

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.03

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1783>

Разработка и валидация методики определения тетрадекапептида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

М. А. Токарева^{1,2}✉, Е. С. Мельников^{1,2}, М. В. Белова^{1,3}, Е. Н. Фишер^{1,4}, Т. А. Родина², И. Е. Шохин^{5,6}

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени И. В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ГКБ им. И. В. Давыдовского ДЗМ»). 109240, Россия, г. Москва, ул. Яузская, д. 11

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»). 129090, Россия, г. Москва, Большая Сухаревская площадь, д. 3

⁴ Общество с ограниченной ответственностью «Лаборатория фармацевтических исследований» (ООО «ЛФИ»). 121205, Россия, г. Москва, тер. Инновационного Центра Сколково, Большой б-р, д. 42, стр. 1, этаж 2, помещ. 243

⁵ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

⁶ Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

✉ Контактное лицо: Токарева Маргарита Алексеевна. E-mail: tokareva_m_a@student.sechenov.ru

ORCID: М. А. Токарева – <https://orcid.org/0000-0001-7684-358X>; Е. С. Мельников – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>;

М. В. Белова – <https://orcid.org/0000-0002-0861-5945>; Е. Н. Фишер – <https://orcid.org/0000-0002-6456-7669>;

Т. А. Родина – <https://orcid.org/0000-0002-0528-3068>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 16.02.2024

Статья принята в печать: 27.03.2024

Статья опубликована: 15.04.2024

Резюме

Введение. В последние годы растет число разрабатываемых и регистрируемых лекарственных средств пептидной природы, в связи с чем необходимы современные аналитические подходы и методики определения этих веществ в биологических матрицах для изучения фармакокинетики. Пептиды по структуре занимают промежуточное положение между малыми молекулами и биополимерами, что создаёт трудности при разработке методик их определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Дериватизация пептидов может способствовать достижению оптимального хроматографического разделения и снижению нижнего предела количественного определения методики.

Цель. Разработка и валидация методики определения тетрадекапептида (ТДП) треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы. Определение ТДП в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. При пробоподготовке использована комбинация методов осаждения белков плазмы крови раствором пропионовой кислоты в метаноле, жидкость-жидкостной экстракции, дериватизации пептида пропионовым ангидридом. Внутренний стандарт (ВС): треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-лейцил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат. Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме, элюент А – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде, элюент В – 0,1%-й муравьиной кислоты в ацетонитриле. Колонка: Waters XBridge C18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм. Ионизация методом электрораспыления в положительном режиме. При детектировании в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM) для 4-замещенного ТДП пропионата использовали переходы: 681,30 → 73,95 m/z, 681,30 → 84,00 m/z, 681,30 → 101,90 m/z, 681,30 → 140,10 m/z, для 4-замещенного ВС пропионата: 686,00 → 74,10 m/z, 686,00 → 84,05 m/z, 686,00 → 102,00 m/z, 686,00 → 140,00 m/z.

Результаты и обсуждение. Валидация методики проведена в соответствии с требованиями Евразийского экономического союза по параметрам: селективности, эффекту матрицы, градуировочной кривой, правильности и прецизионности, степени извлечения, нижнему пределу количественного определения, переносу пробы, стабильности.

Заключение. Проведена разработка и валидация методики определения ТДП в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон составил 5,00–1000,00 нг/мл, что позволяет использовать методику при изучении фармакокинетики ТДП.

Ключевые слова: пептид, плазма крови, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, дериватизация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Е. С. Мельников, М. А. Токарева, Е. Н. Фишер, Т. А. Родина участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. И. Е. Шохин, Е. Н. Фишер и М. В. Белова отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Токарева М. А., Мельников Е. С., Белова М. В., Фишер Е. Н., Родина Т. А., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики определения тетрадекапептида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):171–180. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1783>

© Токарева М. А., Мельников Е. С., Белова М. В., Фишер Е. Н., Родина Т. А., Шохин И. Е., 2024

© Tokareva M. A., Melnikov E. S., Belova M. V., Fisher E. N., Rodina T. A., Shohin I. E., 2024

HPLC-MS/MS method development and validation for the determination of tetradecapeptide in human plasma

Margarita A. Tokareva^{1,2}✉, Evgeny S. Melnikov^{1,2}, Maria V. Belova^{1,3}, Elizaveta N. Fisher^{1,4}, Tatiana A. Rodina², Igor E. Shohin^{5,6}

¹ I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

² Clinical Hospital. I. V. Davidovsky Department of Health of the city of Moscow. 11, Yauzskaya str., Moscow, 109240, Russia

³ N. V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine. 3, Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia

⁴ LLC "Laboratory of pharmaceutical research" (LLC "LFI"). Room 243, 42/1, Bolshoy Boulevard, ter. Skolkovo Innovation Centre, Moscow, 121205, Russia

⁵ LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia

⁶ National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute). 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

✉ **Corresponding author:** Margarita A. Tokareva. **E-mail:** tokareva_m_a@student.sechenov.ru

ORCID: Margarita A. Tokareva – <https://orcid.org/0000-0001-7684-358X>; Evgeny S. Melnikov – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>;

Maria V. Belova – <https://orcid.org/0000-0002-0861-5945>; Elizaveta N. Fisher – <https://orcid.org/0000-0002-6456-7669>;

Tatiana A. Rodina – <https://orcid.org/0000-0002-0528-3068>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 16.02.2024

Accepted: 27.03.2024

Published: 15.04.2024

Abstract

Introduction. The number of peptide drugs being developed and registered has increased in recent years. Therefore, modern analytical approaches and methods are required to determine these substances in biological matrices during pharmacokinetic studies. Peptides are structurally intermediate between small molecules and biopolymers, making it difficult to develop methods for determining them using High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS). Peptide derivatization can help achieve optimal chromatographic separation and increase method sensitivity.

Aim. To develop and validate a method for the determination of the tetradecapeptide (TDP) threonyl-glutamyl-lysyl-lysyl-arginyl-arginyl-glutamyl-threonyl-valyl-glutamyl-arginyl-glutamyl-lysyl-glutamate in human plasma by HPLC-MS/MS.

Materials and methods. The determination of TDP in human plasma was performed by HPLC-MS/MS. Sample preparation included a combination of blood plasma protein precipitation with propionic acid solution in methanol, liquid-liquid extraction with chloroform, and peptide derivatization with propionic anhydride. Internal standard (IS) was threonyl-glutamyl-lysyl-lysyl-arginyl-arginyl-glutamyl-threonyl-leucyl-glutamyl-arginyl-glutamyl-lysyl-glutamate. Chromatographic separation was performed in gradient mode, eluent A was 0.1 % formic acid solution in water, eluent B was 0.1 % formic acid in acetonitrile. Column: Waters XBridge C18, 4.6 × 50 mm, 5 μm. Ionization source was electrospray in positive mode. Multiple reaction monitoring (MRM) transitions for 4-substituted TDP propionate were: 681.30 → 73.95 m/z, 681.30 → 84.00 m/z, 681.30 → 101.90 m/z, 681.30 → 140.10 m/z, and for 4-substituted IS propionate: 686.00 → 74.10 m/z, 686.00 → 84.05 m/z, 686.00 → 102.00 m/z, 686.00 → 140.00 m/z.

Results and discussion. Validation of the developed method was carried out in accordance with the requirements of Eurasian Economic Union and the following parameters were determined: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy and precision, recovery, lower limit of quantification, sample carryover, stability.

Conclusion. The method for the determination of TDP in human blood plasma by HPLC-MS/MS was developed and validated. The analytical range was 5.00–1000.00 ng/mL, allowing the method to be used to study TDP pharmacokinetics.

Keywords: peptide, blood plasma, HPLC-MS/MS, validation, derivatization

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Evgeny S. Melnikov, Margarita A. Tokareva, Elizaveta N. Fisher and Tatyana A. Rodina participated in the development and validation of the bioanalytical methodology. Igor E. Shohin, Elizaveta N. Fischer and Maria V. Belova were responsible for the organizational part of the study. All the above authors participated in the discussion of the results obtained in the form of scientific discussion.

For citation: Tokareva M. A., Melnikov E. S., Belova M. V., Fisher E. N., Rodina T. A., Shohin I. E. HPLC-MS/MS method development and validation for the determination of tetradecapeptide in human plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(2):171–180. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1783>

ВВЕДЕНИЕ

Пептиды обладают высокой специфичностью связывания с мишенями, что обеспечивает терапевтический эффект при применении в малых дозах и делает пептиды особо привлекательными для разработки новых лекарственных средств [1, 2]. В свете увеличивающегося количества регистрируемых лекарственных средств пептидной природы [3–7] проводится множество доклинических и клинических исследова-

ний¹ [8], для которых требуется разработка высокочувствительных методик определения пептидов в биологических образцах.

По своей структуре, молекулярной массе и физико-химическим свойствам пептиды занимают промежуточное положение между малыми молекулами и белками [9]. В связи с этим при работе с пептидны-

¹ ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>. Accessed: 01.03.2024.

ми молекулами могут применяться различные аналитические подходы, характерные как для малых молекул, так и для биополимеров. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) получил широкое распространение при анализе малых молекул ввиду высокой чувствительности и специфичности, также этот метод применяется и для определения пептидов в биологических образцах [10–14]. При определении белков традиционно используется метод иммуноферментного анализа (ИФА) [enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA], применимый и для коротких пептидов [15, 16]. Определение некоторых пептидных молекул возможно как методом ВЭЖХ-МС/МС, так и с помощью ELISA [17, 18]. Проведение иммуноферментного анализа требует наличия соответствующих наборов либо их разработки собственными силами. Однако ELISA не всегда обеспечивает достаточную селективность за счет перекрестной реактивности, поэтому метод ВЭЖХ-МС/МС на сегодняшний день все чаще применяется в биоаналитических исследованиях лекарственных средств пептидной природы [10].

При разработке методик определения пептидов методом ВЭЖХ-МС/МС в биологических образцах следует уделять особое внимание выбору способа пробоподготовки, поскольку часто такие молекулы присутствуют в образце в крайне низких концентрациях и может потребоваться концентрирование пробы для увеличения чувствительности [19]. Кроме того, многие пептиды проявляют выраженные гидрофильные свойства [20], что необходимо учитывать как при пробоподготовке, так и при выборе условий хроматографического разделения. Ввиду гидрофильности не для всех соединений возможно подобрать оптимальные условия хроматографического разделения в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. Альтернативой может стать применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC] [21, 22] либо дериватизация пептида с целью увеличения его липофильности [23]. Кроме того, за счет дериватизации может быть достигнута большая чувствительность при детектировании [23].

Другой важной особенностью многих пептидов является низкая стабильность в присутствии биологической матрицы, что следует учитывать при разработке и валидации биоаналитической методики [24, 25].

Целью настоящей работы является разработка и валидация методики определения тетрадекапептида (ТДП) [tetradecapeptide, TDP] треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата (рисунок 1) в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Ранее в научной литературе не были описаны биоаналитические методики определения данного пептида в биологических образцах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR (Shimadzu Corporation, Япония) с tandemным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройной квадруполь, Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автоматическим пробоотборником. Для обработки первичных данных использовали программное обеспечение LabSolutions ver. 5.97 (Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция/Нидерланды/Израиль), муравьиная кислота (98 %, PanReas, Испания), метанол (класс «х.ч.», ООО ТД «ХИММЕД», Россия), хлороформ (99,9 %, Honeywell, Германия), пропионовая кислота (99,84 %, BASF, Германия), пропионовый ангидрид (>99,8 %, Sigma-Aldrich, США), вода деминерализованная I класса (Milli-Q, Millipore, Франция). Стандартные образцы: треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат (Россия, количественное содержание 100,5 %), треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-лейцил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат (внутренний стандарт, ВС) [Internal standard, IS] (Россия, количественное содержание 98,1 %).

Исходные стандартные растворы ТДП и ВС готовили путем растворения навески в смеси ацетонитрил:вода (1:1). Концентрация исходных стандартных растворов 1 для ТДП и ВС составляла 1 000 000 нг/мл, концентрация исходного стандартного раствора 2 ТДП составляла 10 000 нг/мл.

Рабочие стандартные растворы ТДП готовили из исходных стандартных растворов ТДП 1 или 2 путем их разведения в смеси ацетонитрил:вода (1:1). Аликвоты рабочих стандартных растворов ТДП (10 мкл) помещали в центрифужные микропробирки вместимостью 2 мл и замораживали при –30 °С. Рабочий стандартный раствор ВС готовили путем разведения исходного стандартного раствора в смеси ацетонитрил:вода (1:1) до получения 2500 нг/мл. Исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –30 °С.

Приготовление градуировочных образцов и образцов контроля качества и пробоподготовка

Градуировочные образцы (ГО) и образцы контроля качества (КК) [quality control, QC] готовили путем добавления 190 мкл интактной плазмы крови в мик-

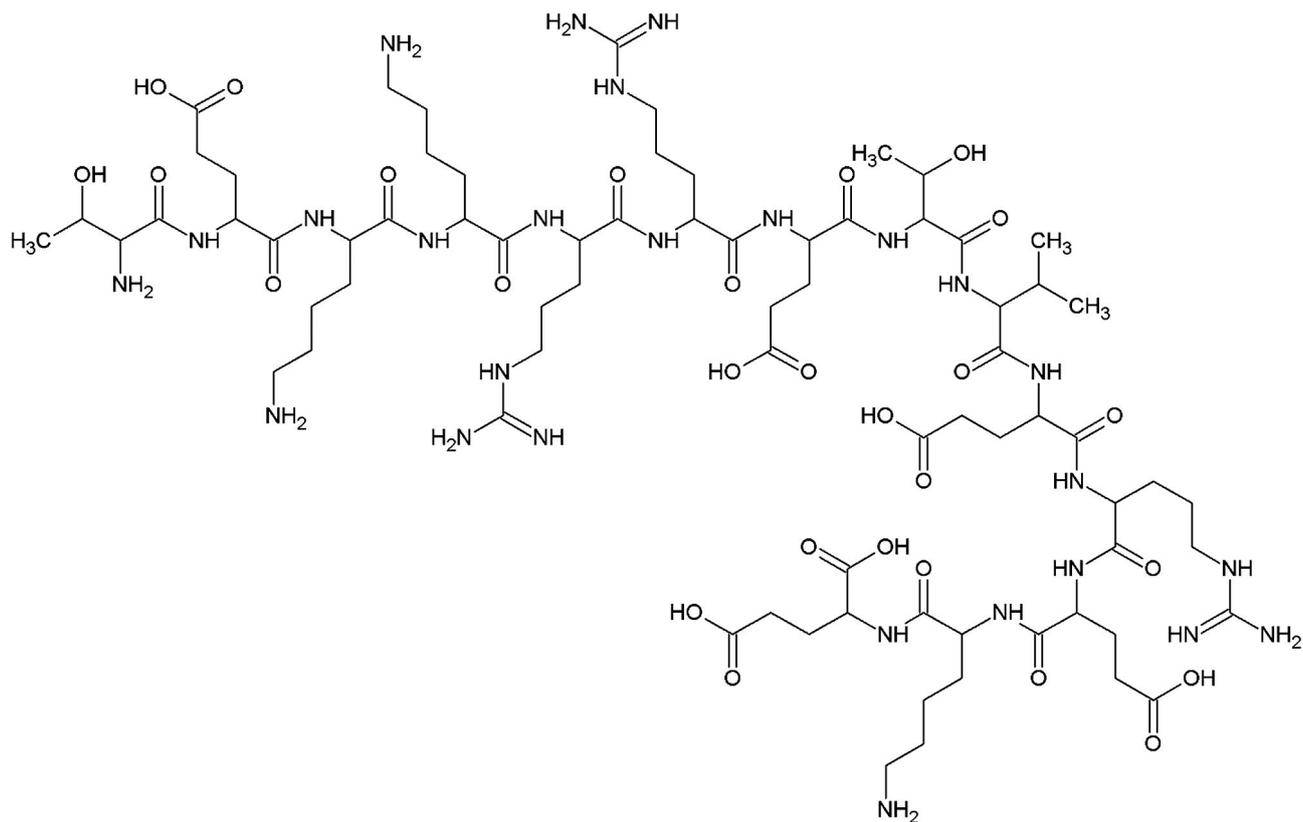


Рисунок 1. Структура тетрадекапептида

Figure 1. Tetradecapeptide structure

ропробирки типа «эппендорф» с заранее подготовленной аликвотой 10 мкл соответствующего рабочего стандартного раствора ТДП после размораживания с последующим интенсивным перемешиванием на встряхивателе типа «вортекс».

К 200 мкл образца (ГО, образца КК, образца интактной плазмы крови) прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС, 420 мкл раствора пропионовой кислоты в метаноле (1:20), перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 с, затем центрифугировали в течение 15 мин с относительным центробежным ускорением 15294g. Далее супернатант переносили в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 800 мкл хлороформа, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 с, затем центрифугировали в течение 15 мин с относительным центробежным ускорением 15294g. После центрифугирования отбирали около 200–250 мкл верхней (водной) фазы, переносили в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл и упаривали досуха в токе азота при комнатной температуре. К сухому остатку прибавляли 60 мкл раствора пропионовой кислоты в воде (1:5) и 55 мкл раствора пропионического ангидрида в ацетонитриле (1:10), перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 с, помещали

пробирку в УЗ-баню при температуре 60 °С на 5 мин. Далее образец упаривали в токе азота при температуре 60 °С досуха. К полученному сухому остатку прибавляли 100 мкл воды Milli-Q, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 с, переносили в полипропиленовые вставки в хроматографические вials и помещали в автосамплер хроматографа.

Концентрации ТДП и ВС в ГО (уровни 1–8) и образцах КК, соответствующих нижнему пределу количественного определения (НПКО) [lower limit of quantification, LLOQ], средненизкому [low-medium, LM], среднему [medium, M] и верхнему [high, H] уровням, представлены в таблице 1.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Хроматографическая колонка: Waters XBridge C18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза (ПФ): 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему) – элюент А, 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему) – элюент В.
- Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин.

Таблица 1. Концентрации определяемых веществ в градуировочных образцах и образцах КК

Table 1. Concentrations of analytes in calibration and QC samples

Уровень Level	Концентрация, нг/мл Concentration, ng/mL	
	ТДП TDP	ВС IS
0	0,00	125,00
1	5,00	125,00
2	10,00	125,00
3	20,00	125,00
4	500,00	125,00
5	100,00	125,00
6	200,00	125,00
7	500,00	125,00
8	1000,00	125,00
LLOQ	5,00	125,00
L	15,00	125,00
LM	30,00	125,00
M	300,00	125,00
H	750,00	125,00

Градиент по составу ПФ представлен в таблице 2.

- Объем вводимой пробы: 7 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–5,50 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °С, линия десольватации 250 °С, напряжение на капилляре +5,0 кВ.

Таблица 2. Градиент по составу ПФ

Table 2. Mobile phase gradient

Время, мин Time, min	Элюент В, % Eluent B, %
0,00–2,00	10 → 22
2,00–2,40	22 → 100
2,40–3,60	100
3,60–4,10	100 → 10
4,10–5,50	10

- Время удерживания 4-замещенного ТДП пропионата: около 1,72 мин.
- Время удерживания 4-замещенного ВС пропионата: около 1,93 мин.
- Условия детектирования 4-замещенного ТДП пропионата в режиме MRM: 681,30 → 73,95 m/z, 681,30 → 84,00 m/z, 681,30 → 101,90 m/z, 681,30 → 140,10 m/z.
- Условия детектирования 4-замещенного ВС пропионата в режиме MRM: 686,00 → 74,10 m/z, 686,00 → 84,05 m/z, 686,00 → 102,00 m/z, 686,00 → 140,00 m/z.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

При разработке ВЭЖХ-МС/МС-методики для ТДП последовательно подбирались и оптимизировались условия детектирования и хроматографического

разделения для достижения максимальной чувствительности и селективности.

Молекула ТДП обладает выраженными основными свойствами за счет наличия 3 остатков лизина, 3 остатков аргинина и N-концевой аминокислотной группы. Расчетное значение изоэлектрической точки составляет 8,17¹. Благодаря этому исследуемый ТДП легко растворяется в воде и кислотах, а также для него характерно образование многозарядных квазимолекулярных ионов при положительной ионизации электрораспылением. Молекулярная масса ТДП составляет 1818,02 Да², исходя из этого были спрогнозированы значения m/z для одно- и многозарядных квазимолекулярных ионов, которые могут быть обнаружены в масс-спектре полного ионного тока (1819,00, 909,60, 607,10, 455,50, 364,60 m/z). Расчеты полностью согласовывались с экспериментальным масс-спектром, однако в нем практически не наблюдался однозарядный ион (1819,00 m/z).

При разработке методики было отмечено, что ввиду выраженных гидрофильных свойств ТДП обладает низким сродством к октадецилсиликагелю: время удерживания ТДП соответствовало мертвому времени хроматографической системы даже при снижении объемной доли элюента В до 2%. Оптимальным решением данной проблемы является дериватизация ТДП пропиононовым ангидридом. Этот подход хорошо изучен для пептидов, содержащих большое количество остатков лизина, и позволяет повысить липофильность, а также упрощает интерпретацию масс-спектров фрагментации квазимолекулярных ионов [26–28].

В реакции ТДП с пропиононовым ангидридом в нейтральной и слабокислой среде могут участвовать ε-аминогруппы лизина и N-концевая аминокислотная группа [27]. Таким образом, при полном протекании реакции для ТДП ожидалось образование 4-замещенных пропионилованных производных. В масс-спектре полного ионного тока для продуктов дериватизации наибольшей интенсивностью обладал сигнал 681,30 m/z, что соответствует расчетам для трехзарядного квазимолекулярного иона четырехжды пропионилованного ТДП.

При разработке методики пробоподготовки было установлено, что ТДП хорошо извлекается из плазмы крови раствором пропионовой кислоты в метаноле. Далее образец очищали от липофильных компонентов с помощью экстракции хлороформом. Параллельно избыточное количество метанола переходило в органическую фазу, а исследуемый пептид концентрировался в водной фазе. Последующие этапы пробоподготовки были экспериментально опти-

¹ Compute pI/Mw tool. Available at: https://web.expasy.org/compute_pi/ Accessed: 01.03.2024.

² Peptide calculator. Available at: <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/> Accessed: 01.03.2024.

мизированы для получения четырежды пропионилированного производного ТДП с максимальным выходом. В образцах не наблюдали ни продуктов неполного протекания реакции (одно-, дву-, тризамещенные варианты ТДП), ни продуктов избыточного пропионилирования с участием остатков аргинина.

В качестве ВС использовали аналог исследуемого ТДП с одной заменой аминокислоты в последовательности (замена валина на лейцин), что обеспечило увеличение молекулярной массы, но не оказало значительного влияния на кислотно-основные свойства ВС по сравнению с ТДП.

Валидация методики

Валидация разработанной методики была проведена по следующим параметрам: селективности, эффекту матрицы, градуировочной кривой, правильности (на уровнях внутри цикла, между циклами), прецизионности (на уровнях внутри цикла, между циклами), степени извлечения, нижнему пределу количественного определения, переносу пробы, стабильности (стабильности исходных и рабочих стандартных растворов ТДП и ВС; краткосрочной стабильности («настойной» и «постпрепаративной»); стабильности при трехкратной заморозке-разморозке; долгосрочной стабильности ТДП в матрице)^{1,2,3}.

Селективность и специфичность

Анализировали 6 образцов нормальной интактной плазмы крови, по одному образцу гемолизной и хилезной плазмы крови, а также 8 образцов на уровне НПКО, приготовленных с использованием интактной плазмы из тех же источников. Сигнал ТДП на хроматограммах интактной плазмы крови не превышал 11,29 % от сигнала на хроматограмме образца НПКО и 3,83 % в случае ВС, что соответствует нормам (не более 20 % для анализируемого вещества и 5 % для ВС). Хроматограммы образцов интактной плазмы крови и на уровне НПКО представлены на рисунках 2 и 3.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 (ред. от 15.02.2023) «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107>. Ссылка активна на 01.03.2024.

² EMA. European Medicines Agency. Bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 01.03.2024.

³ Research C for DE and. U.S. Food and Drug Administration. FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Accessed: 01.03.2024.

Градуировочная кривая

Проводили анализ ГО в диапазоне концентраций 5,00–1000,00 нг/мл. По полученным значениям строили градуировочные графики в координатах «отношение площади пика ТДП к площади пика ВС от отношения концентрации ТДП к концентрации ВС в плазме крови». В ходе валидации методики проведено 10 аналитических циклов, и во всех случаях коэффициенты корреляции составили более 0,99, а отклонения рассчитанных концентраций для ГО соответствовали нормам (не более 20 % на уровне НПКО и 15 % для остальных уровней). Пример градуировочного графика представлен на рисунке 4.

Правильность и прецизионность

Проводили анализ образцов КК, соответствующих уровням LLOQ, L, LM, M, H. Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня концентраций ТДП. Правильность и прецизионность были оценены внутри цикла, между двумя циклами, между тремя циклами. Максимальное отклонение среднего значения рассчитанной концентрации от номинальной составило 6,14 %, а относительное стандартное отклонение не превышало 12,33 % при нормах для обеих величин не более 20 % на уровне НПКО и 15 % для остальных уровней.

Степень извлечения и эффект матрицы

Средняя степень извлечения ТДП из образцов плазмы крови (8 источников интактной плазмы крови, включая по одному источнику гемолизной и хилезной плазмы) составила 51 % для уровня L, 50 % для уровня M, 62 % для уровня H, относительные стандартные отклонения составили 7,40, 5,05 и 10,85 % соответственно. Хотя степень извлечения ТДП не слишком высока, она сопоставима со степенью извлечения ВС, и средняя, нормализованная по ВС степень извлечения составила 95, 92 и 90 % для уровней L, M, H соответственно, относительные стандартные отклонения – 5,70, 6,58 и 8,53 %.

При оценке эффекта матрицы (8 источников интактной плазмы крови, включая по одному источнику гемолизной и хилезной плазмы) было обнаружено значительное усиление аналитического сигнала под действием соэлюирующихся компонентов образца по сравнению с пробами, приготовленными без использования биологической матрицы. Усредненный эффект матрицы для уровня L составил 2,94, а для уровня H составил 3,05, относительные стандартные отклонения составили 4,12 и 3,03 % соответственно, при этом эффект матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, составил 1,01 и 1,11 для уровней L и H соответственно, относительные стандартные отклонения – 5,86 и 3,82 %.

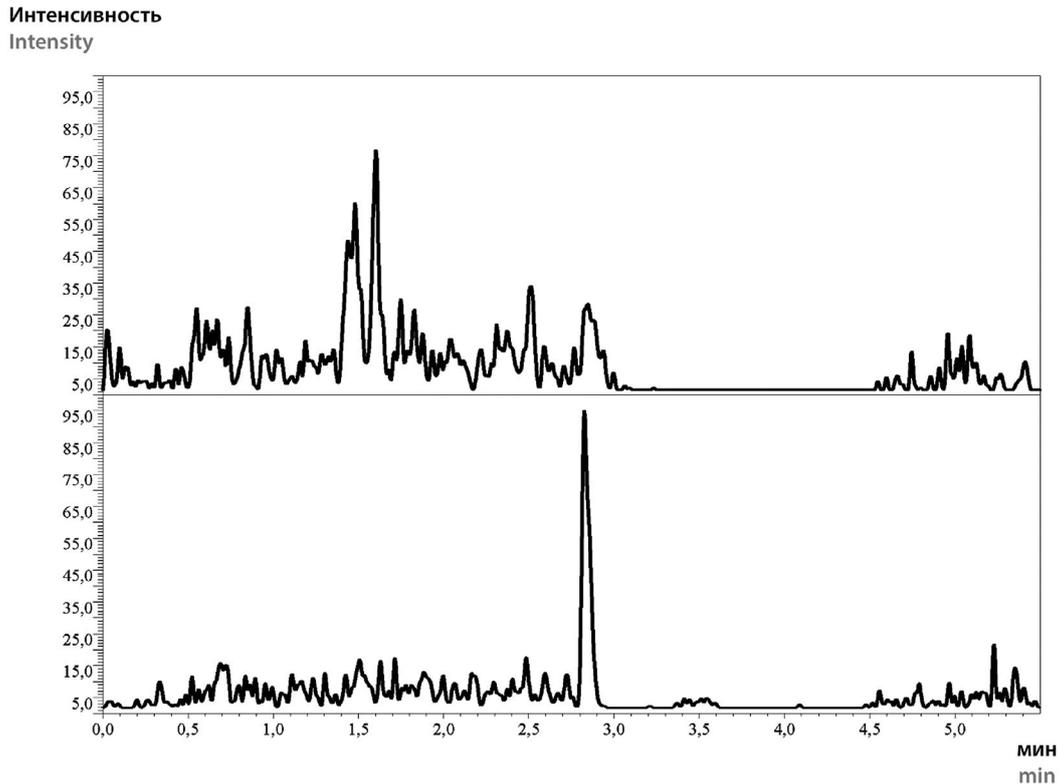


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 2. Chromatogram of blank plasma sample

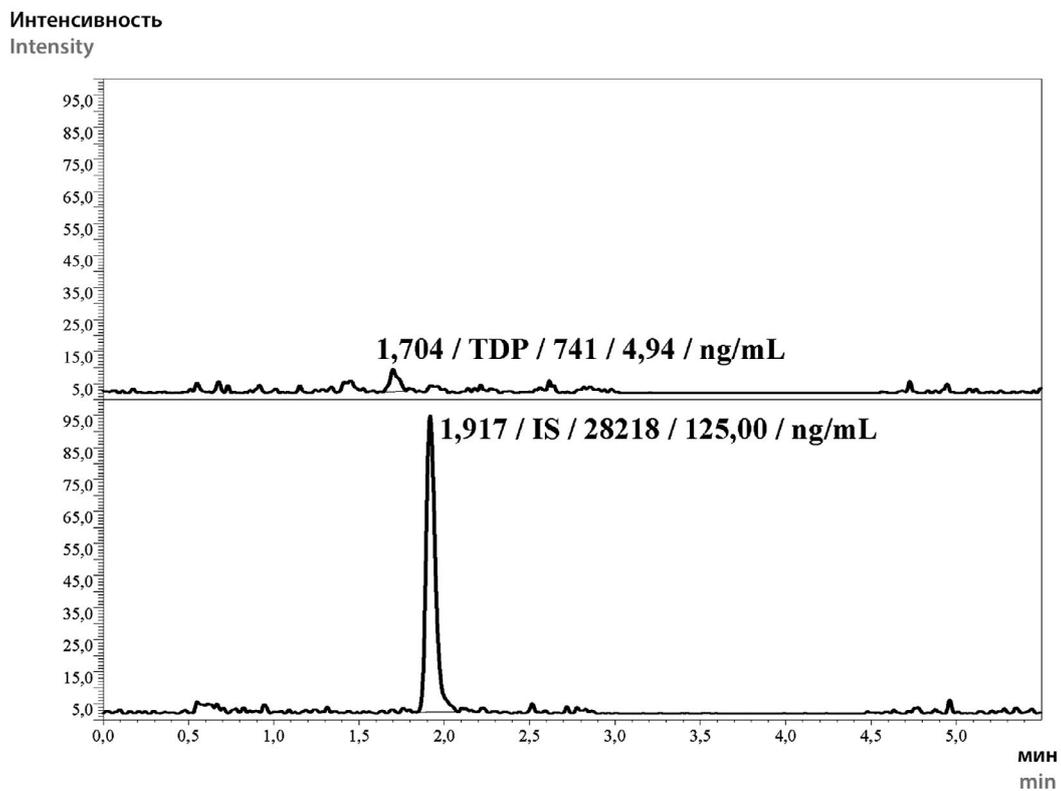


Рисунок 3. Хроматограмма образца плазмы крови на уровне нижнего предела количественного определения

Figure 3. Chromatogram of plasma sample at lower limit of quantification

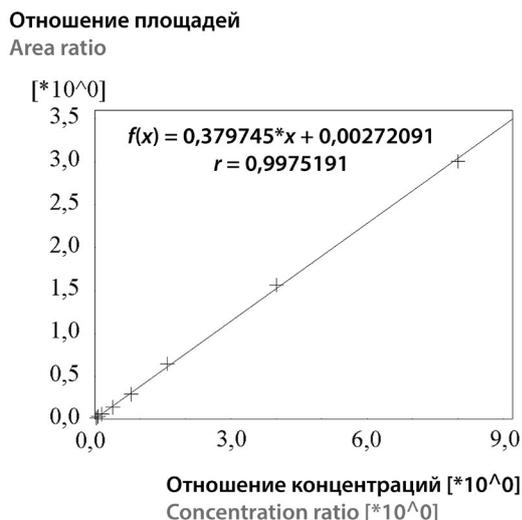


Рисунок 4. Градуировочный график, цикл № 1

Figure 4. 1st run calibration curve

Результаты оценки степени извлечения и эффекта матрицы демонстрируют, что ВС по своим свойствам подобен ТДП и позволяет компенсировать различия в составе проб и возможные колебания эффективности процессов на различных стадиях пробоподготовки.

Перенос пробы

Доказано отсутствие аналитически значимого переноса пробы при последовательном анализе градуировочного образца с наибольшей концентрацией и образца интактной плазмы крови. На хроматограмме образца интактной плазмы крови площадь пика ТДП не превышала 13,67 % от площади пика на уровне НПКО (норма – не более 20 %), а площадь пика ВС составляла не более 2,75 % от площади пика на хроматограмме образца с добавлением ВС (норма – не более 5 %).

Стабильность

Было проанализировано по три образца на уровнях L и H для оценки «настойной» и «постпрепаративной» стабильности, стабильности исходных и рабочих стандартных растворов, стабильности при трехкратной заморозке-разморозке, долгосрочной стабильности ТДП в плазме.

Стабильность при замораживании-размораживании [freeze-thaw stability, FT] была оценена отдельно после каждого размораживания, всего выполнено 3 цикла. Каждая анализируемая проба подвергалась замораживанию не менее чем в течение 24 ч при температуре от –32 до –28 °С и оттаиванию в течение 6 ч при комнатной температуре. После этого часть проб помещали обратно в морозильную камеру, а часть анализировали. Полученные результаты приведены в таблице (таблица 3).

Таблица 3. Оценка стабильности при трехкратной заморозке-разморозке ТДП на уровнях L и H

Table 3. Triple freeze-thaw cycles stability evaluation of TDPs at the levels L and H

Уровень Level	L	H	E, % (L)	E, % (H)
Введено, нг/мл Inject, ng/mL	15,00	750,00		
FT – 1 цикл, найдено, нг/мл FT – 1 run, found ng/mL	16,57 14,12 16,37	732,52 756,80 782,04	10,45 –5,85 9,16	–2,33 0,91 4,27
Среднее Mean	15,69	757,12	4,59	0,95
FT – 2 цикл, найдено, нг/мл FT – 2 run, found ng/mL	13,47 15,03 15,76	693,86 680,50 676,17	–10,21 0,23 5,08	–7,49 –9,27 –9,84
Среднее Mean	14,75	683,51	–1,64	–8,87
FT – 3 цикл, найдено, нг/мл FT – 3 run, found ng/mL	11,65 13,26 13,70	673,28 692,31 705,23	–22,35 –11,63 –8,64	–10,23 –7,69 –5,97
Среднее Mean	12,87	690,27	–14,20	–7,96

Доказана «настойная» стабильность ТДП в составе плазмы крови при комнатной температуре в течение 12 ч. Среднее значение концентрации ТДП (% от номинальной концентрации) составило 90,02 % на уровне L и 94,62 % на уровне H.

Готовые пробы были стабильны в течение 24 ч при температуре от 2 до 8 °С. Среднее значение концентрации ТДП (% от номинальной концентрации) составило 101,01 % на уровне L и 102,24 % на уровне H.

Долгосрочная стабильность ТДП в плазме крови была оценена при температуре от –32 до –28 °С. Так как до начала исследования не было доступной информации о стабильности ТДП в плазме крови, была проведена расширенная оценка долгосрочной стабильности в плазме крови при хранении образцов в течение 5, 12, 19, 26, 35, 67 дней (рисунки 5, 6).

Стабильность исходного и рабочих стандартных растворов была изучена при хранении в течение 56 дней при температуре от –32 до –28 °С. Среднее значение концентрации ТДП (% от номинальной концентрации) составило 88,52 % на уровне L и 97,60 % на уровне H для исходного раствора, 91,02 % на уровне L и 109,48 % на уровне H для рабочих растворов. Для ВС среднее значение площади пика в случае исходного раствора составило 111,16 и 103,28 % для рабочего раствора относительно среднего значения площади пика для свежеприготовленного раствора.

Для всех видов стабильности полученные величины относительной погрешности соответствуют нормам (в диапазоне от –15 до +15 %).

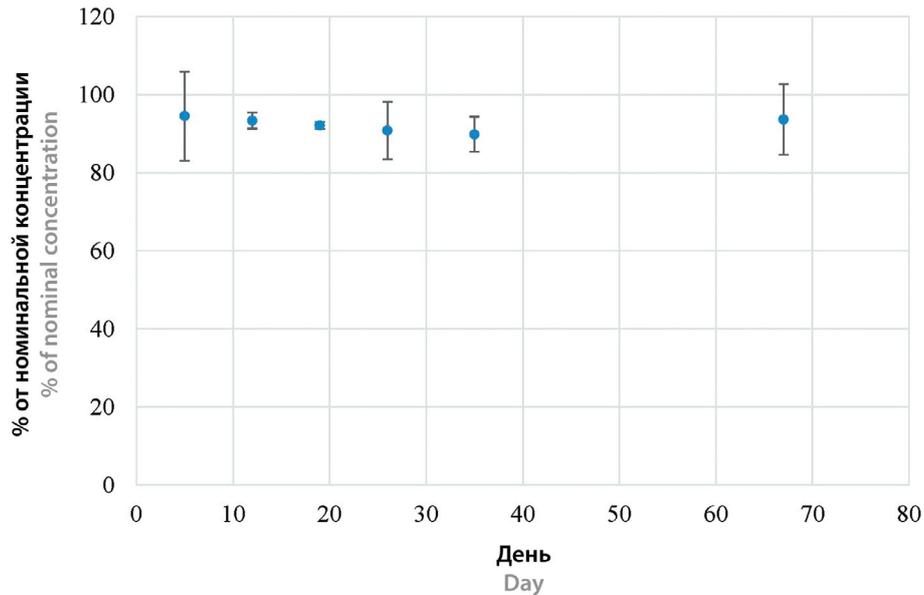


Рисунок 5. Стабильность тетрадекапептида в плазме крови на уровне L при температуре от -32 до -28 °C
Figure 5. Tetradecapeptide stability in plasma at the level L at temperatures from -32 to -28 °C

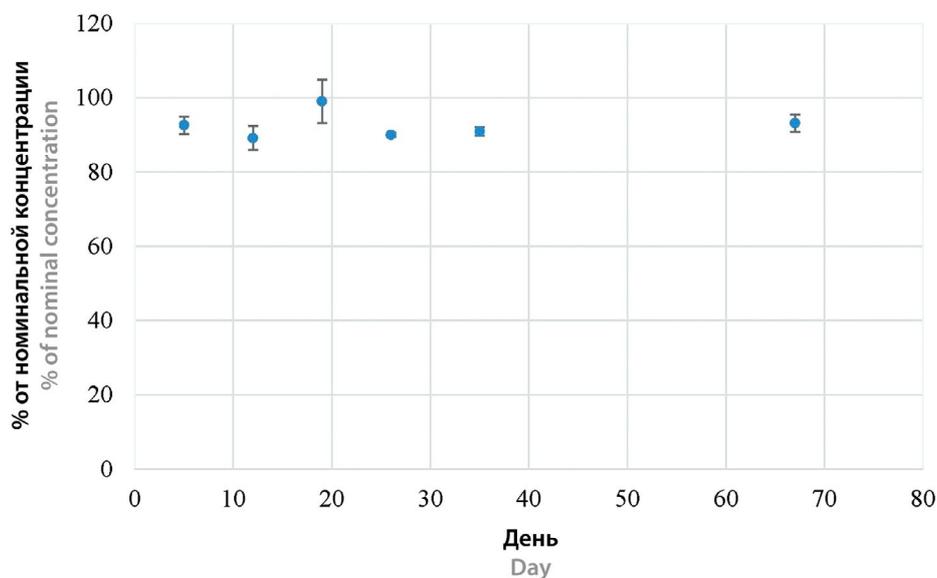


Рисунок 6. Стабильность тетрадекапептида в плазме крови на уровне H при температуре от -32 до -28 °C
Figure 6. Tetradecapeptide stability in plasma at the level H at temperatures from -32 to -28 °C

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена разработка и валидация методики определения ТДП в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Пробоподготовка включала этапы осаждения белков плазмы крови раствором пропионовой кислоты в метаноле, жидкость-жидкостной экстракции хлороформом с последующим упариванием и дериватизацией ТДП и ВС пропионовым ангидридом. Подтвержденный аналитический диапазон

методики составил 5,00–1000,00 нг/мл в плазме крови, что позволяет использовать ее для изучения фармакокинетики ТДП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. De la Torre B. G., Albericio F. Peptide Therapeutics 2.0. *Molecules*. 2020;25(10):2293. DOI: 10.3390/molecules25102293.
2. Torchilin V. Intracellular delivery of protein and peptide therapeutics. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2008;5(2–3):e95–e103. DOI: 10.1016/j.ddtec.2009.01.002.

- Al Shaer D., Al Musaimi O., Albericio F., de la Torre B. G. 2018 FDA Tides Harvest. *Pharmaceuticals*. 2019;12(2):52. DOI: 10.3390/ph12020052.
- Al Shaer D., Al Musaimi O., Albericio F., de la Torre B. G. 2019 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*. 2020;13(3):40. DOI: 10.3390/ph13030040.
- Al Musaimi O., Al Shaer D., Albericio F., de la Torre B. G. 2020 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*. 2021;14(2):145. DOI: 10.3390/ph14020145.
- Al Shaer D., Al Musaimi O., Albericio F., de la Torre B. G. 2021 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*. 2022;15(2):222. DOI: 10.3390/ph15020222.
- Al Musaimi O., Al Shaer D., Albericio F., de la Torre B. G. 2022 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*. 2023;16(3):336. DOI: 10.3390/ph16030336.
- Kaspar A. A., Reichert J. M. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discovery Today*. 2013;18(17–18):807–817. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.05.011.
- Apostolopoulos V., Bojarska J., Chai T.-T., Elnagdy S., Kaczmarek K., Matsoukas J., New R., Parang K., Paredes Lopez O., Parhiz H., Pereira C. O., Pickholz M., Remko M., Saviano M., Skwarczynski M., Tang Y., Wolf W. M., Yoshiya T., Zabrocki J., Zielenkiewicz P., AlKhazindar M., Barriga V., Kelaidonis K., Mousavinezhad Sarasia E., Toth I. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules*. 2021;26(2):430. DOI: 10.3390/molecules26020430.
- Ewles M., Goodwin L. Bioanalytical approaches to analyzing peptides and proteins by LC-MS/MS. *Bioanalysis*. 2011;3(12):1379–1397. DOI: 10.4155/bio.11.112.
- Rauh M. LC-MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry. *Journal of Chromatography B*. 2012;883–884:59–67. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.09.030.
- Fisher E. N., Melnikov E. S., Gegeckori V., Potoldykova N. V., Enikeev D. V., Pavlenko K. A., Agatonovic-Kustrin S., Morton D. W., Ramenskaya G. V. Development and Validation of an LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Short Peptide-Based Drugs in Human Blood Plasma. *Molecules*. 2022;27(22):7831. DOI: 10.3390/molecules27227831.
- Ding J.-S., Peng W.-X., Zhang Z.-H., Li H.-D., Jiang X.-H. Determination of octreotide in human plasma by HPLC-MS with solid-phase extraction and study on the relative bioavailability of domestic and imported octreotide injections. *Yao Xue Xue Bao*. 2004;39(7):542–545.
- Sauter M., Uhl P., Burhenne J., Haefeli W. E. Application of triple quadrupole tandem mass spectrometry to the bioanalysis of collision-induced dissociation-resistant cyclic peptides – Ultra-sensitive quantification of the somatostatin-analog pasireotide utilizing UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;194:113728. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113728.
- Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015;72:4–15. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- Chen Y., Liang Y., Lv R., Xia N., Xue T., Zhao S. An immunological determination of somatostatin in pharmaceutical by sandwich ELISA based on IgY and polyclonal antibody. *Microchemical Journal*. 2019;145:532–538. DOI: 10.1016/j.microc.2018.11.019.
- Oh H. S., Choi M., Lee T. S., An Y., Park E. J., Kim T. H., Shin S., Shin B. S. Pharmacokinetics and brain distribution of the therapeutic peptide liraglutide by a novel LC-MS/MS analysis. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2023;14(1):19. DOI: 10.1186/s40543-023-00382-5.
- Malm-Erjefält M., Björnsdottir I., Vanggaard J., Helleberg H., Larsen U., Oosterhuis B., van Lier J. J., Zdravkovic M., Olsen A. K. Metabolism and Excretion of the Once-Daily Human Glucagon-Like Peptide-1 Analog Liraglutide in Healthy Male Subjects and Its In Vitro Degradation by Dipeptidyl Peptidase IV and Neutral Endopeptidase. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(11):1944–1953. DOI: 10.1124/dmd.110.034066.
- De Souza I. D., Queiroz M. E. C. Advances in sample preparation and HPLC-MS/MS methods for determining amyloid- β peptide in biological samples: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2023;415(18):4003–4021. DOI: 10.1007/s00216-023-04631-9.
- Hamman J. H., Enslin G. M., Kotzé A. F. Oral Delivery of Peptide Drugs. *BioDrugs*. 2005;19(3):165–177. DOI: 10.2165/00063030-200519030-00003.
- Le Maux S., Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. Improved short peptide identification using HILIC-MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence. *Food Chemistry*. 2015;173:847–854. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.104.
- Doulou E., Kalomiraki M., Parla A., Thermos K., Chaniotakis N. A., Panderi I. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection (HILIC-FL) for the Quantitation of Octreotide in Injection Forms. *Analytica*. 2021;2(4):121–129. DOI: 10.3390/analytica2040012.
- Kang L., Weng N., Jian W. LC-MS bioanalysis of intact proteins and peptides. *Biomedical Chromatography*. 2020;34(1): e4633. DOI: 10.1002/bmc.4633.
- Böttger R., Hoffmann R., Knappe D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS ONE*. 2017;12(6):e0178943. DOI: 10.1371/journal.pone.0178943.
- Powell M. F. Chapter 30. Peptide Stability in Drug Development: in vitro Peptide Degradation in Plasma and Serum. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 1993;28:285–294.
- Zee B. M., Garcia B. A. Discovery of lysine post-translational modifications through mass spectrometric detection. *Essays in Biochemistry*. 2012;52:147–63. DOI: 10.1042/bse0520147.
- Lin S., Garcia B. A. Examining Histone Posttranslational Modification Patterns by High-Resolution Mass Spectrometry. *Methods in Enzymology*. 2012;512:3–28. DOI: 10.1016/B978-0-12-391940-3.00001-9.
- Bonaldi T., Imhof A., Regula J. T. A combination of different mass spectroscopic techniques for the analysis of dynamic changes of histone modifications. *Proteomics*. 2004;4(5):1382–1396. DOI: 10.1002/prot.200300743.