

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНИЯ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОАТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС

Н.С. Попов

к.фарм.н., зав. научно-исследовательской лабораторией,
ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России» (г. Тверь, Россия)

Е.Н. Егорова

д.м.н., зав. кафедрой биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики,
ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России» (г. Тверь, Россия)

М.Б. Петрова

д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии,
ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России» (г. Тверь, Россия)

Е.В. Андрианова

ассистент, кафедра биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики,
ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России» (г. Тверь, Россия)

О.А. Шикунова

ассистент, кафедра фармации,
ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России» (г. Тверь, Россия)
E-mail: education@tvgtmu.ru

Актуальность. Исследования эффективности применения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (ацексамата) в виде мази для лечения ожоговых ран у животных показали перспективность его использования в качестве регенеранта и репаранта. Одним из важных этапов фармакологического изучения наружных лекарственных форм является оценка резорбции. Эти исследования требуют внедрения точных и воспроизводимых биоаналитических методик.

Цель исследования. Разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс для последующей оценки резорбции вещества из лекарственных форм для наружного применения.

Материал и методы. Объектом исследования явился 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата, количественное определение которого в плазме крови крыс осуществляли с помощью ВЭЖХ Agilent Technologies 1260 Infinity II и масс-спектрометра AB Sciex 3200MD. Хроматограммы 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамовой кислоты и сульфацида (внутренний стандарт) были построены в режиме MRM. Хроматографическое разделение анализов проводили с использованием колонки Phenomenex Synergi C18 4 мкм, 2×50 мм, элюирование осуществляли в градиентном режиме смесью воды и абсолютного метанола. Анализировали калибровочные стандарты, образцы контроля качества и холостые образцы. Для разработанной методики определяли аналитический диапазон, предел детектирования, нижний предел количественного определения, линейность. Методику валидировали по показателям: селективность, матричный эффект, степень извлечения, перенос вещества, точность и прецизионность, стабильность. Разработанная методика была использована для оценки резорбции 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата из мази после однократного нанесения на поверхность ожоговых дефектов кожи крыс.

Результаты. Через 2 ч после нанесения мази концентрации 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты в плазме крови крыс составили соответственно $18,05 \pm 0,96$ и $21,62 \pm 1,12$ нг/мл в пересчете на 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата. Полученные результаты свидетельствуют о незначительной резорбции исследуемого вещества через поверхность ожогового дефекта.

Выводы. Разработанная методика количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс является селективной, точной, прецизионной, линейной и по всем параметрам соответствует требованиям к валидации биоаналитических методик.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС, хроматография, масс-спектрометрия, 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин, N-ацетил-6-аминогексаноат (ацексамовая) кислота.

Для цитирования: Попов Н.С., Егорова Е.Н., Петрова М.Б., Андрианова Е.В., Шикунова О.А. Применение ВЭЖХ-масс-спектрометрии для количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(10):45-51. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-10-06>

Адекватная регенерация тканей остается актуальной проблемой биологии и медицины [1, 2]. Важным является поиск лекарственных средств, способных ускорять репаративные процессы в тканях. Одним из веществ с потенциальными про-регенераторными свойствами является N-ацетил-6-аминогексановая (ацексамовая) кислота и ее производные, которые обладают противоотечным действием, стимулируют рост грануляций и образование костной мозоли [3–5]. Исследования эффективности применения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (ацексамата) в виде мази для лечения ожоговых ран у животных показали перспективность его использования в качестве регенеранта и репаранта [6, 7]. Одним из важных этапов фармакологического изучения наружных лекарственных форм является оценка резорбции. Такие исследования требуют разработки и внедрения новых точных и воспроизводимых биоаналитических методик. Современным методом, позволяющим с высокой

точностью идентифицировать и осуществить количественное определение химических веществ в биологических объектах, является хромато-масс-спектрометрия.

Цель исследования – разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс для последующей оценки резорбции вещества из лекарственных форм для наружного применения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Активная фармацевтическая субстанция 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (рис. 1) была получена в АО «ВНЦ БАВ» профессором С.Я. Скачиловой и использована авторами для приготовления опытных образцов мягких лекарственных форм, а также в качестве стандарта для разработки и валидации методики ВЭЖХ-МС/МС.

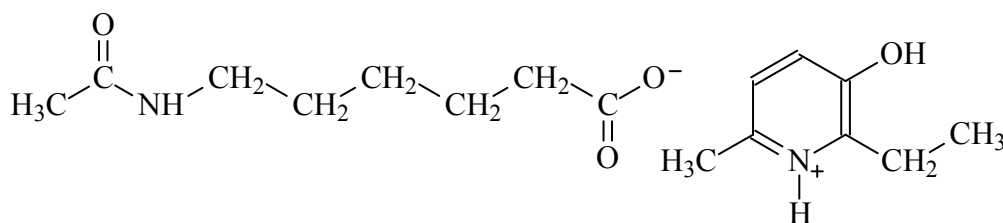


Рис. 1. Химическая структура 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата

Таблица 1. Хроматографические параметры определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата

Хроматографическая колонка	Phenomenex Synerdgi C18 4 мкм, 2×50 мм			
Подвижная фаза А	Деионизованная вода + 0,1% НСООН			
Подвижная фаза В	Абсолютный метанол + 0,1% НСООН			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% А	% В
	0,0	0,3	90	10
	1,0		90	10
	3,0		10	90
	4,0		10	90
	4,01		90	10
5,0	90		10	
Температура колонки, °С	40			
Объем ввода, мкл	10			
Общее время анализа, мин	5			
Промывка инжектора	3 с, 50%-ный раствор изопропилового спирта			

Хроматографическое определение 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата проводили с помощью ВЭЖХ Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Германия) и tandemного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex 3200MD QTrap с электрораспылительным источником ионов (Sciex, Сингапур).

Оптимизацию параметров масс-спектрометрического детектирования 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата осуществляли введением в источник ионов стандартного раствора вещества (40 нг/мл) с помощью шприцевого инжектора со скоростью 10 мкл/мин. В качестве растворителя использовали 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в абсолютном ацетонитриле. Определяли отношение массы к заряду (m/z) ионов предшественников и ионов-продуктов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамовой кислоты и сульфацетамида (внутренний стандарт); полученные данные использовали для дальнейшего построения хроматограмм в режиме мониторинга множественных реакций.

Разделение аналитов проводили с использованием хроматографической колонки Phenomenex Synerdgi C18 4 мкм, 2×50 мм. Элюирование осуществляли смесью деионизированной воды и абсолютного метанола с добавлением 0,1%-ной муравьиной кислоты в градиентном режиме (табл. 1).

Дальнейшая пробоподготовка образцов представляла собой осаждение белков плазмы с помощью абсолютного метанола. Для этого в пробирку Эппендорфа вместимостью 2 мл с помощью автоматического дозатора помещали 200 мкл плазмы крови крыс, добавляли 500 мкл метанольного раствора сульфацетамида (внутренний стандарт) в концентрации 200 нг/мл, охлажденного до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, встряхивали на вортексе в течение 15 с, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 15000 об/мин и температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Супернатант в объеме 200 мкл переносили в одноразовые полиэтиленовые вставки в хроматографических виалах, которые помещали в автоматический пробоотборник хроматографа.

Для приготовления калибровочных и контрольных образцов использовали пулированную плазму пяти интактных крыс. Исходный раствор 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата готовили на деионизированной воде в концентрации 2000 мкг/мл и использовали для приготовления рабочих водных растворов

аналита с концентрациями 5, 10, 50, 100, 500, 1000 и 5000 нг/мл. Калибровочные стандарты получали добавлением 50 мкл соответствующего рабочего раствора 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата к 950 мкл плазмы крови до достижения концентраций 0,25; 0,5; 2,5; 5; 25; 50 и 250 нг/мл. Аналогично готовили образцы контроля качества в концентрациях 1, 100 и 200 нг/мл, холостые образцы, не содержащие анализируемое вещество, и внутренний стандарт.

Серию образцов проанализировали пятикратно, после чего установили зависимость сигналов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты, нормированных на сигнал сульфацетамида, от концентрации. Для полученных калибровочных кривых определяли аналитический диапазон, предел детектирования, нижний предел количественного определения, линейность.

Разработанную методику валидировали по показателям: селективность, матричный эффект, степень извлечения, перенос вещества, точность и прецизионность, стабильность [8–10]. Результаты обрабатывали с использованием ПО Microsoft Office Excel 365.

Разработанную методику использовали для оценки резорбции 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата с поверхности ожоговых дефектов. В эксперименте на 15 белых неинбредных самках крыс моделировали термический ожог III степени [11], на который наносили местно 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в виде 2%-ной мази в количестве 2 г. Через 2 ч после аппликации мази от животных получали кровь из бедренной вены в объеме трёх миллилитров, которую немедленно центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин для получения плазмы

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Построение хроматограмм осуществляли по ионному току в режиме множественных реакций (MRM). MRM-переходы для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамата и сульфацетамида составили соответственно m/z 138,0 \rightarrow m/z 123,0; m/z 174,0 \rightarrow m/z 114,0 и m/z 215,2 \rightarrow m/z 156,0.

Анализ результатов хроматографического определения показал, что время удерживания 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамовой кислоты и сульфацетамида (внутренний стандарт) составило соответственно 1,0; 1,25 и 1,2 мин (рис. 2).

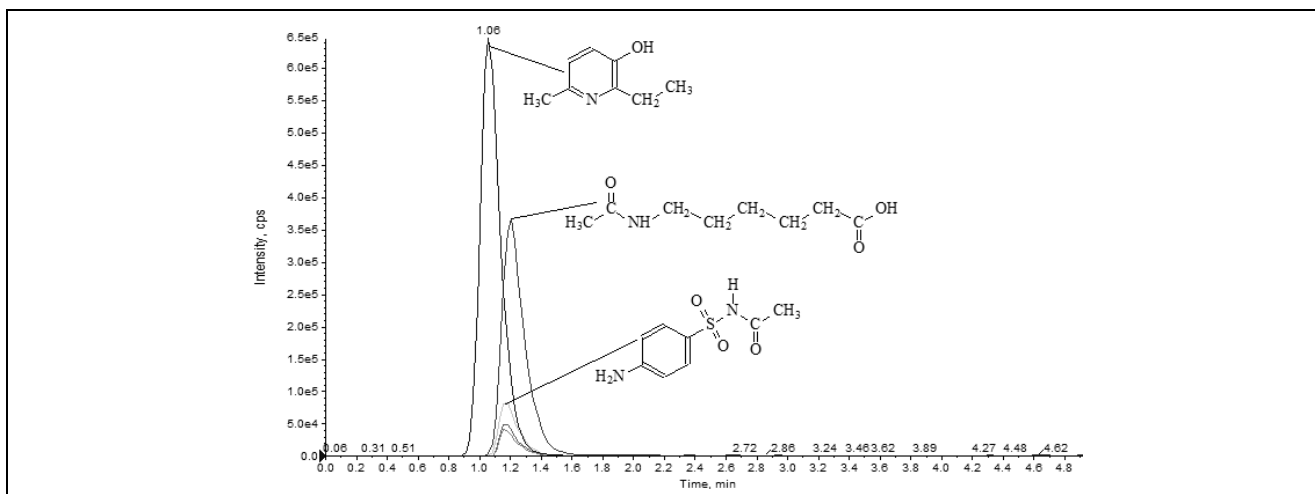


Рис. 2. Хроматограмма образца плазмы крови с концентрацией 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата 50 нг/мл

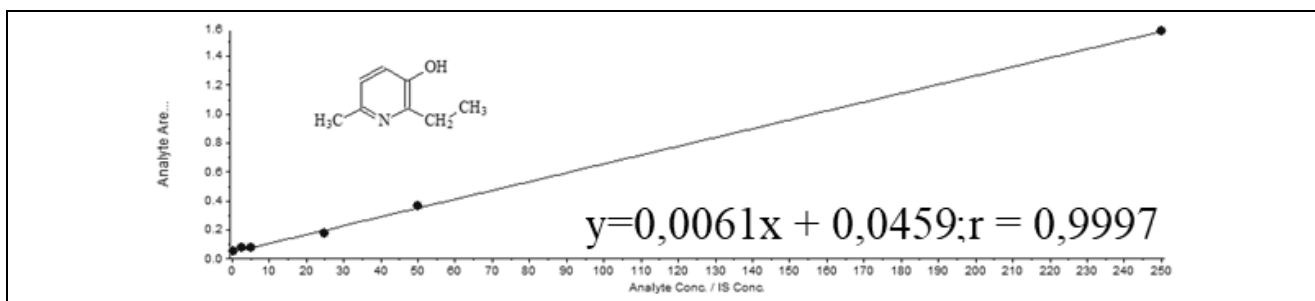


Рис. 3. Калибровочная прямая для количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина в плазме крови крыс в пересчете на 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (по оси X представлена концентрация аналита в нг/мл, по оси Y – отношение площади хроматографического пика 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина к площади пика сульфацетамида)

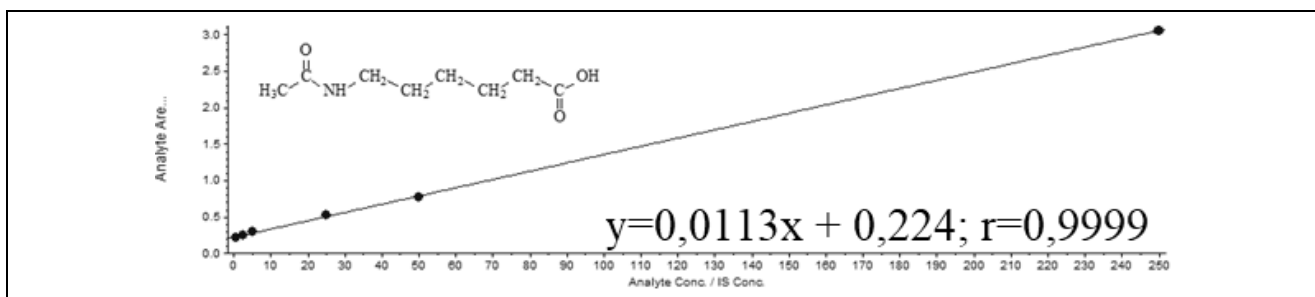


Рис. 4. Калибровочная прямая для количественного определения ацексамовой кислоты в плазме крови крыс в пересчете на 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (по оси X представлена концентрация аналита в нг/мл, по оси Y – отношение площади хроматографического пика ацексамовой кислоты к площади пика сульфацетамида)

Для разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС были определены метрологические параметры. Нижний предел детектирования и нижний предел количественного определения для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты составили 0,25 и 0,5 нг/мл соответственно.

Для построения калибровочного графика, описывающего зависимость нормированного сигнала аналита от концентрации, использовали регрессию без нормирования. Для 2-этил-6-метил-3-гидрокси-

пиридина и ацексамовой кислоты аналитический диапазон составил от 0,5 до 250 нг/мл в пересчете на 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (рис. 3 и 4).

Для определения значения матричного эффекта были проанализированы образцы, приготовленные на чистом растворителе, и образцы, содержащие экстракт плазмы крови крыс. Матричный эффект был установлен для трех уровней концентрации 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-аце-

тил-6-аминогексаноата: 1, 100 и 200 нг/мл. По результатам исследования было выявлено, что величина матричного эффекта не превышала 15% для 2-этил-6-метил-3-гидро-ксипиридина и ацесамовой кислоты на всех уровнях концентраций.

Оценку степени извлечения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацесамовой кислоты из плазмы крови крыс осуществляли для трех уровней концентрации 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (1, 100 и 200 нг/мл) сравнением площадей хроматографических пиков экстрагированных образцов и образцов на чистом растворителе с добавлением экстракта матрицы. Для всех анализируемых концентраций степень извлечения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацесамовой кислоты составила более 90%.

Результаты анализа стабильности показали, что площадь хроматографических пиков стандартных растворов при хранении в течение 14 дней при температуре от 2 до 8 °С и образцов плазмы крови при хранении в течение 24 и 48 ч при температуре 15 °С не изменилась более чем на 10%. Кроме того, образцы плазмы крови с концен-

трациями анализируемого вещества 1 и 200 нг/мл сохраняли свою стабильность после трех циклов замораживания и размораживания. Отклонение площади пика при повторных анализах не вышло за допустимые пределы.

Точность и прецизионность разработанной методики оценивали для образцов плазмы крови крыс с содержанием 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата на уровне нижнего предела количественного определения (1 нг/мл), средних (100 нг/мл) и высоких (200 нг/мл) концентраций. Исследования проводили как в течение одного дня, так и на следующий день, при этом для каждой концентрации анализируемого вещества хроматографический анализ осуществляли пятикратно. Результаты оценки точности и прецизионности показали, что для всех концентраций 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата значения относительного стандартного отклонения и относительной погрешности соответствовали валидационным критериям (не более 20% для минимальной концентрации, не более 15% – для остальных концентраций) (табл. 2).

Таблица 2. Точность и прецизионность методики ВЭЖХ-МС/МС определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс

Серия	Стандартный образец	1,0 нг/мл (LLQC)		100,0 нг/мл (MQC)		200 нг/мл (HQC)	
		ЭМГП	N-ААГ	ЭМГП	N-ААГ	ЭМГП	N-ААГ
1	Измеренная концентрация, нг/мл, mean±SD	1,081±0,127	1,051±0,175	106,48±2,53	102,82±8,64	209,14±3,64	201,38±5,42
	Точность, %	108,1	105,1	106,5	102,8	104,5	100,7
	CV, %	12,69	17,57	2,53	8,64	1,82	2,71
2	Измеренная концентрация, нг/мл, mean±SD	1,084±0,174	1,060±0,148	104,12±7,67	104,56±8,80	202,4±9,42	206,3±6,48
	Точность, %	108,4	106,0	104,1	104,6	101,2	103,2
	CV, %	17,42	14,88	7,67	8,80	4,71	3,24
3	Измеренная концентрация, нг/мл, mean±SD	1,108±0,184	1,194±0,148	103,92±7,63	106,72±9,39	204,52±10,74	206,0±6,52
	Точность, %	110,8	119,4	103,9	106,7	102,3	103,0
	CV, %	18,45	17,54	7,63	9,39	5,37	3,26
Между сериями	Измеренная концентрация, нг/мл, mean±SD	1,091±0,152	1,101±0,161	104,84±6,06	104,70±8,45	205,35±8,40	204,56±6,16
	Точность, %	109,1	110,1	104,8	104,7	102,7	102,3
	CV, %	15,21	16,16	6,05	8,45	4,20	3,08

П р и м е ч а н и е : ЭМГП – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин; N-ААГ – N-ацетил-6-аминогексановая кислота.

Разработанную методику использовали для оценки резорбции 2-этил-6-метил-3-гидрокси-пиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата из 2%-ной мази [6], однократно наносимой на поверхность ожоговых дефектов кожи крыс площадью 225 мм² в количестве 2 г. Так, было выявлено, что через 2 ч после нанесения мази концентрации 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацесамовой кислоты в плазме крови крыс составили соответственно 18,05±0,96 и 21,62±1,12 нг/мл в пересчете на 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат. Полученные результаты свидетельствуют о незначительной резорбции исследуемого вещества через поверхность ожогового дефекта.

ВЫВОДЫ

Установлено, что разработанная методика количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС пригодна для выполнения биоаналитических исследований. Основные валидационные характеристики методики полностью соответствуют критериям приемлемости, приведенным в отечественной и зарубежной нормативной документации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Iismaa S.E., Kaidonis X., Nicks A.M., Bogush N., Kikuchi K., Naqvi N., Harvey R.P., Husain A., Graham R.M.* Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues. *NPJ Regen. Med.* 2018; 23 (3): 6. doi: 10.1038/s41536-018-0044-5.
2. *Макаревич П.И., Ефименко А.Ю., Ткачук В.А.* Биохимическая регуляция регенеративных процессов факторами роста и цитокинами: основные механизмы и значимость

- для регенеративной медицины. *Биохимия.* 2020; 85 (1): 15–33. doi: 10.31857/S0320972520010029.
3. *Пахомов Д.В., Блинова Е.В., Шимановский Д.Н., Кильмяшкина М.Ф., Казаева М.А., Блинов Д.С., Нелипа М.В., Николаев А.В., Алхататнех Б.А., Скачилова С.Я., Богоявленская Т.А., Кытько О.В.* Доказательные аспекты стимулирования заживления неосложненной раны при локальном применении серебряной соли ацесамовой кислоты. *Оперативная хирургия и клиническая анатомия.* 2020; 4 (1): 19–25. doi.org/10.17116/operhirurg2020401119.
 4. *Блинова Е.В., Миронов М.А., Блинов Д.С.* Регенерация инфицированной кожной раны на фоне топического воздействия солями N-ацетил-6-аминогексановой кислоты. *Здоровье и образование в XXI веке.* 2018; 20 (7): 80–83.
 5. *Popov N.S., Demidova M.A., Malygin A.S.* Assessment of pharmacological activity and bioavailability of the new derivative 1,3,4-thiadiazole. *Research Results in Pharmacology.* 2018; 4 (2): 27–46. doi 10.3897/rpharmacology4.27582.
 6. *Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Блинова Е.В. и др.* Мазь для лечения ожогов 1–3 степени. Патент на изобретение № 2731175 зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 31.08.2020 г.
 7. *Андрианова Е.В., Егорова Е. Н., Петрова М.Б., Пахомов М.А.* Биохимические аспекты прорегенераторного действия 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* 2021; 17(1): 12–16.
 8. *Guidance for Industry: Analytical procedures and method validation (draft).* U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2000.
 9. *Guideline on validation of bioanalytical methods (draft).* European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.
 10. *Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание.* М., 2015; 1: 1470
 11. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.* М.: Гриф и К., 2012.

Поступила 6 июля 2021 г.

HPLC-MASS SPECTROMETRY AS METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF 2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINIUM N-ACETYL-6-AMINOHEXANOATE IN RAT BLOOD PLASMA

© Authors, 2021

N.S. Popov

Ph.D. (Pharm.), Head of the Research Laboratory, Tver State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tver, Russia)

E.N. Egorova

Dr.Sc. (Med.), Head of the Department of Biochemistry with Clinical Laboratory Diagnostics Course, Tver State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tver, Russia)

M.B. Petrova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department of Biology,
Tver State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tver, Russia)

E.V. Andrianova

Assistant, Department of Biochemistry with Clinical Laboratory Diagnostics Course,
Tver State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tver, Russia)

O.A. Shikunova

Assistant, Department of Farmation,
Tver State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tver, Russia)
E-mail: education@tvsmu.ru

Relevance. Studies of the effectiveness use of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexanoate (acexamate) as an ointment for the treatment of burn wounds in animals have shown the prospects of its use as a regenerant and reparant. One of the important stages of the pharmacological study medicines for external application is the assessment of resorption. These studies require the implementation of precise and reproducible bioanalytical techniques.

Aim: to design and validate a chromatography-mass spectrometric technique for the quantitative determination of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexanoate in rat blood plasma for subsequent evaluation of the substance resorption from medicines for external application.

Material and methods. The object of the study was 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexanoate, which was quantified in rat blood plasma with HPLC method using Agilent Technologies 1260 Infinity II and AB Sciex 3200MD mass spectrometer. Chromatograms of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine, acexamic acid and sulfacetamide (internal standard) were constructed in the MRM mode. Chromatographic separation of analytes was carried out using a Phenomenex Synerdgi C18 column of 4 microns, 2x50 mm, elution was fulfilled in a gradient mode with a mixture of water and absolute methanol. Calibration standards, quality control samples and blank samples were analyzed. For the developed method, the analytical range, the detection limit, the lower limit of quantitative determination, linearity were determined. The method was validated by the following indicators: selectivity, matrix effect, degree of extraction, substance transfer, accuracy and precision, stability. The developed technique was used to evaluate the resorption of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexanoate from ointment after a single application to the surface of burn defects of the rat skin.

Results. 2 hours after applying the ointment, the concentrations of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine and acexamic acid in the rat blood plasma were 18.05±0.96 ng/ml and 21.62±1.12 ng/ml, respectively, in terms of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexanoate. The obtained results indicate a slight resorption of the test substance through the surface of the burn defect.

Conclusion. The developed method for the quantitative determination of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexanoate in rat blood plasma is selective, accurate, precise, linear and meets the requirements for the validation of bioanalytical methods in all parameters.

Key words: HPLS-MS/MS, chromatography, mass-spectrometry, 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine, N-acetyl-6-aminohexanoic (acexamic) acid.

For citation: Popov N.S., Egorova E.N., Petrova M.B., Andrianova E.V., Shikunova O.A. HPLC-MASS spectrometry as method for quantitative determination of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexanoate in rat blood plasma. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(10):45–51. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-10-06>

REFERENCES

1. Iismaa S.E., Kaidonis X., Nicks A.M., Bogush N., Kikuchi K., Naqvi N., Harvey R.P., Husain A., Graham R.M. Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues. NPJ Regen. Med. 2018; 23 (3): 6. doi: 10.1038/s41536-018-0044-5.
2. Makarevich P.I., Efimenko A.Ju., Tkachuk V.A. Biohimicheskaja reguljacija regenerativnyh processov faktorami rosta i citokinami: osnovnye mehanizmy i znachimost' dlja regenerativnoj mediciny. Biohimija. 2020; 85 (1): 15-33. doi: 10.31857/S0320972520010029.
3. Pahomov D.V., Blinova E.V., Shimanovskij D.N., Kil'mjashkina M.F., Kazaeva M.A., Blinov D.S., Nelipa M.V., Nikolaev A.V., Alhatatneh B.A., Skachilova S.Ja., Bogojavlenskaja T.A., Kyt'ko O.V. Dokazatel'nye aspekty stimulirovanija zazhivlenija neoslozhennoj rany pri lokal'nom primenenii serebrjanoy soli aceksamovoj kisloty. Operativnaja hirurgija i klinicheskaja anatomija. 2020; 4 (1): 19-25. doi.org/10.17116/operhirurg2020401119.
4. Blinova E.V., Mironov M.A., Blinov D.S. Regeneracija inficirovannoj kozhnoj rany na fone topicheskogo vozdeystvija soljami N-acetil-6- aminogeksanovoj kisloty. Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke. 2018; 20 (7): 80-83.
5. Popov N.S., Demidova M.A., Malygin A.S. Assessment of pharmacological activity and bioavailability of the new derivative 1,3,4-thiadiazole. Research Results in Pharmacology. 2018; 4 (2): 27-46. doi 10.3897/rpharmacology4.27582.
6. Skachilova S.Ja., Ermakova G.A., Blinova E.V. i dr. Maz' dlja lechenija ozhogov 1-3 stepeni. Patent na izobretenie № 2731175 zaregistririvan v Gosudarstvennom reestre izobretenij RF 31.08.2020 g.
7. Andrianova E.V., Egorova E. N., Petrova M.B., Pahomov M.A. Biohimicheskie aspekty proregeneratornogo deystvija 2-jetil-6-metil-3-gidroksipiridinija N-acetil-6-aminogeksaonata. Vestnik biotehnologii i fiziko-himicheskoy biologii imeni Ju.A. Ovchinnikova. 2021; 17(1): 12-16.
8. Guidance for Industry: Analytical procedures and method validation (draft). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2000.
9. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.
10. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XIII izdanie. M., 2015; 1: 1470
11. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledo-vanij lekarstvennyh sredstv. M.: Grif i K., 2012.