

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
РИЛИЗИНГ-ГОРМОНА ГОНАДОТРОПИНА И ЕГО АНАЛОГОВ
В ЦЕЛЯХ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ**

К.М. Шестакова, Г.А. Дудко, М.А. Дикунец[@]

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Антидопинговый Центр»,
Москва, 105005 Россия*

[@]Автор для переписки, e-mail: dikunets@yandex.ru

В настоящей работе представлена методика быстрого, чувствительного и селективного определения ряда синтетических аналогов релизинг-гормона гонадотропина в моче человека с использованием твердофазной экстракции и сверхпроизводительной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС/МС). Определены и оптимизированы параметры, влияющие на пробоподготовку, хроматографическое разделение и МС/МС-детектирование. Последнее проводили в условиях электро-распылительной ионизации с регистрацией положительно заряженных ионов в режиме мониторинга выбранных реакций. Для количественной оценки концентраций соединений в качестве внутреннего стандарта использовали леупролид-¹³C₆. Предложенная методика была валидирована с учетом параметров специфичности, линейности (0.1–10 нг/мл), степени извлечения (52–98%), предела обнаружения (0.1 нг/мл), матричного эффекта и стабильности.

Ключевые слова: *релизинг-гормон гонадотропина, агонисты релизинг-гормона гонадотропина, твердофазная экстракция, сверхпроизводительная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, СВЭЖХ-МС/МС, сверхпроизводительная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения, СВЭЖХ-МСВР, допинг-контроль.*

**DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE FOR THE MASS-SPECTROMETRIC
DETERMINATION OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE
AND ITS ANALOGS FOR DOPING CONTROL**

K.M. Shestakova, G.A. Dudko, M.A. Dikunets

Federal State Budgetary Institution “Antidoping Centre”, Moscow, 105005 Russia

[@]Corresponding author e-mail: dikunets@yandex.ru

In the present study, a rapid, sensitive, and selective method for determination of several synthetic analogues of gonadotropin-releasing hormone in human urine by solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed. Various parameters affecting sample preparation, LC separation, and MS/MS detection were investigated, and optimized conditions were identified. The UPLC-MS/MS system was equipped with an electrospray ion source operating in positive ion mode with selected reaction monitoring. Leuprolide-¹³C₆ was used as internal standard for analytes quantitative assessment. The proposed method was validated considering the parameters specificity, linearity (0.1–10 ng/ml), recovery (52–98%), limit of detection (0.1 ng/ml), matrix effects and stability.

Keywords: *gonadotropin-releasing hormone, gonadotropin-releasing hormone agonists, solid-phase egonadotropin-releasing hormon, gonadotropin-releasing hormon agonists, solid-phase extraction, ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS, ultra-performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, UPLC-HRMS, doping control.*

Введение

Анаболические стероиды (АС) относятся к наиболее эффективному и доступному классу допинговых препаратов, которые используются спортсменами для улучшения мышечных и силовых показателей. С начала 1970-х годов АС запрещены к использованию в спорте Международным Олимпийским Комитетом. Используемые антидопинговыми лабораториями современные инструментальные методы чрезвычайно чувствительны и позволяют детектировать следовые количества синтетических андрогенов на протяжении месяцев со времени их последнего приема. Внедрение в практику персонализированного подхода, основанного на мониторинге стероидного профиля, а также масс-спектрометрии изотопных соотношений углерода (C^{12}/C^{13}) позволило решить проблему доказательного обнаружения допинга [1]. Тем не менее, несмотря на эффективную борьбу против использования эндогенных АС в спорте высших достижений, высокая активность андрогенов для получения преимуществ в силовых видах спорта приводит к стремительному развитию новых стратегий их использования в обход установленных правил. Основной целью таких схем является стимулирование секреции эндогенного тестостерона допинговыми агентами, действующими опосредованным путем на нейрогуморальном уровне [2]. В связи с этим проблема употребления непрямого андрогенного допинга привлекла пристальное внимание мирового антидопингового сообщества. В последних исследованиях были выявлены основные классы допинговых веществ, косвенно влияющих на выработку собственных андрогенов: тестостерона (Т), эпитестостерона (Е), дигидротестостерона (ДГТ) и других. К таким препаратам относят хорионический гонадотропин (ХГч), лютеинизирующий гормон (ЛГ) и его агонисты, блокаторы эстрогенов или ингибиторы ароматазы, а также рилизинг-гормон гонадотропина (гонадолиберин, гонадорелин, ГнРГ) и его аналоги [3].

Помимо потенциальных эргогенных преимуществ, ГнРГ и его аналоги также могут скрывать употребление экзогенного тестостерона или других натуральных андрогенов за счет маскировки изменений в специализированных тестированиях (Т/Е, C^{12}/C^{13} -изотопные отношения), а также могут участвовать в устранении негативных последствий приема андрогенов (например, гинекомастия, гипосперматогенез, сексуальная дисфункция).

Агонисты ГнРГ являются суперактивными синтетическими производными эндогенного декапептида гонадолиберина – основного регулятора репродуктивной системы. ГнРГ вырабатывается гипоталамусом и регулирует выработку гипофизарного ЛГ и секрецию тестостерона в тестикулах. Воздей-

ствие ГнРГ и его агонистов на гипоталамо-гипофизарно-гонадальную ось носит двухфазный характер [4], это позволяет использовать их для достижения двух противоположных фармакологических эффектов, характер которых зависит от режима введения. Кратковременное введение обеспечивает стимулирующий эффект на репродуктивную систему, а создание стабильной концентрации в плазме крови – подавляющий. Таким образом, ГнРГ и его синтетические аналоги могут использоваться спортсменами в качестве допинговых и/или маскирующих агентов непосредственно для увеличения мышечной массы и силы или для восстановления уровня тестостерона после введения анаболических стероидных гормонов [5]. На сегодняшний момент гонадотропин наравне с его рилизинг-пептидами внесены в Запрещенный список ВАДА 2016 года.

Для количественного и качественного определения веществ пептидной природы в допинг-контроле преимущественно используются следующие биомолекулярные технологии: иммунохимические методы, изоэлектрическое фокусирование, гель-электрофорез, жидкостная и газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией [6]. Иммунохимические методы используют с применением специфических антител, однако при анализе пептидов с массой до 1000 Да получение антител достаточно проблематично, в силу невысокого иммунного ответа при их выработке. Таким образом, альтернативой в данном случае является использование ВЭЖХ-МС, которая повышает эффективность и специфичность анализа, что позволяет проводить целенаправленное детектирование соответствующих пептидных и белковых препаратов. В то же время ВЭЖХ-МС позволяет определять не только нативные молекулы, но и их метаболиты [7, 8].

Хотя существует метод определения ГнРГ в моче [8], нативный ГнРГ обладает кратковременной продолжительностью действия и поэтому может использоваться только для краткосрочного маскирующего действия, не оказывая эргогенный эффект [9]. Имеется большой потенциал для использования аналогов ГнРГ в качестве допинговых средств, но до сих пор не было никаких доказательств их использования элитными спортсменами, и пока не существует разработанных методов их обнаружения. В связи с этим разработка способа определения ГнРГ и его аналогов для целей допинг-контроля является актуальной задачей.

Впервые в данной работе представлена методика определения синтетических аналогов ГнРГ в моче с использованием сверхпроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС/МС).

Экспериментальная часть

Материалы и методы

В работе использовали сертифицированные стандартные материалы, синтезированные компанией Bachem, Швейцария:

№ п/п	Название (обозначение аналога ГнРГ)	Аминокислотная последовательность	Кат. номер	Содержание основного компонента не менее
1	Рилизинг-гормон гонадотропина (гонадолиберин, гонадорелин, рилизинг-гормон лютеинизирующего гормона, LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	H-4005	98.0%
2	Нафарелин (Nafarelin, (D-2-Nal ⁶)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-2-Nal-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	H-6095.0001	97.7%
3	Дезлорелин (Deslorelin, (Des-Gly ¹⁰ , D-Trp ⁶ , Pro-NHEt ⁹)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-NHEt	H-4116.0005	88.1%
4	Фертирелин (Fertirelin, (Des-Gly ¹⁰ , Pro-NHEt ⁹)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NHEt	H-4055.0005	99.3%
5	Леупролид (Leuprolide, (Des-Gly ¹⁰ , D-Leu ⁶ , Pro-NHEt ⁹)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt	H-4060.0005	98.5%
6	Гистрелин (Histrelin, (Des-Gly ¹⁰ , D-His(Bzl) ⁶ , Pro-NHEt ⁹)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-His(Bzl)-Leu-Arg-Pro-NHEt	H-9210.0005	99.3%
7	Гозерелин (Goserelin, (D-Ser(tBu) ⁶ , Azagly ¹⁰)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-azaGly-NH ₂	H-6395.0005	88.6%;
8	Бусерелин (Buserelin, (Des-Gly ¹⁰ , D-Ser(tBu) ⁶ , Pro-NHEt ⁹)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-NHEt	H-4224.0005	99.3%
9	Трипторелин (Triptorelin, (D-Trp ⁶)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	H-4075.0005	98.6%
10	Аларелин (Alarelin, (Des-Gly ¹⁰ , D-Ala ⁶ , Pro-NHEt ⁹)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ala-Leu-Arg-Pro-NHEt	H-4070.0005	98.9%
11	Пефорелин (Peforelin)	Pyr-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH ₂	H-4258.0001	98.2%
12	Леупролид- ¹³ C (Leuprolide- ¹³ C, (Des-Gly ¹⁰ , D-Leu ⁶ , [¹³ C ₆]Leu ⁷ , Pro-NHEt ⁹)-LHRH)	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-[¹³ C ₆]Leu-Arg-Pro-NHEt	H-6258.1000	95.1%

В работе использовали метанол и ацетонитрил фирмы Merck, Германия, концентрированную муравьиную кислоту фирмы Fluka, Германия и воду фирмы Fisher Chemical, Бельгия, все марки «для ВЭЖХ-МС». 30% водный раствор гидроксида аммония приобретен у Acros Organics, Бельгия.

Для извлечения синтетических аналогов ГнРГ использовали концентрирующие патроны для ТФЭ Oasis[®]WCX (60 мг × 3 мл, 30 мкм, кат. номер 186002497) фирмы Waters Inc., США.

Оборудование

СВЭЖХ-МС/МС-анализ выполняли на жидкостном хроматографе модели Acquity UPLC (Waters Inc., США), оснащенный системой автоматического ввода образцов, модулем нагрева хроматографической колонки, дегазатором, соединенным с масс-спектрометрическим детектором модели TSQ Vantage (Thermo Scientific, США) с внешним источником электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком. Для сбора и обработки данных применяли программное обеспечение Xcalibur версии 2.2 (Thermo Scientific, США).

СВЭЖХ-МС/МС-анализ (сверхпроизводительная высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения) выполняли на жидкостном хроматографе модели Acquity UPLC (Waters Inc., США) с системой автоматического ввода образцов, модулем нагрева хроматографической колонки, дегазатором, соединенным с масс-спектрометрическим детектором модели Exactive (Thermo Scientific, Германия) с внешним источником электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком. Для сбора и обработки данных применяли программное обеспечение Xcalibur версии 2.1 (Thermo Scientific, США).

Вспомогательное оборудование

Весы аналитические прецизионные (макс. 22 г, d = 0.001 мг, мин. 0.1 мг, e = 1 мг) модели XP26 фирмы Mettler-Toledo, Швейцария, использовали для взвешивания точных навесок сертифицированных референсных стандартов.

В работе использовали автоматические механические одноканальные дозаторы переменного объема

(0.5–10, 20–200, 100–1000, 500–5000 и 1000–10000 мкл) с погрешностью измерения не более $\pm 1.5\%$ модели Research plus фирмы Eppendorf, Германия.

Осаждение мелкодисперсных частиц проводили на центрифуге марки 5430 фирмы Eppendorf AG, Германия. Для упаривания использовали концентрирующую станцию TurboVap[®]LV (Caliper LifeSciences, США), совмещенную с генератором азота Peak Scientific, Великобритания.

Хроматографические условия

Для хроматографического разделения веществ использовали колонку Acquity UPLC VEN C18 (2.1 × 100 мм, размер частиц 1.7 мкм), соединенную с предколонкой Acquity UPLC VEN C18 (2.1 × 5 мм, размер частиц 1.7 мкм) фирмы Waters Inc., США. Суммарная скорость потока подвижных фаз составляла 0.3 мл/мин. Для понижения общего рабочего давления в системе использовали термостатирование колонки (60°C). Подвижная фаза представляла собой 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде (А) и метаноле (В). Для разделения соединений использовали следующую программу градиентного элюирования: 0–0.5 мин – 95% А, 3.0–4.5 мин – 5% А, 4.51–6.0 мин – 95% А. После введения образца система ввода пробы промывалась смесью вода–метанол (90:10, об.%). Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 7 мин. Объем пробы – 10 мкл.

Масс-спектрометрические условия

Масс-спектры синтетических аналогов ГнРГ получали методом СВЭЖХ-МСВР в условиях электро-распылительной ионизации с нагреваемым потоком (ЭРИНП) в режиме полного сканирования (Full scan) в диапазоне масс 100–1800 Да с разрешением 50 000 (на половине высоты) и точностью определения масс 5 млн⁻¹. Скорость сканирования 2 скан/с, максимальное время удерживания ионов 500 мс. Условия ионизации: напряжение на капилляре +4 кВ, температура фокусирующего капилляра 370°C, скорость потока распыляющего газа азота 70 усл. ед., скорость потока вспомогательного газа азота 10 усл. ед., температура в камере ионизации 300°C.

Масс-спектры определяемых соединений при использовании СВЭЖХ-МС/МС получены в условиях ЭРИНП: напряжение на капилляре +4 кВ; температура фокусирующего капилляра 370°C, скорость потока распыляющего газа азота 50 усл. ед.; скорость потока вспомогательного газа азота 20 усл. ед.; температура в камере ионизации 300°C. Ширина пропускания ионов на первом квадруполе (Q1) и третьем квадруполе (Q3) составляла 0.7 Да, время задержки 5 мс. В качестве газа-мишени использовали аргон (99.999%), давление аргона в камере соударения 1.5 мТорр. Оптимизацию масс-спектрометрических параметров регистрации соединений проводили

в автоматическом режиме, используя встроенный шприцевой насос. Масс-спектрометрическое детектирование целевых соединений выполняли в режиме мониторинга селективных реакций (SRM).

Пробоподготовка образцов биожидкости человека

В вакуумный манифолд устанавливали патроны для ТФЭ Oasis[®]WCX, проводили их кондиционирование 3 мл метанола и 3 мл воды, затем наносили 1–3 мл образца мочи и добавляли 20 мкл раствора внутреннего стандарта (леупролид-¹³C₆ 0.1 нг/мкл). Картриджи промывали 2 мл свежеприготовленного 5% раствора аммиака и 2 мл смеси ацетонитрил/вода (20/80, об.%), просушивали картриджи 3 мин. Соединения элюировали 2 мл (2 × 1 мл) 5% раствора муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил–вода (75:25, об.%). Элюат упаривали досуха в токе азота при температуре 45°C, сухой остаток перерастворяли в 100 мкл 0.1% раствора муравьиной кислоты в воде.

Результаты и их обсуждение

Оптимизация хроматографических условий

Сорбенты, используемые для упаковки аналитических колонок, сильно влияют на разделение и чувствительность хроматографического метода. Разделение пептидных соединений осуществляют на различных типах неподвижной фазы. Так, при разделении соединений методом обращенно-фазовой хроматографии чаще всего применяют сорбенты с привитыми C₈- и C₁₈-группами, нормально-фазовой хроматографии – сорбенты с привитыми CN- или фенильными группами [10]. Как правило, обращенная фаза на основе силикагеля с пришитыми группами C₁₈ считается золотым стандартом в пептидном анализе благодаря простоте и стабильности. Нанесение на силикагель, характеризующийся высокой механической прочностью и регулярной структурой пор, кремнийорганического слоя и последующая модификация функциональными группами позволяет избежать возникновения размытого фронта хроматографических пиков.

Запатентованный сорбент Bridged Ethyl Hybrid (ВЕН) аналитической колонки Acquity UPLC VEN C18 – гибридный сорбент второго поколения с этильными мостиками в каркасе – характеризуется высокой селективностью и эффективностью разделения низкомолекулярных пептидных соединений, включенных в группу S2 Запрещенного списка ВАДА, таких как секретологи гормона роста (GHRPs, Growth Hormone Releasing Peptides). Сорбент ВЕН является уникальным и сочетающим в себе лучшие свойства полимерных сорбентов и силикагельной матрицы [11]. За счет использования мелких частиц размером 1.7 мкм достигается высокая эффективность разделения соединений. Кроме того, три функциональных лиганда в структуре сорбента обеспечивают его ста-

бильность от низких до высоких значений pH раствора (от 1 до 12).

Разделение пептидных веществ в значительной степени зависит от кислотных добавок в подвижную фазу, к ним относятся трифторуксусная, уксусная и муравьиная кислоты, регулирующие pH раствора [12]. Кислотные добавки за счет формирования ионных пар увеличивают гидрофобность соединений, что приводит к улучшению взаимодействия молекул определяемых соединений с гидрофобной неподвижной фазой, хроматографического разделения и, как следствие, более симметричным и узким пикам, имеющих форму распределения Гаусса.

На предприятии строго соблюдается процедура стандартизации разрабатываемых методик, основной целью которых является последующее внедрение в производственную практику. В ФГБУ АДЦ в методиках определения допинговых соединений в моче человека методом СВЭЖХ-МС/МС в качестве

неподвижной фазы используется аналитическая колонка Acquity UPLC BEH C18, а в качестве подвижной – 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде и метаноле с градиентным элюированием. В связи с этим для гармонизации и унификации разрабатываемой методики анализа рилизинг-гормона гонадотропина и его синтетических аналогов в биологических жидкостях человека нами выбраны выше описанные условия хроматографического разделения.

На рис. 1 представлена хроматограмма определяемых соединений. Видно, что хроматографические пики всех веществ симметричны и имеют форму распределения Гаусса. Времена удерживания увеличиваются в ряду: пефорелин (2.24 мин) < ГнРГ (2.42 мин) < гистрелин (2.57 мин) < фертирелин (2.59 мин) < аларелин (2.63 мин) < трипторелин (2.76 мин) < дезлорелин (2.83 мин) < гозерелин (2.84 мин) < леупролид (2.86 мин) = леупролид-¹³C₆ (2.86 мин) < бусерелин (2.91 мин) < нафарелин (3.01 мин).

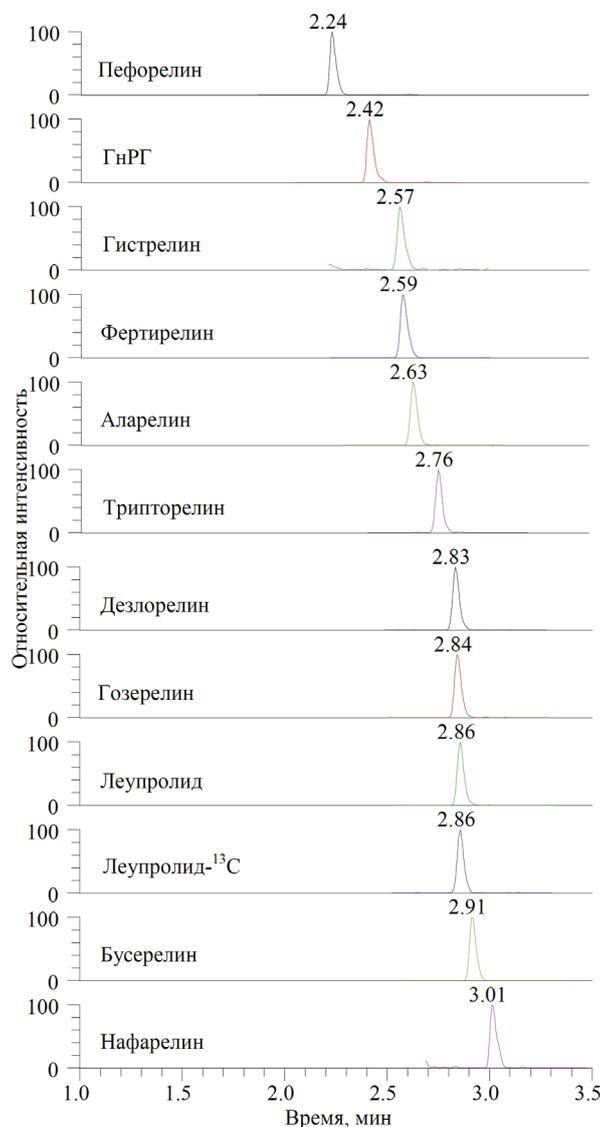


Рис. 1. Масс-хроматограмма тестовой смеси ГнРГ и его синтетических аналогов (концентрация 1 нг/мкл каждого).

В табл. 1 приведены структуры агонистов ГнРГ, а также времена их удерживания на обращенно-фазовой колонке Acquity UPLC BEH C18, синим и красным маркером выделены сайты, влияющие на удерживание соединений на поверхности сорбента. Наименьшим временем удерживания обладает пефорелин – 2.15 мин, нативный ГнРГ и другие его синтетические агонисты имеют бóльшие времена удерживания. Основным отличием между ГнРГ и его агонистами является замена аминокислоты глицина в положении на другой аминокислотный остаток в D-конфигурации. Включение D-изомерных аминокислот, в особенности с крупными гидрофобными остатками, увеличивает гидрофобность молекулы и, как следствие, время удерживания. Так, например, аларелин является аналогом леупролида и обладает малым структурным различием с ним: в леупролиде D-аланин замещен на D-лейцин. Такая замена аминокислот приводит к увеличению времени удерживания с 2.63 мин у аларелина до 2.86 мин у леупролида.

Кроме того, гидрофобность молекулы может быть увеличена за счет модификации концевой группы. Так, у гозерелина, имеющего C-концевую структурную модификацию azaGly, время удерживания составляет 2.84 мин, а у его аналога – бусерелина ацилирование C-концевой амидогруппы увеличивает гидрофобность, что приводит к повышению времени удерживания на 0.07 мин (2.91 мин). Структура трипторелина отличается от бусерелина дополнительным концевым глицинамидным фрагментом и заменой D-серина на D-триптофан в положении Р6, такая модификация молекулы приводит к изменению времени удерживания на гибридном сорбенте на 0.15 мин. Таким образом, аминокислотная последовательность агонистов ГнРГ, в которой произведено замещение глицина в положении 6, а также модификации концевой группы увеличивают их гидрофобность, что приводит к увеличению времен удерживания.

Таблица 1. Времена удерживания (RT) ГнРГ и его синтетических аналогов на аналитической колонке Acquity UPLC BEH C18

Соединение	Аминокислотная последовательность	RT, мин
Пефорелин	Pyr-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH ₂	2.24
ГнРГ	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	2.42
Гистрелин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-His(Bzl)-Leu-Arg-Pro-NHEt	2.57

Таблица 1. Продолжение

Фертирелин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NHEt	2.59
Аларелин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ala-Leu-Arg-Pro-NHEt	2.63
Трипторелин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	2.76
Дезлорелин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-NHEt	2.83
Гозерелин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-azaGly-NH ₂	2.84

Таблица 1. Окончание

Леупролид	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt	2.86
Леупролид- ¹³ C	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-[¹³ C ₆]Leu-Arg-Pro-NHEt	2.86
Бусерелин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-NHEt	2.91
Нафарелин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-2-Nal-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	3.01

Оптимизация масс-спектрометрических параметров

Электрораспылительная ионизация (ЭРИ) по сравнению с химической ионизацией при атмосферном давлении является наиболее приемлемой для количественного масс-спектрометрического анализа пептидов благодаря своей простоте и высокой чувствительности. Тандемная масс-спектрометрия наиболее широко используется для определения отдельных компонентов в сложной многокомпонентной смеси. В типичном МС/МС-эксперименте

молекулярные ионы (ионы-прекурсоры) полипептидов диссоциируют в газовой фазе. Наиболее распространенным методом ионной диссоциации является столкновение заряженной молекулы пептида с молекулами инертного газа, таких как аргон, гелий или молекулярный азот. Эти столкновения приводят к возбуждению ионов вещества и последующей их фрагментации или диссоциации.

Образование многозарядных ионов молекулами пептидных соединений в условиях ЭРИ является от-

личительной особенностью процесса их ионизации. Природа входящих в структуру пептида аминокислот – основной фактор, влияющий на распределение заряда в молекуле. В качестве ионов-прекурсоров пептидных соединений с молекулярным весом до 2 000 Да обычно выбирают ионы $[M+H]^+$ и $[M+2H]^{2+}$, тогда как для пептидов с молекулярной массой 2 000–4 000 Да наиболее предпочтительны ионы $[M+3H]^{3+}$ и $[M+4H]^{4+}$. Для обеспечения более высокой эффективности протонирования основных участков молекул целевых соединений используют подвижные фазы, рН которых находится в области кислых значений.

Нами получены масс-спектры синтетических агонистов ГнРГ с применением метода СВЭЖХ-МСВР с разрешением 50 000 на половине высоты и точностью измерения масс не менее 5 млн⁻¹. В таких условиях наблюдается высокая селективность и специфичность определения целевых соединений. При использовании МСВР одновременно регистрируются все образующиеся в ионном источнике ионы, а не только их незначительная часть, как в случае

тандемной масс-спектрометрии. Необходимо подчеркнуть, что метод СВЭЖХ-МСВР с орбитальной ионной ловушкой позволяет возвращаться к ранее полученным данным, то есть проводить ретроспективный анализ, а также идентифицировать метаболиты как в биологических жидкостях, так и в синтезированных в условиях *in vitro*.

Синтетические аналоги ГнРГ, являющиеся олигопептидами и имеющие в своей структуре легко протонирующиеся аминокислоты, эффективно ионизируются в условиях ЭРИНП, поэтому режим детектирования положительно заряженных ионов повышает чувствительность их определения. Все соединения образовывали протонированные молекулы $[M+H]^+$, однако их интенсивность была крайне низка, поскольку для пептидных веществ характерно образование многозарядных ионов. Протонированные молекулы ГнРГ и его синтетических аналогов идентифицировали по совпадению точных экспериментальных масс с расчетными значениями (табл. 2).

Таблица 2. Расчетные и экспериментальные значения точных масс протонированных молекул ГнРГ и его синтетических аналогов

Соединение	Брутто-формула	Точная масса $[M+H]^+$, Да		Δ , ppm
		теор.	эксп.	
ГнРГ	$C_{55}H_{74}N_{16}O_{14}$	1183.5643	1183.5618	-2.13
Дезлорелин	$C_{64}H_{83}N_{17}O_{12}$	1282.6479	1282.6456	-1.86
Фертирелин	$C_{55}H_{76}N_{16}O_{12}$	1153.5901	1153.5872	-2.51
Леупролид	$C_{59}H_{84}N_{16}O_{12}$	1209.6527	1209.6486	-3.42
Гистрелин	$C_{66}H_{86}N_{18}O_{12}$	1323.6745	1323.6695	-3.81
Гозерелин	$C_{59}H_{84}N_{18}O_{14}$	1269.6488	1269.4410	-3.64
Бусерелин	$C_{60}H_{86}N_{16}O_{13}$	1239.6633	1239.6606	-2.18
Пефорелин	$C_{59}H_{74}N_{18}O_{14}$	1258.5632	1258.5604	-2.22
Трипторелин	$C_{64}H_{82}N_{18}O_{13}$	1311.6381	1311.6344	-2.86
Аларелин	$C_{56}H_{78}N_{16}O_{12}$	1167.6058	1167.6024	-2.90
Леупролид- ¹³ C ₆	$C_{53}^{13}C_6H_{84}N_{16}O_{12}$	1215.6725	1215.6690	-2.88
Нафарелин	$C_{66}H_{83}N_{17}O_{13}$	1322.6429	1322.6398	-2.34

На рис. 2 и 3 в качестве примеров представлены масс-спектры дезлорелина и фертирелина, полученные методом СВЭЖХ-МСВР в условиях ЭРИНП в режиме полного сканирования с регистрацией положительных ионов. В этих условиях дезлорелин и фертирелин образуют протонированные молекулы $[M+H]^+$ с m/z 1282.6456 и 1153.5872 и двухзарядные ионы $[M+2H]^{2+}$ с m/z 641.8260 и 577.2972, соответственно. Интенсивности ионов $[M+H]^+$ составили менее 5% относительно интенсивности ионов $[M+2H]^{2+}$. Анализ масс-спектров других целевых соединений, полученных в режиме полного сканирования ионного тока, показал, что у всех анализируемых соединений наиболее интенсивными молекулярными

ионами являются двухзарядные ионы $[M+2H]^{2+}$, это объясняется наличием дополнительных ионогенных функциональных групп на С-конце (NH₂-группа), а также наличием в структуре основных аминокислот.

Исключение составляет гистрелин, в состав которого входит пиразольная группа, наличие которой обуславливает дополнительное протонирование исходной молекулы и, таким образом, наиболее интенсивным ионом-прекурсором является ион с зарядом +3 (рис. 4). В масс-спектре гистрелина, полученного в условиях ЭРИНП с регистрацией положительных ионов, присутствует также двухзарядный ион $[M+2H]^{2+}$ с m/z 662.3, обладающий меньшей интенсивностью.

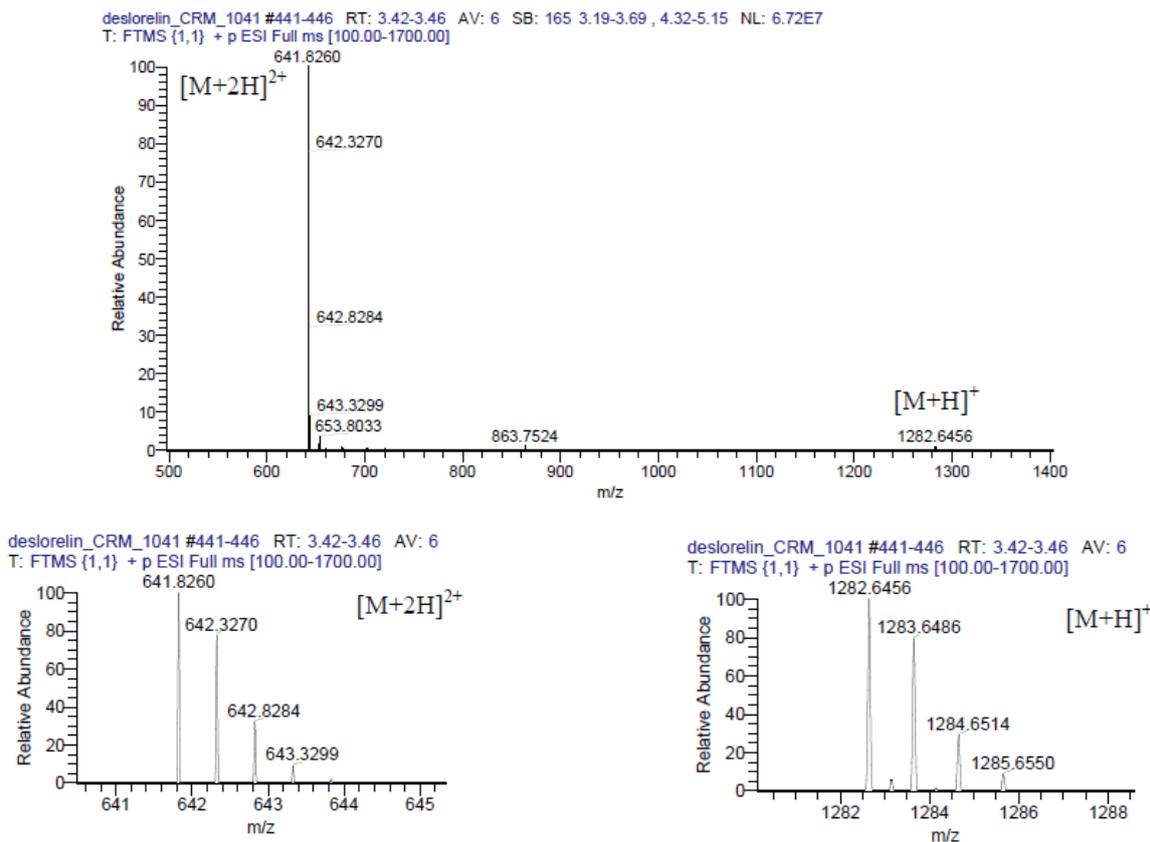


Рис. 2. Масс-спектр дезлорелина, полученный методом СВЭЖХ-МСВР в условиях ЭРИНП с регистрацией полного ионного тока.

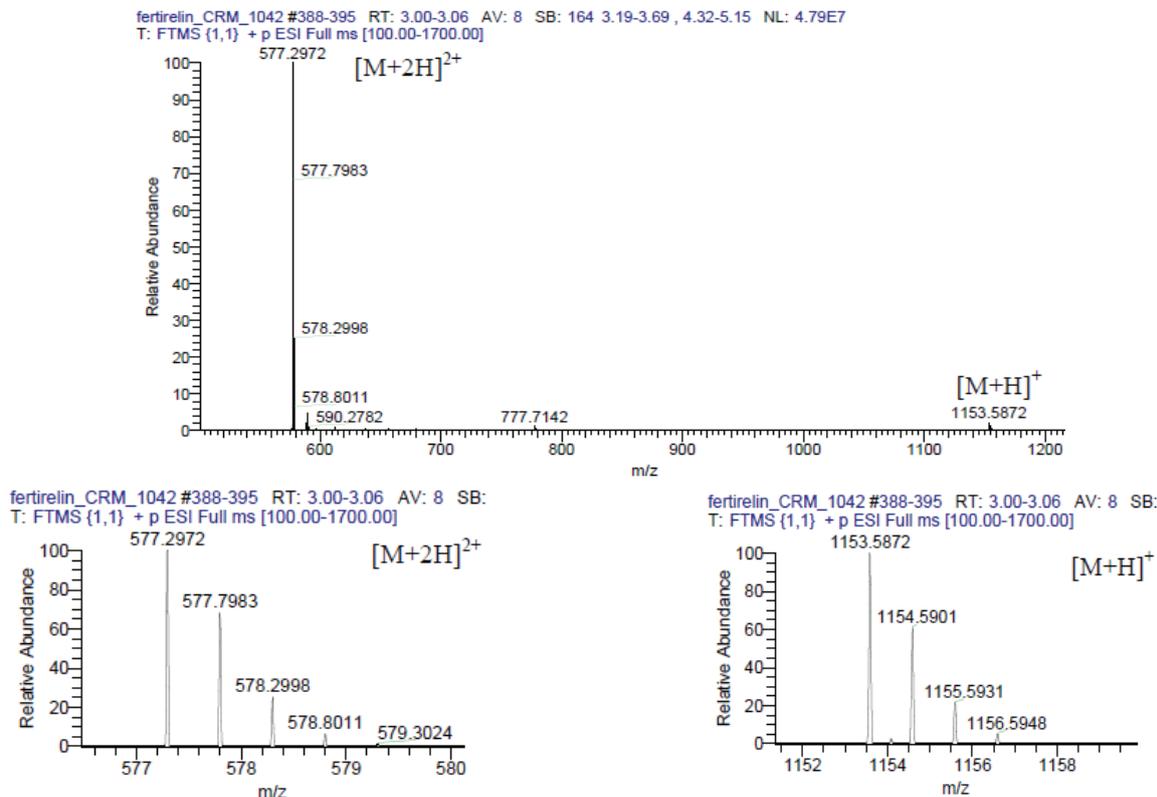


Рис. 3. Масс-спектр фертирелина, полученный методом СВЭЖХ-МСВР в условиях ЭРИНП с регистрацией полного ионного тока.

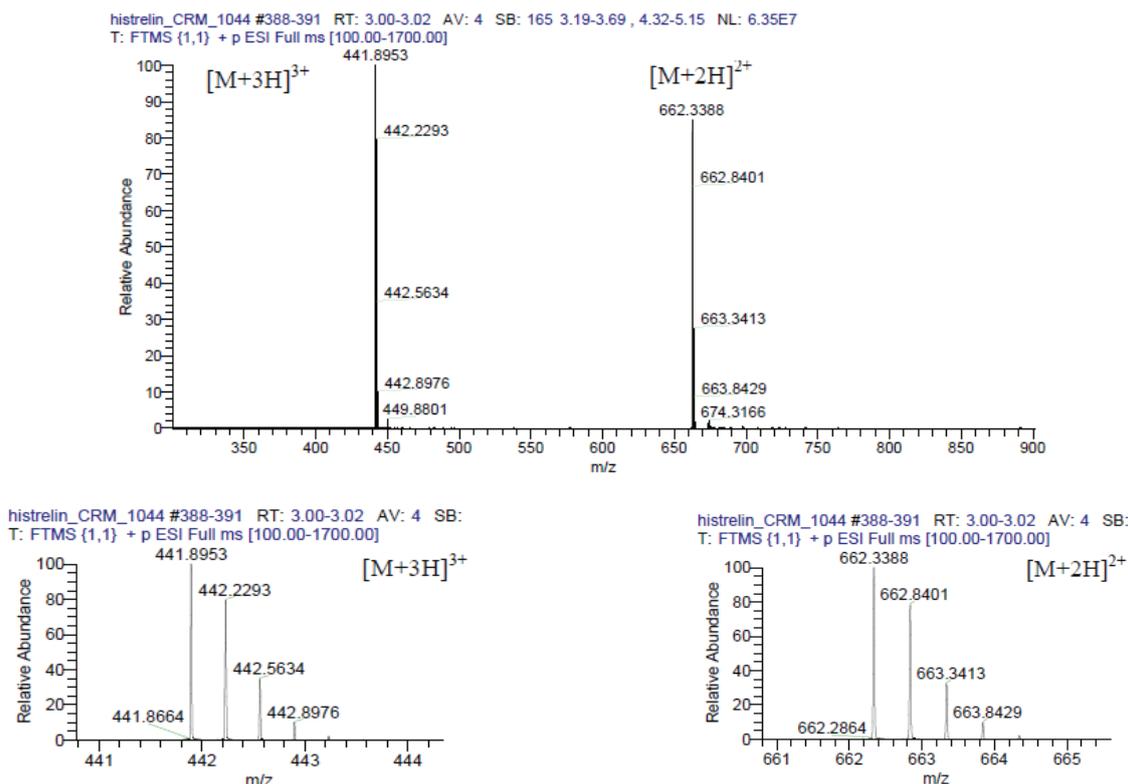


Рис. 4. Масс-спектр гистрелина, полученный методом СВЭЖХ-МСВП в условиях ЭРИНП с регистрацией полного ионного тока.

После выявления наиболее интенсивных ионов-прекурсоров ГнРГ и его синтетических аналогов, образующихся при использовании ЭРИНП, изучен процесс их фрагментации в условиях диссоциации, индуцированной соударениями, с целью выбора наиболее интенсивных и характеристичных ионов-продуктов. Тип ионов-продуктов, наблюдаемых в МС/МС-спектрах, зависит от первичной последовательности аминокислот и степени протонирования пептида. Номенклатура образующихся ионов была впервые предложена Р. Roepstorff и J. Fohlman [13] и позже дополнена R.S. Johnson с соавторами [14]. Особенности диссоциации, активированной соударениями, соединений с пептидной структурой подробно описаны в работе [15]. Если при разрыве пептидных связей происходит удерживание заряда на *N*-концевом фрагменте, ион-продукт классифицируется как А, В или С, а если заряд локализован на *C*-концевом фрагменте, то ион-продукт обозначается как X, Y или Z, при этом нижний индекс указывает на количество остатков в фрагменте.

На рис. 5 представлены масс-спектры нафарелина и леупролида, полученные в условиях тандемной масс-спектрометрии при фрагментации двухзарядных ионов-прекурсоров, образующихся в условиях ЭРИНП, с m/z 661.9 и 605.3, соответственно. Так как главными отличиями между ГнРГ и его агонистами являются замена глицина в положении Р6 на другой аминокислотный остаток и/или модификация концевой группы (то есть левые части их структур идентичны), то во всех масс-спектрах присутствуют ионы-продукты с m/z 221.2 и 249.1 – фрагменты a_2 и b_2 , соответственно. Кроме того,

все МС/МС-спектры содержали ион-продукт с m/z 159.1, соответствующий иммонийному иону Trp³.

Далее проводили выбор ионов-продуктов, обладающих наибольшей интенсивностью и специфичностью, а также осуществляли оптимизацию условий масс-спектрального определения. Важным параметром, влияющим на интенсивность ионов-прекурсоров, является амплитуда радиочастоты S-образной линзы, а для ионов-продуктов – энергия соударения в ячейке столкновений. Настройку оптики масс-спектрометра выполняли в автоматическом режиме непрерывным прямым вводом во внешний источник ионизации растворов определяемых соединений (10 нг/мкл) с помощью встроенного шприцевого насоса со скоростью 5-10 мкл/мин. На рис. 6 представлены графики влияния амплитуды радиочастоты S-образной линзы на интенсивность сигнала двухзарядного иона дезлорелина с m/z 641.88 и энергии столкновения на интенсивность образующихся в камере соударений ионов-продуктов.

В отличие от низкомолекулярных соединений, соединения пептидной структуры в условиях ЭРИНП образуют многозарядные ионы, поэтому в условиях диссоциации, индуцированной соударениями, для них характерно образование ионов-продуктов, имеющих отношение массы к заряду больше, чем у иона-прекурсора. Необходимо отметить, что такие ионные переходы являются очень специфичными и характеристичными. Так, например, при фрагментации двухзарядных ионов-прекурсоров фертирелина (m/z 577.40) и гозерелина

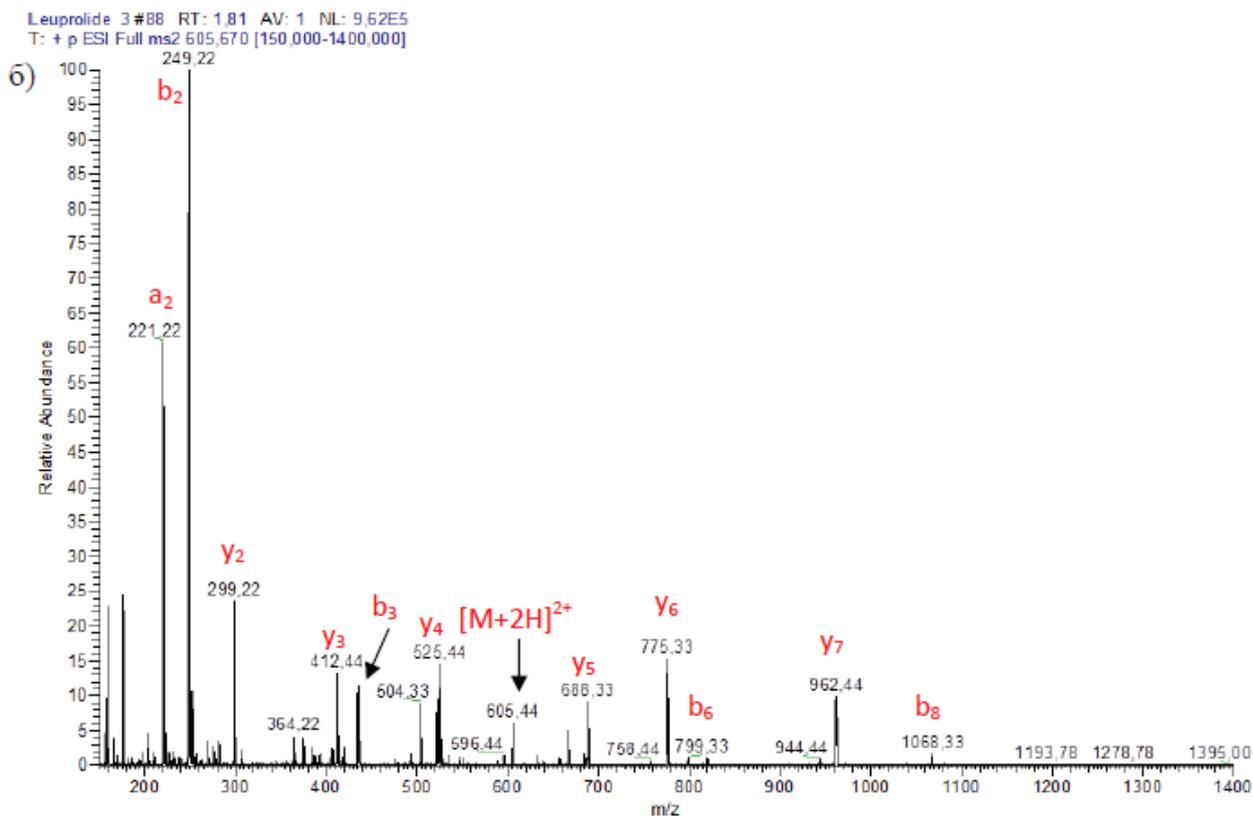
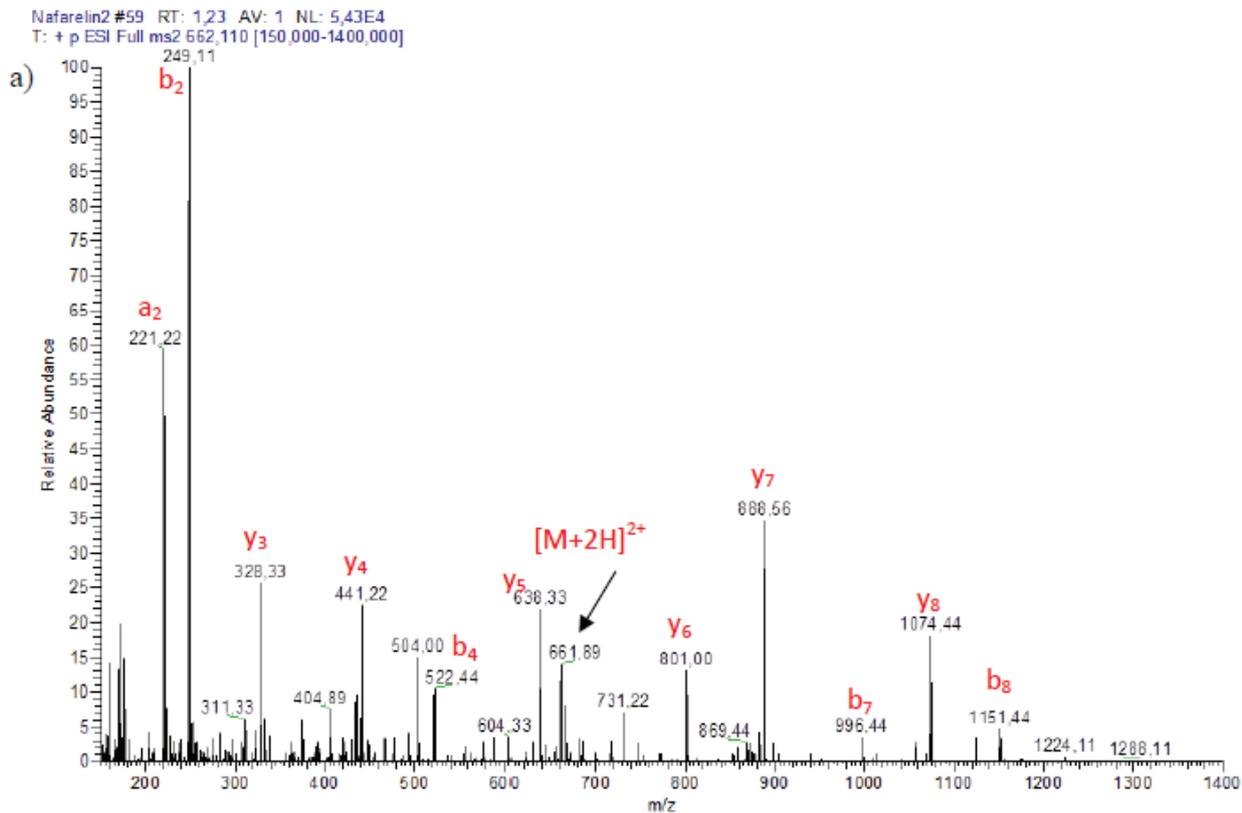


Рис. 5. Масс-спектры нафарелина (а) и леупролида (б), полученные методом СВЭЖХ-МС/МС с ЭРИНП при фрагментации двухзарядных ионов-прекурсоров с m/z 661.9 и 605.3, соответственно, при ЭС 20 эВ.

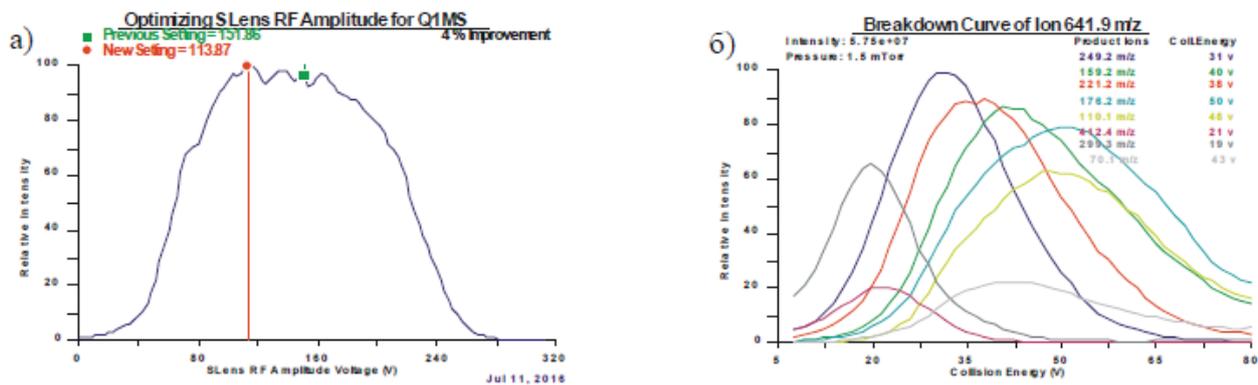


Рис. 6. Оптимизация амплитуды радиочастоты S-образной линзы с целью повышения интенсивности детектирования двухзарядного иона дезлорелина с m/z 641.88 (а) и автоматический выбор ионов-продуктов, образующихся при его фрагментации в условиях диссоциации, индуцированной соударениями (б).

(m/z 635.40), наряду с ионами-продуктами, имеющими m/z меньше такового у выбранного иона-прекурсора, образуются ионы-продукты с большим значением m/z – 719.20 и 779.40, соответственно (рис. 7, 8). Оптимизацию условий детектирования ионов-продуктов с большим значением отношения массы к заряду также проводили в автоматическом режиме.

Для каждого соединения выбрано по три характеристичных перехода, обладающих наибольшей интенсивностью сигнала. В табл. 3 представлены выбранные масс-спектрометрические условия определения целевых соединений методом СВЭЖХ-МС/МС в условиях ЭРИНП в режиме мониторинга выбранных реакций.

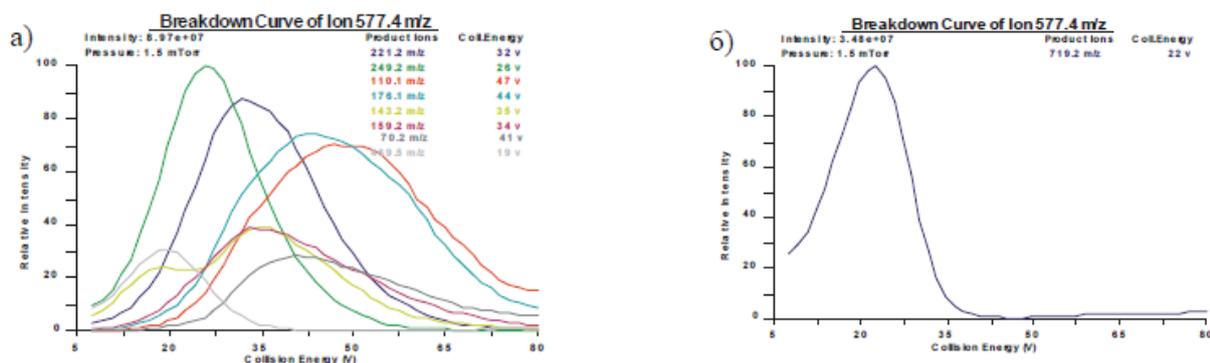


Рис. 7. Автоматический выбор ионов-продуктов, образующихся при фрагментации двухзарядного иона фертирелина с m/z 577.40 в условиях диссоциации, индуцированной соударениями (а), и оптимизация амплитуды радиочастоты S-образной линзы для иона-продукта с m/z 719.20 (б).

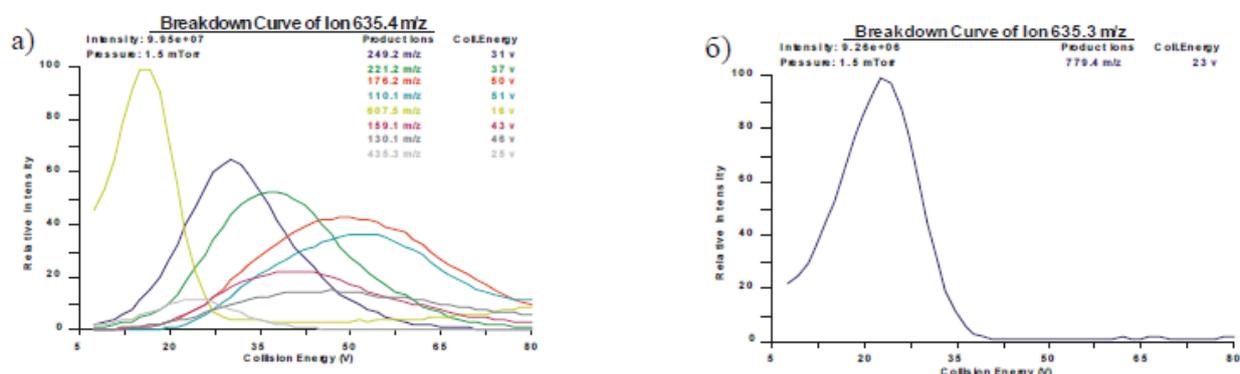


Рис. 8. Автоматический выбор ионов-продуктов, образующихся при фрагментации двухзарядного иона гозерелина с m/z 635.40 в условиях диссоциации, индуцированной соударениями (а), и оптимизация амплитуды радиочастоты S-образной линзы для иона-продукта с m/z 779.40 (б).

Таблица 3. Параметры масс-спектрометрического определения ГнРГ и его синтетических агонистов

Соединение	Ион	Ион, m/z		ЭС, эВ	S-линза, эВ
		прекурсор	продукт		
Пефорелин	$[M+2H]^{2+}$	630.3	172.1	25	126
			249.2	34	
			110.1	50	
Гистрелин	$[M+3H]^{3+}$	441.9	91.1	51	110
			200.2	30	
			538.3	16	
Фертирелин	$[M+2H]^{2+}$	577.4	719.2	22	140
			249.2	26	
			110.1	47	
Аларелин	$[M+2H]^{2+}$	584.4	249.2	27	100
			221.2	33	
			733.6	23	
Трипторелин	$[M+2H]^{2+}$	656.4	249.2	31	120
			221.2	37	
			1063.5	24	
Дезлорелин	$[M+2H]^{2+}$	641.9	249.2	31	115
			159.2	40	
			299.3	19	
Гозерелин	$[M+2H]^{2+}$	635.4	249.2	31	127
			607.5	16	
			779.4	23	
Леупролид	$[M+2H]^{2+}$	605.4	249.2	30	140
			176.1	47	
			775.23	23	
Леупролид-13С	$[M+2H]^{2+}$	608.4	249.2	28	100
			221.2	33	
			917.5	14	
Бусерелин	$[M+2H]^{2+}$	620.5	592.5	16	130
			249.1	26	
			176.2	49	
Нафарелин	$[M+2H]^{2+}$	662.4	249.2	35	160
			170.1	51	
			176.2	51	
ГнРГ	$[M+2H]^{2+}$	591.7	221.1	33	110
			249.1	25	
			176.1	44	

Оптимизация процедуры извлечения ГнРГ и его агонистов из мочи человека

Хотя масс-спектрометрия является эффективным методом селективного определения соединений пептидной природы в сложных биологических матрицах, пробоподготовка, тем не менее, является неотъемлемой частью аналитического процесса. В случае игнорирования необходимых этапов пробоподготовки значительное количество компонентов матрицы может привести к контаминации и

подавлению ионизации в источнике.

Наиболее распространенными способами извлечения пептидов из биожидкостей являются преципитация белков [16, 17] и/или твердофазная экстракция (ТФЭ) [8, 18], но наиболее предпочтительным является последний. Использование ТФЭ обеспечивает максимальную степень извлечения соединений пептидной природы и концентрирование целевых соединений для достижения низких пределов обнаружения, уменьшает эффект компонентов матрицы, характеризуется высо-

кой воспроизводимостью и высокой избирательностью сорбции. В аналитическом обзоре показано, что сорбент на основе полимерного силикагеля с пришитыми неполярными C_{18} -группами широко применяется для выделения пептидов из биожидкостей. Использование картриджей Oasis®HLB позволяет достичь удовлетворительной степени извлечения и селективности экстракции синтетических аналогов ГнРГ.

Полимерный сорбент Oasis®HLB представляет собой сополимер двух мономеров гидрофильного *N*-винилпирролидона и липофильного дивинилбензола. Он характеризуется высокой воспроизводимостью, стабильностью во всем диапазоне pH (0–14) и высокой степенью извлечения целевых соединений. Уникальным свойством этого сорбента является способность сорбировать на своей поверхности как неполярные вещества, так и полярные. В качестве альтернативы рассматривали полимерный сорбент Oasis®WCX, представляющий собой полимер со смешанной обращенно-фазовой и катионообменной функциональностью, разработанный для селективного выделения соединений с сильными основными свойствами и четвертичных аминов. Для сорбента Oasis®WCX характерен смешанный механизм адсорбции, который осуществляется за счет ионообменного механизма и обращенно-фазового взаимодействия соединения с поверхностью сорбента.

Нами проведен сравнительный анализ степеней извлечения ГнРГ и его синтетических агонистов из мочи, полученных с применением концентрирующих патронов Oasis®HLB и Oasis®WCX, последний рекомендован фирмой-производителем для выделения соединений пептидной природы из матрицы [19]. При использовании сорбента Oasis®WCX наблюдали более эффективное извлечение определяемых соединений из матрицы, это связано с наличием в структуре ГнРГ и его суперагонистов аминокислот гистидина и аргинина, обладающих основными свойствами, а также триптофана, лейцина и пролина, которые являются неполярными аминокислотами. Следовательно, целевые соединения способны удерживаться на поверхности сорбента за счет смешанного механизма взаимодействия, что приводит к увеличению степеней их извлечения (рис. 9). Кроме того, промывка картриджа после нанесения образца 5% раствором гидроксида аммония позволяет удалить полярные мешающие компоненты биологической матрицы, а последующая промывка смесью ацетонитрил – вода (20/80, об.%) – соединения, имеющие меньшее сродство к сорбенту. Таким образом, использование двухстадийной промывки перед этапом элюции целевых соединений с поверхности сорбента позволяет получить более чистый элюат, что очень важно для дальнейшего масс-спектрометрического детектирования пептидных молекул.

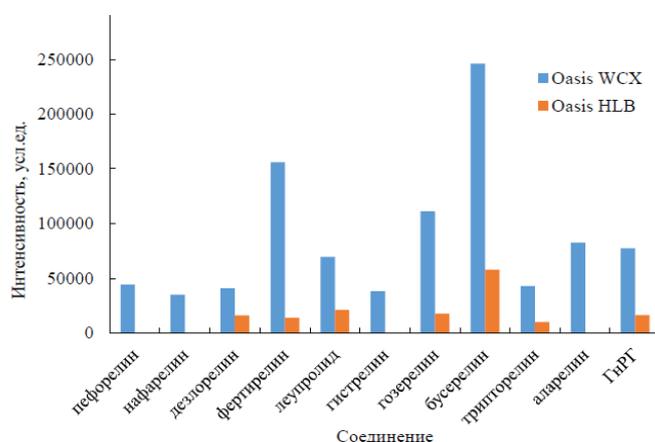


Рис. 9. Влияние типа сорбента на извлечение ГнРГ и его агонистов из мочи.

Анализ участков масс-хроматограмм, соответствующих временам удерживания целевых соединений в пределах одной минуты ($\pm 5\%$), показал, что на всех полученных масс-хроматограммах на указанных участках отсутствовали интерферирующие пики компонентов матрицы с отношением сигнал/шум, более или равным 3:1 (рис. 10, 11). Все выбранные переходы характеризуются высокой селективностью и специфичностью, поскольку в этих условиях интерференция с эндогенными соединениями мочи минимальна.

Разработанная методика определения ГнРГ и его синтетических агонистов в моче человека методом СВЭЖХ-МС/МС была валидирована. Для всех соединений определены следующие параметры:

минимально определяемая концентрация, эффект подавления ионизации компонентами матрицы и степень извлечения из мочи. Степень извлечения рассчитывали как отношение интенсивностей сигналов, полученных при анализе экстрактов образцов мочи с добавкой определяемого соединения до и после проведения всех стадий пробоподготовки, выраженное в процентах. Для установления минимально определяемой концентрации анализировали пять образцов мочи с добавкой соединений на пяти разных концентрационных уровнях: 0.05, 0.1, 0.5, 2 и 5 нг/мл. Основные метрологические характеристики методики определения ГнРГ и его агонистов в моче представлены в табл. 4.

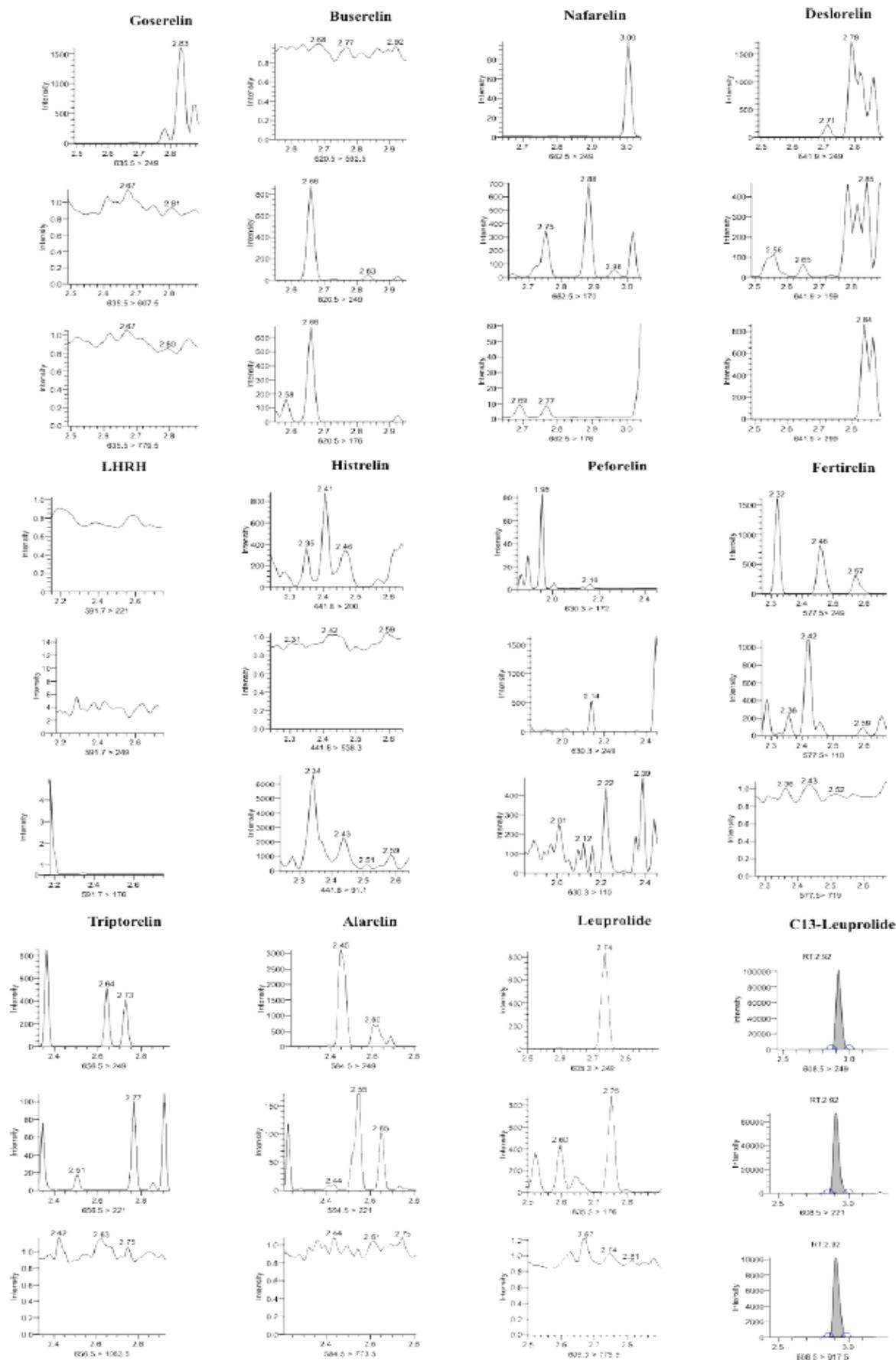


Рис. 10. Масс-хроматограммы экстракта образца синтетической мочи, полученные методом СВЭЖХ-МС/МС в SRM-режиме (скрининговая распечатка).

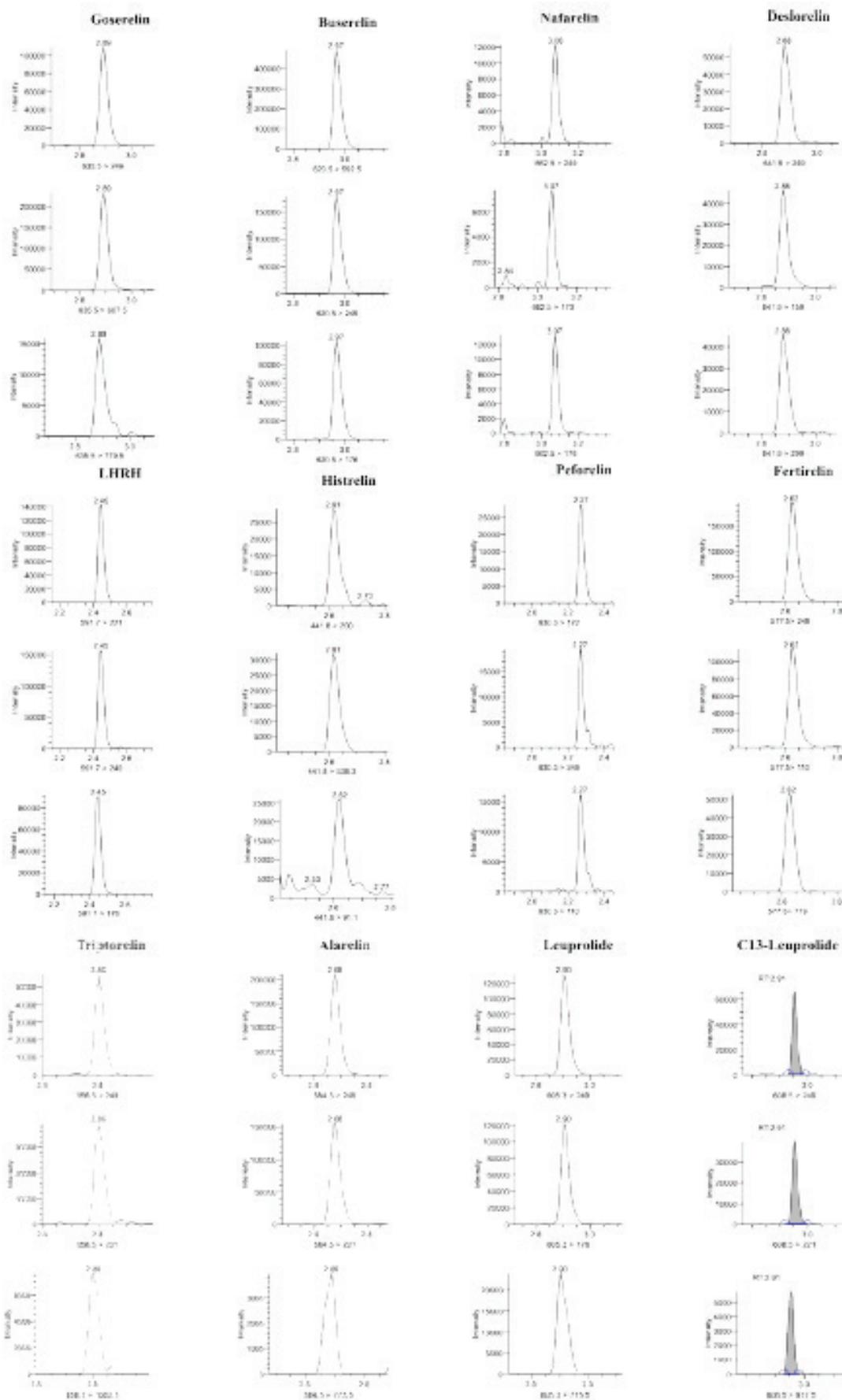


Рис. 11. Масс-хроматограммы экстракта внешнего образца контроля качества, содержащего по 2 нг/мл ГнРГ и его агонистов, полученные методом СВЭЖХ-МС/МС в SRM-режиме (скрининговая распечатка).

Таблица 4. Метрологические характеристики методики определения ГнРГ и его синтетических агонистов в моче методом СВЭЖХ-МС/МС ($n=5$)

Соединение	Степень извлечения, %	Предел обнаружения, нг/мл	Эффект матрицы, %	
			Усиление	Подавление
Пефорелин	52.6 ± 4.8	0.5	45.4 ± 17.9	–
Нафарелин	77.1 ± 10.3	0.5	117.9 ± 19.7	–
Дезлорелин	96.0 ± 6.6	0.1	125.9 ± 23.2	–
Фертирелин	91.1 ± 15.8	0.1	3.1 ± 17.1	–
Леупролид	93.9 ± 13.4	0.5	230.3 ± 39.7	–
Гистрелин	85.7 ± 10.9	0.5	15.3 ± 24.0	–
Гозерелин	100.7 ± 13.4	0.1	354.4 ± 58.7	–
Бусерелин	106.9 ± 11.4	0.1	253.9 ± 78.2	–
Трипторелин	98.5 ± 12.9	0.5	50.8 ± 10.9	–
Аларелин	94.8 ± 11.4	0.5	–	1.8 ± 10.5
ГнРГ	96.8 ± 12.5	0.1	12.1 ± 17.3	–

Выводы

В данной работе представлена методика масс-спектрометрического детектирования суперагонистов ГнРГ, которые потенциально могут использоваться спортсменами в качестве допинга. Проведена оптимизация хроматографических и масс-спектрометрических условий определения изучаемых соединений. Пределы обнаружения ГнРГ и его синтетических агонистов варьировались от 0.01 до 0.1 нг/мл.

Данный способ может использоваться для определения ГнРГ и его аналогов в биологических жидкостях человека в целях антидопингового контроля.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства спорта Российской Федерации в рамках государственного контракта № 396 от 14.07.2016 г. «Разработка методики анализа рилизинг гормона лютеинизирующего гормона и его синтетических аналогов в биологических жидкостях человека».

Список литературы / References:

1. Mareck U., Geyer H., Opfermann G., Thevis M., Schänzer W. Factors influencing the steroid profile in doping control analysis // J. Mass Spectrom. 2008. V. 43. № 7. P. 877–891.
2. Handelsman D.J. The rationale for banning human chorionic gonadotropin and estrogen blockers in sport // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006. V. 91. № 5. P. 1646–1653.
3. Stenman U.H., Hotakainen K., Alfthan H. Gonadotropins in doping: pharmacological basis and detection of illicit use // Br. J. Pharmacol. 2008. V. 154. № 3. P. 569–583.
4. Gore A.C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons: gene expression and neuroanatomical studies // Prog. Brain Res. 2002. V. 141. P. 193–208.
5. Esposito S., Deventer K., Geldof L., Van Eenoo P. In vitro models for metabolic studies of small peptide hormones in sport drug testing // J. Pept. Sci. 2015. V. 21. № 1. P. 1–9.
6. Richards S.L., Cawley A.T., Cavicchioli R., Suann C.J., Pickford R., Raftery M.J. Aptamer based peptide enrichment for quantitative analysis of gonadotropin-releasing hormone by LC-MS/MS // Talanta. 2016. V. 150. P. 671–680.
7. Thomas A., Walpurgis K., Krug O., Schänzer W., Thevis M. Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry // J. Chromatogr. A 2012. V. 1259. P. 251–257.

8. Thomas A., Geyer H., Kamber M., Schänzer W., Thevis M. Mass spectrometric determination of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in human urine for doping control purposes by means of LC-ESI-MS/MS // J. Mass Spectrom. 2008. V. 43. № 7. P. 908–915.
9. Handelsman D.J., Swerdloff R.S. Pharmacokinetics of gonadotropin-releasing hormone and its analogs // Endocr. Rev. 1986. V. 7. № 1. P. 95–105.
10. Yoshida T. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review // J. Biochem. Biophys. Methods. 2004. V. 60. № 3. P. 265–280.
11. Sample preparation and chromatographic columns of company Waters // Аналитический контроль. Фармацевтическая отрасль (Analytical Control. Pharmaceutical Industry). 2010. V. 23. № 6. P. 88–89 (in Russ.).
12. Garcia M.C. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. 2005. V. 825. № 2. P. 111–123.
13. Roepstorff P., Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides // Biomed. Mass Spectrom. 1984. V. 11. № 11. P. 601.
14. Johnson R.S., Martin S.A., Biemann K., Stults J.T., Throck Watson J. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine //

Anal. Chem. 1987. V. 59. № 21. P. 2621–2625.

15. Bakhtiar R., Guan Z. Electron capture dissociation mass spectrometry in characterization of peptides and proteins // *Biotechnol. Lett.* 2006. V. 28. № 14. P. 1047–1059.

16. Sofianos Z.D., Katsila T., Kostomitsopoulos N., Balafas V., Matsoukas J., Tselios T., Tamvakopoulos C. *In vivo* evaluation and *in vitro* metabolism of leuprolide in mice – mass spectrometry-based biomarker measurement for efficacy and toxicity // *J. Mass Spectrom.* 2008. V. 43. № 10. P. 1381–1392.

17. Michalet S., Favreau P., Stocklin R. Profiling and *in vivo* quantification of proteins by high resolution mass spectrometry: the example of goserelin, an analogue of luteinizing hormone-releasing hormone // *Clin. Chem.*

Lab. Med. 2003. V. 41. № 12. P. 1589–1598.

18. Kim H.K., Lee T.H., Suh J.H., Eom H.Y., Min J.W., Yeom H., Kim U., Jung H.J., Cha K.H., Choi Y.S., Youm J.R., Han S.B. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of goserelin in rabbit plasma // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2010. V. 878. № 24. P. 2235–2242.

19. Bioanalysis of biotherapeutics summary [electronic resource] // Waters : [site] : — URL: http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/DA_Waters_Biotherapeutic_Bioanalysis_summary.pdf. Date of access: 15.08.2016.

Об авторах:

Шестакова Ксения Михайловна, инженер отдела пептидного допинга и анализа крови, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Антидопинговый Центр» (105005, Россия, Москва, Елизаветинский пер., д. 10, стр. 1).

Дудко Григорий Алексеевич, начальник отдела хромато-масс-спектрометрических методов анализа, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Антидопинговый Центр» (105005, Россия, Москва, Елизаветинский пер., д. 10, стр. 1).

Дикунец Марина Александровна, кандидат химических наук, директор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Антидопинговый Центр» (105005, Россия, Москва, Елизаветинский пер., д. 10, стр. 1).