



# Количественное определение димерного дипептидного миметика с антидепрессантоподобной активностью в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Колыванов Г. Б., Литвин А. А.,  
Дворянинов Д. А., Жердев В. П., Дорофеев В. Л.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

## Аннотация

В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» создан новый димерный дипептидный миметик с антидепрессантоподобной активностью. Разработана и валидирована специфичная, чувствительная, быстрая и воспроизводимая методика определения гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-аспарагинил-*L*-аспарагина (ГТС-301) в плазме крови крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и tandem масс-спектрометрическим детектором. Нижний предел количественного определения в плазме крови составлял 50 нг/мл. Все градуировочные графики описывались квадратичным уравнением (коэффициент корреляции в среднем 0,996,  $n = 3$ ) в диапазоне концентраций 50–10000 нг/мл. Значения правильности для образцов контроля качества варьировались в течение дня в среднем от 93,2 до 113,3 %. Прецизионность (точность) колебалась в диапазоне 1,1–11,4 %. На протяжении валидационного периода значения правильности в среднем были в пределах 101,1–108,8 % и точности — 5,4–7,3 %. Для градуировочных стандартов величины валидационных параметров также были в пределах допустимых значений (правильность — 92,2–106,8 %, точность — 0,1–11,5 %). Результаты изучения разбавления/разведения экспериментальных проб плазмы крови интактным биоматериалом в 10 и 100 раз лежат в пределах допустимых значений 85–115 %. Установлено, что ГТС-301 устойчив в биологическом материале при комнатной температуре при кратковременном хранении (3 ч), при нахождении в термостатируемом автосемплере (5 °C) в течение аналитического эксперимента (до 20 ч), при длительном хранении при –50 °C (в течение 4 недель), а также, если подвергается нескольким циклам замораживания/размораживания (3 цикла). Таким образом, вышеперечисленные характеристики разработанной методики делают её подходящей для применения в доклинических исследованиях фармакокинетики. Разработанная методика апробирована при изучении фармакокинетики ГТС-301 в плазме крови крыс после однократного внутрибрюшинного введения в дозе 150 мг/кг.

**Ключевые слова:** ГТС-301; высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС); плазма крови; крысы; валидация методики

## Для цитирования:

Кравцова О. Ю., Грибакина О. Г., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Дворянинов Д. А., Жердев В. П., Дорофеев В. Л. Количественное определение димерного дипептидного миметика с антидепрессантоподобной активностью в плазме крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2025;(3):47–56. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-47-56>. EDN: ZQXRFG  
**Поступила:** 01.08.2025. **В доработанном виде:** 05.09.2025. **Принята к печати:** 28.09.2025. **Опубликована:** 30.09.2025.

## Quantification of a dimeric dipeptide mimetic with antidepressant-like activity in rat blood plasma by high performance liquid chromatography-mass spectrometry

Oxana Yu. Kravtsova, Oxana G. Gribakina, Gennady B. Kolyvanov, Alexander A. Litvin, Dmitry A. Dvoryaninov, Vladimir P. Zherdev, Vladimir L. Dorofeev  
Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

## Abstract

A new dimeric dipeptide mimetic with antidepressant-like activity has been developed at the FSBSI "FRC of Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies". A specific, sensitive, fast and reproducible method for the determination of bis-(*N*-monosuccinyl-*L*-asparaginyl-*L*-asparagine hexamethylenediamide (GTS-301) in rat blood plasma using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detector has been developed and validated. The lower limit of quantification in blood plasma was 50 ng/ml. All calibration curves were described by a quadratic equation (correlation coefficient averaged 0.996,  $n = 3$ ) in the concentration range of 50–10000 ng/ml. The accuracy values for the quality control samples varied throughout the day from an average of 93.2 to 113.3 %. The precision ranged from 1.1 to 11.4 %. During the validation period, the accuracy values averaged 101.1–108.8 % and accuracy — 5.4–7.3 %. For the calibration standards, the values of the validation parameters were also within acceptable values (accuracy — 92.2–106.8 %, accuracy — 0.1–11.5 %). The results of the dilution study of experimental blood plasma samples with intact biomaterial in 10- and 100-fold lie within the acceptable values of 85–115 %. It has been established that GTS-301 is stable in the biological material at ambient temperature for short-term storage (3 hours), exposure to a thermostatically controlled autosampler (5 °C) during an analytical experiment (up to 20 hours), and prolonged storage at –50 °C (for 4 weeks), and also if subjected to several freezing/thawing cycles (3 cycles). Thus, the above-mentioned characteristics of the developed

technique make it suitable for use in preclinical pharmacokinetic studies. The pharmacokinetics of GTS-301 in rat blood plasma after a single intraperitoneal injection at a dose of 150 mg/kg was described.

**Keywords:** GTS-301; high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS); blood plasma; rats; validation

### For citations:

Kravtsova OYu, Gribakina OG, Kolyvanov GB, Litvin AA, Dvoryaninov DA, Zherdev VP, Dorofeev VL. Quantification of a dimeric dipeptide mimetic with antidepressant-like activity in rat blood plasma by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2025;(3):47–56. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2025-3-47-56>. EDN: ZQXRFG

**Received:** 01.08.2025. **Revision received:** 05.09.2025. **Accepted:** 28.09.2025. **Published:** 30.09.2025.

## Введение / Introduction

На основе структуры экспонированного участка 4-й петли нейротрофина-3 создан его димерный дипептидный миметик, гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-аспарагинил-*L*-аспарагина) (ГТС-301). Новое соединение сходно с полноразмерным нейротрофином и активировало рецепторы TrkC и TrkB. У ГТС-301 выявлена нейропротекторная активность в экспериментах на клетках гиппокампа мыши HT-22 в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности в концентрациях  $10^{-12}$  и  $10^{-8}$  М соответственно и антидепрессантоподобная активность в тесте вынужденного плавания на мышах при 7-дневном внутрибрюшинном введении в дозах 10–40 мг/кг [1].

*Цель настоящего исследования* — разработка и валидация методики количественного определения ГТС-301 в плазме крови крыс для последующего изучения его экспериментальной фармакокинетики.

Методику валидировали по следующим параметрам: специфичность (селективность), чувствительность, линейность, прецизионность (точность), правильность, воспроизводимость и стабильность [3–7]. Это первая методика количественного определения ГТС-301 в биоматериале с масс-спектрометрическим детектированием, которая может быть применена для фармакокинетических исследований.

## Материалы и методы / Materials and methods

В работе использовали: фармацевтическую субстанцию ГТС-301— гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-аспарагинил-*L*-аспарагина) (М. в. = 772,77 а.е.м.), серия 150424-1, синтезированную в лаборатории пептидных регуляторов Отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», как описано ранее [2], а также следующие реактивы — ацетонитрил («J.T. Baker», США), вода деионизованная («Pangreас», «Applichem», ФРГ), кислота муравьиная 85 % («Acros Organics», Россия).

## Оборудование и условия хроматографирования

В работе использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Ultimate 3000, Thermo Scientific, США), совмещённую с масс-спектрометрическим (МС) детектором — тип тройной квадруполь (TSQ Altis, Thermo Scientific, США). В составе ВЭЖХ: бинарный четырёхканальный насос, дегазатор подвижной фазы, термостат хроматографических колонок, автосемплер, термостат автосемплера. Для регистрации и обработки данных использовали программное обеспечение Xcalibur v.4.2.28.14 (Thermo Scientific, США). Хроматографическое разделение проводили на колонке «Luna C18(2), 3 мкм, 20×4.0 мм, 100A (Phenomenex, США, part#600779-1) (температура колонки — 40 °С) в режиме градиентного элюирования: 0,0 мин — 2 % Б; 1,0–2,2 мин — 98 % Б; 2,3–3,5 мин — 2 % Б. Скорость потока подвижной фазы — 1 мл/мин. Подвижная фаза состояла из воды деионизованной (А) и ацетонитрила (Б), содержащих 0,1 % кислоты муравьиной (по объёму).

**Животные / Animals.** Животные (35 голов) содержались в лабораторном виварии при 20–22 °С, относительной влажности воздуха 45–65 %, имели постоянный доступ к корму и воде. Эксперименты проводили в соответствии с «Руководством по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований. Рекомендация ЕАЭС №33 от 14.11.2023».

Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с нормативной документацией (ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014), касающейся гуманного обращения с животными, и стандартными операционными процедурами лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Проведение экспериментов с животными одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

### Биоматериал и экспериментальные пробы

В настоящей методике биоматрицей для приготовления модельных растворов служила плазма крови крыс с массой тела 180–200 г, полученных из питомника «Филиал «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская обл.). У интактных животных пробы крови отбирали

декапитацией в пробирки, содержащие 100 мкл 5 %  $K_2$ ЭДТА. Плазму крови отделяли центрифугированием при 3500 об/мин в течение 15 мин, замораживали при  $-50^\circ\text{C}$  и хранили без добавления консервантов.

Изучение фармакокинетики ГТС-301 в плазме крови крыс проводилось после его однократного внутрибрюшинного введения (в/б) в дозе 150 мг/кг. Соединение ГТС-301 вводили животным в виде суспензии в полисорбате-80 с помощью шприца. Для определения ГТС-301 в плазме крови крыс образцы крови отбирали до введения (контроль) и через 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 и 6,0 ч после введения.

**Пробоподготовка.** Пробоподготовку проводили методом осаждения белков плазмы крови органическим растворителем. К 100 мкл образца плазмы крови добавляли 400 мкл охлаждённого ацетонитрила. Полученный раствор перемешивали на встряхивателе Vortex в течение 5 с и в течение 15 мин на платформе горизонтального встряхивателя, затем 15 мин центрифугировали при 6500 об/мин. Отбирали надосадочный слой (200 мкл) и переносили в вials хроматографические, которые помещали в термостатируемый ( $5^\circ\text{C}$ ) автосемплер системы ВЭЖХ-МС. Объём вкола составлял 5 мкл.

#### **Калибровочные стандарты и образцы контроля качества**

Матричный раствор ГТС-301 (100 мкг/мл) готовили, растворяя навеску в ацетонитриле. Рабочие стандартные растворы требуемой концентрации для построения калибровочных кривых и образцов контроля качества (КК) были приготовлены путём серийных разведений на ацетонитриле. Все растворы до их использования хранили в холодильнике при  $5^\circ\text{C}$ . Растворы (модельные) для построения калибровочных кривых — калибровочные стандарты — ГТС-301 готовили (в дубликate, анализ однократно) внесением рабочего стандартного раствора, эквивалентного 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 нг/мл исследуемого вещества в интактную плазму крови крыс. Образцы КК (модельные растворы) с концентрациями 7,5; 75; 750 нг/мл также готовили (в трипликate, анализ дважды) на плазме крови.

**Валидационные характеристики.** Аналитическую методику количественного определения ГТС-301 валидировали по следующим показателям: *специфичность (селективность)*, *чувствительность*, *линейность*, *прецизионность (точность)*, *правильность*, *воспроизводимость* и *стабильность*. Для оценки влияния мешающих определению веществ и специфичности (селективности) анализировали экстракт плазмы крови, полученный от 6 разных интактных крыс. Для количественного определения целевого соединения строили калибровочные кривые методом линейной регрессии, откладывая по оси ординат (Y) площадь хроматографического пика ГТС-301 и по оси абсцисс (X) его концентрации в нг/мл. Нижний предел количественного определения (НПКО) (*чувствительность*

методики) оценивали как наименьшую концентрацию, которую можно было обсчитать с приемлемой прецизионностью ( $\geq 20\%$ ) и правильностью (80–120 %).

*Прецизионность (точность)* определяли как относительное стандартное отклонение, RSD (%) по формуле:

$$\text{RSD, \%} = (\text{стандартное отклонение, SD} / \text{среднее, Mean}) \times 100$$

Прецизионность (точность) и правильность методики оценивали, анализируя образцы КК (7,5; 75; 750 нг/мл) в течение одного и трёх дней соответственно.

*Правильность* выражали в виде отклонения от носительной погрешности, RE:

$$\text{Относительная погрешность, \%} = (\text{расчётная концентрация} \times 100) / \text{теоретическая концентрация}$$

$$\text{Отклонение правильности, RE \%} = |\text{относительная погрешность} - 100|$$

Отклонение (как в большую, так и меньшую сторону) расчётной концентрации от теоретической для калибровочных проб и образцов КК должно составлять  $\leq 15\%$  (отклонение правильности).

*Воспроизводимость* внутри одного рабочего цикла и между несколькими рабочими циклами оценивалась, исходя из правильности и прецизионности.

Критерии приемлемости вышеперечисленных валидационных параметров оценивали в соответствии с требованиями ЕАЭС, ЕМА и FDA [3–5, 7].

#### **Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки**

Расчёт степени извлечения ГТС-301 из плазмы крови проводили с использованием площадей хроматографических пиков, полученных при анализе проэкстрагированных спайков (*преэкстракционных*) и спайков, приготовленных на заранее проэкстрагированной интактной плазме (*постэкстракционных*). Концентрации ГТС-301 и в пре-, и в постэкстракционных спайках — 100, 1000 и 10000 нг/мл (приготовление в шести повторностях, анализ каждого репликата — однократно).

Для определения эффективности обработки (Process efficiency) сравнивали результаты анализа преэкстракционных модельных растворов (100, 1000 и 10000 нг/мл) с результатами анализа ацетонитрильных стандартных растворов ГТС-301 с такими же концентрациями (приготовление в шести повторностях, анализ каждого репликата — однократно).

Определение матричного эффекта (Matrix effect), то есть, выявление в какой степени влияет присутствие биологической матрицы на ионизацию целевого соединения, проводили с использованием площадей хроматографических пиков ацетонитрильных стандартных растворов ГТС-301 (100, 1000 и 10000 нг/мл) и площадей пиков, полученных при анализе постэкстракционных спайков, содержащих ГТС-301 в концентрациях 100, 1000 и 10000 нг/мл (приготовление



в шести повторностях, анализ каждого репликата — однократно).

**Изучение разбавления/разведения проб интактным биоматериалом (фактор разведения)**

Возможность разбавления/разведения проб интактным биоматериалом изучали на спайках на плазме крови крыс с концентрацией заведомо выше самого верхнего уровня градуировочной зависимости ( $>10$  мкг/мл), а именно 100, 50 мкг/мл (в 100 раз) и 10, 5 мкг/мл (в 10 раз). Приготовленные спайки (в трёх повторностях для каждой концентрации) разводили интактным биоматериалом в 100 и 10 раз соответственно (фактор разведения = 100 и 10), анализировали (полученные после разведения концентрации теоретически уже укладывались в диапазон градуировочной зависимости:  $50 \div 10000$  нг ГТС-301/ мл плазмы крови) и рассчитывали отклонение расчётной концентрации от теоретической.

**Стабильность**

Исследование стабильности ГТС-301, которое проводили на образцах КК (концентрации: 7,5; 75; 750 нг/мл, приготовлены в трёх повторностях, анализ каждого репликата однократно), включало:

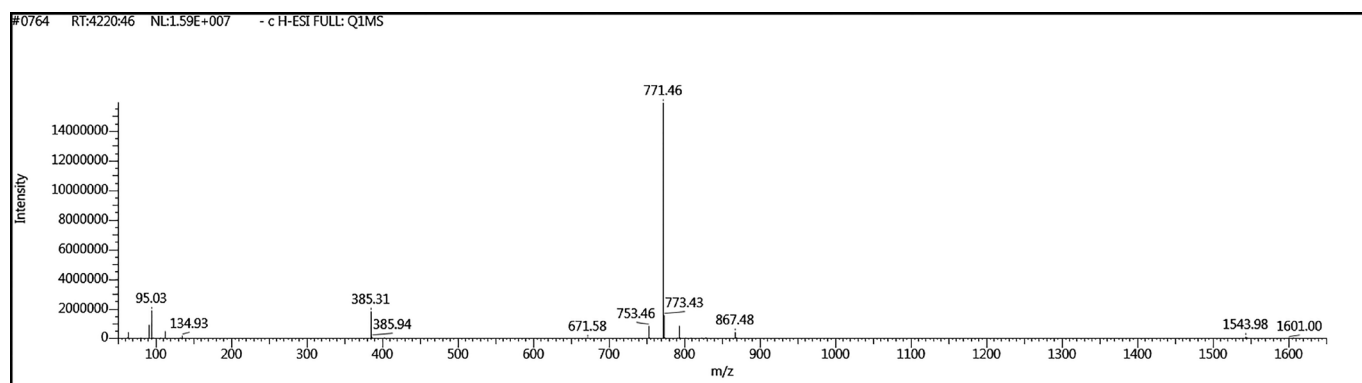
- а) изучение стабильности при многократном замораживании/размораживании (3 полных цикла замораживания/размораживания при  $-50^\circ\text{C}$ , цикл=24 ч);
- б) изучение стабильности при кратковременном хранении (3 ч) модельных растворов при комнатной температуре ( $22-23^\circ\text{C}$ );
- в) изучение стабильности при нахождении готовых проб в автосемплере (при  $5^\circ\text{C}$ ) в течение анализа и дольше, но не более 48 ч;
- г) изучение стабильности при долговременном хранении (30 дней) модельных растворов при  $-50^\circ\text{C}$ .

**Результаты и их обсуждение / Results and Discussion**

**ВЭЖХ-МС условия**

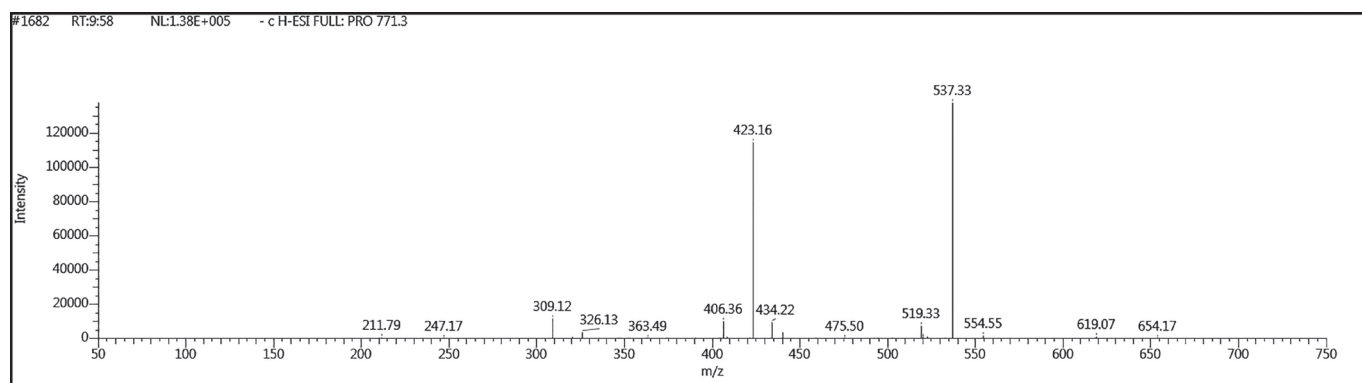
При ионизации методом электроспрей (ESI) в результате сканирования в режиме регистрации полного ионного тока (режим Q1) был определён молекулярный ион ГТС-301 —  $771,3$  m/z, регистрация отрицательных ионов (рис. 1). При регистрации положительных ионов прекурсор-ион тестируемого соединения определялся значительно хуже. Сканирование в режиме MS/MS (регистрация отрицательных ионов) выявило основные пути фрагментации изучаемой молекулы и специфические дочерние ионы — режим Product Ion (Q3):  $537,2$  m/z,  $423,3$  m/z (рис. 2). Анализ в режиме SRM (Q1/Q3) (Selected Reaction Monitoring) позволил подобрать оптимальные настройки прибора для фрагментации молекулы ГТС-301. Регистрацию масс-спектров ГТС-301 проводили в SRM-режиме по переходу  $771,3/537,2$  m/z. Напряжение на капилляре составило 2500 В, температура испарителя  $350^\circ\text{C}$ , температура капилляра переноса ионов составила  $350^\circ\text{C}$ ; энергия фрагментации в коллизионной ячейке 32 В. Параметры вспомогательных газов-распылителей задавались управляющей программой по умолчанию для потока 1 мл/мин.

Используемая в работе колонка обеспечила отличную форму пика целевого анализата, эффективность разделения, приемлемую линейность и воспроизводимость на фоне эндогенных соединений. Оптимизацию состава подвижной фазы проводили, исходя из селективности пика анализата и его времени удерживания. В описанных выше условиях хроматографирования время удерживания ГТС-301 составило  $0,71 \pm 0,01$  мин. На рис. 3 представлена хромато-масс-спектрограмма интактной плазмы крови крысы, а на рис. 4 — плазмы



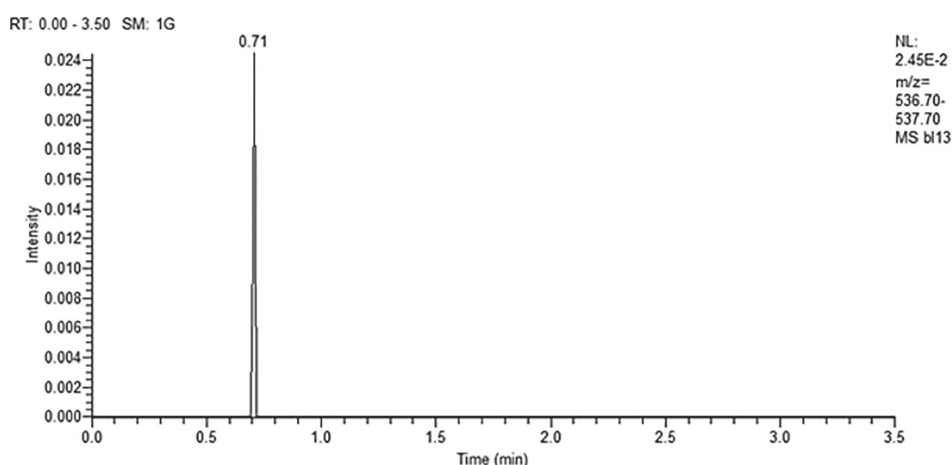
**Рис. 1.** Масс-спектр (режим Q1, суммарный ионный ток) ГТС-301 (стандартный раствор в 1 % ДМСО/0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле/0,1 % муравьиной кислоты в воде (об/об), концентрация — 20 мкг/мл) при ионизации методом электроспрей: регистрация отрицательных ионов. Прекурсор ион,  $[\text{M}-\text{H}]^-$  —  $771,3$  m/z

**Fig. 1.** Mass spectrum (Q1 mode, total ion current) of GTS-301 (standard solution in 1 % DMSO/0.1 % formic acid in acetonitrile/0.1 % formic acid in water (v/v), concentration —  $20 \mu\text{g/ml}$ ) in electrospray ionization: registration of negative ions. Ion precursor,  $[\text{M}-\text{H}]^-$  —  $771.3$  m/z

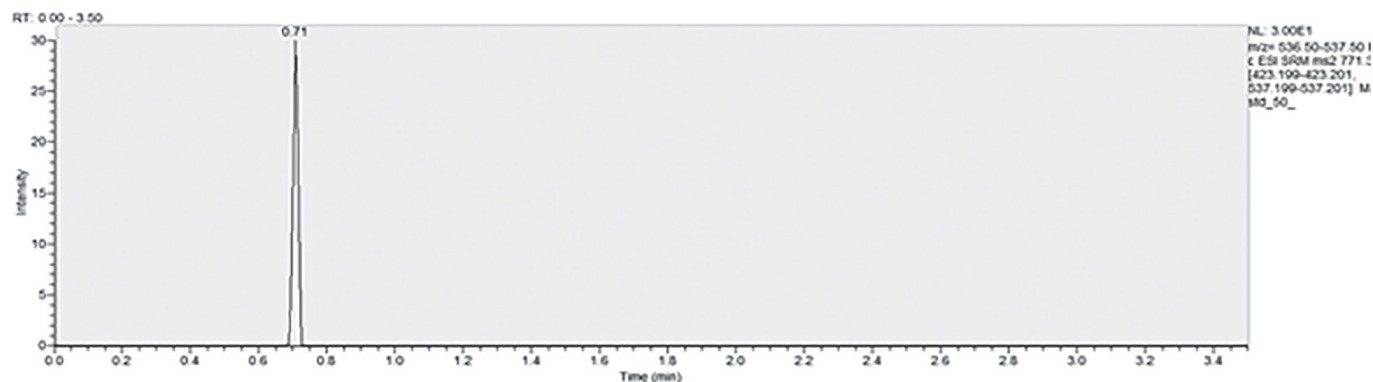


**Рис. 2.** Масс-спектр (режим Product Ion, MS/MS) ГТС-301 (стандартный раствор в 1 % ДМСО/0,1 % муравьиной кислоты в ацетонитриле/0,1 % муравьиной кислоты в воде (по объёму), концентрация — 20 мкг/мл) при ионизации методом электроспрей: регистрация отрицательных ионов. Ион-продукты: 537,2 m/z и 423,3 m/z

**Fig. 2.** Mass spectrum (Product Ion mode, MS/MS) GTS-301 (standard solution in 1 % DMSO/0.1 % formic acid in acetonitrile/0.1 % formic acid in water (v/v), concentration — 20 µg/ml) in electrospray ionization: registration of negative ions. Ion products: 537.2 m/z and 423.3 m/z



**Рис. 3.** Хроматограмма интактной пробы плазмы (проба не содержит ГТС-301)  
**Fig. 3.** Chromatogram of an intact plasma sample (the sample does not contain GTS-301)



**Рис. 4.** Хроматограмма спайка с концентрацией ГТС-301 50 нг/мл — нижний предел количественного определения разработанной методики (НПКО)

**Fig. 4.** Chromatogram of the 50 ng/ml spike GTS-301 (LLOQ)

крови крысы, содержащей 50 нг/мл ГТС-301 (НПКО). Стоит отметить, что на хромато-масс-спектрограмме интактной плазмы крови присутствует пик со временем удерживания 0,71 мин, интерферирующий с пиком целевого анализа, однако соотношение сигнал/шум составляет  $>10$ , что находится в допустимых пределах относительно НПКО.

#### Пробоподготовка

Выбор метода извлечения исследуемого вещества из биоматрицы основывался на его простоте, низкой стоимости по сравнению с твёрдофазной и жидкостно-жидкостной экстракциями и достаточной эффективности. В качестве осаждающего агента использовали: этиловый, метиловый спирты и ацетонитрил. Ацетонитрил проявил себя как наиболее эффективный и доступный агент для осаждения белков при экстракции ГТС-301 (степень извлечения в среднем составила  $109,8 \pm 11,3 \%$ ).

#### Валидационные характеристики

##### Специфичность (селективность)

В результате изучения специфичности (селективности) методики (анализ 6 интактных (холостых) проб плазмы и 6 спайков с концентрацией ГТС-301 50 нг/мл) показано, что компоненты биологического материала по времени удерживания совпадают с пиком целевого соединения. Однако интенсивность пика коэкстрактивных веществ на три порядка меньше пика ГТС-301. Поэтому при расчёте концентраций площадью пика биоматрицы можно пренебречь. Типичные хроматограммы интактной плазмы крови и НПКО ГТС-301 представлены на рис. 3 и 4.

##### Количественное определение целевого соединения.

##### Линейность методики

В результате анализа градуировочных проб в каждый из дней валидации (3 дня), приготовленных в дубликаты, для ГТС-301 выявлена квадратичная зависимость ( $y = ax^2 + bx + c$ ) (исключая холостые пробы) в диапазоне концентраций  $50 \div 10000$  нг/мл. Характеристики полученных градуировочных зависимостей представлены в табл. 1.

##### Чувствительность, нижний предел количественного определения (НПКО) методики

При построении градуировочных зависимостей установлен НПКО применяемой методики в плазме крови крысы для ГТС-301 — 50 нг/мл при соотношении сигнал/шум  $>10$  (анализ 6 спайков). На хроматограмме (см. рис. 4) видно, что пик ГТС-301 симметричный, отвечает распределению Гаусса, без признаков размывания и раздвоения.

##### Прецизионность, правильность и воспроизводимость

Проведён анализ образцов КК ГТС-301, и рассчитаны метрологические параметры валидации, представленные в табл. 2.

Для образцов КК правильность, демонстрирующая насколько сильно расчётное (найденное) значение концентрации отличается от истинного, варьировалась в течение дня в среднем от 93,2 до 113,3 %, то есть, отклонение составило  $\leq 15 \%$ . Точность, определяющая воспроизводимость измерений, колебалась в диапазоне 1,1–11,4 % [4, 5, 7]. На протяжении валидационного периода в течение трёх дней значения правильности в среднем были в пределах 101,1–108,8 %, а точности — 5,4–7,3 %. Прецизионность и правильность, рассчитанная для результатов анализа проб НПКО и калибровочных стандартов, также отвечала критериям приемлемости [4, 5, 7]. В целом можно заключить, что применяемая методика количественного определения ГТС-301 в плазме крови крысы методом ВЭЖХ-МС демонстрирует высокую точность и воспроизводимость в пределах тестируемого диапазона концентраций целевого соединения  $50 \div 10000$  нг соединения/мл плазмы крови.

##### Эффект матрицы, степень извлечения и эффективность обработки

Результаты определения эффекта матрицы [7] позволяют заключить, что присутствие компонентов биоматрицы практически не влияет на ионизацию ГТС-301 (в среднем этот параметр составил  $106,4 \pm 2,5 \%$ ). Степень извлечения достигала в среднем  $109,8 \pm 11,3 \%$ , а эффективность обработки —  $103,0 \pm 8,3 \%$ . Таким

Характеристики градуировочных зависимостей для ГТС-301

Таблица 1

Table 1

Parameters of calibration relationships for GTS-301

| День валидации | Градуировочная зависимость вида $y = ax^2 + bx + c$ |      |        | Коэффициент корреляции ( $r^2$ ) | Фактор взвешивания | Диапазон       | Количество уровней |
|----------------|---|------|--------|----------------------------------|--------------------|----------------|--------------------|
|                | $a$ ( $\cdot 10^{-5}$ )                             | $b$  | $c$    |                                  |                    |                |                    |
| 1              | 0,18  | 0,52 | 12,35  | 0,9969                           | $1/x$              | 0,05–10 мкг/мл | 7                  |
| 2              | 1,64  | 0,47 | –17,87 | 0,9922                           | $1/x^2$            |                | 7                  |
| 3              | 1,15  | 0,56 | –3,44  | 0,9974                           | $1/x$              |                | 8                  |

Примечания:  $y$  — площадь хроматографического пика (counts) ГТС-301;  $x$  — концентрация (нг/мл) ГТС-301.

Notes:  $y$  is the area of the chromatographic peak (counts) of GTS-301;  $x$  is the concentration (ng/ml) of GTS-301.

Таблица 2

Прецизионность, правильность и воспроизводимость ГТС-301 в плазме крови крыс

Table 2

Precision, accuracy, and reproducibility of GTS-301 in rat blood plasma

| Теоретическая концентрация, нг/мл | Внутри цикла   |                           |                            | Между циклами |   |       |       |
|-----------------------------------|--|---------------------------|----------------------------|---------------|---|-------|-------|
|                                   | Расчётная концентрация (среднее), нг/мл; $n =$ , RSD %, RE % |                           |                            | $n$           | Расчётная концентрация (среднее), нг/мл | RSD % | RE %  |
|                                   | 1-й день   | 2-й день                  | 3-й день                   |               |   |       |       |
| 75                                | 85,0<br>6; 2,5;<br>113,3                                     | 83,3<br>6; 1,7;<br>111,0  | 76,6<br>6; 11,4;<br>102,1  | 18            | 81,60                                   | 5,4   | 108,8 |
| 750                               | 781,1<br>6; 6,4;<br>106,8                                    | 794,5<br>6; 5,7;<br>105,9 | 698,6<br>6; 6,4;<br>93,2   | 15            | 758,07                                  | 6,8   | 101,1 |
| 7500                              | 7430,5<br>6; 1,1;<br>99,1                                    | 7450,8<br>6; 2,0;<br>99,3 | 8427,7<br>6; 1,8;<br>112,4 | 18            | 7769,65                                 | 7,3   | 103,6 |

образом, при осаждении белков плазмы ацетонитрилом (как метода пробоподготовки) достигается достаточная степень извлечения ГТС-301 из плазмы крови крысы.

#### Изучение разбавления/разведения проб интактным биоматериалом (фактор разведения)

Результаты изучения разбавления/разведения экспериментальных проб плазмы крови интактным биоматериалом свидетельствуют, что величины отклонений расчётной концентрации от теоретической для всех концентрационных уровней (5, 10 и 50, 100 мкг/мл) лежат в пределах допустимых значений 85–115 %. Данный факт указывает на возможность/приемлемость разведения проб интактным биоматериалом в 10 и 100 раз соответственно.

#### Стабильность

Стабильность ГТС-301 изучали на образцах КК в различных условиях хранения. Матричный раствор целевого соединения в ацетонитриле был стабилен при  $-24^{\circ}\text{C}$  в течение 30 суток. В результате изучения стабильности ГТС-301 при многократном замораживании (при  $-50^{\circ}\text{C}$ ), а именно после трёх полных циклов замораживания/размораживания выявлено, что содержание анализируемого соединения в модельных растворах на плазме не снижалось (табл. 3). Данные, полученные в ходе исследования стабильности ГТС-301 при разных сроках и температурных условиях хранения (кратковременная стабильность в течение 3 ч при комнатной температуре, в течение 24 ч при нахождении в термостатируемом автосемплере ( $5^{\circ}\text{C}$ ), долговременная стабильность при хранении в течение 4 недель (при  $-50^{\circ}\text{C}$ )) демонстрируют устойчивость целевого соединения к распаду во времени при его нахождении в биологическом материале.

Разработанная методика количественного определения ГТС-301 в плазме крови крыс была апроби-

Таблица 3

Стабильность ГТС-301 в плазме крови крыс ( $n = 3$ )

Table 3

Stability of GTS-301 in rat blood plasma ( $n = 3$ )

| Условия хранения | Номинальная концентрация, нг/мл | Расчётная концентрация (среднее), нг/мл | Стабильность (среднее), % |
|------------------|---------------------------------|---|---------------------------|
| а                | 75                              | 81,27                                   | 108,3                     |
|                  | 750                             | 742,3                                   | 99,0                      |
|                  | 7500                            | 7534,0                                  | 100,5                     |
| б                | 75                              | 84,03                                   | 112,1                     |
|                  | 750                             | 788,83                                  | 105,2                     |
|                  | 7500                            | 7474,03                                 | 99,7                      |
| в                | 75                              | 70,53                                   | 94,0                      |
|                  | 750                             | 796,73                                  | 106,2                     |
|                  | 7500                            | 7563,43                                 | 100,8                     |
| г                | 75                              | 71,0                                    | 94,7                      |
|                  | 750                             | 733,0                                   | 97,7                      |
|                  | 7500                            | 7390,0                                  | 98,5                      |

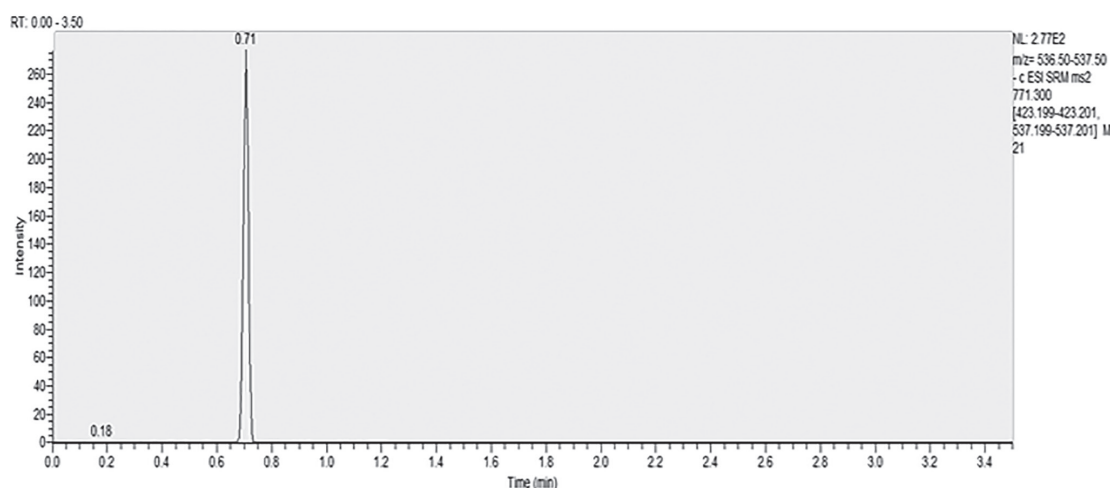
рована при изучении его фармакокинетики после его однократного внутрибрюшинного (в/б) введения.

На рис. 5 представлена типичная хроматограмма плазмы крови крысы через 4 ч после однократного в/б введения ГТС-301 в дозе 150 мг/кг.

Усреднённый фармакокинетический профиль ГТС-301 в плазме крови крыс после однократного в/б введения представлен на рис. 6. Поскольку на каждую временную точку использовали 5 животных, результирующая кривая была построена по усреднённым концентрациям.

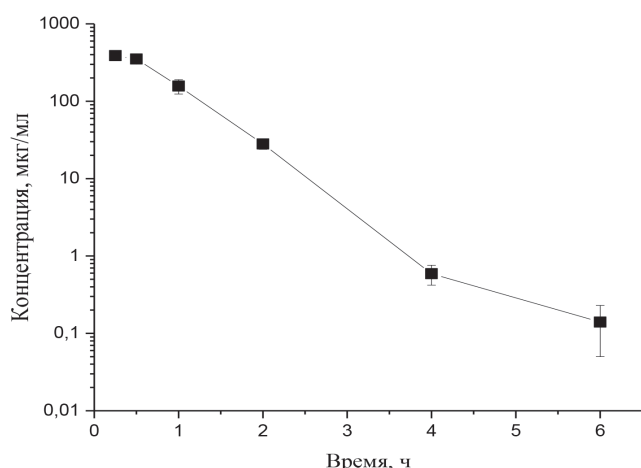
Установлено, что максимальная концентрация ГТС-301 (388,21 мкг/мл) достигается уже через 15 мин после введения, а период полувыведения составляет около полчаса.





**Рис. 5.** Хроматограмма плазмы крови крысы через 4 ч после однократного внутрибрюшинного введения ГТС-301 в дозе 150 мг/кг (концентрация ГТС-301 составляет 640 нг/мл плазмы крови)

**Fig. 5.** Chromatogram of rat blood plasma after 4 h a single intraperitoneal administration 150 mg/kg dose of GTS-301 (The concentration of GTS-301 is 640 ng/ml of blood plasma)



**Рис. 6.** Фармакокинетический профиль ГТС-301 в плазме крови крыс после однократного внутрибрюшинного введения (доза 150 мг/кг) фармацевтической субстанции ( $n = 5$ ;  $\bar{x} \pm SD$ ) в полулогарифмических координатах: на оси ординат —  $\lg$  концентрации ГТС-301

**Fig. 6.** Semi-logarithmic pharmacokinetic profile of GTS-301 in rat blood plasma after single intraperitoneal substance administration (dose 150 mg/kg) ( $n = 5$ ;  $\bar{x} \pm SD$ ): on the ordinate axis —  $\lg$  concentrations of GTS-301

### Закключение/Conclusion

На основании полученных данных можно констатировать, что разработана и валидирована селективная, чувствительная и воспроизводимая ВЭЖХ-МС методика количественного определения димерного дипептидного миметика с антидепрессантоподобной активностью — ГТС-301 в биологическом материале,

которая может быть применена в исследованиях фармакокинетики. Для извлечения ГТС-301 из биоматериала и осаждения белков плазмы крови использовали ацетонитрил, степень извлечения достигала в среднем  $109,8 \pm 11,3$  %. НПКО ГТС-301 в плазме крови крысы составил 50 нг/мл при соотношении сигнал/шум  $>10$ . Все градуировочные графики для ГТС-301, полученные в ходе валидационного периода, имели квадратичную зависимость (уравнение вида  $y = ax^2 + bx + c$ , коэффициент корреляции в среднем 0,996,  $n = 3$ ) в диапазоне концентраций 50–10000 нг ГТС-301/мл плазмы. Валидация разработанной методики включала в себя определение правильности (Ассигура), демонстрирующей насколько сильно расчётное (обнаруженное) значение концентрации отличается от истинного, и точности (Precision), определяющей воспроизводимость измерений. Значения правильности для образцов контроля качества варьировались в течение дня в среднем от 93,2 до 113,3 %, таким образом, отклонение Ассигура не превышало 15 %. Точность для ГТС-301 варьировалась в диапазоне 1,1–11,4 %. На протяжении валидационного периода значения правильности в среднем были в пределах 101,1–108,8 %, а точности 5,4–7,3 %. Для градуировочных стандартов величины валидационных параметров также были в пределах допустимых значений (Ассигура — 92,2–106,8 % и Precision — 0,1–11,5 %). Результаты изучения разбавления/разведения экспериментальных проб плазмы крови интактным биоматериалом (величины отклонений расчётной концентрации от теоретической для всех концентрационных уровней (5, 10 и 50, 100 мкг/мл) лежат в пределах допустимых значений (85–115 %) и указывают на возможность/приемлемость разведения проб интактным биомате-



риалом в 10 и 100 раз соответственно. Изучение стабильности ГТС-301 выявило, что соединение устойчиво в биологическом материале при комнатной температуре при кратковременном хранении (3 ч), при нахождении в термостатируемом автосемплере (5 °C) в течение аналитического эксперимента (до 20 ч), при длительном хранении при –50 °C (в течение 4 недель), а также, если подвергается нескольким циклам

замораживания/размораживания (3 цикла).

Таким образом, вышеперечисленные характеристики разработанной методики делают её релевантной для фармакокинетических исследований. Данная методика апробирована при изучении фармакокинетики ГТС-301 в плазме крови крыс после однократного в/б введения в дозе 150 мг/кг.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

### Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки..

## ADDITIONAL INFORMATION

### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

### Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication.

### Funding

The work was carried out without sponsorship.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Кравцова Оксана Юрьевна** — к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: [kravtsova\\_ou@academpharm.ru](mailto:kravtsova_ou@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>  
РИНЦ SPIN-код: 1733-2330

**Oksana Yu. Kravtsova** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Pharmacokinetics Laboratory, Federal Research Center of Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: [kravtsova\\_ou@academpharm.ru](mailto:kravtsova_ou@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0693-2007>  
RSCI SPIN code: 1733-2330

**Грибакина Оксана Геннадьевна** — к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: [gribakina\\_og@academpharm.ru](mailto:gribakina_og@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>  
РИНЦ SPIN-код: 6266-8161

**Oxana G. Gribakina** — PhD, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Scientist of the Laboratory of Pharmacokinetics, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: [gribakina\\_og@academpharm.ru](mailto:gribakina_og@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4604-4346>  
RSCI SPIN code: 6266-8161

**Колыванов Геннадий Борисович** — д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация  
e-mail: [kolyvanov\\_gb@academpharm.ru](mailto:kolyvanov_gb@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>  
РИНЦ SPIN-код: 2538-8639

**Gennady B. Kolyvanov** — PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Pharmacokinetics, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation  
e-mail: [kolyvanov\\_gb@academpharm.ru](mailto:kolyvanov_gb@academpharm.ru)  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2571-0047>  
RSCI SPIN code: 2538-8639

**Литвин Александр Алексеевич** — д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

**Автор, ответственный за переписку**

e-mail: litvin\_aa@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>

РИНЦ SPIN-код: 6193-5770

**Alexander A. Litvin** — PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Pharmacokinetics, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

**Corresponding author**

e-mail: litvin\_aa@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2818-3457>

RSCI SPIN code: 6193-5770

**Дворянинов Дмитрий Александрович** — м. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

e-mail: dvoryaninov\_da@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0000-0663-1741>

РИНЦ SPIN-код: 4126-9549

**Dmitry A. Dvoryaninov** — Junior Research Scientist of the Laboratory of Pharmacokinetics, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

e-mail: dvoryaninov\_da@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0000-0663-1741>

RSCI SPIN code: 4126-9549

**Жердев Владимир Павлович** — д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

e-mail: zherdev\_vp@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>

РИНЦ SPIN-код: 2213-9592

**Vladimir P. Zherdev** — PhD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Laboratory Pharmacokinetics Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

e-mail: zherdev\_vp@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2710-7134>

RSCI SPIN code: 2213-9592

**Дорофеев Владимир Львович** — д. фарм. н., профессор, и. о. генерального директора ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

**Vladimir L. Dorofeev** — PhD, Dr. Sci. (Pharm), Professor, Acting General Director of Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

## Список литературы / References

1. Гудашева Т.А., Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., и др. Первый дипептидный миметик нейротрофина-3: дизайн и фармакологические свойства. Доклады российской академии наук. Науки о жизни. 2022;505(1):303-309. [Gudasheva TA, Sazonova NM, Tarasiuk FV, et al. The first dipeptide mimetic of neurotrophin-3: design and pharmacological properties. *Reports Russ. Acad. Sci. Life Sci.* 2022;505(1):303-309. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S2686738922040059. EDN: HYVEYB
2. Патент РФ RU 2800369C9/05.04.2022. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. и др. Димерные дипептидные миметики нейротрофина-3. [Patent RUS RU 2800369C9/05.04.2022. Seredenin SB, Gudasheva TA, et al. Dimeric dipeptide mimetics of neutriphine-3. (In Russ.)].
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. Мионов А.Н. (ред.), Гриф и Ко, Москва. 2013. [Guidelines for the Examination of Medicines. Tom 1. Ed by Mironov AN, Moscow, Grif I Ko, 2013. (In Russ.)]. ISBN: 978-8125-1858-5.

4. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, Совет Евразийской экономической комиссии, решение от 3 ноября 2016 №85. [Guide to the Expertise of Medicinal Products. Volume I, Rules for Conducting Bioequivalence Studies of Medicinal Products within the Eurasian Economic Union, Council of the Eurasian Economic Commission, Decision No. 85 of November 3, 2016. (In Russ.)].
5. EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use, London, 2011.
6. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003 Jul 1;75(13):3019-30. doi: 10.1021/ac020361s.
7. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioanalytical method validation. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 2018.