

Применение жидкостной хроматомасс-спектрометрии в доклинических исследованиях лекарственных веществ

Е.Б.Гугля

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований, Москва (директор — проф. А.П.Эттингер)

В обзоре представлен гибридный метод жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС), его основные принципы и роль в доклинических исследованиях новых лекарственных веществ. Рассмотрены три составляющие метода — подготовка проб, жидкостная хроматография и масс-спектрометрическое детектирование — при их использовании в современном биоанализе. Обсуждаются тенденции развития и особенности применения метода при начальном скрининге и последующем доклиническом изучении фармакокинетики лекарственных веществ.

Ключевые слова: ЖХ-МС/МС, биоанализ, доклинические исследования

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Application in Drug Discovery and Preclinical Study

E.B.Guglya

Pirogov Russian National Research Medical University, Institute for Fundamental and Applied Biomedical Research, Moscow (Director — Prof. A.P.Oettinger)

Basic principles of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS) and its role in drug discovery and preclinical studies are reviewed. Three stages and components of the method in modern bioanalysis application are considered — sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. The method trends and features for early drug screening and subsequent preclinical study of pharmacokinetics of drugs are discussed.

Key words: LC-MS/MS, bioanalysis, preclinical study

Создание, исследование и внедрение нового лекарственного вещества (ЛВ), которое начинается синтезом химических соединений и заканчивается выводом ЛВ на рынок, — длительный (около 10–15 лет) и дорогостоящий (до нескольких миллиардов долларов) процесс; только одно из десятков тысяч вновь синтезируемых веществ становится готовым лекарственным средством. Метод жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС), безоговорочный лидер среди инструментальных аналитических методов в медико-биологических областях исследований, используется на всех этапах разработки ЛВ [1]. Цель данного обзора — дать общее представление о современном состоянии и

применении метода ЖХ-МС/МС в биоанализе при доклинических исследованиях новых ЛВ.

Роль биоанализа в доклинических исследованиях лекарственных веществ

Методы ЖХ-МС/МС используются в настоящее время на самых ранних этапах разработки ЛВ, начиная с идентификации белков-мишеней и массового скрининга для определения физико-химических свойств, таких как липофильность, растворимость, ионизируемость, химическая стабильность [2]. После исследований *in vitro* биологической активности, селективности и токсичности нового вещества проводят изучение фармакокинетики *in vitro* (ADME — absorption, distribution, metabolism, excretion — поглощения, распределения, метаболизма, выведения) и ускоренные, так называемые кассетные, фармакокинетические исследования *in vivo*, когда несколько тестируемых веществ вводят в организм животного одновременно. На следующем этапе проводят более подробные исследования токсикологии и фармакокинетики оптимизированной формы ЛВ на разных видах животных (доклинические исследования).

Для корреспонденции:

Гугля Елена Борисовна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Телефон: (495) 434-0232

E-mail: eguglya@gmail.com

Статья поступила 22.01.2014, принята к печати 20.02.2014

Исходными данными для расчета фармакокинетических параметров служат концентрации вещества и/или его метаболита в определенные моменты времени в той или иной биологической среде. При исследованиях *in vitro* проводят анализ культуральной среды, содержащей гепатоциты, микросомы, клетки кишечного эпителия, при исследованиях *in vivo* — анализ биологических жидкостей и тканей организма, прежде всего плазмы крови.

Для обозначения методов определения ЛВ в биопробах в последние годы используют термин «биоанализ». Качественный скачок в биоанализе произошел в 90-х гг. после появления коммерчески доступных жидкостных тандемных хромато-масс-спектрометров, благодаря чему упростилось решение многих задач, связанных с анализом биоматериала [3]. Использование биоанализа во многом определяет теперь общую методологию процесса разработки ЛВ [4]. Рекордные достижения метода — определение и идентификация многих соединений в одном анализе, чувствительность определения до 0,01 нг/мл, продолжительность около 1 мин [5] (при скрининговом анализе одного компонента — около 10 с [6]).

Основные принципы жидкостной хромато-масс-спектрометрии

Появление гибридного метода, сочетающего жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию (разделение ионизированных частиц по величине отношения массы к заряду, m/z), стало возможным после открытия метода ионизации молекул при атмосферном давлении [1]. На основе этого открытия были разработаны устройства-интерфейсы, в которых молекулы вещества-аналита, выходящие из хроматографической колонки, ионизируются в источнике ионов и направляются в анализатор масс, работающий при высоком вакууме (рисунок). Самый распространенный источник ионов — электрораспыление, он представляет собой тонкий капилляр, к которому приложено электростатическое напряжение в несколько киловольт. На выходе капилляра происходит ионизация молекул с образованием положительно и отрицательно заряженных молекулярных ионов, например $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ и других, в том числе многозарядных.

В масс-анализаторе происходит разделение ионов по шкале m/z . В существующих типах анализаторов, среди

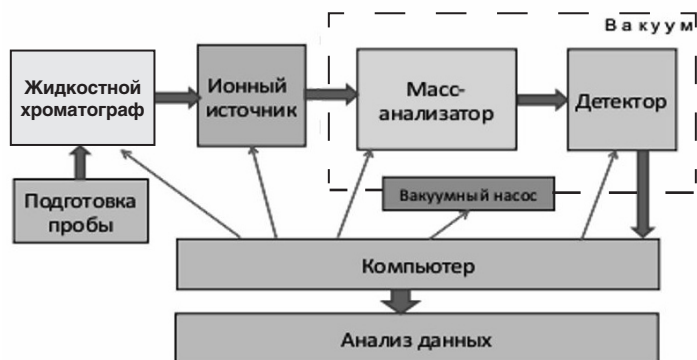


Рисунок. Схема хромато-масс-спектрометрического анализа.

которых наиболее важны для биоанализа квадрупольный (Q), времяпролетный (TOF) и ионная ловушка (IT), разделение ионов происходит в результате различных физических процессов [1, 3]. Детектор преобразует поступающий с масс-анализатора ионный ток в сигнал, пропорциональный количеству ионов с той или иной величиной m/z , и передает его на устройство сбора и обработки информации. Анализатор может работать в режиме регистрации всех поступающих ионов (сканирование) или только одиночных ионов с заранее заданной величиной m/z (регистрация выбранных ионов — SIM, selective ion monitoring), при котором выбранные ионы детектируются с большей чувствительностью, чем при сканировании.

Тандемный масс-спектрометр (МС/МС) отличается тем, что содержит не один, а два последовательно соединенных масс-анализатора, между которыми расположена камера для фрагментации ионизированных молекул. Разделение ионов происходит в обоих анализаторах, т.е. дважды, что позволяет применять специальные режимы регистрации, расширяющие возможности всей системы анализа: 1) сканирование продуктов фрагментации («дочерних» ионов) — ключевой прием для идентификации неизвестных ионов по образовавшимся фрагментам; 2) сканирование ионов-прекурсоров (т.е. ионов, образовавших данный фрагмент) — позволяет по характерному фрагменту выявлять исходные структурно близкие соединения-«родители», например метаболиты; 3) регистрация постоянных нейтральных потерь — используют, когда характеристические фрагменты молекулы нейтральны; 4) мониторинг множественных реакций (MRM, multiple reaction monitoring), выбор оптимизированных пар прекурсор-фрагмент — применяют для количественных определений.

Для биоанализа преимущественно используют тройной квадруполь (два квадруполя и камера соударений, QqQ), квадруполь с ионной ловушкой (Qq-IT), квадруполь и времяпролетный анализатор (Qq-TOF). На протяжении полутора десятка лет золотым стандартом количественного биоанализа считали тандемный хромато-масс-спектрометр типа тройного квадруполя с электрораспылением (HPLC-ESI-QqQ) [7], работающий в режиме MRM. Для идентификации метаболитов использовали режимы сканирования прекурсора или нейтральных потерь.

В последние годы в практику входят приборы нового поколения, соединяющие сверхвысокоэффективные жидкостные хроматографы (СЭЖХ) и тандемные масс-спектрометры высокого разрешения (МСВР) [8]. Высоким считается разрешение, когда отношение массы иона к ширине его спектральной линии на полувысоте больше 10 000. В МСВР можно не только разделить ионы с близкой массой, но и саму массу измерить с точностью до четвертого-пятого знака после запятой, что позволяет определить элементный состав иона.

СЭЖХ обеспечивает ускорение анализа, улучшение его селективности и чувствительности, а МСВР — получение максимума информации в одном анализе, в том числе и без какой-либо предварительной оптимизации режимов работы для целевого вещества, что выгодно отличается от принципов работы тройного квадруполя, где рабочие

параметры необходимо настраивать для каждого анализа. Полная информация обо всех зарегистрированных ионах сохраняется в памяти управляющего компьютера и по окончании анализа может быть востребована и обработана с использованием специальных программ. К настоящему времени в рамках доклинических исследований выполнены уже десятки работ, демонстрирующие возможности МСВР для количественного анализа и одновременного получения необходимой информации для идентификации метаболитов [9].

Особенности масс-спектрометрического анализа биологических проб

На схеме (см. рисунок) могут быть выделены три последовательных этапа метода: подготовка пробы (включенная в единую конструкцию аналитической системы или выполняемая независимо), хроматография и масс-спектрометрия. Все три составляющие взаимосвязаны и одинаково важны; на оптимизацию условий одного из них оказывают влияние другие. Основные критерии, согласно которым происходит развитие биоанализа: высокая производительность, высокая чувствительность и селективность [10]. Эти требования продиктованы необходимостью анализировать большое количество проб и определять очень низкие содержания ЛВ в сложных биологических матрицах. Рассмотрим подробнее, каким образом решаются эти задачи.

Подготовка пробы. Исходные биологические пробы не пригодны для прямого инструментального анализа. Существуют три основных способа подготовки пробы перед вводом в хроматографическую систему: 1) осаждение белков; 2) жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ); 3) твердофазная экстракция (ТФЭ). Способ осаждения белков — денатурация под действием органического растворителя — универсален и прост. В рутинных анализах он используется чаще всего, так как в большинстве случаев дает удовлетворительные результаты, однако проба содержит еще большое число эндогенных соединений (соли, фосфолипиды и другие), осложняющих последующее масс-спектрометрическое измерение. ЖЖЭ, основанная на распределении молекул между несмешивающимися жидкостями, и ТФЭ, основанная на адсорбции в хроматографическом режиме, дают более чистый экстракт, однако они более трудоемки и длительны. Дополнительное преимущество методов экстракции — возможное повышение концентрации аналита на порядок.

На основе трех перечисленных способов созданы и развиваются различные варианты подготовки проб для биоанализа [11]. Как правило, пробоподготовка — самое медленное звено анализа, если используются ручные операции. На увеличение ее производительности направлены значительные усилия, причем сразу по трем направлениям: 1) роботизированное дозирование жидкости; 2) многолуночные (число лунок 96, 384, 1536) планшеты и 3) ввод пробы онлайн непосредственно в блок дозирования хроматографа. Первые два варианта часто применяют совместно.

Роботизированные устройства заменяют человека на операциях подготовки калибровочных проб и проб для

контроля качества анализа, при вводе внутреннего стандарта и собственно дозировании растворителя для извлечения вещества [12].

Многолуночные планшеты заменяют последовательную работу с каждой пробой (в пробирке или на сорбционном картридже) на одновременную обработку многих проб, причем и при ручном дозировании, и при роботизированном. Коммерчески доступны планшеты с самым широким набором свойств [13]. Современные планшеты очень экономичны: лунка, содержащая не более 2 мг сорбента, может быть использована для нанесения около 0,5 мл пробы, для экстракции с сорбента достаточно около 50 мкл растворителя. Завоевывает популярность жидкостная экстракция на носителе (SLE — supported liquid extraction) [14]. Метод реализуется на планшетах, заполненных пористым инертным наполнителем, на который дозируется проба, после чего целевые вещества смываются несмешивающимся растворителем-экстрагентом. По сравнению с обычной ЖЖЭ процесс отличается повышенной производительностью.

В особых случаях приходится сочетать несколько различных способов пробоподготовки, чтобы достичь желаемых показателей качества анализа, чаще всего это осаждение белков и ТФЭ, как в недавно опубликованной работе [15].

В доклинических исследованиях, когда эксперименты проводят на мелких животных, очень важно предусмотреть возможность работы с пробами малого объема. Большое количество новых технологий для миниатюризации пробоподготовки приведено в обзоре [16]. Входят в практику биоанализа такие варианты, как твердофазная микроэкстракция (сорбция на внешней поверхности иглы дозирующего шприца, в том числе в анализах *in vivo*), микроэкстракция в заполненных сорбентом шприцах автоматических дозаторов хроматографа (MEPS), сорбция в заполненных наконечниках автоматических пипеток и другие. Хорошие результаты получены при отборе проб крови объемом менее 10 мкл на стеклянные капилляры с последующим осаждением белка и фильтрацией на 96-луночных планшетах [17].

Другой подход к ускорению подготовки проб — ввод пробы онлайн на короткую колонку (картридж), которая встроена в блок ввода пробы хроматографа [18, 19]. В данном случае высокая степень очистки, свойственная методам ТФЭ, сочетается с полной автоматизацией процесса, который происходит в единой инструментальной системе. Выбор сорбентов для картриджей очень широк — практически весь набор, используемый для аналитических хроматографических колонок. Очень эффективно применение сорбента с крупным размером зерен в режиме турбулентной хроматографии [20] и сорбента типа RAM (restricted access material) с неоднородной структурой пористости [6]. В обоих случаях механизм разделения сходен с эксклюзионным, при котором малые молекулы ЛВ удерживаются сорбентом, а белковые компоненты пробы «проскакивают» и смываются. Преимущества методов онлайн — ограничение человеческого фактора, что означает лучшую воспроизводимость и безопасность работы (нет контакта оператора с матрицей) при большой скорости,

высокой степени концентрирования и сравнительно низкой стоимости. Недостаток — необходимость дополнительного оборудования для реализации процесса.

Отбор проб крови методом сухого пятна (DBS — dried blood spot) давно применяют в клинических исследованиях. Он менее травматичен, так как позволяет отбирать пробы минимального объема (микролитры), удобен для хранения и транспортировки проб и реализован как полностью автоматизированный онлайн-вариант. Метод с успехом применен в скрининговых исследованиях на крысах при кассетном дозировании нескольких веществ [21] и при стандартном исследовании фармакокинетики на крысах, как часть валидированной методики [22].

Часто для установления фармакокинетического профиля нового ЛВ необходимо измерять его содержание не только в плазме, но и в культуральных средах, в моче и тканях; в каждом случае приходится решать специфические задачи. Например, при подготовке к анализу среды, содержащей клетки, возникала необходимость повысить степень извлечения [23]; моча требует тщательной подготовки, так как содержит большое число различных метаболитов; анализ тканей осложняется прежде всего трудностью процедур отбора представительной пробы и экстракции целевых веществ из гомогената [24].

Хроматография. После первичной очистки проба все еще содержит много сопутствующих эндогенных веществ, которые могут помешать масс-спектрометрическому анализу, взаимодействуя с целевыми компонентами. Дальнейшее отделение последних происходит на хроматографических аналитических колонках. Селективность разделения зависит от химической природы сорбента, заполняющего колонку, и состава элюента; эффективность разделения также зависит от свойств сорбента (размера зерна, структуры пористости сорбента, геометрии колонки) и элюента (вязкости) и от температуры колонки. С теорией и практикой современной жидкостной хроматографии можно познакомиться в классической монографии [25].

Стандартный размер зерна для колонок высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) — 5 или 3 мкм. Применяют также структуры с неоднородной пористостью — поверхностно-пористые сорбенты и монокристаллические фазы, которые обладают повышенной сорбционной емкостью, высокой эффективностью при одновременном снижении противодавления и поэтому находят широкое применение в быстром биоанализе [26].

Использование все более мелких частиц в сорбционных колонках — известный общий прием ускорения анализа и повышения его эффективности. Последние достижения в технологии сорбентов позволяют получать сорбенты с частицами 1,7 мкм. Время анализа, требуемое для заданной степени разделения компонентов, при прочих равных условиях, уменьшается обратно пропорционально квадрату размера частиц сорбента. Однако ввиду мелкого размера частиц возрастает величина противодавления; для преодоления сопротивления потоку необходима система подачи растворителя с рабочими давлениями более 1000 атм (типичное максимальное значение для ВЭЖХ 400 атм). Хроматографию при таких высоких давлениях, для которой характерны повышенные скорость потока и

эффективность разделения, назвали сверхвысокоэффективной (СЭЖХ, или UPLC — ultra high performance chromatography). За счет повышения эффективности (уменьшения ширины пика) увеличивается чувствительность и разрешающая способность в анализах [26]. В настоящее время масс-спектрометры нового поколения реализуются только в комбинации с СЭЖХ.

Несмотря на химическое разнообразие сорбентов, самым популярным вариантом остаются неполярные, или обращенные, фазы на основе силикагеля с химически привитыми углеводородными (C18, C8, C2) и с другими группами, а также полимерные сорбенты. Однако многие ЛВ полярны, плохо удерживаются неполярной обращенной фазой даже при «слабом» элюенте с большим содержанием воды. В результате целевые аналиты не удается хорошо отделить от фона матрицы, а слишком большой процент воды в элюенте плохо сказывается на ионизации молекул при электрораспылении, что снижает чувствительность анализа.

Решением проблемы стали полярные сорбенты на основе силикагеля с другим механизмом удерживания, типа HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography), сочетающие хорошее разделение полярных соединений с высокой эффективностью и небольшим противодавлением [27]. На таких колонках возможно увеличение скорости анализа даже без насосов высокого давления для СЭЖХ. Целевые компоненты удерживаются сильнее и смещаются в область, свободную от фоновых веществ [28]. Характеристики удерживания сорбентов HILIC «ортогональны» обычной обращенной фазе, поэтому последовательное сочетание двух разделительных систем (стандартный прием хроматографии) дает прекрасную селективность при разделении сложных смесей, когда не удается получить разделение на одной колонке [19].

Чтобы максимально увеличить скорость биоанализа, предлагается вариант анализа без хроматографической колонки (ТФЭ–МС), т.е. совмещение хроматографии и пробоподготовки на одной короткой колонке; при этом продолжительность анализа можно снизить в 10–20 раз [29]. Для скрининговых исследований ADME качество анализа удовлетворительное, результаты хорошо согласуются с традиционными вариантами. Совершенствование метода, как надеются авторы, позволит распространить его на исследования фармакокинетики *in vivo*.

Масс-спектрометрия биологических проб и матричный эффект. Повышению производительности и качества биоанализов препятствует матричный эффект (МЭ). В классическом определении это изменение эффективности ионизации аналита под влиянием сопутствующих компонентов матрицы (белки, фосфолипиды, соли и др.). На него обратили внимание, когда ради ускорения анализа стали применять короткие хроматографические колонки и крутые градиенты состава элюента. Оказалось, что быстрая хроматография ухудшает основные показатели количественного анализа — прецизионность и воспроизводимость. Позднее стало ясно, что на степень ионизации аналитов влияют не только эндогенные вещества, но и вносимые реагенты (для сохранности пробы) и загрязняющие примеси (материал дозатора). На результаты

масс-детектирования влияют и другие причины: гемолиз и «старение» пробы, изменение степени извлечения под влиянием других компонентов, интерференция других ионов с той же целочисленной массой [30, 31].

Стало очевидным, что следует или преодолевать МЭ, или его учитывать [32]. По результатам многочисленных экспериментов выработано правило контролировать МЭ использованием разных образцов «чистой» матрицы, сравнением степени извлечения аналита и внутреннего стандарта — соединения близкой структуры или того же соединения, меченного стабильным изотопом. Полностью оценить МЭ можно только на реальных пробах (влияние гемолиза, посторонних примесей, вносимых при отборе проб, изменение состава матрицы, связанное с питанием животного или человека и т.п.).

Главные способы преодоления МЭ направлены на отделение целевых компонентов от фоновых путем эффективной предварительной очистки или выбора надлежащих условий хроматографирования; еще один совсем простой способ — разбавление пробы в тех случаях, когда это возможно [33].

Требования к методам анализа на разных стадиях доклинических исследований

Требования к методу количественного анализа биологических проб различаются в зависимости от решаемых задач (таблица) [1].

Методы для скрининговых исследований. На стадиях высокопроизводительного скрининга потенциальных ЛВ, включая тесты на метаболическую стабильность, ингибирование ферментов, проницаемость и другие, необходим анализ большого числа образцов (порядка сотни в день). Требуется экспрессный, достаточно селективный метод для параллельного анализа в одной пробе многих, не обязательно родственных соединений, при этом жестких требований к количественному определению нет. Такого типа анализы очень привлекательны для максимальной автоматизации как при разработке метода (автоматизация выбора условий), так и при проведении длинных серий массовых анализов и обработке их результатов. Указанным требованиям удовлетворяют полностью автоматизированные системы, использующие онлайн ТФЭ, с общей продолжительностью анализа около 1 мин и менее, что позволяет проводить различные исследования *in vitro* с максимальной производительностью [5, 29].

Кроме автоматизации анализа, повышения производительности можно достичь путем параллельного проведения анализов — мультиплексной хроматографии, хорошо

согласующейся с параллельной подготовкой проб в 96-луночных планшетах [4]. Принцип мультиплексирования реализуется параллельным дозированием проб на несколько колонок с выходом на масс-спектрометр, обрабатывающий несколько каналов последовательно. Усовершенствованная система ввода проб для мультиплексной хроматографии была применена для скрининговых анализов ADME *in vitro* [34].

Для снижения затрат и увеличения производительности исследования фармакокинетические испытания *in vivo* начинают с ускоренного кассетного скрининга на крысах. При использовании такого «дозирования *n* в одном» в анализируемой пробе содержатся несколько тестируемых веществ и еще большее число их метаболитов, поэтому основное требование к методу анализа — селективность, достаточная для разделения и определения всех компонентов. Сравнение результатов анализа с использованием изотопно меченного внутреннего стандарта при кассетном дозировании 4 моноклональных антител и при их дискретном вводе подтвердило достаточную селективность метода [35].

Валидированные количественные методы. На поздних этапах доклинических исследований для расчета параметров фармакокинетики нужен инструмент точного определения концентраций — полностью валидированный метод. При этом весь лабораторный процесс необходимо организовать с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики (GLP): оборудование должно быть сертифицировано, качество реагентов подтверждено, после приема образца на исследование ему должен быть присвоен уникальный идентификационный номер, все манипуляции при проведении анализа описаны как стандартные операции и выполнение их проконтролировано и т.д.

Валидация — это подтверждение заявленных характеристик: селективности, чувствительности, линейности, воспроизводимости, прецизионности, стабильности аналита, сохранности его при разбавлении, ограничение матричного эффекта и переноса вещества, которые должны удовлетворять регламентным критериям [36]. Так, воспроизводимость, прецизионность, изменение концентрации в тестах на стабильность не должны превышать 15% измеряемой величины. При изменении анализируемой матрицы (плазма, моча, слюна, ткань мозга и т.д.), вида животных, типа используемого оборудования метод нельзя переносить автоматически, необходимо проведение частичной валидации. Методы, разработанные на этапах скрининга, использовать напрямую нельзя, но их можно совершенствовать. Методы, прошедшие валидацию для доклинических испытаний, как правило, далее используют

Таблица. Требования к биоаналитическим методам		
Требования к методу	Скрининговые исследования	Доклинические исследования
Разработка условий	Автоматизированный метод, пригодный для быстрого анализа разных веществ, в том числе многокомпонентного анализа	Оптимизация условий для каждого аналита, каждой матрицы и вида животного. Автоматизация возможна, но не обязательна
Валидация	Частичная валидация	Обязательная полная валидация
Число проб	Несколько проб для каждого вещества, тысячи веществ в одном проекте	Среднее число проб для десятков веществ в одном проекте

и в фазе клинических испытаний, но тоже после повторной частичной валидации.

Предложены обобщенные подходы для разработки методов с их последующей валидацией [37]. Рекомендована определенная последовательность действий: 1) выбор условий подготовки пробы и анализа с учетом физико-химических свойств и метаболизма вещества; 2) предварительное изучение стабильности с использованием пробы контроля качества (QC) и реальных проб для оценки условий отбора, хранения и выполнения методики; 3) предварительная валидация для оценки только показателей прецизионности и воспроизводимости на реальных пробах; 4) полная валидация для подтверждения показателей, полученных при разработке метода. Эффективность такого подхода была подтверждена успешностью валидаций методов, разработанных по этому алгоритму.

Количество опубликованных валидированных методов для изучения фармакокинетики измеряется тысячами, в подавляющем числе случаев использованы масс-спектрометры типа тройного квадруполя. Однако в научных публикациях уже представлено и около десятка валидированных методов с использованием масс-спектрометров высокого разрешения. Среди хроматографических систем преимущество также у традиционного варианта ВЭЖХ, но СЭЖХ используют все чаще; за последние 5 лет опубликовано порядка ста валидированных методов для фармакокинетических исследований. В одной из недавних работ описан метод, соединивший несколько самых последних технологий: отбор микродозы (кровь крысы объемом 1,25 мкл) по технологии сухого пятна, автоматическую экстракцию в режиме онлайн, двумерную хроматографию и детектирование МСВР [22]. Метод удовлетворяет всем регламентным требованиям и был использован для получения на крысах фармакокинетических параметров двух новых ЛВ.

Методы изучения метаболизма. Кроме задач количественного анализа важная часть исследований при разработке ЛВ связана с идентификацией молекул при изучении метаболизма сначала на клеточных моделях *in vitro*, а затем и *in vivo*. Можно выделить три типа подобных задач: 1) установление путей метаболических превращений при идентификации циркулирующих метаболитов; 2) изучение фармакокинетики вещества-метаболита путем количественного определения и 3) идентификация реакционно-способных метаболитов, играющих особую роль медиаторов и потенциальных токсикантов.

Показано, что для идентификации неизвестных соединений масс-спектрометры низкого разрешения не вполне пригодны: исследование трудоемко и продолжительно и часто дает ложноположительные результаты [38]. Поэтому в настоящее время с этой целью используют МСВР, прежде всего типа Qq-TOF, которые уже в режиме сканирования позволяют с высокой вероятностью определять элементный состав ионов по измеренной с высокой точностью массе. Описание методологии идентификации молекул и используемых для этого разнообразных режимов работы тандемных МСВР, сочетающих сканирование в первом анализаторе и фрагментацию во втором, может быть предметом отдельного обзора. Интересующихся отсылаем к работе [39]; здесь их кратко перечислим. В первой группе

режимов работы — фрагментация ионов в зависимости от текущих данных сканирования в первом масс-анализаторе по одному из критериев: 1) интенсивность иона; 2) точная величина массы; 3) изотопное распределение; 4) величина псевдо-нейтральных потерь массы; 5) величина дефекта масс. Во второй — фрагментация всех ионов без каких-либо предварительных условий: 1) фрагментация при двух (низкой и высокой) энергиях соударений; 2) полная фрагментация в режиме SWATH — при разбиении всего диапазона масс на узкие интервалы.

При обработке большого массива данных, полученных МСВР, с помощью специальных программ выявляют те ионы, что соответствуют сдвигу массы молекулярного иона на определенную величину, задаваемую той или иной метаболической реакцией. Кроме информации о молекулярных ионах в том же анализе получают сведения о фрагментации избранных или всех молекулярных ионов в диапазоне сканирования в зависимости от режима работы масс-спектрометра. Обработка совокупности данных даже одного анализа может решить сложную задачу установления путей метаболического превращения вещества.

Заключение

Представленный краткий обзор публикаций последних 5 лет показывает современное состояние и тенденции развития в биоанализе универсального инструментального метода жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии. Высокая производительность, чувствительность и селективность метода во многом способствуют прогрессу различных биомедицинских технологий, в том числе доклинических исследований новых лекарственных веществ, определяя успешность таких направлений, как массовый скрининг *in vitro* и *in vivo*, установление метаболизма новых лекарственных веществ, количественные определения лекарственных веществ при низких концентрациях для расчета фармакокинетических параметров.

Литература

1. Ramanathan D.M., LeLacheur R.M. Evolving role of mass spectrometry in drug discovery and development // *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics* / Ed. by R.Ramanathan. NY: John Wiley & Sons, 2009. P.1–85.
2. Gillespie T.A., Winger B.E. Mass spectrometry for small molecule pharmaceutical product development: a review // *Mass Spectrom Rev.* 2011. V.3 (3). P.479–490.
3. Kang J.S. Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples // *Tandem Mass Spectrometry — Applications and Principles* / Ed. By J.K.Prasain [Electronic resource]. INTECH [Official website]. URL: <http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-and-principles> (accessed: 12.07.2013).
4. Shou W.Z., Zhang J. Recent development in high-throughput bioanalytical support for *in vitro* ADMET profiling // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010. V.6 (3). P.321–336.
5. Wu X., Wang J., Tan L. et al. *In vitro* ADME profiling using high-throughput rapidfire mass spectrometry: cytochrome p450 inhibition and metabolic stability assays // *J Biomol Screen.* 2012. V.17 (6). P.761–772.

6. Schebb N.H., Inceoglu B., Rose T. et al. Development of an ultra fast online-solid phase extraction (SPE) liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) based approach for the determination of drugs in pharmacokinetic studies // *Anal Methods*. 2011. V.3 (2). P.420–428.
7. Чернецова Е.С., Корякова А.Г. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией для исследования новых лекарственных веществ // *Масс-спектрометрия*. 2010. Т.7. №2. С.101–112.
8. Ding X., Ghobarah H., Zhang X. et al. High-throughput liquid chromatography/mass spectrometry method for the quantitation of small molecules using accurate mass technologies in supporting discovery drug screening // *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2013. V.27 (3). P.401–408.
9. Ramanathan R., Jemal M., Ramagiri S. et al. It is time for a paradigm shift in drug discovery bioanalysis: from SRM to HRMS // *J Mass Spectrom*. 2011. V.46 (6). P.595–601.
10. Zhou M. Competitiveness of Bioanalytical Laboratories — technical and regulatory perspectives // *Regulated Bioanalytical Laboratories. Technical and Regulatory Aspects from Global Perspectives*. NY: John Wiley & Sons, 2011. P.229–296.
11. Singleton C. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC-MS analysis // *Bioanalysis*. 2012. V.4 (9). P.1123–1140.
12. Kong F., Yuan L., Zheng Y.F., Chen W. Automatic liquid handling for life science: a critical review of the current state of the art // *J Lab Autom*. 2012. V.17 (3). P.169–185.
13. Решения для подготовки образцов и хроматографии для количественного биоанализа [Электронный ресурс] // Waters Corporation [Official website]. URL: http://www.waters.com/waters/library.htm?locale=ru_RU&lid=134621334 (дата обращения: 15.01.2014).
14. Zhang Y., Cao H., Jiang H. Supported liquid extraction versus liquid-liquid extraction for sample preparation in LC-MS/MS-based bioanalysis // *Bioanalysis*. 2013. V.5 (3). P.285–288.
15. Vičková H., Janák J., Gottvald T. et al. How to address the sample preparation of hydrophilic compounds: Determination of entecavir in plasma and plasma ultrafiltrate with novel extraction sorbents // *J Pharm Biomed Anal*. 2014. №88. P.337–344.
16. Namera A., Saito T. Recent advances in unique sample preparation techniques for bioanalysis // *Bioanalysis*. 2013. V.5 (8). P.915–932.
17. Spreadborough M.J., Day J., Jackson-Addie K., Wilson A. Bioanalytical implementation of plasma capillary microsampling: small hurdles, large gains // *Bioanalysis*. 2013. V.5 (12). P.1485–1489.
18. Jian W., Romm M.V., Edom R.W. et al. Evaluation of a high-throughput online solid phase extraction-tandem mass spectrometry system for in vivo bioanalytical studies // *Anal Chem*. 2011. V.83 (21). P.8259–8266.
19. Zeng M., Zhang J., Yang Y. et al. An automated dual-gradient liquid chromatography-MS/MS method for the simultaneous determination of ferulic acid, ligustrazine and ligustilide in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study // *J Pharm Biomed Anal*. 2014. V.88. P.354–363.
20. Couchman L. Turbulent flow chromatography in bioanalysis: a review // *Biomed Chromatogr*. 2012. V.26 (8). P.892–905.
21. Liang X., Yang L., Berezhevskiy L. et al. Evaluation of dried blood spot sampling following cassette dosing in drug discovery // *Bioanalysis*. 2011. V.3 (20). P.2291–2302.
22. Oliveira R.V., Henion J., Wickremsinhe E. Fully-automated approach for online dried blood spot extraction and bioanalysis by two-dimensional-liquid chromatography coupled with high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *Anal Chem*. 2014. V.86 (2). P.1246–1253.
23. Cai X., Walker A., Cheng C. et al. Approach to improve compound recovery in a high-throughput Caco-2 permeability assay supported by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J Pharm Sci*. 2012. V.101 (8). P.2755–2762.
24. Ramesh Varkhede N., Jhajra S., Suresh Ahire D., Singh S. Metabolite identification studies on amiodarone in in vitro (rat liver microsomes, rat and human liver S9 fractions) and in vivo (rat feces, urine, plasma) matrices by using liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry and multiple-stage mass spectrometry: characterization of the diquinone metabolite supposedly responsible for the drug's hepatotoxicity // *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2014. V.28 (4). P.311–331.
25. Introduction to modern liquid chromatography / Ed. by L.R.Snyder, J.J.Kirkland. New Jersey: Wiley, 2010.
26. Núñez O., Gallart-Ayala H., Martins C.P. et al. State-of-the-art in fast liquid chromatography-mass spectrometry for bio-analytical applications // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013. V.927. P.3–21.
27. Jian W., Edom R.W., Xu Y., Weng N. Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis // *J Sep Sci*. 2010. V.33 (6–7). P.681–697.
28. Havlíková L., Vičková H., Solich P., Nováková L. HILIC UHPLC-MS/MS for fast and sensitive bioanalysis: accounting for matrix effects in method development // *Bioanalysis*. 2013. V.5 (19). P.2345–2357.
29. Miller V.P. SPE-MS analysis of absorption, distribution, metabolism and excretion assays: a tool to increase throughput and streamline workflow // *Bioanalysis*. 2012. V.4 (9). P.1111–1121.
30. Van de Merbel N.C., de Vries R. Aging of biological matrices and its effect on bioanalytical method performance // *Bioanalysis*. 2013. V.5 (19). P.2393–2407.
31. Li F., Ewles M., Pelzer M. et al. Case studies: the impact of nonanalyte components on LC-MS/MS-based bioanalysis: strategies for identifying and overcoming matrix effects // *Bioanalysis*. 2013. V.5 (19). P.2409–2441.
32. Van Eeckhaut A., Lanckmans K., Sarre S. et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009. V.877 (23). P.2198–2207.
33. Ye Z., Tsao H., Gao H., Brummel C.L. Minimizing matrix effects while preserving throughput in LC-MS/MS bioanalysis // *Bioanalysis*. 2011. V.3 (14). P.1587–1601.
34. Zhang J., Vath M., Ferraro C. et al. A high-speed liquid chromatography/tandem mass spectrometry platform using multiplexed multiple-injection chromatography controlled by single software and its application in discovery ADME screening // *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2013. V.27 (7). P.731–737.
35. Li H., Ortiz R., Tran L.T. et al. Simultaneous analysis of multiple monoclonal antibody biotherapeutics by LC-MS/MS method in rat plasma following cassette-dosing // *AAPS J*. 2013. V.15 (2). P.337–346.
36. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. Concept Paper // *Recommendations on the Need for a (CHMP) Guideline on the Validation of Bioanalytical Methods*. London, UK: European Medicines Agency, 2008.
37. Xue Y.J., Melo B., Vallejo M. et al. An integrated bioanalytical method development and validation approach: case studies // *Biomed Chromatogr*. 2012. V.26 (10). P.1215–1227.
38. Rousu T., Herttuainen J., Tolonen A. Comparison of triple quadrupole, hybrid linear ion trap triple quadrupole, time-of-flight and LTQ-Orbitrap mass spectrometers in drug discovery phase metabolite screening and identification in vitro — amitriptyline and verapamil as model compounds // *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010. V.24 (7). P.939–957.
39. Ma S., Chowdhury S.K. Data acquisition and data mining techniques for metabolite identification using LC coupled to high-resolution MS // *Bioanalysis*. 2013. V.5 (10). P.1285–1297.