<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-120-127>
УДК 615.03

Оригинальная статья / Research article

Определение транексамовой кислоты в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

А. В. Алешина^{1*}, Т. Н. Комаров^{1,2}, О. А. Арчакова¹, Д. С. Щелгачева¹, Н. С. Багаева¹,
В. В. Давыданова¹, А. Ю. Савченко², И. Е. Шохин^{1,3}

¹ ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

³ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

*Контактное лицо: Алешина Александра Вадимовна. E-mail: a.aleshina@cpha.ru

ORCID: А. В. Алешина – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>;
Д. С. Щелгачева – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; В. В. Давыданова – <https://orcid.org/0000-0003-2727-2148>;
А. Ю. Савченко – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 29.03.2021

Статья принята в печать: 24.05.2021

Статья опубликована: 25.05.2021

Резюме

Введение. Транексамовая кислота является одним из наиболее распространенных препаратов, применяемых для остановки кровотечений после травм, хирургических вмешательств и в гинекологии. Наиболее распространенным аналитическим методом определения данного соединения является обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), однако из-за своей химической структуры данное соединение относится к группе так называемых слабоудерживаемых соединений, в связи с чем возникает необходимость разработки методики, позволяющей с наименьшими временными и ресурсными затратами, без использования специализированных колонок провести определение транексамовой кислоты в плазме крови человека.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения транексамовой кислоты в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Определение транексамовой кислоты в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки использовали способ осаждения ацетонитрилом.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика определения транексамовой кислоты в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 100,00–15000,00 нг/мл в плазме крови. Аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения исследований фармакокинетики препаратов транексамовой кислоты.

Ключевые слова: транексамовая кислота, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, биоэквивалентность

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

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, А. В. Алешина участвовали в разработке биоаналитической методики. Д. С. Щелгачева и В. В. Давыданова принимали участие в проведении валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин и А. Ю. Савченко отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Алешина А. В., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Савченко А. Ю., Шохин И. Е. Определение транексамовой кислоты в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):120–127. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-120-127>

Development and Validation of Tranexamic Acid Determination in Human Plasma by HPLC-MS/MS method

Alexandra V. Aleshina^{1*}, Timofey N. Komarov^{1,2}, Olga A. Archakova¹, Dana S. Shchelgacheva¹,
Natalia S. Bagaeva¹, Veronika V. Davydanova¹, Alla Yu. Savchenko², Igor E. Shohin^{1,3}

¹ LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

³ Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*Corresponding author: Alexandra V. Aleshina. E-mail: a.aleshina@cpha.ru

ORCID: Alexandra V. Aleshina – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>;
Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Dana S. Shchelgacheva – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>;
Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; Veronika V. Davydanova – <https://orcid.org/0000-0003-2727-2148>;
Alla Yu. Savchenko – <https://orcid.org/0000-0003-2734-5036>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 29.03.2021

Revised: 24.05.2021

Published: 25.05.2021

© Алешина А. В., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Савченко А. Ю., Шохин И. Е., 2021

© Aleshina A. V., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Savchenko A. Yu., Shohin I. E., 2021

Abstract

Introduction. Tranexamic acid is one of the most common drugs used to stop bleeding after trauma, in surgery and gynecology. The most common analytical method for the determination of this compound is reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). However, this compound belongs to the group of so-called poorly retained compounds due to its chemical structure. It is necessary to develop an analytical method that will allow the determination of tranexamic acid in human blood plasma with the least time, resource costs and without the use of specialized columns.

Aim. The aim of this study is to develop a method for tranexamic acid in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS) for pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Determination of tranexamic acid in plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by acetonitrile protein precipitation.

Results and discussion. This method was validated by next parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, recovery, lower limit of quantification, carry-over effect and stability.

Conclusion. The method of the determination of tranexamic acid in human plasma was developed and validated by HPLC-MS/MS. The linearity in plasma sample was achieved in the concentration range of 100.00–15000.00 ng/ml. Method could be applied to tranexamic acid determination in plasma for pharmacokinetics and bioequivalence studies.

Keywords: tranexamic acid, plasma, HPLC-MS/MS, validation, bioequivalence

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. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Alexandra V. Aleshina have developed an analytical method. Dana S. Shchegacheva, Veronika V. Davydanova have validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin and Alla Yu. Savchenko carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

For citation: Aleshina A. V., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchegacheva D. S., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Savchenko A. Yu., Shohin I. E. Development and validation of tranexamic acid determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):120–127. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-120-127>

ВВЕДЕНИЕ

Транексамовая кислота (ТК) (tranexamic acid (TA) (рисунок 1) представляет собой препарат, оказывающий антифибринолитическое действие, обратимо блокируя сайты связывания лизина на плазминогене, тем самым предотвращая взаимодействие плазмина (который образуется в результате активации плазминогена) с остатками лизина на полимере фибрина и последующей деградацией фибрина [1]. Основными показаниями для применения транексамовой кислоты являются состояния с аномальным кровотечением или тенденциями к кровотечениям, в которых, как считается, участвует местный или системный гиперфибринолиз [2]. Также особое распространение транексамовая кислота получила в гинекологии в качестве негормонального препарата для лечения обильных менструальных кровотечений, для уменьшения кровотечения во время гинекологических операций, таких как абдоминальная миомэктомия или гистерэктомия [3]. Существуют данные о возможности применения транексамовой кислоты в качестве препарата от COVID-19 (coronavirus disease 2019) для некоторых групп пациентов. Противовирус-

ный эффект связывают с теорией, согласно которой SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2), вирус, вызывающий COVID-19, становится более вирулентным, когда S-белок этого вируса расщепляется плазмином. Поэтому ингибирование плазмина может предотвратить прогрессирование COVID-19. В свою очередь транексамовая кислота, как типичный антифибринолитический препарат, снижает выработку плазмина [4]. В Российской Федерации транексамовая кислота входит в список жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что свидетельствует о значимости данного лекарственного препарата для отечественного здравоохранения [5].

По своему строению транексамовая кислота представляет собой транс-4-(аминометил)-циклогексанкарбоновую кислоту и является синтетическим аналогом аминокислоты лизина. За счет наличия карбоксильной группы данное соединение обладает гидрофильными свойствами, что иллюстрируется значениями коэффициента распределения октанол-вода ($\log P$) для данного вещества (таблица 1).

Таблица 1. $\log P$ и pK_a для транексамовой кислоты

Table 1. $\log P$ and pK_a for tranexamic acid

	Транексамовая кислота Tranexamic acid
$\log P$	–1,6
pK_a	4,56
Ссылка Reference	[6]

Рисунок 1. Структурная формула транексамовой кислоты

Figure 1. Chemical structure of tranexamic acid

Известно, что физико-химические свойства лекарственных соединений в достаточной степени влияют на их фармакокинетику. Такая характеристика как гидрофильность/липофильность оказывает влияние на биодоступность лекарственного средства, а также влияет на поведение вещества в хроматографической системе. Однако в случае гидрофильных и полярных соединений, к которым в том числе относится и транексамовая кислота, при определении их методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в обращенно-фазовом режиме возникают трудности, вызванные тем, что данные вещества слабо удерживаются на классических октадецил-силикагельных колонках. Для решения практических задач по удерживанию слабоудерживаемых компонентов существуют различные подходы, такие как введение в состав подвижной фазы ион-парных добавок, использование колонок с низким процентным содержанием углерода, использование колонок с привитыми полярными радикалами, например циано-, amino- модификации силикагеля, или применение метода гидрофильной хроматографии [Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)] [7]. Однако не все приведенные выше подходы возможны к реализации на практике в условиях повседневной работы. Кроме того, зачастую аналитические лаборатории не всегда имеют в своем распоряжении полный ассортимент хроматографических колонок. В связи с этим возникает необходимость разработок хроматографических методик для слабоудерживаемых веществ с подбором оптимальных условий хроматографического разделения, детектирования, а также способа пробоподготовки.

На данный момент в рецензируемых журналах представлены различные методики определения транексамовой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектора с тройным квадруполом (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid

chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)] в плазме или сыворотке крови человека (таблица 2).

Однако стоит отметить, что приведенные выше методики требуют трудозатратной пробоподготовки или подразумевают использование коррозионно-агрессивных реагентов для осаждения белков. В данном исследовании приведены разработка и валидация методики определения транексамовой кислоты методом ВЭЖХ с масс-селективным детектированием и использованием в качестве пробоподготовки осаждения белков ацетонитрилом, что позволяет облегчить и ускорить процедуру пробоподготовки, при этом получив методику, отвечающую всем требованиям нормативной документации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR, оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и tandemным масс-спектрометрическим детектором (тройным квадруполом). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Lab Solutions (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: метанол (класс «HPLC-grade», J.T. Baker, Нидерланды), ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция/Нидерланды/Израиль), муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Испания), аммиак водный (класс «for analysis», PanReac, Испания), вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы транексамо-

Таблица 2. Биоаналитические методики количественного определения транексамовой кислоты

Table 2. Bioanalytical methods of quantitative determination of tranexamic acid

Аналитический метод Analytical method	Пробоподготовка Sample preparation	Внутренний стандарт Internal standart	Аналитический диапазон Analytical range	Хроматографическая колонка Chromatography column	Ссылка Reference
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Осаждение хлорной кислотой Protein precipitation by perchloric acid	Метилдопа Methylidopa	0,02 – 10,00 мкг/мл 0.02 – 10.00 µg/ml	XTerra™ MS C18 Column (100 × 2.1 mm, 3.5 µm)	[8]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Осаждение хлорной кислотой Protein precipitation by perchloric acid	цис-4-аминоциклогексан-карбоновая кислота cis-4-aminocyclohexanecarboxylic acid	1,00 – 200,00 мкг/мл 1.00 – 200.00 µg/ml	HyPURITY C18 Thermo Hypersil column (150 × 2.1 mm, 5 µm)	[9]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Удаление фосфолипидов и осаждение белков Ludox® AS-40 и хлоридом лантана Phospholipid clean-up and protein precipitation by Ludox® AS-40 and lanthanum chloride	цис-4-аминоциклогексан-карбоновая кислота cis-4-aminocyclohexanecarboxylic acid	1,00 – 1000,00 мкг/мл 1.00 – 1000.00 µg/ml	Thermo Scientific™ Accucore™ Urea HILIC HPLC Columns (150 × 3 mm, 2. µm)	[10]

вой кислоты (количественное содержание 99,3 %, Хуньянь Дунтин Фармасьютикал Ко, Лтд., Китай) и вилдаглиптина (количественное содержание 99,8 %, Sigma-Aldrich, Германия).

Исходные стандартные растворы транексамовой кислоты и внутреннего стандарта (ВС) [internal standard (IS)] вилдаглиптина (ВИЛ) [vildagliptin (VIL)] готовили путем растворения навески субстанций в метаноле; рабочие стандартные растворы транексамовой кислоты и рабочий раствор ВС вилдаглиптина готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций в плазме крови, соответствующих уровням 1–8, а также уровням LLOQ (lower limit of quantification), L (low), M (middle) и H (high) (таблица 3).

Исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –40 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –40 °С.

Пробоподготовка

К 200 мкл (калибровочного образца, образца контроля качества, образца интактной плазмы крови), помещенного в центрифужные микропробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС вилдаглиптина, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, далее центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Таблица 3. Концентрации определяемых веществ в калибровочных образцах и в образцах контроля качества

Table 3. Concentrations of analyte in calibration samples and in quality control samples

Уровень Level	Концентрация аналита, нг/мл Analyte concentration, ng/ml	Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/ml
	ТК TA	ВИЛ VIL
1	100,00	500,00
2	250,00	500,00
3	500,00	500,00
4	1000,00	500,00
5	5000,00	500,00
6	8000,00	500,00
7	10000,00	500,00
8	15000,00	500,00
9	100,00	500,00
LLOQ	300,00	500,00
L	7500,00	500,00
M	12500,00	500,00
H	100,00	500,00

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Хроматографическая колонка: Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: Элюент А: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q с прибавлением 0,08 % аммиака (по объему), элюент В: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты с прибавлением 0,08 % аммиака в метаноле (по объему).
- Градиент по составу подвижной фазы (ПФ) представлен в таблице 4.

Таблица 4. Градиентное элюирование

Table 4. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %	Скорость потока ПФ, мл/мин Mobile phase flow rate, ml/min
0,00	12,5	87,5	1,00
0,50	12,5	87,5	1,00
2,50	12,5	87,5	1,00
2,60	12,5	87,5	1,30
3,00	100,0	0,0	1,30
4,00	100,0	0,0	1,30
4,20	12,5	87,5	1,30
4,70	12,5	87,5	1,00
7,50	12,5	87,5	1,00

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–7,50 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °С, линия десольватации 200 °С, напряжение на капилляре +4,5 кВ.
- Режим ионизации: положительный.

Таблица 5. Условия детектирования

Table 5. Detection conditions

Наименование аналита Analyte name	Условия детектирования Detection conditions		
Транексамовая кислота Tranexamic acid	158,10 → 55,10 m/z	158,10 → 67,10 m/z	158,00 → 95,20 m/z
Вилдаглиптин Vildagliptin	304,10 → 107,05 m/z	304,10 → 151,10 m/z	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Главной особенностью разработки методики определения транексамовой кислоты являлась необходимость удержания гидрофильного, полярного вещества в условиях обращенно-фазовой хроматографии. При подборе оптимальной хроматографической колонки были испытаны колонки с привитыми амино- и цианогруппами, октильными группами, а также хроматографические колонки с октадецил модифи-

кацией силикагеля, содержащие различный процент углерода. Кроме того, в процессе разработки методики было испытано применение различных элюентов в качестве подвижной фазы, в том числе буферных систем.

На основании полученных экспериментальных данных в качестве неподвижной фазы была выбрана хроматографическая колонка Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм с содержанием углерода 9,5 % и обладающая малой остаточной силанольной активностью. Применение данной колонки в сочетании с раствором формиата аммония в качестве элюента позволило добиться оптимального удерживания на колонке, предотвратить размывание и добиться оптимальной формы хроматографических пиков.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [11], а также руководств FDA [12] и ЕМА [13] по следующим параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность (на уровнях внутри цикла, между циклов), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами), степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность [стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналитов и ВС; краткосрочная стабильность («на-стоящая» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналитов в матрице].

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников, а также образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов до получения концентраций, соответствующих уровню LLOQ (таблица 3). Отдельно проводили анализ образцов интактной плазмы крови с гемолизом и образцов с повышенным содержанием липидов. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови сигналы пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания аналита и ВС, не превышают 20 % от сигнала аналита на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) и 5 % от сигнала ВС соответственно. Соответствующая хроматограмма приведена ниже на рисунке 2.

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением рабочих стандартных растворов транексамовой кислоты и рабочего раствора ВС вилдаглиптина без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме, без учёта влияния степени извлечения транексамовой кислоты из биологической матрицы.

Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 2. Blank plasma sample chromatogram

Эффект матрицы был оценен на низком (уровень L) и высоком (уровень H) уровнях аналитического диапазона концентраций транексамовой кислоты (таблица 3). Для ВС вилдаглиптина эффект матрицы был рассчитан на уровне 500,00 нг/мл. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6. Расчёт фактора матрицы ТК, нормализованного по фактору матрицы ВС

Table 6. The matrix factor of TA, normalized by the IS matrix factor

	Интактная плазма крови Blank plasma		Гемолизная интактная плазма крови Hemolyzed blank plasma		Гиперлипидемическая интактная плазма крови Hyperlipidemic blank plasma	
	Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L)	Нормализованный Mf (H) Normalized Mf (H)	Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L)	Нормализованный Mf (H) Normalized Mf (H)	Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L)	Нормализованный Mf (H) Normalized Mf (H)
Среднее Average	1,25	0,92	1,45	1,03	1,37	1,04
CV, %	5,90	4,45	6,84	4,07	5,35	3,31

Калибровочная кривая

Проводили анализ восьми образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора ВС вилдаглиптина и рабочих стандартных растворов транексамовой кислоты до концентраций, указанных в таблице 3 (уровни 1–8). По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика транексамовой кислоты к площади пика вилдаглиптина от отношения концентрации транексамовой кислоты к концентрации вилдаглиптина в плазме крови (рисунок 4). Хромотограмма образца на уровне 8 (таблица 3) представлена на рисунке 3.

Рисунок 3. Хромотограмма образца плазмы крови, уровень 8

Figure 3. Level 8 plasma sample chromatogram

Точность и прецизионность

Проводили анализ образцов плазмы крови, соответствующих уровням LLOQ, L, M и H (таблица 3). Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точность и прецизионность были оценены внутри цикла, между двумя циклами и между тремя циклами, данные приведены в таблице 7.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, прецизионность) и относительной погрешности (E, точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

Рисунок 4. Пример калибровочного графика зависимости от отношения площади пика транексамовой кислоты к площади пика вилдаглиптина от отношения концентрации транексамовой кислоты к концентрации вилдаглиптина в плазме крови

Figure 4. Example of the calibration curve representing dependence of the ratio area peak of tranexamic acid to vildagliptin on the concentration ratio of tranexamic acid to the vildagliptin in plasma.

Таблица 7. Точность и прецизионность методики

Table 7. Accuracy and precision of the method

Уровень Level	RSD, %			E, %		
	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)
LLOQ	3,17	6,05	3,75	-11,49	-6,77	-5,49
L	2,84	3,58	5,02	3,43	6,10	8,15
M	2,68	1,95	3,95	1,34	1,68	-0,30
H	0,79	2,20	4,50	-7,22	-5,97	-6,45

Степень извлечения

Для оценки степени извлечения (СИ) анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной плазмы, без влияния степени извлечения на уровнях L, M, и H (таблица 3), а также образцы контроля качества для оценки степени извлечения. Отдельно проводили анализ образцов интактной плазмы крови с гемолизом и с повышенным содержанием липидов. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8. Оценка степени извлечения транексамовой кислоты на уровнях L, M, и H из различных видов биологической матрицы

Table 8. Calculation of tranexamic acid recovery at L, M, H levels from different types of biological matrix

	СИ (уровень L), % Recovery (level L), %	СИ (уровень M), % Recovery (level M), %	СИ (уровень H), % Recovery (level H), %
Среднее Average	58,35	83,43	67,87
SD	6,88	2,23	6,24
RSD	11,80	2,67	9,19

Степень извлечения не должна быть равной 100 %, но необходимо обеспечить эффективное и воспроизводимое извлечение веществ из биологической

матрицы. Относительное стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения аналита из биологических матриц не должно превышать 15 %.

Нижний предел количественного определения

НПКО методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация транексамовой кислоты в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение транексамовой кислоты со значениями RSD и E не более 20 %. НПКО составил 100,00 нг/мл. Хроматограмма плазмы крови с содержанием транексамовой кислоты на уровне НПКО приведена на рисунке 5. Отношение сигнал/шум по пику транексамовой кислоты на уровне НПКО, рассчитанное при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония), составляет 28,3.

Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы крови, уровень НПКО

Figure 5. LLOQ plasma sample chromatogram

Стабильность

Были подтверждены краткосрочная стабильность («настоящая» и «постпрепаративная»), стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, стабильность исходных и рабочих стандартных растворов (при хранении в течение 16 дней при температуре -40°C), долгосрочная стабильность (при хранении

в течение 71 дня при температуре -40°C) исследуемых веществ на низком (L) и высоком (H) уровнях концентраций (таблица 3).

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочного образца, соответствующего уровню 8 (см. таблицу 3), и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемого вещества и ВС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика определения транексамовой кислоты в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 100,00–15000,00 нг/мл в плазме крови человека. Полученный аналитический диапазон позволяет применить разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов транексамовой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dunn C. J., Goa K. L. Tranexamic acid. *Drugs*. 1999;57(6):1005–1032.
2. Ng W. Ch. K., Jerath A., Wasowicz M. Tranexamic acid: a clinical review. *Anestezjologia Intensywna Terapia*. 2015;47(4):339–350. DOI: 10.5603/AIT.a2015.0011.
3. Klebanoff J. S., Marfori Ch. Q., Ingraham C. F., Wu C. Z., Moawad G. M. Applications of Tranexamic acid in benign gynecology. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 2019;31(4):235–239. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000547.
4. Ogawa H., Asakura H. Consideration of tranexamic acid administration to COVID-19 patients. *Physiological reviews*. 2020; 100(4):1595–1596. DOI: 10.1152/physrev.00023.2020.
5. Распоряжение Правительства РФ от 12 октября 2019 г. № 2406-р. «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2020 год, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/563469457>. Ссылка активна на 12.05.2021.
6. Tranexamic acid. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00302>. Accessed: 25.02.2021.
7. Карцова Л. А., Бессонова Е. А., Сомова В. Д. Применение ионных жидкостей на основе имидазола в условиях обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии при разделении полярных лекарственных препаратов. В сб.: III Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». 21–27 мая 2017. Краснодар: Мегастронг; 2017. С. 15. Доступно по: <http://www.spsl.nsc.ru/FullText/konfe/%D0%90%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F%20%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D1%8F2017.pdf>. Ссылка активна на 12.05.2021.
8. Chang Q., Yin O. Q. P., Chow M. S. S. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of tranexamic acid in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2004;805(2):275–280. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.03.013.
9. Delyle S. G., Abe E., Batisse A., Tremey B., Fischler M., Devillier P., Alvarez J. C. A validated assay for the quantitative analysis of tranexamic acid in human serum by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(5–6):438–443. DOI: 10.1016/j.cca.2010.01.005.
10. Fabresse N., Fall F., Etting I., Devillier P., Alvarez J.-C., Grassin-Delyle S. LC–MS/MS determination of tranexamic acid in human plas-

ma after phospholipid clean-up. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;141:149–156. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.04.024.

11. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К; 2013. 280 с.
12. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Accessed: 25.02.2021.
13. Bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Accessed: 25.02.2021.

REFERENCES

1. Dunn C. J., Goa K. L. Tranexamic acid. *Drugs*. 1999;57(6):1005–1032.
2. Ng W. Ch. K., Jerath A., Wasowicz M. Tranexamic acid: a clinical review. *Anestezjologia Intensywna Terapia*. 2015;47(4):339–350. DOI: 10.5603/AIT.a2015.0011.
3. Klebanoff J. S., Marfori Ch. Q., Ingraham C. F., Wu C. Z., Moawad G. M. Applications of Tranexamic acid in benign gynecology. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 2019;31(4):235–239. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000547.
4. Ogawa H., Asakura H. Consideration of tranexamic acid administration to COVID-19 patients. *Physiological reviews*. 2020; 100(4):1595–1596. DOI: 10.1152/physrev.00023.2020.
5. *Rasporyazhenie Pravitel'stva RF ot 12 oktyabrya 2019 g. № 2406-r. "Ob utverzhdenii perechnya zhiznennno neobkhodimyykh i vazhneyshikh lekarstvennykh preparatov na 2020 god, a takzhe perechny lekarstvennykh preparatov dlya meditsinskogo primeneniya i minimal'nogo assortimenta lekarstvennykh preparatov, neobkhodimyykh dlya okazaniya meditsinskoy pomoshchi"* [Order of the Government of the Russian Federation of 12 October 2019 No. 2406-r. "On approval of the list of vital and essential drugs for 2020, as well as lists of drugs for medical use and the minimum range of drugs required for the provision of medical care"]. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/563469457>. Accessed: 12.05.2021. (In Russ.)
6. Tranexamic acid. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00302>. Accessed: 25.02.2021.
7. Kartsova L. A., Bessonova E. A., Somova V. D. *Primenenie ionnykh zhidkostey na osnove imidazola v usloviyakh obrashchenno-fazovoy i gidrofil'noy khromatografii pri razdelenii polyarnyykh lekarstvennykh preparatov. V sb.: III Vserossiyskaya konferentsiya "Analiticheskaya khromatografiya i kapillyarnyy elektroferez"* [The use of ionic liquids based on imidazole under conditions of reversed-phase and hydrophilic chromatography in the separation of polar drugs. In: III All-Russian conference "Analytical chromatography and capillary electrophoresis"]. May 21–27 2017. Krasnodar: Megastrong; 2017. P. 15. Available at: <http://www.spsl.nsc.ru/FullText/konfe/%D0%90%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F%20%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D1%8F2017.pdf>. Accessed: 12.05.2021. (In Russ.)
8. Chang Q., Yin O. Q. P., Chow M. S. S. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of tranexamic acid in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2004;805(2):275–280. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.03.013.
9. Delyle S. G., Abe E., Batisse A., Tremey B., Fischler M., Devillier P., Alvarez J. C. A validated assay for the quantitative analysis of tranexamic acid in human serum by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(5–6):438–443. DOI: 10.1016/j.cca.2010.01.005.
10. Fabresse N., Fall F., Etting I., Devillier P., Alvarez J.-C., Grassin-Delyle S. LC–MS/MS determination of tranexamic acid in human plasma after phospholipid clean-up. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;141:149–156. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.04.024.
11. Mironov A. N. *Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv*. [Guidelines for the examination of medicines]. V. II. Moscow: Grif i K; 2013. 280 p. (In Russ.)
12. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Accessed: 25.02.2021.
13. Bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Accessed: 25.02.2021.