



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.051:543.544.5.068.7

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10714

Особенности выбора операций подготовки проб плазмы крови для хроматографического анализа лекарственных препаратов

Дарья Александровна Никитина^{1,2}✉,

Анна Сергеевна Кушакова², Игорь Георгиевич Зенкевич¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, Санкт-Петербург, Россия, daryanikitina@me.com✉

²АО БИОКАД, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) со спектрофотометрическим/масс-спектрометрическим детектированием широко применяется для определения лекарственных соединений (ЛС) при проведении исследований фармакокинетики и для оценки биоэквивалентности ЛС. Растущее многообразие структур ЛС обуславливает сложность разработки биоаналитических методик определения содержания ЛС в биологических матрицах. Чаще всего встречающейся в практической работе матрицей является плазма крови человека, которая имеет сложный состав эндогенных веществ. Выбор и оптимизацию операций подготовки проб (или их сочетаний) до настоящего времени чаще всего проводят на основании самых общих представлений о природе определяемых соединений. Это приводит к большим затратам времени, которые удалось бы минимизировать, если связать характер операций подготовки проб с физико-химическими характеристиками аналитов.

В настоящей работе в результате систематизации известных способов подготовки образцов плазмы крови для определения ЛС рассмотрена возможность выбора таких способов на основании некоторых физико-химических свойств и биохимических характеристик целевых аналитов, прежде всего их факторов гидрофобности, степени связывания с белками плазмы и растворимости в воде. На основании сопоставления оригинальных экспериментальных и литературных данных описан подход к выбору способа подготовки проб для определения целевого аналита в плазме крови на основе свойств (фактор гидрофобности $\log P$ и степень связывания с белками плазмы) определяемого соединения.

Показано, что депротеинизация образцов при помощи ультрацентрифужных фильтров возможна только для тех соединений, степень связывания с белками которых ориентировочно не выше 50%. Значение $\log P$ определяет возможность применения распределительного варианта жидкостно-жидкостной экстракции в качестве способа подготовки образцов. При этом на выбор операции осаждения белков значения фактора гидрофобности не влияют, то есть данный способ подготовки проб является одинаково пригодным для липофильных и гидрофильных аналитов.

Выявленные особенности процедур подготовки проб плазмы крови для проведения хроматографического анализа позволяют оптимизировать процесс разработки и валидации биоаналитических методик, используемых при проведении клинических исследований.

Ключевые слова: плазма крови, лекарственные соединения, подготовка проб для анализа, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

Для цитирования: Никитина Д.А., Кушакова А.С., Зенкевич И.Г. Особенности выбора операций подготовки проб плазмы крови для хроматографического анализа лекарственных препаратов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 5. С. 694-710. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10714>



Original article

Features of the selection of operations of preparation of blood plasma samples for the chromatographic analysis of drugs

Daria A. Nikitina^{1,2✉}, Anna S. Kushakova², Igor G. Zenkevich¹

¹ St. Petersburg State University, Institute of Chemistry, St. Petersburg, Russian Federation, daryanikitina@me.com✉

²JSC BIOCAD, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC) with spectrophotometric/mass spectrometric detection is widely used to determine drug products (DP) in pharmacokinetic studies and to assess the bioequivalence of drugs. The increasing diversity of DP structures complicates the development of bioanalytical methods for determining the content of DP in biological matrices. The most common matrix in practical work is human blood plasma, which has a complex composition of endogenous substances. The choice and optimization of sample preparation operations (or their combinations) is still most often carried out based on the most general ideas about the nature of the determined compounds. This leads to a large consumption of time, which could be minimized if the sample preparation operations would be related to the physicochemical characteristics of the analytes.

In this study, as a result of systematization of the known methods for preparing blood plasma samples for the determination of DP, the possibility of choosing such methods based on certain physicochemical properties and biochemical characteristics of the target analytes, primarily their hydrophobicity factors, the degree plasma protein binding of drugs, and solubility in water, is considered. Based on a comparison of the original experimental and literature data, an approach for choosing a sample preparation method for determining the target analyte in blood plasma based on properties (hydrophobicity factor $\log P$ and degree of plasma protein binding of drugs) of the analyte was described.

It has been shown that the deproteinization of samples using ultracentrifuge filters is possible only for those compounds, the degree of protein binding of which is not higher than 50%. The $\log P$ value determines the possibility of using the distribution variant of liquid-liquid extraction as a method of sample preparation. At the same time, hydrophobicity factor values do not affect the choice of protein precipitation operation, e.g., this method of sample preparation is suitable for both lipophilic and hydrophilic analytes.

The identified features of the procedures for preparing blood plasma samples for chromatographic analysis allow to optimize the development and validation of bioanalytical methods used in clinical trials.

Keywords: blood plasma, drug products, sample preparation for analysis, reverse phase high performance liquid chromatography.

For citation: Nikitina D.A., Kushakova A.S., Zenkevich I.G. Features of the selection of operations of preparation of blood plasma samples for the chromatographic analysis of drugs. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2022. 22(5): 694-710. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10714>

Введение

Метод ОФ ВЭЖХ со спектрофотометрическим/масс-спектрометрическим детектированием широко применяется для определения лекарственных соединений (ЛС) в биологических объектах при проведении фармакокинетики и для оценки биоэквивалентности ЛС. Многообразие структур ЛС обуславливает сложности разработки биоаналитических методик определения их содержания в биологических матрицах. Чаще всего встречающейся в практической работе матрицей является плазма крови человека, которой

присущ сложный состав эндогенных веществ. Белковые компоненты крови (альбумин, липопротеин, гликопротеин и глобулины) и фосфолипиды могут мешать определению целевых аналитов и увеличивать нижние пределы их количественного определения (ПКО) [1].

При клинической характеристике даже одного лекарственного препарата число анализируемых проб достигает нескольких тысяч. Поскольку подготовка проб к анализу является одним из основных источников погрешности результатов количественных определений [2], то корректный выбор процедур подготовки

образцов для анализа зачастую является залогом успешной разработки методики.

Подготовка проб плазмы крови для хроматографического определения ЛС чаще всего включает следующие операции: жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ); твердофазную экстракцию (ТФЭ) с реализацией различных механизмов сорбции (ионный обмен, полярный и неполярный); осаждение/высаливание белковых компонентов крови; ультрафильтрацию и, реже, другие [3-7]. Можно заметить, что такой вариант как твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ) при решении подобных задач не используют.

Выбор и оптимизацию операций подготовки проб (или их сочетаний) до настоящего времени чаще всего проводят на основании самых общих представлений о природе определяемых соединений. Это нередко приводит к большим затратам времени, которые удалось бы минимизировать, если связать характер операций подготовки проб с физико-химическими характеристиками аналитов. В связи с этим, целью настоящей работы явилось сопоставление и систематизация широко применимых способов подготовки образцов плазмы крови для выявления возможности подбора таких способов на основании некоторых физико-химических свойств и биохимических характеристик целевых аналитов, прежде всего их факторов гидрофобности, степени связывания с белками плазмы и растворимости в воде.

Экспериментальная часть

Подготовка проб к анализу. Растворы субстанций I–X (табл. 1) с концентрациями 1 мг/см³ готовили растворением навесок анализируемых соединений в подвижной фазе (состав растворителей соответствовал начальным моментам градиентного элюирования). В качестве матрицы для приготовления модельных растворов использовали пулированную плазму крови 8-10 здоровых добровольцев, хранившуюся в замороженном виде

при температуре не выше -70°C. Подготовку образцов для ВЭЖХ анализа осуществляли по одной из следующих схем:

1) жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) проводили путем добавления к образцам экстрагента в соотношении 1:3, полученные растворы перемешивали, центрифугировали, органические экстракты упаривали в токе азота, сухие остатки перерастворяли в подвижной фазе;

2) для осаждения белков плазмы крови в качестве осадителя использовали ацетонитрил (в соотношении плазма крови - органический растворитель 1:3), полученные растворы перемешивали, центрифугировали, надосадочные слои переносили в вials для хроматографического анализа;

3) твердофазную экстракцию (ТФЭ) проводили с использованием картриджей (Oasis, Waters, США): наносили на них пробы и пропускали через картриджи различные растворители с целью элюирования примесей и целевых аналитов по отдельности;

4) для фильтрации белков плазмы использовали центрифужные ультрафильтры Amicon® Ultra 3K (Millipore, США). В пробирки с фильтрами вносили заданные объемы образцов, центрифугировали; прошедшие через мембраны количества растворов отбирали в вials для хроматографического анализа.

Условия хроматографического анализа. Для приготовления подвижных фаз использовали деионизованную воду (удельное сопротивление 18.2 мОм×м), полученную на установке Milli-Q (Millipore, США), и ацетонитрил (HPLC-gradient grade, Panreac, Испания), либо метанол (ОСЧ, Химмед, Россия) с добавками ацетата аммония, муравьиной или трифторуксусной кислот. Хроматографическое определение проводили в различных режимах элюирования с использованием сорбентов на основе силикагеля с привитыми фазами C8, C18 или Phenyl, на жидкостном хроматографе Agilent

Таблица 1. Оригинальные способы определения содержания соединений (I-X) в плазме/цельной крови человека. Международные непатентованные названия (МНН) лекарственных препаратов и их основные характеристики соответствуют Таблице 2
 Table 1. Original methods for determining the content of compounds (I-X) in human plasma/whole blood. International non-proprietary names (INN) of drug products and their main characteristics correspond to Table 2

Препарат	Подготовка образцов	Условия хроматографического разделения	Детектирование	Диапазон определяемых концентраций, нг/см ³
1	2	3	4	5
I Монометил-фумарат	Осаждение: 100 мкл ПК + 5 мкл ВС + 400 мкл CH ₃ CN → {ПЦ} → Анализ супернатанта	XBridge Hilic, 2.1×50 мм, 3.5 мкм; ПФ: А) 100 мМ NH ₄ Ac : CH ₃ CN, 1:49 (об. %), pH=7.4; Б) 100 мМ NH ₄ Ac : H ₂ O : CH ₃ CN, 1:14:35 (об. %), pH = 7.4; ГЭ, t _R ~ 1.8 мин.	ВЭЖХ-МС/МС ESI(-), MRM: m/z: 129.0→85.0, СЕ 5 эВ ВС: 134→90.1, СЕ 7 эВ	50-4000
II Эрлотиниб	Осаждение: 100 мкл ПК + 5 мкл ВС + 300 мкл CH ₃ CN > {ПЦ} → Анализ супернатанта	Acquity UPLC C18 HSS, 30 мм × 2.1 мм, 1.8 мкм; ПФ: 2 мМ NH ₄ Ac (pH=6.0): CH ₃ CN, 50:50 (об. %), ИЭ, t _R ~ 1.2 мин.	ВЭЖХ-МС/МС ESI(+), MRM: m/z: 394.2→278.0, СЕ 30 эВ ВС: 400.2→284.1, СЕ 30 эВ	5-2000
III Бозентан	Осаждение: 100 мкл ПК + 10 мкл ВС + 400 мкл CH ₃ CN → {ПЦ} → Анализ супернатанта	XBridge, C18, 50 мм×4.6 мм, 3.5 мкм; ПФ: 0.1% МК в воде: 0.1% МК CH ₃ CN, 40:60 (об. %), ИЭ, t _R = 2.7 мин.	ВЭЖХ-МС/МС ESI(+), MRM: m/z: 552.0→202.0, СЕ 35 эВ ВС: 556.2→202.0, СЕ 35 эВ	5-2500
IV Пазопаниб	Осаждение: 100 мкл ПК + 200 мкл CH ₃ CN → {ПЦ} → Анализируют супернатант	XBridge, Waters Phenyl, 50 мм × 4.6 мм, 3.5 мкм; ПФ: А) 0.02% ТФУ в смеси CH ₃ CN : вода, 15:85 (об. %), Б) 0.02% ТФУ в CH ₃ CN ГЭ, t _R ~ 3.6 мин.	ВЭЖХ-УФ (305нм)	1000-60000
V Терифлуно-мид	Осаждение: 200 мкл ПК + 300 мкл CH ₃ CN → {ПЦ} → Анализируют супернатант, смешанный с водой (1:1)	Xbridge C18 4.6×50 мм, 3.5 мкм; ПФ: А) 5 мМ NH ₄ Ac (pH = 6.7) Б) CH ₃ OH : CH ₃ CN, 50:50 (об. %) ГЭ, t _R ~ 5.5 мин.	ВЭЖХ-УФ (295 нм)	25-3000

1	2	3	4	5
VI Леналидо-мид	Осаждение: 50 мкл ПК + 5 мкл ВС + 200 мкл CH ₃ CN → {ПЦ} → Анализируют супернатант, смешанный с водой (1:1)	XBridge Waters, Phenyl, 50 мм × 4.6 мм, 3.5 мкм; ПФ: А) 0.1% CH ₃ COOH в воде, Б) 0.1% CH ₃ COOH в CH ₃ CN, 85:15 (об. %), ИЭ, t _R ~ 3. .	ВЭЖХ-МС/МС ESI(+), MRM: m/z: 260.1 → 149.0, СЕ 5 эВ ВС: 265.1 → 149.0, СЕ 7 эВ	5-800
VII Абиратерон	ЖЖЭ: 200 мкл ПК + 20 мкл ВС + 600 мкл CH ₃ CN → {ПЦ} → 700 мкл супернатанта упаривают досуха, перерастворяют в 100 мкл ПФ	XBridge, Waters, C18, 50 мм × 4.6 мм, 3.5 мкм; ПФ: А) 0.1% CH ₃ COOH в воде Б) 0.1% CH ₃ COOH в CH ₃ CN ГЭ, t _R ~ 6.4 мин.	ВЭЖХ-МС/МС ESI(+), MRM: m/z: 350 → 156.1, СЕ 50 эВ ВС: 357 → 157.0, СЕ 60 эВ	0.5-300
VIII Гефитиниб	ЖЖЭ: 100 мкл ПК + 5 мкл ВС + 550 мкл EtAc → {ПЦ} → 400 мкл супернатанта упаривают досуха, перерастворяют в 100 мкл ПФ	Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 50 мм × 3.0 мм, 2.7 мкм; ПФ: 4 мМ NH ₄ Ac (pH=5.7) : CH ₃ CN, 30:70 (об. %) ИЭ, t _R ~ 0.89 мин.	ВЭЖХ-МС/МС ESI(+), MRM: m/z: 447.2 → 127.8, СЕ 33 эВ ВС: 494.5 → 394.4, СЕ 33 эВ	1-300
IX Эверолимус	ЖЖЭ: 200 мкл цельной крови + 10 мкл ВС + 1 мл смеси этилацетат:гексан (1:1) → {ПЦ} → 400 мкл супернатанта упаривают досуха, растворяют в 100 мкл ПФ	XTerra, Waters C8, 3.0 мм × 50 мм, 3.5 мкм; ПФ: А) 10 мМ NH ₄ Ac + 0.1% CH ₃ COOH в воде, Б) 10 мМ NH ₄ Ac + 0.1% CH ₃ COOH в CH ₃ OH, А : Б = 20:80 (об. %) ИЭ, t _R ~ 1.90 мин.	ВЭЖХ-МС/МС ESI(-), MRM: m/z: 980.6 → 389.2, СЕ 70 эВ ВС: 986.6 → 395.2, СЕ 70 эВ	0.5– 100
X Энтекавир	Фильтрация: 500 мкл ПК + 20 мкл ВС, центрифугируют в центрифужных пробирках, анализируют фильтрат	Zorbax Eclipse Plus C18 50 × 2.1 мм, 1.8 мкм; ПФ: А) 0.1% МК в воде Б) 0.1% МК в CH ₃ CN ГЭ, t _R ~ 0.75 мин.	ВЭЖХ-МС/МС ESI(+), MRM: m/z: 278 → 152.0, СЕ 16 эВ ВС: 282 → 156.0, СЕ 16 эВ	0.2-10

ПФ – подвижная фаза, СЕ – энергия соударений, ВС – внутренний стандарт, t_R – время удерживания, ТФУ – трифторуксусная кислота, МК – муравьиная кислота, ПК – плазма крови, {ПЦ} – перемешивают, центрифугируют, ИЭ – изократическое элюирование, ГЭ – градиентное элюирование.



1260 Infinity с диодно-матричным или масс-спектрометрическим детектированием (Agilent Triple Quad 6420, США). Детали способов подготовки образцов, условия хроматографического разделения и способы детектирования для каждого из соединений I–X указаны в табл. 1.

Обработка результатов. Хроматограммы получали, обрабатывали и хранили в программах MassHunter и ChemStation (версия A.10); для статистической обработки данных и построения графиков использовали ПО Excel (версия 4.1).

Обсуждение результатов

Общая характеристика объектов анализа. Для выявления возможной связи физико-химических свойств ЛС с операциями подготовки проб плазмы крови был проведен критический анализ 60 публикаций, в которых охарактеризованы детали подготовки проб 51 соединения (табл. 2). Данные табл. 2 дополнены сведениями для 10 соединений (I–X), методики анализа которых были разработаны в лабораториях АО «БИОКАД» (Санкт-Петербург). Для всех ЛС в табл. 2 использованы международные непатентованные наименования (МНН).

Основным параметром для отбора публикаций и систематизации данных являлись значения факторов гидрофобности лекарственных веществ. Представленные в таблице 2. соединения отражают широкий диапазон значений $\log P$ (от -11.0 до 7.4). Результаты предварительного рассмотрения данных (для менее представительной выборки) приведены в публикации [8]. Использованный ранее набор данных был расширен и дополнен сведениями, прежде всего, о более гидрофильных соединениях. В результате, в табл. 2 сопоставлены важнейшие условия подготовки проб 61 соединения, для каждого из которых указаны молекулярная масса, расчетное значение $\log P$ (ChemAxon) и степень связывания с белками плазмы (PB,%). Для каждого варианта подготовки проб приведена

ссылка на оригинальную публикацию (если способы подготовки проб отличаются, для некоторых соединений указаны две ссылки); отсутствие ссылки означает характеристику данного лекарственного препарата в АО «БИОКАД». Представленные в табл. 2 соединения различаются по способам применения: 75% рассмотренных препаратов вводят перорально, 16% – внутривенно, азациитидин – подкожно, а колистин – аурикулярно.

Препараты, перечисленные в табл. 2, обладают разной химической природой и относятся к различным фармакологическим группам. Например, *цис*-платин – неорганическое комплексное соединение, а капреомицин – полипептидный антибиотик, относящийся к классу аминокликозидов с аномально низким значением фактора гидрофобности (экспериментальное -9.61, расчетное -11.0), что может объясняться наличием в данном соединении большого числа способных к протонированию свободных аминогрупп. Для нескольких препаратов активным веществом является соль (гидрохлорид эрлотиниба) или гидрат (бозентана моногидрат и леналидомида гемигидрат).

В приведенной выше табл. 1 кратко сопоставлены методики определения 10 соединений (I–X), которые были подготовлены в соответствии с требованиями Совета Евразийской экономической комиссии к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу биологических образцов. Для 8 из 10 указанных ЛС рекомендовано масс-спектрометрическое детектирование, что можно объяснить, во-первых, требованиями к минимизации пределов количественного определения, связанными с низкими значениями уровней терапевтических концентраций этих препаратов в организме человека. Во-вторых, спектрофотометрическое детектирование в ультрафиолетовой области может сопровождаться фоновым влиянием матрицы, минимизировать которое удастся смещением из ближневолнового

Таблица 2. Основные характеристики операций подготовки проб некоторых лекарственных препаратов. Соединения расположены по убыванию расчетных значений $\log P$ (ChemAxon)
 Table 2. Main characteristics of sample preparation operations for some drug products. Compounds are arranged in descending order of calculated $\log P$ values (ChemAxon)

МНН	Мол. масса, Да	$\log P$ (ChemAxon)	РВ, %	Вариант подготовки проб, ссылка
1	2	3	4	5
Эверолимус (IX)	958	7.4	~74%	ЖЖЭ*
Элтромбопаг	443	6.03	~99%	Осаждение; [9]
Аторвастатин	559	5.39	~98%	ЖЖЭ; [10]
Бозентан (III)	552	4.94	~98%	Осаждение*
Дапоксетин	305	4.67	~99%	ЖЖЭ; [11]
Винорелбин	779	4.65	~90%	ЖЖЭ; [12]
Симепревир	750	4.56	~99%	ЖЖЭ; [13]
Лоратадин	383	4.55	99%	ЖЖЭ; [14]
Пиронаридин	518	4.22	~92%	ЖЖЭ; [15]
Натеглинид	317	4.03	~98%	Микро-ЖЖЭ; [16]
Абиратерона ацетат (VII)	392	3.97	~99%	ЖЖЭ*
Хлорохин	320	3.93	~74%	Осаждение; [15]
Гефитиниб (VIII)	447	3.75	~90%	ЖЖЭ*
Кризотиниб	450	3.57	~91%	Осаждение; [17]
Пазопаниб(IV)	438	3.55	~99%	Осаждение*
Микофеноловая кислота	320	3.53	~98%	ЖЖЭ; [18]
Канаглифлозин	444	3.52	~99%	ЖЖЭ; [19]
Артемизинин	298	3.48	~95%	Осаждение; [15]
Оланзапин	312	3.39	~93%	ЖЖЭ; [20]
Асунапревир	748	3.37	~99%	ЖЖЭ; [21]
Бупропион	276	3.27	~85%	ЖЖЭ; [22]
Эрлотиниб	393	3.2	~95%	Осаждение*
Стирипентол	234	3.12	~99%	ЖЖЭ; [23]
				Осаждение; [24]
Диазепам	285	3.08	~98%	ЖЖЭ; [25]
Сунитиниб	398.5	2.93	~95%	ЖЖЭ; [26]
Доцетаксел	808	2.92	~97%	ЖЖЭ; [27]
Флувоксамин	318	2.8	~80%	ЖЖЭ; [28]
Гилтеритиниб	553	2.79	~94%	ТФЭ; [29]
Ретигабин	303	2.7	~80%	ЖЖЭ; [30]
Эсликарбазепина ацетат	296	2.17	~40%	ТФЭ; [51]
Терифлуномид (V)	270	2.14	~99%	Осаждение*
Дапаглифлозин	409	2.11	~91%	ЖЖЭ; [19]
Оксакарбазепин	252	1.82	~40%	ЖЖЭ; [33,34]
Эмпаглифлозин	451	1.66	~86%	ЖЖЭ; [19]
Долутегравир	419	1.1	~99%	Осаждение + ТФЭ; [33]
Доксорубин	544	0.92	~74%	Осаждение; [34]
Монометилфумарат (I)	130	0.34	~40%	Осаждение*
Зонисамид	212	0.11	~40%	ЖЖЭ; [35, 36]
Цисплатин	300	-	~95%	Дериватизация + ЖЖЭ; [37]
Меркаптопурин	152	-0.12	~19%	Осаждение; [38]
Сультам	290	-0.27	~60%	Осаждение; [39]
Диданозин	236	-0.35	~5%	ТФЭ; [40]



1	2	3	4	5
Метронидазол	171	-0.46	~20%	Осаждение; [41]
Изониазид	137	-0.69	~10%	Осаждение; [42]
Леналидомид (VI)	259	-0.71	~30%	Осаждение*
Энтекавир (X)	277	-1.4	~13%	Ультрафильтрация*
Флударабин	285	-1.5	19-29%	Осаждение; [52] Осаждение; [53]
Дроксидопа	213	-2.7	N/A**	Осаждение; [54]
Цитарабин	243	-2.8	~13%	Катионообменная ТФЭ; [43]
Азациитидин	244	-3.1	N/A**	Ионообменная ТФЭ; [44] Осаждение; [45]
Миглитол	207	-3.2	<4.0%	Осаждение; [55] Ионообменная ТФЭ; [56]
Карбоцистеин	179	-3.3	N/A**	Осаждение; [57]
Авибактам	265	-3.6	5.7- 8.2%	Ионообменная ТФЭ; [58]
Имипенем	299	-3.9	20%	Ультрафильтрация; [59]
Тигециклин	585.6	-3.9	~89%	Осаждение; [46]
Цефтазидим	547	-4.1	~10%	Ультрафильтрация; [47]
Меропенем	384	-4.4	~2%	Осаждение; [48,49] ТФЭ; [50]
Окситетрациклин	460	-4.5	N/A**	Осаждение; [60] ТФЭ; [61]
Колистин	1155	-8.1	N/A**	Осаждение; [62]
Паромомицин	615	-8.3	N/A**	Осаждение; [63]
Капреомицин	1321	-11	N/A**	Ион-парная ТФЭ; [64]

*Ссылки не указаны для препаратов, охарактеризованных в АО «БИОКАД»;

**Данные о степени связывания с белками плазмы крови неизвестны.

диапазона в более длинноволновую область спектра, что не всегда возможно из-за значительного снижения интенсивностей сигналов целевых аналитов. Для терифлуномида и пазопаниба максимумы их поглощения приходятся на длинноволновую область спектра (295 и 305 нм, соответственно). В сочетании с отсутствием требований к низким ПКО это позволило разработать методики их определения в плазме крови с использованием ОФ ВЭЖХ-УФ.

Особенности подготовки проб плазмы крови. Анализ 70 методик определения содержания ЛС в плазме крови человека показывает, что чаще всего применяемой операцией подготовки проб является осаждение белков (43%). Только в 14% рас-

считываемых публикаций описано применение ТФЭ для подготовки проб. При этом используют картриджи как с фазой С18, так и с ионообменными наполнителями; ЖЖЭ применяют в 39% определений, что в три раза больше, чем ТФЭ. Это связано с тем, что жидкостная экстракция в сравнении с ТФЭ проще и дешевле. Однако, ЖЖЭ неприменима для гидрофильных ЛС и их метаболитов, если только она не включает предварительную стадию дериватизации определяемых соединений.

Применение ультрафильтрации в качестве способа подготовки проб указано лишь в 4% рассмотренных публикаций. В связи с этим, целесообразно прокомментировать такую характеристику, как сте-

пень связывания лекарственного соединения с белками плазмы крови. Значение этой характеристики устанавливают на ранних стадиях разработки ЛС, в основном, с помощью метода равновесного диализа. Степень связывания с белками выражают как массовую долю связанной фракции ЛС (в процентах). Например, энтакавир связывается с белками плазмы примерно на 13%, что является довольно низким значением, в то время как ацетат абиратерона – более чем на 99%. Для преобладающего большинства синтетических ЛС степень связывания с белками плазмы весьма велика. Депротеинизация образца при помощи ультрацентрифужных фильтров относится к наиболее простым и быстрым способам отделения мешающих компонентов, однако, в отличие от экстракции, не предусматривает диссоциацию белково-препаратных комплексов. Следовательно, механическое удаление белков посредством пропускания образца через полупроницаемую мембрану (с размерами пор около 3 кДа) целесообразно только для тех соединений, степень связывания которых, ориентировочно, не выше 50%, так как в противном случае степени извлечения целевых анализов окажутся неудовлетворительными.

Проверка возможной корреляции степени связывания ЛС с белками плазмы с применением такой операции подготовки проб как осаждение белков показывает, что она незначима. По данным табл. 2 среднее значение степени связывания тех ЛС, для которых подготовка проб включает стадию осаждения белков плазмы, составляет $60 \pm 37\%$, а при отсутствии этой операции – $76 \pm 33\%$. Таким образом, речь идет лишь о слабо выраженной тенденции, которую в дальнейшем можно не принимать во внимание.

Следующим важным параметром, характеризующим свойства определяемого соединения, является фактор гидрофоб-

ности (логарифм коэффициента распределения соединения в гетерофазной системе октанол-вода, $\log P$), который характеризует гидрофобность/липофильность молекулы. Однако экспериментальные значения $\log P$ известны не для всех характеризующих соединений. Их часто заменяют расчетными оценками, полученными, например, с помощью онлайн-платформы ChemAxon (<https://chemicalize.com>). Проверка корректности такого подхода, иллюстрируемая соответствующим графиком, описана в работе [8].

Типичные значения факторов гидрофобности ЛС находятся в диапазоне от -3 (полярные) до 7 (неполярные соединения). Чем больше $\log P$ (5.12 для ацетата абиратерона), тем более эффективна его экстракция органическими растворителями (этилацетат, диэтиловый эфир, метил-*трет*-бутиловый эфир и др.) на стадии ЖЖЭ. Соединения с низкими значениями $\log P$ (например, 0.34 для монометилфумарата и -0.8 для энтакавира) преимущественно остаются в водном слое.

Важным физико-химическим свойством ЛС является их растворимость в воде. Параметр $\log P$ в некоторой степени уже отражает соотношение растворимостей компонента в 1-октанолу и воде. Однако эта связь не так однозначна, так как для определения $\log P$ не требуется насыщения растворов, в то время как растворимость в воде S (моль/л) характеризует насыщенные водные растворы. В работе [10] авторы провели корреляционный анализ дескрипторов $\log P$ и $\log S$ для 839 соединений, что позволило установить существование отрицательной корреляции между ними, правда, с невысоким коэффициентом корреляции $R = -0.78$. Это значение сопоставимо с результатами проверки статистической взаимосвязи факторов гидрофобности и растворимости в нашей работе. Проверка эквивалентности значений факторов гидрофобности и растворимости, иллюстрируемая рис. 1, показывает, что их корреляцию

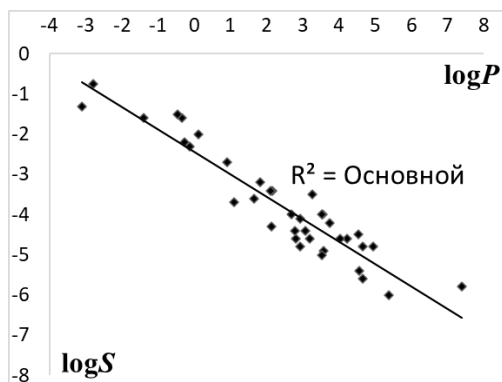


Рис. 1. Корреляция вычисленных значений $\log P$ (ПО ChemAxon) и вычисленных значений факторов растворимости $\log S$ (ПО ALOGPS) ЛС в воде.

Параметры линейной регрессии

$$\log S(\text{ALOGPS}) = a \log P(\text{ChemAxon}) + b:$$

$$a = -0.56 \pm 0.07, b = -2.44 \pm 0.22, R = 0.94, S_0 = 0.46.$$

Fig. 1. Correlation of calculated $\log P$ values (ChemAxon software) and calculated solubility factor $\log S$ values (SW ALOGPS) of DP in water.

описывает уравнение линейной регрессии:

$$\log S(\text{ALOGPS}) = a \log P(\text{ChemAxon}) + b, (1)$$

где $a = -0.56 \pm 0.07$, $b = -2.44 \pm 0.22$, $S_0 = 0.46$, $R = 0.94$. Значения $\log S$, полученные с использованием ПО ALOGPS, представлены на сайте <https://go.drugbank.com/>.

Следовательно, значения $\log P$ и $\log S$ в некотором приближении можно полагать эквивалентными при выборе операции по подготовке проб, однако мы отдаем предпочтение более доступным и более воспроизводимым факторам гидрофобности.

Обработка информации по способам подготовки образцов плазмы крови. Для последующей интерпретации данных и выявления общих закономерностей связи фактора гидрофобности с различными операциями подготовки проб по аналогии с работой [8] мы присвоили им некоторые условные коды (ранги), что делает обработку данных аналогичной ранговой

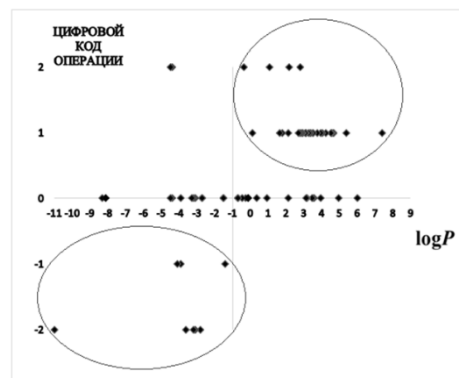


Рис. 2. Корреляция цифровых кодов основных операций подготовки проб (ординаты) при определении содержания ЛС в плазме крови со значениями $\log P$ (абсциссы). Горизонтальная линия соответствует операции осаждения белков (код=0). Относительно вертикальной оси, соответствующей значениям $\log P = -1$, можно выделить два кластера: эллипс в I-м квадранте объединяет точки для гидрофобных соединений, для которых применимы только ТФЭ и ЖЖЭ; эллипс в III-м квадранте объединяет точки для гидрофильных соединений, для которых применимы только операции ультрафильтрации и ионного обмена.

Fig. 2. Correlation of digital codes of the main operations of sample preparation (ordinates) in determining the DP content in blood plasma with $\log P$ values (abscissa).

корреляции Спирмена. Операция осаждения белков по своей сути никак не связана со значениями $\log P$, и поэтому ей целесообразно присвоить код равный нулю. Тогда остальные переменные получают коды: +2 (ТФЭ), +1 (ЖЖЭ), -1 (ультрафильтрация), -2 (ионный обмен), а результаты выявления связи значений $\log P$ и выбранных цифровых кодов в графическом виде представлены на рис. 2.

Из рисунка следует, во-первых, что точки, характеризующие операцию осаждения белков, более или менее равномерно распределены по всему диапазону значений $\log P$ от -8 до +6. Это согласуется с предположением, что применение этой операции подготовки проб не зависит от гидрофобно-гидрофильных свойств аналитов. Во-вторых, так же, как и в работе [8] подтверждено, что два варианта экстракции (ЖЖЭ и ТФЭ) действительно являются наиболее популярными способами подготовки проб, что

обусловлено преимущественно гидрофобным характером характеризуемых ЛС. Соответствующие им семейства точек выделены эллипсом на рис. 2. Доля совместного использования этих способов для нашей выборки составляет 53% от общего числа против 43% процедур подготовки проб с использованием только осаждения белков. Кроме того, закономерно не наблюдается примеров применения операции ионного обмена при значениях $\log P > -1$ (разграничительная вертикальная линия на рисунке соответствует именно этому значению).

Точки, соответствующие применению такой операции как ультрафильтрация локализованы только в III-м квадранте графика на рис. 2 (второй эллипс), что соответствует отрицательным значениям фактора гидрофобности ($\log P < -1$). Как было отмечено ранее, подобный способ подготовки проб применим только для соединений с $PB < 50\%$. Такая взаимосвязь переменных позволяет предположить, что существует связь между гидрофобностью ЛС и степенью их связывания с белками плазмы. На основании данных Табл. 2, получаем следующее уравнение линейной регрессии:

$$PB = a \log P(\text{ChemAxon}) + b, \quad (2)$$

где $a=12.0 \pm 1.7$, $b=47 \pm 6$, $R=0.90$, $S_0=16$. Такой препарат как эверолимус не учитывали, так как его свободная фракция в плазме крови не превышает 15% (на 85% связан с эритроцитами) и, следовательно, определение степени связывания с белками плазмы в этом случае неинформативно.

Значение коэффициента корреляции 0.90 означает, что если данные о PB определяемых соединений неизвестны (7 из 61 соединений в табл. 2), то заключение о применимости ультрафильтрации в качестве способа подготовки проб можно сделать на основании имеющихся значений факторов гидрофобности. При этом значения $\log P$ не влияют на выбор операции осаждения белков; данный способ в равной степени применим для липофильных

и гидрофильных аналитов. Это обусловлено тем, что после отделения надосадочного слоя возможно его прямое дозирование в ВЭЖХ-систему (ацетонитрил и метанол хорошо смешиваются с гидрофильными средами биологических образцов, а также совместимы с элюентами, используемыми в ВЭЖХ). Кроме того, в случае одновременного определения нескольких соединений (ЛС и их метаболитов), данный способ подготовки проб может оказаться единственно возможным в связи с большими различиями в физико-химических свойствах определяемых соединений. Однако при этом часто не удается полностью избавиться от эндогенных компонентов матрицы, что делает проявление матричных эффектов при ВЭЖХ-МС анализе весьма вероятным. В случае необходимости получения более чистых образцов для анализа, снижения пределов обнаружения или повышения степени извлечения и селективности определения предпочтительно использовать распределительный вариант жидкостно-жидкостной экстракции, включающий стадию концентрирования.

Заключение

В результате систематизации литературных данных и обобщения собственного экспериментального опыта по разработке, апробации и валидации биоаналитических методик сформулированы особенности процедур подготовки плазмы крови для ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС анализа лекарственных соединений.

Подтверждено, что выбор такого способа подготовки проб, как осаждение белков, не связан с гидрофобностью ЛС. Наиболее универсальным способом подготовки образцов плазмы крови является осаждение белков органическими растворителями. Наиболее предпочтительным из них оказывается ацетонитрил (его использование позволяет добиться более низких уровней фоновых сигналов, чем при использовании метанола [8]). Ограничением данного способа является



необходимость достижения более низких пределов определений, когда используют ЖЖЭ (для соединений со значениями $\log P > -1$) или ТФЭ. Если же целевые аналиты обладают низкой степенью связывания с белками плазмы, то подходящим способом подготовки проб становится способ ультрафильтрации.

Выявленные особенности процедур подготовки образцов плазмы крови для проведения хроматографического анализа позволяют оптимизировать разработку и валидацию биоаналитических

методик, используемых при проведении клинических исследований и исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/ References

1. Wang W., Liu J., Han Y., Huang W., Wang Q. The Most Convenient and General Approach for Plasma Sample Clean-up: Multifunction Adsorption and Supported Liquid Extraction. *Bioanalysis*. 2012; 4(3); 223-225. <https://doi.org/10.4155/bio.11.332>
2. Kataoka H., Saito K. Recent Advances in SPME Techniques in Biomedical Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011; 54(5); 926-950. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.010>
3. Raju K. Sample Extraction Techniques Used in Bioanalysis: A Review. *J. Global Trends Pharm Sci.* 2020; 11(4): 8552-8557.
4. Vaghela A., Patel A., Vyas A., Pate N. Sample Preparation in Bioanalysis: A Review. *Int. J. Sci. Tech. Research.* 2016; 5(5): 6-10.
5. Clark K.D., Zhang C., Anderson J.L. Sample Preparation for Bioanalytical and Pharmaceutical Analysis. *Anal. Chem.* 2016; 88; 11262-11270. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02935>
6. Chang M.S., Ji Q., Zhang J., El-Shourbagy T.A. Historical Review of Sample Preparation for Chromatographic Bioanalysis: Pros and Cons. *Drug Dev. Res.* 2007; 68(3); 107-133. <https://doi.org/10.1002/ddr.20173>
7. Kosman V.M., Karlina M.V., Pozharickaya O.N. Vliyanie usloviy probopodgotovki i rezhima hromatografirovaniya na uroven' fonovogo

signala pri VEZHKH-UF-analize plazmy krovi. *Vedomosti NCESMP.* 2020; 10(2): 121-128. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-2-121-128>. (In Russ.)

8. Zenkevich I.G., Nikitina D.A., Kushakova A.S. Processing and Interpretation of Analytical Data with a High Degree of Uncertainty. *J. Anal. Chem.* (Russ.). 2022; 77(11): 1016-1031. <https://doi.org/10.1134/S1061934822090143>

9. Yanagimachi N., Obara N., Sakata-Yanagimoto M., Chiba S., Doki K., Homma M. A Simple HPLC Assay for Determining Eltrombopag Concentration in Human Serum. *Biomed. Chromatogr.* 2021; 35(5): e5049. <https://doi.org/10.1002/bmc.5049>.

10. Bahrami G., Mohammadi B., Mirzaeei S., Kiani A. Determination of Atorvastatin in Human Serum by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography with UV Detection. *J. Chromatogr. B.* 2005; 826(1-2): 41-45. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.08.008>

11. Said R., Arafat B., Arafat T. High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometric Bioanalytical Method for the Determination of Dapoxetine in Human Plasma: Application for Bioequivalence Study. *J. Chromatogr. B.* 2020; 1149: 122154. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122154>

12. Qian J., Wang Y., Chang J., Zhang J., Wang J., Hu X. Rapid and Sensitive Determination of Vinorelbine in Human Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and its Pharmacokinetic



- Application. *J. Chromatogr. B.* 2011; 879(9-10): 662-668.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.039>
13. Vanwelkenhuysen I., de Vries R., Timmerman P., Verhaeghe T. Determination of Simeprevir: A Novel, Hepatitis C Protease Inhibitor in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2014; 958: 43-47.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.028>
14. Patel B. N., Sharma N., Sanyal M., Shrivastav P. S. LC-MS-ESI for the Determination of Loratadine and Descarboethoxyloratadine in Human Plasma. *J. Chromatogr. Sci.* 2010; 48(1): 35-44. <https://doi.org/10.1093/chromsci/48.1.35>
15. Casas M., Hansen M., Krogh K., Styriahave B., Björklund E. Analytical Sample Preparation Strategies for the Determination of Antimalarial Drugs in Human Whole Blood, Plasma and Urine. *J. Chromatogr. B.* 2014; 962: 109-131. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.048>
16. Hammad M., Kamal A., Kannouma R., Mansour F. Vortex-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Coupled with Deproteinization for Determination of Nateglinide in Human Plasma Using HPLC/UV. *J. Chromatogr. Sci.* 2021; 59(3): 297-304.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa096>
17. Qiu F., Gu Y., Wang T., Gao Y., Li X., Gao X. Cheng S. Quantification and Pharmacokinetics of Crizotinib in Rats by liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 2016; 30: 962-968.
<https://doi.org/doi.org/10.1002/bmc.3636>
18. Bahrami G., Mohammadi B. An Isocratic High Performance Liquid Chromatographic Method for Quantification of Mycophenolic Acid and its Glucuronide Metabolite in Human Serum Using Liquid–liquid Extraction: Application to Human Pharmacokinetic Studies. *Clinica Chimica Acta.* 2006; 370(1-2): 185-190.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.017>
19. Mabrouk M., Soliman S., El-Agizy H., Mansour F. Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for Determination of three Gliflozins in Human Plasma by HPLC/DAD. *J. Chromatogr. B.* 2020; 1136: 121932. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121932>
20. Aravagiri M., Ames D., Wirshing W.C., Marder S.R. Plasma Level Monitoring of Olanzapine in Patients with Schizophrenia: Determination by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Ther. Drug Monit.* 1997; 19(3): 307-313. <https://doi.org/10.1097/00007691-199706000-00011>
21. Yuan L., Jiang H., Ouyang Z., Xia Y., Zeng J., Peng Q., Lange R., Deng Y., Arnold M., Aubry A. A Rugged and Accurate Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Asunaprevir, an NS3 Protease Inhibitor, in Plasma. *J. Chromatogr. B.* 2013; 921-922: 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.029>
22. Lobo K, Gross A, Ray J, McLachlan A. HPLC Assay for Bupropion and its Major Metabolites in Human Plasma. *J. Chromatogr. B.* 2005; 823(20): 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.009>
23. Takahashi R., Imai K., Yamamoto Y. Determination of Stiripentol in Plasma by High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.* 2015; 41: 643-650. <https://doi.org/10.5649/jjphcs.41.643>
24. Peigné S., Chhun S., Tod M., Rey E., Rodrigues C., Chiron C., Pons G., Jullien V. Population Pharmacokinetics of Stiripentol in Paediatric Patients with Dravet Syndrome Treated with Stiripentol, Valproate and Clobazam Combination Therapy. *Clin. Pharmacokinet.* 2018; 57(6): 739-748. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0592-7>
25. Rouini M., Ardakani Y., Moghaddam K., Solatani F. An Improved HPLC Method for Rapid Quantitation of Diazepam and its Major Metabolites in



- Human Plasma. *Talanta*. 2008; 75(3): 671-676.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.11.060>
26. Minkin P., Zhao M., Chen Z., Ouwerkerk J., Gelderblom H., Baker S.D. Quantification of Sunitinib in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*. 2008; 874(1-2): 84-88.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.007>
27. Wang L, Goh B, Grigg M, Lee S, Khoo Y, Lee H. A Rapid and Sensitive Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for Determination of Docetaxel in Human Plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; 17(14): 1548-1552. <https://doi.org/10.1002/rcm.1091>
28. Bahrami G., Mohammadi B. Rapid and Sensitive Bioanalytical Method for Measurement of Fluvoxamine in Human Serum Using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan as Pre-Column Derivatization Agent: Application to a Human Pharmacokinetic Study. *J. Chromatogr. B*. 2007; 857(2): 322-326.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.07.044>
29. Yasu T., Sugi T., Momo K., Hagihara M., Yasui H. Determination of the Concentration of Gilteritinib in Human Plasma Using HPLC. *Biomed. Chromatogr.* 2021; 35(4): e5028.
<https://doi.org/10.1002/bmc.5028>
30. Perez H., Boram S., Evans C. Development and Validation of a Quantitative Method for Determination of Retigabine and its N-acetyl Metabolite; Overcoming Challenges Associated with Circulating Labile N-glucuronide Metabolites. *Anal. Methods*. 2015; 7(2): 723-735. <https://doi.org/10.1039/C4AY02599G>
31. Mohamed F., Ali M., Marwa F.B., Rageh A., Mostafa A. A Highly Sensitive HPTLC Method for Estimation of Oxcarbazepine in two Binary Mixtures with two Metabolically Related Antiepileptic Drugs: Application to Pharmaceutical and Biological Samples. *Microchem. J.* 2019; 146: 414-422.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.031>
32. Wang L., Wang J., Zhang J., Jiang Q., Zhao L., Zhang T. Simultaneous Determination of Topiramate, Carbamazepine, Oxcarbazepine and its Major Metabolite in Human Plasma by SFC-ESI-MS/MS with Polarity Switching: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Arab. J. Chem.* 2019; 12(8): 4775-4783.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.016>
33. Charbe N., Baldelli S., Cozzi V., Castoldi S., Cattaneo D., Clementi E. Development of an HPLC-UV Assay Method for the Simultaneous Quantification of Nine Antiretroviral Agents in the Plasma of HIV-infected Patients. *J. Pharm. Analysis*. 2016; 6(6): 396-403.
<https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2016.05.008>
34. Dharmalingam S.R., Ramamurthy S., Chidambaram K., Nadaraju S.A Simple HPLC Bioanalytical Method for the Determination of Doxorubicin Hydrochloride in Rat Plasma: Application to Pharmacokinetic Studies. *Tropical J. Pharm. Res.* 2014; 13(3): 409-415.
<https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i3.15>
35. Lourenço D., Sarraguça M., Alves G., Coutinho P., Araujo A., Rodrigues M. A Novel HPLC Method for the Determination of Zonisamide in Human Plasma Using Microextraction by Packed Sorbent Optimised by Experimental Design. *Anal. Methods*. 2017; 9(40): 5910-5919.
<https://doi.org/10.1039/C7AY01912B>
36. Majnooni M.B., Mohammadi B., Jalili R., Bahrami G.H. Rapid and Sensitive High Performance Liquid Chromatographic Determination of Zonisamide in Human Serum Application to a Pharmacokinetic Study. *Indian J. Pharm. Sci.* 2012; 74(4): 360-364. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.107073>
37. Kaushik K., Sripuram V., Bedada S., Reddy N., Priyadarshini G., Devarakonda K. A Simple and Sensitive Validated HPLC Method for Quantitative Determination of Cisplatin in Human Plasma. *Clin. Res. &*



- Reg. Affairs.* 2010; 27(1): 1-6.
<https://doi.org/10.3109/10601330903490462>
38. Naik K., Nandibewoor S. RP-HPLC Method for the Estimation of 6-Mercaptopurine in Spiked Human Plasma and Pharmaceutical Formulations. *J. Anal. Chem.* 2013; 68(12): 1212-1215.
<https://doi.org/10.7868/S0044450213120049>
39. Madej K., Paprotny Ł., Wianowska D., Kasprzyk J., Herman M., Piekoszewski W. A Fully Validated HPLC–UV Method for Determination of Sulthiame in Human Serum/Plasma Samples. *Biomed. Chromatogr.* 2021; 35(3): e5002.
<https://doi.org/10.1002/bmc.5002>
40. Hemasree S., Sumadhuri B., Murthy T. Quantization of Didanosine in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Adv. Pharm. Edu. & Res.* 2013; 3(3): 187-195.
41. Galmier M., Frasey A., Bastide M., Beyssac E., Petit J., Aiache J., Lartigue-Mattei C. Simple and Sensitive Method for Determination of Metronidazole in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B.* 1998; 720(1-2): 239-243.
[https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(98\)00443-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(98)00443-5)
42. DashtBozorg B., Goodarzi A., Fahimi F., Tabarsi P., Shahsavari N., Kobarfard F., Dastan F. Simultaneous Determination of Isoniazid, Pyrazinamide and Rifampin in Human Plasma by High-performance Liquid Chromatography and UV Detection. *Iran J. Pharm. Res.* 2019; 18(4): 1735-1741.
<https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100849>
43. Hilhorst M., Hendriks G., van Hout M., Sillén H., van de Merbel N. HPLC-MS/MS Method for the Determination of Cytarabine in Human Plasma. *Bioanalysis.* 2011; 3(1): 1603-1611.
<https://doi.org/10.4155/bio.11.140>
44. Anders N., Wanjiku T., He P., Azad N., Rudek M. A Robust and Rapid Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Method for the Quantitative analysis of 5-Azacytidine. *Biomed. Chromatogr.* 2016; 30(3): 494-496.
<https://doi.org/10.1002/bmc.3562>
45. Assessment Report for Vidaza (International Nonproprietary Name: Azacytidine). *European Medicines Agency.* 2008; 593162: 1-55.
46. D’Avolio A., Peila E., Simiele M., Pensi D., Baietto L., Cusato J., Cinnirella G., De Rosa F., Di Perri G. Ultra Performance Liquid Chromatography PDA Method for Determination of Tigecycline in Human Plasma. *Therap. Drug Monit.* 2013; 35(6): 853-858.
<https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31829403b1>
47. Bergman J., Harvill L., Hawkins S., Sladky K., Cox S. Determination of Ceftazidime in Plasma by RP-HPLC and Ultraviolet Detection. *Biomed. Chromatogr.* 2021; 35(7): e5104.
<https://doi.org/10.1002/bmc.5104>
48. Dincel D., Sagirli O., Topcu G. A High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Meropenem in Serum. *J. Chromatogr. Sci.* 2020; 58(2): 144-150.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz087>
49. Paal M., Zoller M., Schuster C., Vogeser M., Schütze G. Simultaneous Quantification of Cefepime, Meropenem, Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Linezolid and Piperacillin in Human Serum Using an Isotope-Dilution HPLC–MS/MS Method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 152: 102-110.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.031>
50. Roth T., Fiedler S., Mihai S., Parsch H. Determination of Meropenem Levels in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Biomed Chromatogr.* 2017; 31(5): e3880.
<https://doi.org/10.1002/bmc.3880>
51. Alves G., Figueiredo I., Castelo Branco M., Loureiro A., Fortuna A., Falcão A., Caramona M. Enantioselective HPLC–UV Method for Determination of EslicarbazepineAcetate (BIA 2-093) and its Metabolites in Human Plasma. *Biomed.*



- Chromatogr.* 2007; 21(11): 1127-1134.
<https://doi.org/10.1002/bmc.858>
52. Huang L., Lizaka P., Dvorak C., Aweekaa F., Long-Boylea J. Simultaneous Determination of Fludarabine and Clofarabine in Human Plasma by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B.* 2007; 960(1): 194-199.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.045>
53. Silvertand L. H. H., Vazvaei F., Weigl P., Rosing H., Hillebrand M. J. X., van Maanen M. J., Beijnen J. H. Simultaneous Quantification of Fludarabine and Cyclophosphamide in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; 19(24): 3673-3680.
<https://doi.org/10.1002/rcm.2242>
54. Wang H., Yang G., Zhou J., Pei J., Zhang Q., Song X., Sun Z. Development and Validation of a UPLC-MS/MS Method for Quantitation of Droxidopa in Human Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *J. Chromatogr. B.* 2016; 1027(8): 234-238.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.056>
55. Jain R., Lukram O., Dwivedi A. Ultra-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry Method for the Estimation of Miglitol in Human Plasma using Metformin as the Internal Standard. *Drug Test Anal.* 2011; 3(4): 255-262.
<https://doi.org/10.1002/dta.226>
56. Mizuno-Yasuhira A., Kinoshita K., Jingu Sh., Yamaguchi J. A Sensitive and Selective Method for the Quantitative Analysis of Miglitol in Rat Plasma Using Unique Solid-Phase Extraction Coupled with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 2014; 28(10): 1423-1429.
<https://doi.org/10.1002/bmc.3185>
57. Dhanure Sh., Savalia A., More P., Shirode P., Kapse K. Shah V. Bioanalytical Method for Carbocisteine in Human Plasma by Using LC-MS/MS: A Pharmacokinetic Application. *Sci Pharm.* 2014; 82: 765-776.
<https://doi.org/10.3797/scipharm.1403-12>
58. Sillen H., Mitchell R., Sleight R., Mainwaring G., Catton K., Houghton R., Glendining K. Determination of Avibactam and Ceftazidime in Human Plasma Samples by LC-MS. *Bioanalysis.* 2015; 7(12): 1423-1434. <https://doi.org/10.4155/bio.15.76>
59. Garcia-Capdevila L., Lopez-Calull C., Arroyo C., Moral M.A., Manges M. A., Bonal J. Determination of Imipenem in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography for Pharmacokinetic Studies in Patients. *J. Chromatogr. B.* 1997; 25(692(1)): 127-132.
[https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(96\)00498-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(96)00498-7)
60. Sebaiy M., Hassan W., Elhennawy M. Developing a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Simultaneous Determination of Oxytetracycline, Tinidazole and Esomeprazole in Human Plasma. *J. Chromatogr. Sci.* 2019; 57(8): 724-729.
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz046>
61. Kowalski C., Pomorska M., Sławik T. Development of HPLC with UV-VIS Detection for the Determination of the Level of Oxytetracycline in the Biological Matrix. *J. Liquid Chromatogr. & Related Tech.* 2006; 29(18): 2721-2731.
<https://doi.org/10.1080/10826070600925030>
62. Jansson B., Karvanen M., Cars O., Plachouras D., Friberga L. Quantitative Analysis of Colistin A and Colistin B in Plasma and Culture Medium using a Simple Precipitation Step Followed by LC/MS/MS. *J. Pharm. & Biomed. Anal.* 2009; 49(3): 760-767. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.12.016>
63. Roseboom I., Thijssen B., Rosing H., Mbui J., Beijnen J., Dorlo T. Highly Sensitive UPLC-MS/MS Method for the Quantification of Paromomycin in Human Plasma. *J. Pharm. & Biomed. Anal.* 2020; 185: 1132-1145.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113245>
64. Thuboy B., Kellermann T., Castel S., Norman J., Joubert A., Garcia-Prats A., Hesseling A., Wiesner L. The Determination



of Capreomycin in Human Plasma by LC–MS/MS Using Ion-Pairing Chromatography and Solid-Phase Extraction. *Biomed.*

Chromatogr. 2018; 32(9): e4269.
<https://doi.org/10.1002/bmc.4269>

Информация об авторах / Information about the authors

Д.А. Никитина – аспирант кафедры органической химии, Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета, ведущий химик-аналитик биоаналитического отдела, АО БИОКАД, Санкт-Петербург, Россия

А.С. Кушакова – к.х.н., Руководитель биоаналитического отдела, АО БИОКАД, Санкт-Петербург, Россия

И.Г. Зенкевич – профессор кафедры органической химии, д.х.н., Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

D.A. Nikitina – post-graduate student, Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Saint Petersburg State University, Principal Analytical Chemist, JSC BIOCAD, Saint Petersburg, Russian Federation, e-mail: daryanikitina@me.com

A.S. Kushakova – Ph.D (chemistry), Head of Bioanalytical Division, JSC BIOCAD, Saint Petersburg, Russian Federation

I.G. Zenkevich – Professor, Dr. Sci., Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Saint Petersburg State University, St Petersburg, Russian Federation, e-mail: izenkevich@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 06.09.2022; одобрена после рецензирования 25.11.2022; принята к публикации 01.12.2022.

The article was submitted 06.09.2022; approved after reviewing 25.11.2022; accepted for publication 01.12.2022.