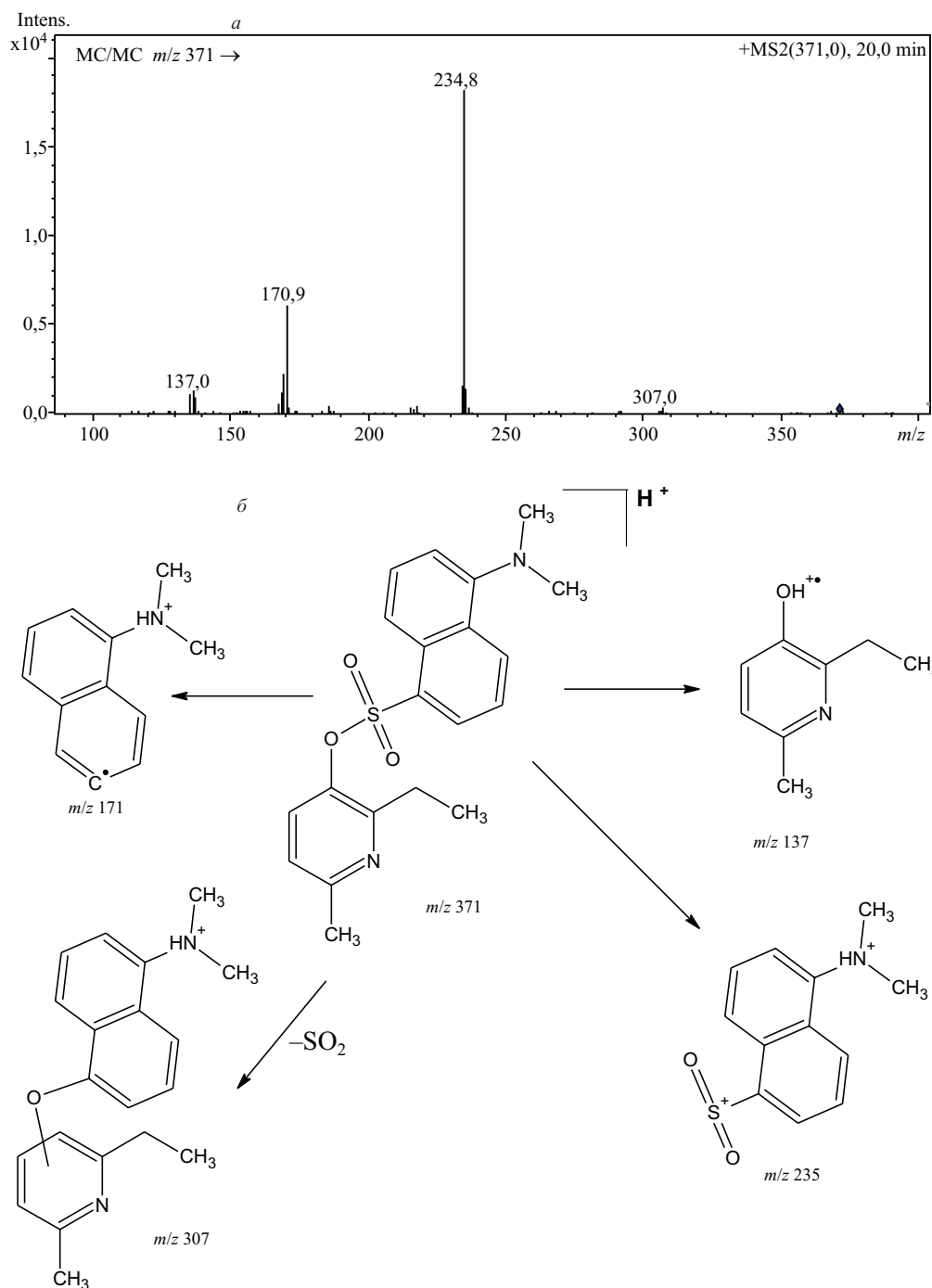


Рис. 4. MS/MS спектр (а) и возможный путь фрагментации протонированного иона  $[M+H]^+$  дансильного производного 2-этил-6-метил-3-оксипиридина (ЭМО-Д), б.

ром и автосамплером, в сочетании с масс-спектрометром в варианте “ионной ловушки” модели LC/MSD Trap SL фирмы “Agilent Technologies” (США), которая оснащена внешним источником ионов с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении.

*Хроматографические условия.* Для хроматографического разделения использовали колонку Zorbax Eclipse XDB-C8, 150  $\cdot$  4,6 мм, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 А, фирмы “Zorbax”, США. В качестве мо-

бильной фазы использовали 0,05 % раствор муравьиной кислоты (рН 3,0) (А) и 90 % раствор метанола (В). Постоянная скорость потока составляла 250 мкл/мин. ВЭЖХ-МС анализ проводился в режиме градиентного элюирования: 0 мин — (В) 15 %; 5,5 мин — (В) 50 %; 10 мин — (В) 90 %; 20 мин — (В) 15 %, общее время анализа составляло 20 мин.

*Масс-спектрометрические условия.* При хромато-масс-спектрометрическом анализе ионизация осу-

Таблица 1. Молекулярная масса (Мм), время удерживания (RT), МС и МС/МС характеристичные ионы 2-этил-6-метил-3-оксипиридина и 3-оксипиридина, а также их дансильных производных

Соединение	RT, мин	Мм	[M+H] <sup>+</sup>	Характеристичные ионы, m/z	
				МС	МС/МС
2-этил-6-метил-3-оксипиридин	5,6	137	138	138	123 (100 %), 110 (9 %)
3-оксипиридин	5,7	95	96	96	96 (100 %)
2-этил-6-метил-3-оксипиридин (дансильное производное)	20,0	370	371	371	235 (100 %), 171 (33 %), 137 (6 %)
3-оксипиридин (дансильное производное)	18,5	328	329	329	234 (35 %), 170 (100 %), 96 (8 %)

Таблица 2. Сравнительный анализ различных способов пробоподготовки мочи человека по критериям извлечения 2-этил-6-метил-3-оксипиридина и эффекту влияния биологической матрицы

Экстрагент	pH мочи	Процент извлечения ЭМО (%) <sup>*</sup>	Эффект матрицы (%) <sup>**</sup>	Экстрагент	pH мочи	Процент извлечения ЭМО (%) <sup>*</sup>	Эффект матрицы (%) <sup>*</sup>
<i>Жидкость-жидкостная экстракция ЭМО</i>				<i>Твердофазная экстракция ЭМО</i>			
Диэтиловый эфир (n = 27)	4,0	12,0 ± 2,3	16,6 ± 1,5	Этилацетат (n = 9)	7,0	24,4 ± 3,3	2,7 ± 1,4
	7,0	72,2 ± 3,4	14,0 ± 3,4				
	9,0	63,9 ± 4,9	10,4 ± 2,7				
Этилацетат (n = 27)	4,0	31,0 ± 1,3	4,3 ± 0,98	Диэтиловый эфир (n = 27)	7,0	53,2 ± 2,1	3,2 ± 2,4
	7,0	83,9 ± 5,7	6,9 ± 2,8				
	9,0	42,1 ± 3,8	10,5 ± 6,5				
Диэтиловый эфир / этилацетат (1:1) (n = 27)	4,0	19,4 ± 2,5	5,3 ± 0,8	Трет-бутил-метиловый эфир (n = 9)	7,0	65,4 ± 2,5	2,3 ± 2,2
	7,0	71,9 ± 4,5	9,1 ± 2,5				
	9,0	29,2 ± 2,7	19,6 ± 3,3				
<i>Жидкость-жидкостная экстракция + дериватизация ДНХ</i>				<i>Твердофазная экстракция + дериватизация ДНХ</i>			
Этилацетат (n = 9)	7,0	51,9 ± 0,9	66,3 ± 1,3	Трет-бутил-метиловый эфир (n = 9)	7,0	48,1 ± 3,4	99,4 ± 4,1

\* Процент извлечения = (отклик 3 / отклик 2) · 100 % (100 % — полное извлечение аналита из биологической пробы).

\*\* Эффект влияния матрицы = (отклик 2 / отклик 1) · 100 % (100 % — отсутствие влияния биологической матрицы на процесс ионизации).

шествовалась электрораспылением при атмосферном давлении в режиме регистрации положительных ионов. Напряжение на капилляре и противоэлектрод (конус) составляло 3,5 кВ и – 500 В соответственно; скорость потока осушающего газа азота — 9 л/мин; температура в камере ионизации — 350 °С. Давление на распылителе составляло 2,07 бар. Сканирование по полному ионному току проводили в диапазоне 60 – 500 а. е. м.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Оптимизация условий пробоподготовки образцов мочи.* Для оптимизации условий пробоподготовки образцов мочи было изучено влияние pH среды, органического экстрагента, эффектов матрицы и способа экстракции на степень извлечения 2-этил-6-метил-3-оксипиридина (ЭМО) из матрицы. Процент извлечения ЭМО и эффект матрицы оценивали в соответствии с

требованиями ИЮПАК по валидации методов, используемых в аналитических и биохимических исследованиях [7, 8]. Экстракцию ЭМО из мочи проводили методами ЖЖЭ и ТФЭ с использованием разных растворителей: диэтиловый эфир, трет-бутиловый эфир, этилацетат, смесь этилацетат — диэтиловый эфир (50/50 об. %).

Для оценки вышеуказанных критериев во всех экспериментах готовили три пакета образцов. Первый пакет включал смесь стандартных растворов ЭМО и 3-оксипиридина (ВС), растворенных в подвижной фазе (отклик 1). Второй пакет образцов готовили путем добавления смеси стандартных растворов после процесса экстракции в сухой остаток (отклик 2). Третий пакет образцов готовили путем добавления стандартных растворов, но непосредственно перед процессом экстракции образцов (отклик 3).

На основании соотношения площадей пиков, полученных после анализа третьего и второго пакета проб,

проводили расчет процента извлечения ЭМО из мочи человека, а на основании соотношения второго и первого пакета проб рассчитывали эффект влияния матрицы.

Сравнительный анализ показал (табл. 2), что для жидкость-жидкостной экстракции оптимальным экстрагентом является этилацетат, процент извлечения ЭМО — 84 %, рН среды — 7,0. Для твердофазной экстракции — трет-бутил-метиловый эфир, процент извлечения ЭМО — 65 %. Несмотря на достаточно высокий процент извлечения ЭМО из мочи человека, предел обнаружения по концентрации составлял больше 500 нг/мл в обоих случаях. Таким образом, результаты показали, что основной проблемой определения ЭМО в моче человека методом ВЭЖХ-МС в условиях электрораспылительной ионизации является негативное влияние эффекта матрицы: в общей сложности ионизации подвергается всего 2 – 17 % аналита. Попытка устранения влияния компонентов матрицы путем использования метода ТФЭ не дала ожидаемых результатов.

Основной причиной высокой степени подавления ионизации ЭМО в матрице является низкая молекулярная масса соединения ( $M_m = 137$ ). Поэтому для увеличения молекулярной массы ЭМО была проведена реакция дериватизации дансилхлоридом для получения дансильного производного 2-этил-6-метил-3-оксипиридина с молекулярной массой 370 а. е. м. (рис. 1).

Результаты сравнения методов ТФЭ и ЖЖЭ после получения дансильного производного ЭМО свидетельствуют о значительном снижении эффекта матрицы в обоих случаях до 99 и 66 % соответственно на фоне незначительного снижения процента извлекаемого соединения (табл. 2). Таким образом, ТФЭ в совокупности с последующим процессом дериватизации дансилхлоридом снижает негативное влияние эффекта матрицы, процент ионизации аналита возрастает до 99 %.

**МС и МС/МС фрагментация 2-этил-6-метил-3-оксипиридина.** Типичные масс-хроматограммы стандартных растворов 2-этил-6-метил-3-оксипиридина и 3-оксипиридина (ВС), их дансильных производных, а также экстракта бланковой мочи и экстракта мочи после приема мексидола представлены на рис. 2. Получение дансильных производных позволило не только избавиться от эффекта матрицы, но и улучшить хроматографическое разделение ЭМО и внутреннего стандарта.

В табл. 1 представлены времена удерживания, МС и МС/МС характеристичные ионы 2-этил-6-метил-3-оксипиридина и 3-оксипиридина (ВС), а также их дансильных производных.

Для 2-этил-6-метил-3-оксипиридина и 3-оксипиридина в условиях электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении характерно образование протонированной молекулы  $[M+H]^+$  с  $m/z$  138 и  $m/z$  96 соответственно. МС/МС спектр и возможные пути фрагментации ЭМО представлены на рис. 3. Фрагментация протонированного молекулярного иона 2-этил-6-метил-3-оксипиридина (рис. 3, б) приводит к образо-

ванию дочерних ионов с  $m/z$  123, 110, 95, 77 и 53. Дочерние ионы с  $m/z$  123, 110 и 95 были получены в результате потери метильной, этильной и всех алифатических групп соответственно. Дочерний ион с  $m/z$  77 предположительно был образован вследствие потери молекулы воды от фрагментного катион-радикала с  $m/z$  95, а малоинтенсивный ион с  $m/z$  53 в результате последующего разрыва пиридинового кольца.

Для дансильных производных 2-этил-6-метил-3-оксипиридина и 3-оксипиридина в условиях электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении характерно образование протонированной молекулы  $[M+H]^+$  с  $m/z$  371 и  $m/z$  329. МС/МС спектр и возможные пути фрагментации ЭМО-Д представлены на рис. 4. Фрагментация протонированного молекулярного иона дансильного производного 2-этил-6-метил-3-оксипиридина (рис. 4, б) приводит к образованию дочерних ионов с  $m/z$  307, 235, 171 и 137. Основной пик в МС/МС спектре ЭМО-Д соответствует иону с  $m/z$  235, образованному в результате потери дансил-катиона. В ходе данного процесса фрагментации образуется также катион-радикал ЭМО с  $m/z$  137. Дочерний ион с  $m/z$  171 предположительно образуется при элиминации N,N-диметилнафталинаминового остатка от протонированного молекулярного иона. Минорный фрагмент с  $m/z$  307 соответствует иону  $[M+H-SO_2]^+$ .

## ВЫВОДЫ

1. Разработан метод хромато-масс-спектрометрического определения 2-этил-6-метил-3-оксипиридина в моче человека после его приема внутрь в форме мексидола. Впервые получены МС, МС/МС спектры 2-этил-6-метил-3-оксипиридина, 3-оксипиридина и их дансильных производных с использованием масс-спектрометра типа “ионная ловушка” в условиях электрораспылительной ионизации.

2. Метод ВЭЖХ-МС в режиме регистрации положительных ионов в совокупности с твердофазной экстракцией и последующим процессом дериватизации дансилхлорида является оптимальным и будет применен в дальнейших исследованиях по изучению метаболизма и стадий выведения мексидола из организма человека.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Вальдман, Т. А. Воронина, Л. Д. Смирнов, *Бюл. exper. биол. и мед.*, № 1, 60 – 62 (1985).
2. Т. А. Воронина, *Психофармакология и биол. наркология*, № 1, 2 – 12 (2001).
3. А. К. Сариев, В. П. Жердев, А. А. Литвин. *Экспер. и клин. фармакол.*, № 5, 42 – 46 (1999).
4. А. К. Сариев, И. А. Давыдова, Г. Г. Незнамов. *Экспер. и клин. фармакол.*, № 3, 17 – 21 (2001).
5. С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, *Клинические исследования лекарственных средств в России*, № 2, 22 – 27 (2004).
6. В. К. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.*, **75**, 3019 – 3030 (2003).

7. M. Thompson, S. L. R. Ellison, and R. Wood, *Pure Appl. Chem.*, **74**(5), 835 – 855 (2002). (CDER), 2001, available at [http:// www.fda.gov / cder / guidance / 4252fnl.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm).
8. *Guidance for industry, bioanalytical methods validation, U. S. Department of health and human services, food and drug administration, center for drug evaluation and research*

Поступила 24.09.08

## HPLC-MS DETERMINATION OF 2-ETHYL-6-METHYL-3-OXYPYRIDINE

P. A. Baranov<sup>1</sup>, S. A. Appolonova<sup>1</sup>, M. A. Dikunets<sup>1</sup>, G. M. Rodchenkov<sup>2</sup>,  
A. K. Sariev<sup>1</sup>, and V. P. Zherdev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal Antidoping Center, Elizavetinskii per. 10, Moscow, 105005, Russia

<sup>2</sup> Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315, Russia

An HPLC-ESI-MS method has been developed for determining 2-ethyl-6-methyl-3-oxypyridine (EMO) in human urine upon peroral administration of this substance in form of mexidol. Various sample preparation (extraction) procedures were tested and compared for evaluating the recovery and matrix effect. Solid-phase extraction procedure followed by derivation with dansyl chloride is proposed as a method of choice. The recovery of analyte was  $48.1 \pm 3.4\%$ , and the matrix effect was  $99.4 \pm 4.1\%$ . The MS and MS/MS spectra of EMO and its dansyl derivatives are presented and interpreted. The analyses were performed using a mass spectrometer of the ion trap type with electrospray ionization at atmospheric pressure, operating in the regime of positive ion detection.

**Key words:** High-performance liquid chromatography, mass spectrometry, mexidol