DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-115-120
УДК 543.51; 543.544.5.068.7; 543.054

Анализ биологических образцов в современной лабораторной практике (обзор)

И. И. Мирошниченко[1], Ю. Е. Шилов[1]*

1 – ФГБУ «Научный центр психического здоровья», 115522, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 34
***Контактное лицо:** Шилов Юрий Е. **E-mail:** shilov.biochem@gmail.com
Статья получена: 13.03.2019. **Статья принята к печати:** 27.05.2019

Резюме
Введение. В представленной публикации освещены ключевые моменты основных этапов разработки методик определения следовых количеств лекарственных веществ и метаболитов в биологических образцах с помощью хроматографических и хроматомасс-спектрометрических методов. Указаны главные источники ошибок. Основное внимание уделено хроматомасс-спектрометрии, которая является базовым методом анализа малых молекул в биологических образцах. Приведены примеры из литературных источников и собственной практики.
Текст. В обзоре освещены некоторые практические вопросы приготовления калибровочных образцов, способы повышения стабильности образца на этапе пробоотбора и получения плазмы. В частности, отражено влияние различных антикоагулянтов на правильность анализа, приведен способ снижения обратной конверсии некоторых метаболитов карбокси-содержащих лекарственных веществ в исходное соединение с целью предотвращения получения завышенных результатов количественного определения. Отмечены некоторые способы пробоподготовки, получающие широкое распространение последнее время, такие как жидкость-жидкостная экстракция в нанесенном слое, основанная на извлечении интересующего компонента из водного образца в слой жидкости, распределенной на твердом высокополярном носителе, с последующим элюированием системой неполярных растворителей, не смешивающихся с этим слоем. Даны рекомендации по использованию внутренних стандартов, приготовлению подвижной фазы для ВЭЖХ, по вопросам хроматографического разделения, валидации методик. В подразделе «Масс-спектрометрическое детектирование» приведены особенности приготовления подвижной фазы для хроматомасс-спектрометрических экспериментов. Освещены вопросы снижения переноса пробы, ионной супрессии, матричного эффекта. Обсуждён феномен перекрестных помех при изучении метаболизма лекарственных веществ посредством хроматомасс-спектрометрии, который заключается во взаимном искажении масс-спектрометрического отклика, когда от разных по массе ионов-предшественников образуются одинаковые по массе фрагменты. Приведены особенности разработки методик в высокопроизводительном фармакокинетическом скрининге.
Заключение. Авторы выражают надежду, что представленный материал будет полезен для ученых и специалистов в области фармакокинетики, изучения биомаркеров и клинических анализов.

Ключевые слова: жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, количественное определение, пробоподготовка, стабильность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Мирошниченко И. И., Шилов Ю. Е. Анализ биологических образцов в современной лабораторной практике (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 115–120.

Analysis of Biological Samples in a Contemporary Laboratory Practice (Review)

I. I. Miroshnichenko[1], Y. E. Shilov[1]*

1 – Mental Health Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences, 34, Kashirskoye shosse, Moscow, 115522 Russia
***Corresponding author:** Yuri E. Shilov. **E-mail:** shilov.biochem@gmail.com
Received: 13.03.2019. **Accepted:** 27.05.2019

Abstract
Introduction. In the present publication highlights the key points of the main stages of development of methods for determining trace amounts of drugs and metabolites in biological samples using chromatographic and chromatography-mass spectrometry methods. The main sources of errors are specified. The main attention is paid to chromatography-mass spectrometry, which is the basic method of analysis of small molecules in biological samples. Examples from literary sources and authors' own practice are given.
Text. The review highlights some of the practical issues of preparation of calibration samples, method of increasing the stability of the sample at the stage of sampling and plasma preparation. In particular, the influence of various anticoagulants on the accuracy of the analysis is reflected. Specify the method of reducing back conversion of some metabolites of carboxyl-containing drugs to parent compound to prevent overestimation of the results of quantitative determination. Some methods of sample preparation, which have become widespread recently, are noted. For example, solid supported liquid-liquid extraction, based on the extraction of the component of interest from the water sample into the liquid layer distributed on a solid high-polar carrier, followed by eluting by a system of non-polar solvents that do not mix with this layer. Recommendations on the use of internal standards, the preparation of the mobile phase for HPLC, on chromatographic separation, validation techniques are given. In the section «Mass spectrometric detection» features of preparation of a mobile phase for chromatography-mass spectrometry experiments are given. The questions of carry-over reduction, ion suppression, matrix effect are covered. The phenomenon of cross-talk in the study of drug metabolism by chromatography-mass spectrometry is discussed. It consists in the mutual distortion of the mass spectrometric response, when the same mass fragments are formed from different ions-precursors. Features of development of techniques for high-performance pharmacokinetic screening are given.
Conclusion. The authors hope that the presented material will be useful for scientists and specialists in the field of pharmacokinetics, biomarker discovery and clinical analyses.

Keywords: liquid chromatography, mass spectrometry, quantification, analytic sample preparation methods, stability.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Miroshnichenko I. I., Shilov Y. E. Analysis of biological samples in a contemporary laboratory practice. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 115–120.

ВВЕДЕНИЕ

Анализ биологических образцов, или биоанализ – это подраздел аналитической химии, охватывающий количественное определение как экзогенных (например, лекарственные вещества и их метаболиты), так и эндогенных веществ в биологических системах, в частности, в организме человека и экспериментальных животных. Большой пласт этих исследований составляет изучение фармакокинетики (ФК) лекарственных веществ (ЛВ) [1]. В ФК исследованиях применяются разнообразные аналитические методы. Среди них следует упомянуть микробиологические, иммунологические, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) и метод флуоресцентого поляризационного иммуноанализа [2], радиоизотопные методы, капиллярный электрофорез [3]. Тем не менее, наиболее распространенным методом остается высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), в частности, с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС-МС), и газовая хроматография (ГХ). Главными достоинствами методов ИФА и ВЭЖХ-МС-МС являются возможность автоматизации (ИФА) и быстрый переход с одного вида анализа на другой при ВЭЖХ-МС-МС. К числу недостатков следует отнести перекрестные реакции в ИФА, ионную супрессию и матричный эффект в ВЭЖХ-МС-МС [4]. Хроматографические подходы позволяют проводить анализ следовых количеств многокомпонентных смесей с достаточной специфичностью и чувствительностью. Поэтому дальнейшее изложение, в основном, ориентировано на хроматографические методы. Проведение иммунологических, радиоизотопных и микробиологических методов, на наш взгляд, является прерогативой специализированных лабораторий. Большое внимание уделяется методу тандемной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС-МС) [5], как одному из наиболее мощных и распространённых инструментов анализа сложных биологических образцов.

Образцы

Приготовление калибровочных образцов начинается с поверки весов и калибровки дозирующих устройств. Если образец стандартной субстанции определяемого ЛВ хранился в холодильнике (особенно при –80 °С), перед вскрытием необходимо выдержать образец в закрытой емкости при комнатной температуре. Это позволить избежать конденсации влаги и погрешности определения массы. Важно учитывать стабильность определяемого вещества при хранении и во время анализа. Так, нифедипин разлагается на свету, поэтому необходимо использовать монохроматический свет красного диапазона длин волн и/или лабораторную посуду из тёмного стекла при соответствующих манипуляциях. На этапе разработки метода необходимо исследовать стабильность маточных и рабочих растворов при хранении в холодильнике. Пока их стабильность не доказана, использовать следует свежеприготовленные растворы. Так, например, нейролептик оланзапин следует использовать непосредственно после разведения [6]. В общем случае нестабильность молекул обусловлена наличием эфирных связей, гетероатомов серы и фрагментов объектов окислительно-восстановительных реакций.

Матрица

При разработке метода и для построения калибровочных кривых, настоятельно рекомендуется использовать плазму/сыворотку крови того вида животных, на котором планируется проведение основного эксперимента. Если ввиду того или иного обстоятельства используется суррогатная матрица, то в дальнейшем необходимо разбавлять опытные образцы суррогатной сывороткой. Это позволит минимизировать матричный эффект, если, конечно, чувствительность определения высокая. Имеет значение способ получения плазмы. Так, при изучении фармакокинетики парааминосалициловой кислоты использование плазмы с ЭДТА давало большой коэлюирующий пик. Использование гепарина в качестве антикоагулянта решило проблему [7]. В зависимости от природы изучаемого соединения предпринимаются необходимые меры для достижения стабильности образца. Так в плазму, содержащую соединения с карбоксильной группой, добавляется кислота. Таким способом достигается смещение равновесия от образования ацил-глюкуронидов в сторону исходного соединения [8]. К примеру, моксифлоксацин подвергается в организме биотрансформации с образованием двух метаболитов – N-сульфата и ацил-глюкуронида. Без добавления кислоты в исследуемый образец после забора пробы будет протекать обратная реакция превращения ацил-глюкуронида в исходный моксифлоксацин, что будет приводить к завышенным значениям концентрации моксифлоксацина в плазме. Напротив, при измерении содержании ингибиторов протонного насоса лансопразола и омепразола к 0,5 мл плазмы добавляли 25 мкл 1М Na_2CO_3 [9], поскольку препараты разлагаются при кислых значениях pH.

Пробоподготовка

В первом приближении обработка пробы осуществляется путем осаждения белков, жидкость-жидкостной или твердофазной экстракцией [10]. Относительно новым словом в создании готовых решений для пробоподготовки с целью извлечения из биологических матриц ЛВ является жидкость-жидкостная экстракция в нанесенном слое (англ. SLE – Solid supported liquid-liquid extraction). Процедура основана на извлечении интересующего компонента из водного образца в слой жидкости, распределенной на твердом

высокополярном носителе, с последующим элюированием системой неполярных растворителей (например, этилацетат, метил-трет-бутиловый эфир), не смешивающихся с этим слоем [11]. Автоматизированная пробоподготовка включает в себя как жидкость-жидкостную, так и твердофазную экстракцию. В простейшем случае можно ограничиться осаждением сывороточных белков. Роботизированные планшеты с 96 лунками стали достаточно распространенным устройством для обработки проб перед инструментальным анализом. Кроме того, всё большее распространение получают методы очистки образцов *on-line* в ВЭЖХ системе с переключением колонок или с использованием монолитных колонок.

Разделение

Необходимо иметь в виду, что свойства приготовленных буферных растворов меняются со временем (изменение pH, загрязнение вследствие размножения микроорганизмов), поэтому необходимо указывать на бутылке дату приготовления и следить за истечением срока годности. Величину pH буферного раствора, входящего в состав подвижной фазы, необходимо определять перед добавлением органического модификатора (ацетонитрил, метанол). Растворитель обладает собственным значением pH, что скажется на характеристиках смеси. Более того, исходя из собственного опыта, замечено, что даже переход на ацетонитрил другой фирмы во время одного и того же эксперимента вызывал смещение времени удерживания компонентов. Важно отметить, что для обеспечения высокой эффективности разделения ионных соединений с помощью обращенно-фазовой хроматографии крайне нежелательно использовать значения pH подвижной фазы в непосредственной близости от величины pKa аналита. При pH подвижной фазы, равной pKa, концентрации молекулярной и ионной формы аналита в растворе будут равны, что может приводить к уширению и искажению пиков. Кроме того, при этом даже незначительные колебания pH могут приводить к существенному изменению времени удерживания определяемого соединения, и, следовательно, к снижению воспроизводимости анализа.

Важным является также то обстоятельство, что ввод определяемого компонента в растворителе с большей элюирующей силой, чем подвижная фаза приводит к расширению, а нередко и к искривлению, хроматографического пика, что явно нежелательно. Поэтому растворитель образца должен быть максимально сходным по составу с подвижной фазой в начальной точке хроматографического анализа. Прежде не рекомендовалось при градиентном разделении использовать смешение 100% органического растворителя о 100% водным раствором из двух ёмкостей для подвижной фазы, поскольку при этом появляются проблемы нагревания смеси, возникновения пузырьков воздуха. Внедрение в повседневную практику проточных дегазаторов в значительной мере снимает эту проблему. Тем не менее, по возможности, следует использовать 95 или 99% главного компонента. Для обеспечения воспроизводимости анализа не рекомендуется пренебрегать термостатом колонки ВЭЖХ. Температура колонки в высокоэффективной жидкостной хроматографии, конечно, не является решающим параметром, как при газовой хроматографии. Однако, зачастую, можно наблюдать колебания величины времени удерживания аналита, связанные с отсутствием термостатирования.

Внутренний стандарт (IS) – вещество, заведомо не находящееся в исследуемом матриксе. Предназначен для уменьшения влияния факторов системной вариации метода (потери при обработке пробы, различия в степени экстракции, объема введенной пробы, ионизации, эффект матрицы и т.п.). Калибровка отношения сигнала искомого вещества к сигналу IS значительно точнее калибровки по абсолютным значениям отклика (площади, высоты пика) аналита. Необходимо следить за тем, чтобы IS случайным образом не попал в опытные образцы. Кроме того, при ТЛМ не стоит применять в качестве IS лекарственный препарат, используемый для комедикации (к примеру, антидепрессант при измерении концентрации нейролептиков). Внутренний стандарт подбирается, по возможности, из соединений, близких по химической структуре к определяемому соединению (изомеров, гомологов, продуктов, получаемых при синтезе). В ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием в качестве внутреннего стандарта лучше всего подходит изотопно-меченное анализируемое вещество. В любом случае, сходная степень экстракции и наличие родственных хроматофоров аналита и IS обязательны. Концентрацию внутреннего стандарта рекомендуют подбирают в диапазоне 30–50% от верхнего предела количественного определения искомого аналита. Хорошей практикой является добавление IS сразу после разморозки проб с последующей обработкой на шейкере для достижения равновесия.

Анализ данных

При изучении клинической фармакокинетики и фармакодинамики правила анализа биологических образцов регулируются контролирующими органами. В ходе валидации метода получают основные параметры в соответствии с правилами FDA (избирательность, чувствительность (предел количественного определения LOQ), правильность, точность, воспроизводимость и стабильность). Помимо этих основных параметров, определяются и другие, например, эффективность экстракции, калибровочный ряд, функции ответа (линейность или не линейность). Масс-спектрометрия включает в себя оценку таких показателей, как ионная супрессия, матричный эффект и перекрестное взаимодействие (cross-

talk). Валидированный метод позволяет надеяться, что условия анализа будут неизменными во время анализа [12]. Данные, находящиеся вне пределов калибровочного диапазона, не должны включаться в результаты эксперимента. Образцы с высоким содержанием разбавляют соответствующим растворителем или подвижной фазой. Значения ниже LOQ в итоговой таблице классифицируются как ND (not detected). Данные в пределах калибровки округляются в соответствие с величиной LOQ до целых значений, 0,1 или 0,01 соответствующей единицы концентрации. Графики Леви-Дженнингса, где по оси X располагаются инъекции IS (или маркерного соединения), а ось Y отображает площадь пика (иногда высоту пика) позволяют отслеживать точность определения и выявить матричный эффект для некоторых атипичных образцов.

Масс-спектрометрическое детектирование

По той же причине, что и ВЭЖХ все больше вытесняет газовую хроматографию из фармацевтического биоанализа, в гибридных подходах сочетание жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией становится преобладающим методом анализа биологических образцов. Дело в том, что данный подход позволяет анализировать нелетучие и термонестабильные вещества, а также обеспечивает высокую специфичность определения. При этом определяемые компоненты сначала разделяют на колонке по времени удерживания, а затем на анализаторе по массам исходного иона и специфического фрагмента. Аналиты переводят в ионы путем электрораспыления (ESI) или химической ионизации при атмосферном давлении (APCI).

Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ-МС имеет свои специфические черты, связанные с детекцией. В ВЭЖХ-МС не используются многие широко распространенные в ВЭЖХ подвижные фазы. В частности, категорически противопоказано использование неорганических буферов. Компоненты фосфатных и других неорганических буферов нелетучие, вследствие этого они накапливаются в ионном источнике и препятствуют ионизации исследуемых соединений. Наиболее распространенными подфижными фазами для ВЭЖХ-МС являются смеси водных растворов летучих солей (формиат аммония, ацетат аммония) или органических кислот (муравьиная кислота, уксусная кислота) с органическими растворителями (ацетонитрил или метанол).

В случае масс-спектрометрии наиболее целесообразно в качестве внутренних стандартов применять аналоги изучаемой молекулы, содержащие стабильные изотопы ^{13}C, ^{15}N или ^{2}H [13]. Молекулы, отличающиеся только изотопным содержанием (изотопологи), обладают одинаковыми физико-химическими свойствами. Изотопологи легко разделяются по массам в анализаторе, в то же время одинаково реагируют на процессы подготовки пробы, в частности, имеют одинаковую экстракционную способность. Необходимым условием является метка в стабильной части молекулы, не подвергающейся метаболическим превращениям. Также следует учитывать изотопный обмен.

В масс-спектрометрическую методику определения желательно включить как минимум два MRM-перехода (*multiple reaction monitoring*) с целью исключить влияние матричного эффекта и интерференции, что затруднительно при наличии только одного перехода. Несомненно, широкий линейный калибровочный диапазон, достигаемый в приборах последнего поколения, является большим достижением, поскольку позволяет избежать разбавления образцов. В то же время, не следует забывать о проблеме переноса пробы (*carry-over*). В связи с этим промывка седла и иглы автоинжектора должна быть первоочередной задачей. И это не столь тривиально, как кажется на первый взгляд. Большинство ЛВ являются основаниями и промывочный раствор *50% метанол – 50% вода* вряд ли устранит загрязнение. Добавление в воду уксусной или хлорной кислоты способствует снижению переноса пробы.

К сожалению, при использовании ВЭЖХ-МС наблюдается нежелательный феномен ионной супрессии, выражающийся в подавлении хроматографического отклика исследуемого соединения в реальной обработанной биопробе по сравнению с сигналом, полученным при детектировании стандартного образца в чистом растворителе [14]. Возможно, компоненты, содержащиеся в матриксе при ESI, вступают в конкурентную борьбу с молекулами определяемого вещества на поверхности заряженных капель, тем самым снижая степень ионизации последних. Главным преимуществом APCI является незначительная, по сравнению с ESI ионная супрессия. К недостаткам этого метода ионизации следует отнести трудность определения термонестабильных веществ.

Для определения матричного эффекта рекомендуют использовать альтернативную матрицу – диализную сыворотку, буферные смеси и вычислять его как отношение площади пика вещества, внесенного в подготовленную матрицу к пику этого вещества в чистом растворителе, выраженное в процентах [15].

$$\text{МЭ (\%)} = \left(\frac{S \text{ пика аналита в подготовленной матрице}}{S \text{ пика аналита в чистом растворителе}} \right) \cdot 100.$$

Установлено, что такие наполнители как Tween 80 и PEG400, вызывают матричный эффект, зависящий от времени отбора пробы. Это может привести к ошибочному увеличению значений клиренса и объема распределения в несколько раз. Предложен простой способ выявления матричного эффекта: образец в пределах одной партии измеряют обычным способом и при разбавлении соответственно в 5 и 10 раз. Увеличение кон-

центрации аналита при разбавлении свидетельствует о выраженном матричном эффекте [16]. Коэлюирующие пики и матричный эффект эксипиентов (вспомогательных веществ лекарственной формы) представляют собой проблему, которую трудно решить на этапе разработки методики, где используется чистая субстанция ЛВ. Метаболиты или интерферирующие пики с тем же самым массовым переходом, что и искомое соединение, могут быть идентифицированы при повторной инжекции образца с достаточно высоким содержанием ЛВ. При изучении ФК это пробы после достижения C_{max}. При этом используют пологий градиент подвижной фазы. При обсуждении методов изучения метаболизма посредством масс-спектрометрии невозможно не коснуться феномена «перекрестных помех» («cross-talk», по терминологии англоязычных авторов) [17]. Взаимное искажение масс-спектрометрического отклика происходит в камере столкновения квадрупольного анализатора, когда от разных по массе ионов-предшественников образуются одинаковые по массе фрагменты. При этом в режиме выбранного иона (SIM, *selected ion monitoring*) ионы от предыдущего мониторинга могут находиться в камере столкновений. Этот эффект зависит от скорости отклика детектора и в современных генерациях приборов в значительной мере преодолен. При изучении метаболизма необходимо принимать во внимание и другой источник перекрестных помех – в источнике ионизации, когда N-окисленные и глюкуронированные метаболиты при ионизации теряют фрагменты 16 и 176 Да, соответственно, что приводит к образованию иона, аналогичному ионизированному исходному веществу

Качество и производительность

На ранних этапах разработки ЛС, при высокопроизводительном фармакокинетическом скрининге (ВПФС) целесообразна разработка экспрессных методик, пусть даже с некоторым ущербом для их валидационных характеристик. Разработка метода зачастую происходит параллельно с получением первичных результатов. Такие показатели, как правильность и воспроизводимость метода, могут быть опущены. В то же время, стабильность образцов и LOQ необходимо установить. ВПФС представляет собой сочетание хроматомасс-спектрометрии и автоматизированных систем пробоподготовки. ВЭЖХ-МС разделение происходит в градиентном режиме на коротких (2–5 см) колонках. Тандемная масс-спектрометрия в этом случае позволяет разделить коэлюирущие пики (т. е. пики веществ разной массы, время хроматографического удерживания которых одинаково). Использование коротких колонок позволяет достичь разделения многокомпонентных смесей в течение нескольких минут, что является настоящим прорывом по сравнению с 50-минутными градиентами в обычной ВЭЖХ-практике с применением колонок длиной 25 см. В последнее время были предприняты немалые усилия для сокращения времени исследования. При проведении ВПФС изучение ФК нового соединения не превышает 5 дней [18]. Для увеличения производительности ВПФС применяются такие подходы как кассетный пул образцов и временной пул [19]. Кассетный пул: несколько ВК, как правило, одного гомологического ряда, вводятся одному животному одновременно (в одном флаконе). Одно из этих веществ должно быть проанализировано заранее при стандартном введении. Образцы, отобранные через разные промежутки времени после введения ВК объединяются в единый пул, который и анализируется. Считается, что подобным методом можно косвенно оценить значение AUC (*area under the curve* – площадь под кривой) для относительной биодоступности. В то же время, проблеме достоверности данных уделяется меньше времени: скрининговый анализ стал чуть ли не синонимом сомнительного анализа. Несмотря на то, что риск в данном случае оправдан (данные должны быть представлены, как можно раньше), возникают вопросы. Нередко значения концентрации, полученные разными лабораториями, различаются между собой. Для принятия обоснованного решения приходится проводить повторный анализ, что приводит к увеличению времени исследования и его удорожанию. Подводя итог, можно заключить, что качество данных не менее важно, чем скорость их получения [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной публикации изложены ключевые моменты основных этапов разработки методик определения следовых количеств лекарственных веществ и метаболитов в биологических жидкостях. Указаны главные источники ошибок. Основное внимание уделено хроматомасс-спектрометрии, которая является базовым методом анализа малых молекул в биологических образцах. Приведены примеры из литературных источников и собственной практики. Авторы выражают надежду, что представленный материал будет полезен для ученых и специалистов в области фармакокинетики, изучения биомаркеров и клинических анализов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pandey S., Pandey P., Tiwari G., Tiwari R. Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharm Methods*. 2010; 1(1): 14–24. DOI: 10.4103/2229-4708.72223.
2. Glahn-Martínez B., Benito-Peña E., Salis F., Descalzo A. B., Orellana G., Moreno-Bondi M. C. Sensitive rapid fluorescence polarization immunoassay for free mycophenolic acid determination in human serum and plasma. *Anal. Chem*. 2018; 90(8): 5459–5465. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00780.
3. Li J., Zhang L., Cheng X., Zhang L., Shen B., Qing C., Fan G. Determination of d-amphetamine and diphenhydramine in beagle dog plasma by a 96-well formatted liquid-liquid extraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2018; 156: 263–271. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.04.040.

4. Brandhorst G., Oellerich M., Maine G., Taylor P., Veen G., Wallemacq P. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? *Clin. Chem*. 2012; 58 (5): 821–825. DOI: 10.1373/clinchem.2011.167189.
5. Aubry A.F. LC-MS/MS bioanalytical challenge: ultra-high sensitivity assays. *Bioanalysis*. 2011; 3 (16): 1819–1825. DOI: 10.4155/bio.11.166.
6. Karinen R., Øiestad E. L., Andresen W., Smith-Kiell A., Christophersen A. Comparison of the stability of stock solutions of drugs of abuse and other drugs stored in a freezer, refrigerator, and at ambient temperature for up to one year. *J. Anal. Toxicol*. 2011; 35(8): 583–590.
7. Мирошниченко И. И., Соколова Г. Б., Мохирева Л. В. Клиническая фармакокинетика таблеток парааминосалициловой кислоты. *Антибиотики и химиотерапия*. 2009; 54(1-2): 20–24.
8. Zhou J., Li F., Duggan J. X. LC–MS bioanalysis of acyl glucuronides. In. Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations. Li W., Zhang J., Tse F.L.S. (Eds). *John Wiley & Sons, Inc.*, Hokoben, NJ, USA. 2013; 447–460 DOI: https://doi.org/10.1002/9781118671276.ch35.
9. Мирошниченко И. И., Юрченко Н. И. Jпределение содержания омепразола и лансопразола в плазме крови методом ВЭЖХ. *Химико-фармацевтический журнал*. 2002; 36(7): 48–49.
10. Singleton C. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC-MS analysis. *Bioanalysis*. 2012; 4(9): 1123–1140. DOI: 10.4155/bio.12.73.
11. Musteata F. M. Extraction and microextraction in bioanalysis. *Bioanalysis*. 2012; 4(19): 2321–2323. DOI: 10.4155/bio.12.206.
12. Sonawane L. V., Poul B. N., Usnale S. V., Waghmare P. V., Surwase L. H. Bioanalytical method validation and its pharmaceutical application – a review. *Pharm. Anal. Acta*. 2014; 5(3): 288–295.
13. Schellekens R. C., Stellaard F., Woerdenbag H. J., Frijlink H. W., Kosterink J. G. Applications of stable isotopes in clinical pharmacology. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 2011; 72(6): 879–897. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04071.x.
14. George R., Haywood A., Khan S., Radovanovic M., Simmonds J., Norris R. Enhancement and suppression of ionization in drug analysis using HPLC-MS/MS in support of therapeutic drug monitoring: a review of current knowledge of its minimization and assessment. *Ther. Drug. Monit*. 2018; 40(1): 1–8. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000471.
15. Zhou W., Yang S., Wang P. G. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*. 2017; 9(23): 1839–1844. DOI: 10.4155/bio-2017-0214.
16. Larger P. J., Breda M., Fraier D., Hughes H., James C. A. Ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery bioanalysis. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2005; 39(1–2): 206–216. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.03.009.
17. Sotgia S., Murphy R. B., Zinellu A., Elliot D., Paliogiannis P., Pinna G. A., Carru C., Mangoni A. A. Development of an LC-tandem mass spectrometry method for the quantitative analysis of hercynine in human whole blood. *Molecules*. 2018; 23(12): E3326. DOI: 10.3390/molecules23123326.
18. Bateman K. P., Cohen L., Emary B., Pucci V. Standardized workflows for increasing efficiency and productivity in discovery stage bioanalysis. *Bioanalysis*. 2013; 5(14): 1783–1794. DOI: 10.4155/bio.13.162.
19. Swales J. G., Tucker J. W., Strittmatter N., Nilsson A., Cobice D., Clench M. R., Mackay C. L., Andren P. E., Takáts Z., Webborn P. J., Goodwin R. J. Mass spectrometry imaging of cassette-dosed drugs for higher throughput pharmacokinetic and biodistribution analysis. *Anal. Chem*. 2014; 86(16): 8473–8080. DOI: 10.1021/ac502217r.
20. Ho S. Best practices for discovery bioanalysis: balancing data quality and productivity. *Bioanalysis*. 2014; 6(20): 2705–2708. DOI: 10.4155/bio.14.201.

REFERENCES

1. Pandey S., Pandey P., Tiwari G., Tiwari R. Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharm Methods*. 2010; 1(1): 14–24. DOI: 10.4103/2229-4708.72223.
2. Glahn-Martínez B., Benito-Peña E., Salis F., Descalzo A. B., Orellana G., Moreno-Bondi M. C. Sensitive rapid fluorescence polarization immunoassay for free mycophenolic acid determination in human serum and plasma. *Anal. Chem*. 2018; 90(8): 5459–5465. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00780.
3. Li J., Zhang L., Cheng X., Zhang L., Shen B., Qing C., Fan G. Determination of d-amphetamine and diphenhydramine in beagle dog plasma by a 96-well formatted liquid-liquid extraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2018; 156: 263–271. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.04.040.
4. Brandhorst G., Oellerich M., Maine G., Taylor P., Veen G., Wallemacq P. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? *Clin. Chem*. 2012; 58(5): 821–825. DOI: 10.1373/clinchem.2011.167189.
5. Aubry A. F. LC-MS/MS bioanalytical challenge: ultra-high sensitivity assays. *Bioanalysis*. 2011; 3(16): 1819–1825. DOI: 10.4155/bio.11.166.
6. Karinen R., Øiestad E. L., Andresen W., Smith-Kiell A., Christophersen A. Comparison of the stability of stock solutions of drugs of abuse and other drugs stored in a freezer, refrigerator, and at ambient temperature for up to one year. *J. Anal. Toxicol*. 2011; 35(8): 583–590.
7. Miroshnichenko I. I., Sokolova G. B., Mokhireva L. V. Clinical pharmacokinetics of para-aminosalicylic acid tablets. *Antibiot. Khimioter*. 2009; 54(1-2): 20–24 (in Russ.).
8. Zhou J., Li F., Duggan J. X. LC–MS bioanalysis of acyl glucuronides. In. Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations. Li W., Zhang J., Tse F.L.S. (Eds). *John Wiley & Sons, Inc.*, Hokoben, NJ, USA. 2013; 447–460. https://doi.org/10.1002/9781118671276.ch35.
9. Miroshnichenko I. I., Yurchenko N. I. HPLC Analysis for omeprazole and lansoprazole in blood plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2002; 36(7): 389–391 (in Russ).
10. Singleton C. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC-MS analysis. *Bioanalysis*. 2012; 4(9): 1123–1140. DOI: 10.4155/bio.12.73.
11. Musteata F. M. Extraction and microextraction in bioanalysis. *Bioanalysis*. 2012; 4(19): 2321–2323. DOI: 10.4155/bio.12.206.
12. Sonawane L. V., Poul B. N., Usnale S. V., Waghmare P. V., Surwase L. H. Bioanalytical method validation and its pharmaceutical application – a review. *Pharm. Anal. Acta*. 2014; 5(3): 288–295.
13. Schellekens R. C., Stellaard F., Woerdenbag H. J., Frijlink H. W., Kosterink J. G. Applications of stable isotopes in clinical pharmacology. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 2011; 72(6): 879–897. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04071.x.
14. George R., Haywood A., Khan S., Radovanovic M., Simmonds J., Norris R. Enhancement and suppression of ionization in drug analysis using HPLC-MS/MS in support of therapeutic drug monitoring: a review of current knowledge of its minimization and assessment. *Ther. Drug. Monit*. 2018; 40(1): 1–8. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000471.
15. Zhou W., Yang S., Wang P. G. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*. 2017; 9(23): 1839–1844. DOI: 10.4155/bio-2017-0214.
16. Larger P. J., Breda M., Fraier D., Hughes H., James C. A. Ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery bioanalysis. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2005; 39(1–2): 206–216. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.03.009.
17. Sotgia S., Murphy R. B., Zinellu A., Elliot D., Paliogiannis P., Pinna G. A., Carru C., Mangoni A. A. Development of an LC-tandem mass spectrometry method for the quantitative analysis of hercynine in human whole blood. Molecules. 2018; 23(12): E3326. DOI: 10.3390/molecules23123326.
18. Bateman K. P., Cohen L., Emary B., Pucci V. Standardized workflows for increasing efficiency and productivity in discovery stage bioanalysis. *Bioanalysis*. 2013; 5(14): 1783–1794. DOI: 10.4155/bio.13.162.
19. Swales J. G., Tucker J. W., Strittmatter N., Nilsson A., Cobice D., Clench M. R., Mackay C. L., Andren P. E., Takáts Z., Webborn P. J., Goodwin R. J. Mass spectrometry imaging of cassette-dosed drugs for higher throughput pharmacokinetic and biodistribution analysis. *Anal. Chem*. 2014; 86(16): 8473–8080. DOI: 10.1021/ac502217r.
20. Ho S. Best practices for discovery bioanalysis: balancing data quality and productivity. *Bioanalysis*. 2014; 6(20): 2705–2708. DOI: 10.4155/bio.14.201.