

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-79-84
УДК 615.03



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики количественного определения бусерелина в плазме крови животных

Е. Н. Фишер^{1,2*}, Е. С. Мельников^{1,3}, И. Е. Шохин²

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8

2 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

3 – ГБУ города Москвы «Городская клиническая больница им. И. В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы», 119027, Россия, г. Москва, ул. Яузская, д. 11

*Контактное лицо: Фишер Елизавета Николаевна. E-mail: elizaveta.fisher@mail.ru

Статья получена: 01.07.2019. Статья принята к печати: 12.08.2019

Резюме

Введение. Бусерелин, синтетический аналог гонадотропин-рилизинг гормона, используется в лечении таких гормонально-зависимых опухолей, как рак предстательной железы и рак молочной железы. На основании опубликованных научных трудов основным аналитическим методом количественного определения бусерелина в биологической жидкости является высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием с использованием в качестве пробоподготовки осаждение белков 10% раствором трихлоруксусной кислоты, который имеет ряд ограничений, связанных с низкой чувствительностью (на уровне мкг/мл). Таким образом, предпочтение в выборе метода количественного определения пептидной молекулы в биологических жидкостях отдавалось высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией, обладающей большей точностью и специфичностью. Основным методом пробоподготовки для аналогов гонадотропин-рилизинг гормона является твердофазная экстракция. В качестве альтернативы был выбран метод осаждение белков, как менее трудоемкий и более простой в исполнении.

Цель. Цель исследования заключалась в разработке и валидации методики количественного определения бусерелина в плазме крови животных (мини-свиней) методом высокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемной масс-спектрометрией для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количественное определение бусерелина в плазме крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемной масс-спектрометрией. Осаждение белков метанолом в соотношении 1:2 использовали в качестве метода пробоподготовки биологической жидкости.

Результаты и обсуждения. Разработанная биоаналитическая методика была валидирована по таким валидационным параметрам, как селективность, линейность, эффект матрицы, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), нижний предел количественного определения, перенос пробы и стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения бусерелина в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон методики составил 1,0–20 нг/мл. Разработанная методика может быть использована для количественного определения бусерелина в плазме крови с целью исследования фармакокинетики.

Ключевые слова: пептиды, бусерелин, фармакокинетика, ВЭЖХ-МС/МС, аналог гонадотропин-рилизинг гормона, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы Е. Н. Фишер, Е. С. Мельников придумали и разработали эксперимент. Автор Е. Н. Фишер проводил расчеты и участвовал в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Фишер Е. Н., Мельников Е. С., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики количественного определения бусерелина в плазме крови животных. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(3): 79–84.

Development and Validation of HPLC-MS/MS Method for Busereline Quantitation in Animal Blood Plasma

Elizaveta N. Fisher^{1,2*}, Evgueniy S. Melnikov^{1,3}, Igor E. Shohin²

1 – I. M. Sechenov First MSU MOH Russia (Sechenovskij University), 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – LLC «СРНА», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

3 – Clinical Hospital. I. V. Davidovsky Department of Health of the city of Moscow, 11, Yauzskaya str. Moscow, 119027, Russia

*Corresponding author: Elizaveta N. Fisher. E-mail: elizaveta.fisher@mail.ru

Received: 01.07.2019. Accepted: 12.08.2019

Abstract

Introduction. Busereline, being a synthetic gonadotropin-releasing hormone analog, is widely used for hormone-dependent cancer treatment (e.g. prostate cancer and breast cancer). Based on the accumulated scientific data for busereline quantitation in biosamples, the main analytical method that is used for this purpose is high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection, combined with protein precipitation (TCA 10%) for sample preparation. However, due to several limitations of this method resulting in low sensitivity (at the µg/mL level of concentrations), the HPLC-MS/MS analytical method was chosen for peptide determination in biosamples. The HPLC-MS/MS method is considered to have higher accuracy and specificity. The main sample preparation method for gonadotropin-releasing hormone analogs is solid-phase extraction. In our work, we've chosen protein precipitation as an alternative – easier and less laborious biosamples preparation process.

Aim. The main objective of this study was the development and validation of HPLC-MS/MS method for busereline quantitation in animal (mini pigs) plasma samples and its further application to pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Busereline quantitative determination in plasma samples was performed using HPLC-MS/MS method. A protein precipitation procedure (methanol, 1:2, v/v) was used for busereline extraction from pig plasma.

Results and discussion. The developed analytical method was validated for selectivity, linearity, matrix effect, accuracy (intra-day, inter-day), precision (intra-day, inter-day), LLOQ, carryover and stability.

Conclusion. A new HPLC-MS/MS method for busereline quantitation in blood plasma was developed and successfully validated. The developed method showed linearity over the quantitation range from 1 to 20 ng/mL. The developed method can be successfully applied to busereline pharmacokinetic studies.

Keywords: peptides, busereline, pharmacokinetics, HPLC-MS/MS, gonadotropin-releasing hormone analogs, validation.

© Фишер Е. Н., Мельников Е. С., Шохин И. Е., 2019

© Fisher E. N., Melnikov E. S., Shohin I. E., 2019

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Elizaveta N. Fisher, Evgeniy S. Melnikov invented and developed the experiment. Author Elizaveta N. Fisher made calculations and participated in the writing of the text article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Fisher E. N., Melnikov E. S., Shohin I. E. Development and validation of HPLC-MS/MS method for bussereline quantitation in animal blood plasma. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 79–84.

ВВЕДЕНИЕ

Бусерелин – синтетический нонапептидный аналог ГнРГ (6-[0-(1,1-Диметилэтил)-D-серин]-9-(N-этил-L-пролинамид)-10-деглицинамид рилизинг-фактора ЛГ (свиного)) с аминокислотной последовательностью H-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-NHEt [1]. Структурная формула бусерелина представлена на рисунке 1.

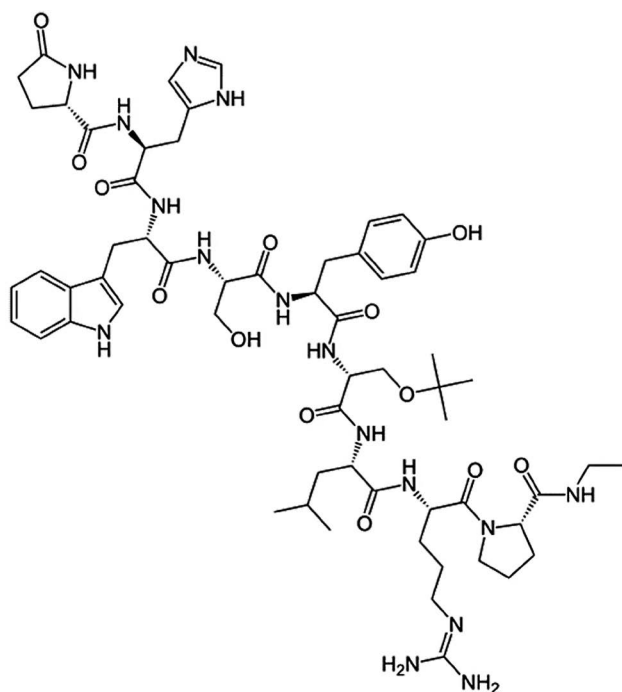


Рисунок 1. Структурная формула бусерелина
Figure 1. The structural formula of bussereline

Аналоги ГнРГ (аГнРГ) вызывают подавления функции половых желез через гипофизарную десенсибилизацию путем непрерывного воздействия на рецепторы гипофиза и являются одной из ведущих групп препаратов, применяемых в терапии гормонально-за-

висимых опухолей таких, как рак предстательной железы и рак молочной железы [2]. По своей структуре аГнРГ относятся к коротким пептидам из-за наличия небольшого количества аминокислотных остатков (не более 20–30) [3]. В результате замены аминокислотных остатков синтетические аГнРГ имеют более выраженное сродство к рецепторам ГнРГ, продолжительный период полувыведения и сильное фармакологическое действие по сравнению с нативным гормоном. В ходе этого активность увеличивается в несколько десятков раз, а период полувыведения возрастает до 2 часов [4].

Сравнительная характеристика аминокислотного состава бусерелина и ГнРГ представлена в таблице 1.

Учитывая строение пептидной молекулы, ее физико-химические свойства, основными методами количественного определения коротких пептидов являются иммунохимический анализ [5], капиллярный электрофорез [6] и виды жидкостной хроматографии [7]. Несмотря на высокую чувствительность иммунохимического метода (на уровне пг/мл), он обладает рядом недостатков, которые заключаются в отсутствии абсолютной селективной, наличии перекрестных реакций с другими молекулами пептидной структуры, что может привести к ложноположительным результатам [8]. Такие аналитические методы, как хроматография и капиллярный электрофорез в сочетании с ФЛД и УФ-детектированием имеют достаточно ограниченную область применения при анализе биологической жидкости. Концентрация анализируемых веществ в таком материале должна иметь высокие значения, чтобы преодолеть влияние матрицы, в то время как концентрация пептидов в крови обычно находится на низком уровне [9]. Таким образом, предпочтение в анализе пептидных молекул в биологических жидкостях отдается высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) с методом ионизации электрораспылением в режиме положительной полярности, так как пептиды обычно являются достаточно полярными молекулами, способными легко протонироваться.

Таблица 1. Аминокислотный состав природного ГнРГ и бусерелина

Table 1. Amino acid composition of natural GnRH and bussereline

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------|-------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|
| ГнРГ | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Arg | Pro | Gly |
| Бусерелин | H-Pyr | His | Trp | Ser | Tyr | D-Ser(But) | Leu | Arg | Pro | |

But = tert-butyl; pGlu = pyroglutamic acid

В приведенных работах [11–13] твердофазная экстракция (ТФЭ) является основным методом пробоподготовки для достижения более низких значений нПКО. Альтернативным вариантом был выбран метод осаждения белков, где в качестве осаждающих реактивов применялись метанол, ацетонитрил и 10% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Использование ацетонитрила приводило к неполному извлечению аналита, а 10% раствор ТХУ обеспечивал извлечение аналита только при работе с высокими концентрациями (на уровне мкг/мл). В приведенном исследовании в качестве метода пробоподготовки биологической жидкости использовали осаждение белков метанолом в соотношении 1:2, как более простой в исполнении и позволяющий достичь требуемого уровня нПКО.

В настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке зарегистрировано две лекарственных формы (ЛФ) бусерелина – спрей назальный дозированный и лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения пролонгированного действия. Последняя является основной ЛФ для курсового лечения онкологических заболеваний длительностью в один месяц (28 дней). Однако длительность курсового лечения может быть увеличена до трех и шести месяцев, что в свою очередь приводит к разработке новой дозировки с целью сокращения частоты дозирования.

Цель исследования заключается в разработке и валидации методики количественного определения бусерелина в плазме крови животных (мини-свиней) для исследований фармакокинетики в рамках проведения доклинических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и МС-детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera (Shimadzu, Япония), оснащенный дегазатором (DGu-20A5R), градиентным насосом (LC-30AD), термостатируемым автосамплером (SIL-30AC), термостатом колонок (CTO-20AC), диодно-матричным (SPD-M20A) и тандемным масс-спектрометрическим детектором (LCMS-8040) (Shimadzu, Япония) под управлением программного обеспечения LabSolution (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation.

Реактивы и растворы

В ходе исследования были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (LC-MS grade, Biosolve, Израиль); метанол (HPLC-grade, Panreac, Испания); кислота муравьиная (Extra pure, Sigma, США); вода Milli-Q. Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы стандартные образцы бусерелина ацетат (№ 68630-75-1, B3303, Sigma, США, годен до

10.2019) и даларгина ацетат (№ 81733-79-1, American Custom Chemicals Corporation, США, годен до 02.2019), который был выбран в качестве внутреннего стандарта (BC).

Исходные стандартные растворы бусерелина и BC готовили путем растворения навесок стандартных образцов в смеси ацетонитрил:вода (1:1). Рабочие стандартные растворы бусерелина готовили путем разведения исходного раствора тем же растворителем.

Исходные растворы, рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

Пробоподготовка была проведена способом осаждения белков метанолом в соотношении 1:2. 400 мкл интактной плазмы (либо 360 мкл с прибавлением 40 мкл раствора стандартного образца) помещали в пробирку типа Eppendorf, прибавляли 10 мкл BC (2000 нг/мл) и 800 мкл метанола. Затем пробы встряхивали на вортексе и центрифугировали в течение 15 минут при 14500 об/мин, после чего супернатант переносили в хроматографические вials.

Условия хроматографического разделения и детектирования

Условия хроматографического разделения были подобраны экспериментально.

Хроматографическая колонка: Jupiter® 5 мкм C18 50 x 4,6 мм 300 Å.

Температура термостата: 40°C.

Подвижная фаза: 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В) в градиентном режиме элюирования со скоростью потока 1,2 мл/мин. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 2.

Объем вводимой пробы: 10 мкл.

Таблица 2. Режим градиентного элюирования

Table 2. Gradient elution

| Время, мин | Объемная доля элюента В, % |
|------------|----------------------------|
| 0–0,3 | 5 |
| 0,3–4,6 | 5–35 |
| 4,6–5,1 | 35–95 |
| 5,1–6,5 | 95 |
| 6,5–8,2 | 95–5 |
| 8,2–10 | 5 |

Параметры детектирования были установлены экспериментально. Детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) при положительной ионизации электрораспылением (ESI), 5кВ. В качестве распыляющего и осушающего газа использовался азот со скоростью 3 л/мин и 20 л/мин,

температура блока нагрева – 400 °С, линии десольватации – 200 °С.

Общее время анализа составило 10 мин. Время удерживания бусерелина – около 4,82 мин, даларгина – около 3,89 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Валидация методики

Валидация биоаналитической методики была проведена на основе руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [14], а также руководств FDA [15] и ЕМА [16] по следующим параметрам: селективность, линейность, эффект матрицы, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), нижний предел количественного определения, перенос пробы и стабильность (стабильность исходных и рабочих растворов аналита и ВС; стабильность замороженного и размороженного аналита; краткосрочная стабильность аналита в матрице; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Селективность

Селективность методики была оценена путем анализа 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников, и образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов бусерелина и ВС. На хроматограммах (рисунки 2 и

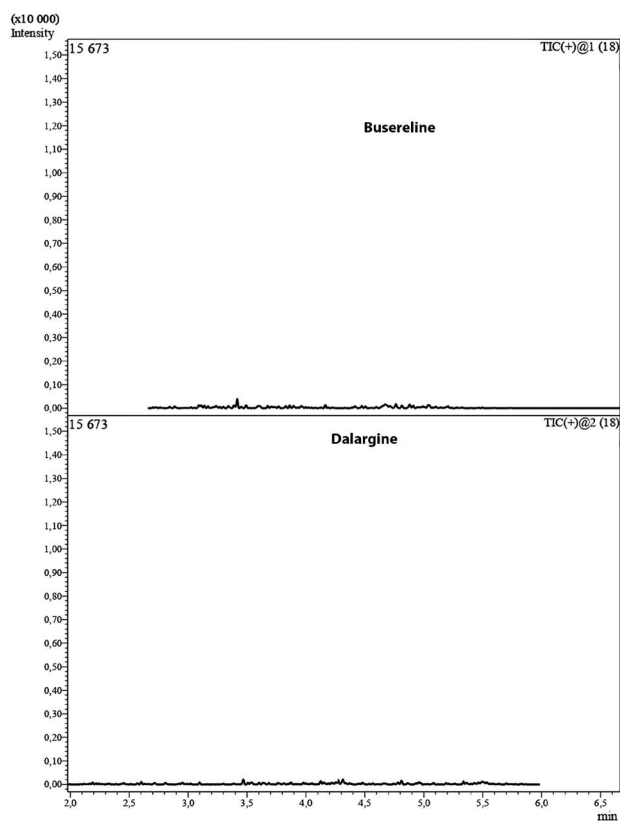


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 2. Chromatogram of a blank plasma sample

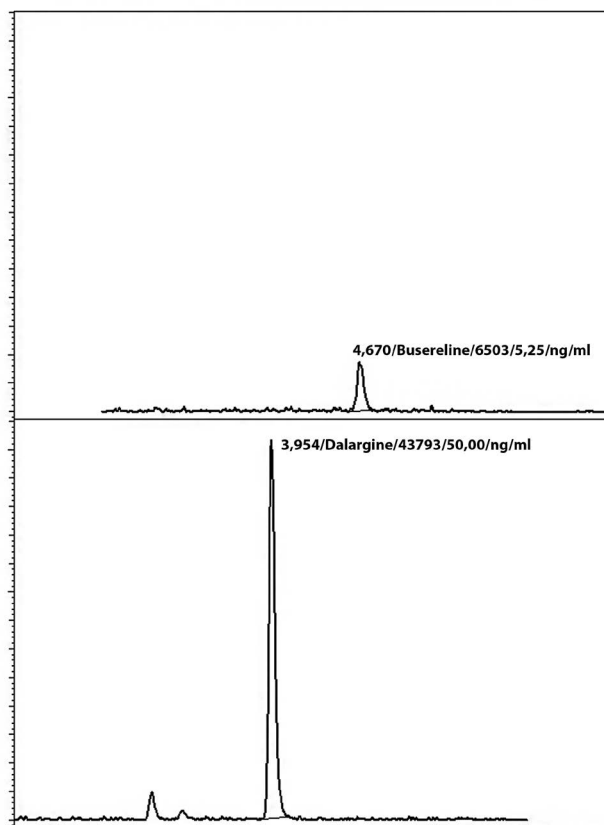


Рисунок 3. Хроматограмма модельного образца интактной плазмы крови, содержащего стандартный раствор бусерелина до концентрации 5,0 нг/мл и рабочий стандартный раствор ВС до концентрации 50 нг/мл

Figure 3. Chromatogram of a blank plasma sample with the addition of a standard solution to concentration of busereline 5,0 ng/ml and standard solution to concentration of IS 50 ng/ml

3) образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков с временами удерживания, соответствующих бусерелину и ВС.

Линейность

Для определения калибровочной зависимости проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови с добавлением рабочих стандартных растворов бусерелина до концентраций 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5 нг/мл, 8 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл и рабочего стандартного раствора ВС до концентрации 50 нг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график (рисунки 4) в координатах отношение площади пика аналита к площади пика ВС от отношения концентрации аналита к концентрации ВС в плазме крови.

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонение концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от фактических значений представлены в таблице 3

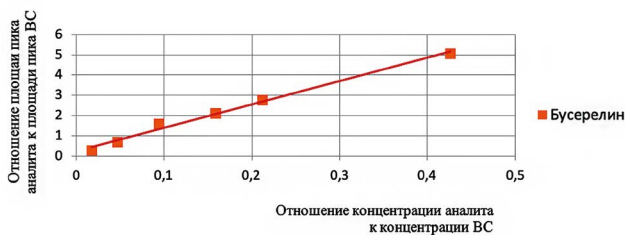


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости отношения площади пика бусерелина к площади пика ВС от отношения концентрации бусерелина к концентрации ВС в плазме крови

Figure 4. The calibration curve dependence of the ratio area peak of bussereline to the IS on the concentration ratio of bussereline to the IS in plasma

Таблица 3. Отклонение концентраций бусерелина от фактических значений

Figure 3. Deviation of bussereline concentrations from nominal values

| Концентрация номинальная, нг/мл | Концентрация рассчитанная, нг/мл | E, % | Норма, не более % |
|---------------------------------|----------------------------------|-------|-------------------|
| 1,00 | 0,87 | -13,0 | 20 |
| 2,50 | 2,38 | -4,8 | 15 |
| 5,00 | 4,73 | -5,4 | 15 |
| 8,00 | 7,94 | -0,8 | 15 |
| 10,00 | 10,61 | 6,1 | 15 |
| 20,00 | 21,30 | 6,5 | 15 |

Эффект матрицы

Для определения влияния биологической матрицы на количественное определение бусерелина в плазме крови был рассчитан эффект матрицы (matrix effect, ME), нормализованный эффект матрицы (ME_{norm}) по ВС и степень извлечения (recovery, RE). Эффект матрицы и степень извлечения были оценены на уровнях 2,5 нг/мл и 20 нг/мл для бусерелина. Средние значения ME составили 76%, ME_{norm} – 98% и RE – 73% на уровне 2,5 нг/мл и ME – 73%, ME_{norm} – 96% и RE – 80% на уровне 20 нг/мл. Таким образом, степень извлечения на нижнем и верхнем уровне имеет незначительное отличие, тем самым показывая одинаковую степень извлечения на всех калибровочных уровнях. Рассчитанные значения коэффициента вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по ВС, соответствуют нормам руководств и не превышают 15%.

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности был проведен анализ 4 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентрации бусерелина 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл. Образцы хроматографировали по 5 раз на каждом уровне концентрации анализата. Исследование проводили в течение 1-й последовательности

(внутри цикла) и 2-й последовательности (между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), представленные в таблицах 4 и 5.

Таблица 4. Правильность и прецизионность методики (внутри цикла)

Table 4. Accuracy and precision of the method (inter-day)

| введено (нг/мл) | найдено (нг/мл), среднее значение (n=5) | S.D. (n=5) | RSD, % (n=5) | E, % |
|-----------------|---|------------|--------------|---------|
| 1 | 0,896 | 0,051 | 5,646 | -10,440 |
| 2,5 | 2,619 | 0,096 | 3,676 | 4,760 |
| 10 | 11,262 | 0,319 | 2,830 | 12,618 |
| 20 | 19,878 | 0,937 | 4,715 | -0,610 |

Таблица 5. Правильность и прецизионность методики по бусерелину (между циклами)

Table 5. Accuracy and precision of the method (intra-day)

| введено (нг/мл) | найдено (нг/мл), среднее значение (n=10) | S.D. (n=10) | RSD, % (n=10) | E, % |
|-----------------|--|-------------|---------------|--------|
| 1 | 0,926 | 0,096 | 10,316 | -7,420 |
| 2,5 | 2,514 | 0,167 | 6,639 | 0,572 |
| 10 | 10,604 | 0,755 | 7,118 | 6,040 |
| 20 | 19,557 | 1,058 | 5,408 | -2,216 |

Полученные значения RSD и E соответствовали нормам руководств (не более 20% для нПКО и не более 15% для остальных точек).

На основании исследований линейности, правильности и прецизионности был определен нПКО. нПКО бусерелина составил 1,0 нг/мл (рисунок 5). Таким образом, выбранный нПКО можно считать действительным.

Стабильность

Стабильность анализируемого вещества и внутреннего стандарта была оценена в составе исходного и рабочего стандартных растворов, биологической матрицы при трехкратной заморозке-разморозке, краткосрочном и долгосрочном хранении на уровнях концентраций 2,5 нг/мл и 20 нг/мл. Площадь пиков при повторных анализах на двух приборах не изменялась более чем на 15%.

Перенос пробы

Отсутствие переноса пробы было доказано последовательным анализом образца с концентрацией анализата 20 нг/мл и образца холостой плазмы крови. На хроматограммах образца холостой плазмы не наблюдалось каких-либо пиков, соответствующих по временам удерживания бусерелину и ВС.

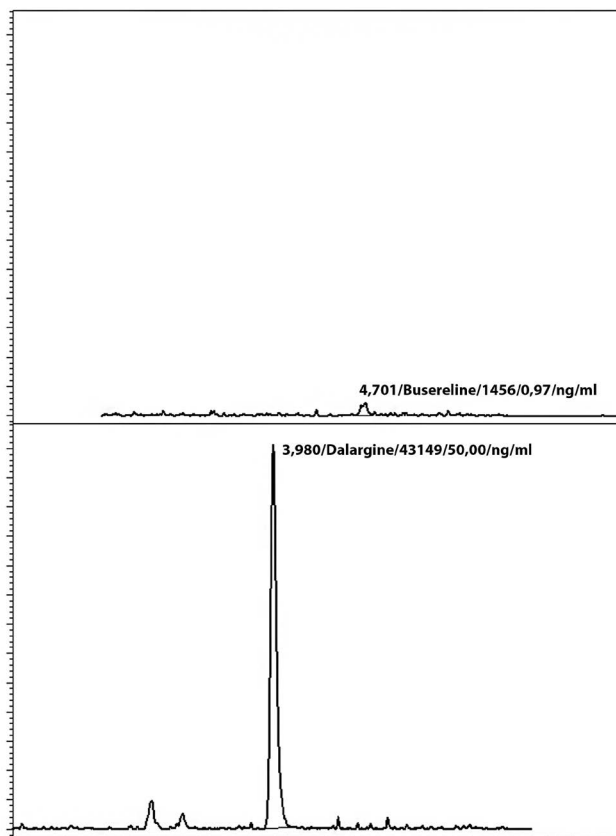


Рисунок 5. Хроматограмма модельного образца интактной плазмы крови, содержащего стандартный раствор бусерелина на уровне нПКО 1,0 нг/мл

Figure 5. Chromatogram of a blank plasma sample with the addition of standard solutions of IS and busereline at the level LLOQ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения бусерелина в плазме крови животных методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон методики составил 1,0–20 нг/мл. Разработанная методика с уровнем нПКО 1,0 нг/мл может быть использована в рамках доклинических исследований с целью исследования фармакокинетики лекарственных средств, содержащих бусерелин.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Suszka-Świtek A., Ryszka F., Dolińska B., Dec R., Danch A., Filipczyk L., Wiaderkiewicz R. Pharmacokinetics and Bioavailability of the GnRH Analogs in the Form of Solution and Zn²⁺-Suspension After Single Subcutaneous Injection in Female Rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2017; 42(2): 251–259.
2. Chrisp P., Goa L. K. Goserelin A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Clinical Use in Sex Hormone-Related Conditions. *Drugs Evaluation.* 1991; 41(2): 254–288.
3. Castro R. S., Sato H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International.* 2015; 74: 185–198.
4. Wilson A. C., Meethal V. M., Bowen R. L., Atwood C. S. Leuprolide acetate: drug of diverse clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2007; 16(11): 1–13.

5. Kogot J. M., Sarkes D. A., Val-Addo I., Pellegrino P. M., Stratis-Cullum D. N. Increased affinity and solubility of peptides used for direct peptide ELISA on polystyrene surfaces through fusion with a polystyrene-binding peptide tag. *BioTechniques.* 2012; 52: 95–102.
6. Trudeau K., Vu K. D., Shareck F., Lacroix M. Capillary Electrophoresis Separation of Protein Composition of γ -Irradiated Food Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE.* 2012; 7(3): 1–9.
7. Gartenmann K., Kochhar S. Short-Chain Peptide Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometer after Derivatization with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47(12): 5068–5071.
8. Jung F., Gee S. J., Harrison R. O., Goodrow M. H., Karu A. E., Braun A. L., Li Q. X., Hammock B. D. Use of Immunochemical Techniques for the Analysis of Pesticides. *Pestic Sci.* 1989; 26: 303–317.
9. 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.
10. Kuhlreiber W. M., Washer S. L. L., Hsu E., Zhao M., Reinhold P., Burger D., Zheng H., Faustman D. L. Low levels of C-peptide have clinical significance for established Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2015; 32(10): 1346–1353.
11. Kim M. K., Lee T. H., Suh J. H., Eom H. Y., Min J. W., Yeom H. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of goserelin in rabbit plasma. *Journal of Chromatography B.* 2010; 878: 2235–2242.
12. Zhang S., Han J., Leng G., Di X., Sha C., Zhang X., Li Y., Liu W. An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of goserelin and testosterone in rat plasma for pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. *Journal of Chromatography B.* 2014; 965: 183–189.
13. Ismaiel O. A., Zhang T., Jenkins R., Karnes H. T. Determination of octreotide and assessment of matrix effects in human plasma using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879(22): 2081–2088.
14. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. II. M.: *Grief and K.* 2013; 280 p. (In Russ.).
15. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
16. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.