

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Химический факультет
Кафедра аналитической химии

На правах рукописи



БЕРИЗОВСКАЯ ЕЛЕНА ИГОРЕВНА

Разработка унифицированного способа установления подлинности
лекарственных средств пептидной и белковой природы методом
масс-спектрометрии высокого разрешения

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н., с.н.с., Родин И.А.

Москва – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1 Обзор литературы.....	14
1.1 Роль лекарственных средств пептидной и белковой природы в современной фармакологии.....	14
1.1.1 Препараты инсулина.....	15
1.1.2 Препараты гормона роста.....	17
1.2 Методы исследования пептидов и белков.....	19
1.2.1 Спектрофотометрические методы.....	19
1.2.2 Хроматографические методы.....	20
1.2.3 Методы масс-спектрометрии.....	21
1.2.3.1 Определение молекулярной массы пептидов и белков.....	23
1.2.3.2 Идентификация пептидов и белков.....	25
1.3 Оценка подлинности лекарственных средств пептидной природы.....	37
Глава 2 Материалы и методы исследования.....	40
2.1 Материалы.....	40
2.2 Стандартные образцы.....	41
2.3 Исследуемые образцы.....	41
2.4 Вспомогательное оборудование и средства измерения.....	42
2.5 Приготовление рабочих и буферных растворов.....	43
2.5.1 Подготовка деионизованной воды.....	43
2.5.2 Приготовление реактива Бредфорда.....	44
2.5.3 Приготовление 5 % водного раствора муравьиной кислоты.....	44
2.5.4 Приготовление 0,1 % водного раствора гидроксида натрия.....	44
2.5.5 Приготовление денатурирующего буферного раствора.....	45
2.5.6 Приготовление раствора для восстановления дисульфидных связей.....	45
2.5.7 Приготовление раствора для модификации сульфгидрильных групп.....	46
2.5.8 Приготовление буферного раствора для проведения ферментативного расщепления.....	46
2.5.9 Приготовление раствора трипсина из свиной поджелудочной железы.....	47

2.5.10 Приготовление раствора эндопротеиназы Glu-C из <i>Staphylococcus aureus</i> V8	47
2.5.11 Приготовление раствора эндопротеиназы Asp-N из <i>Pseudomonas fragi</i>	47
2.5.12 Приготовление раствора эндопротеиназы Lys-C из <i>Lysobacter enzymogenes</i>	48
2.5.13 Приготовление раствора эндопротеиназы Arg-C из подчелюстной железы мыши	48
2.5.14 Приготовление растворов стандартных образцов	48
2.5.15 Приготовление растворов лизатов стандартных образцов	49
2.5.16 Приготовление растворов исследуемых образцов	50
2.5.17 Приготовление растворов лизатов исследуемых образцов	51
2.5.18 Приготовление подвижной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии	52
2.6 Техника эксперимента	53
2.6.1 Качественное определение наличия веществ пептидной природы по методике Бредфорда	53
2.6.2 Изучение влияния вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств пептидной или белковой природы на полноту ферментативного расщепления	53
2.6.3 Условия хроматографического разделения	55
2.6.4 Условия спектрофотометрического детектирования	55
2.6.5 Условия масс-спектрометрического детектирования	56
2.6.6 Определение моноизотопной молекулярной массы действующего вещества лекарственного средства	57
2.6.7 Обработка результатов с использованием специализированного программного обеспечения	58
Глава 3 Результаты и обсуждение	59
3.1 Алгоритм установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы	59

3.2 Оценка наличия соединений пептидной или белковой природы спектрофотометрическим методом	63
3.3 Оценка подлинности действующего вещества лекарственного средства по соответствию теоретической и экспериментально установленной моноизотопных молекулярных масс	64
3.4 Оценка подлинности действующего вещества лекарственного средства по соответствию теоретической и экспериментально установленной аминокислотной последовательности.....	66
3.4.1 Изучение влияния вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств пептидной или белковой природы на полноту ферментативного расщепления	66
3.4.2 Получение масс-спектров фрагментных ионов с использованием алгоритма интеллектуального управления измерениями	77
3.4.3 Обработка полученных результатов с использованием специализированного программного обеспечения.....	90
Глава 4. Апробация унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы	100
4.1 Подлинные лекарственные средства.....	100
4.1.1 Препараты инсулина	100
4.1.2 Препараты рекомбинантного соматотропного гормона	107
4.2 Фальсифицированные лекарственные средства и субстанции	110
ВЫВОДЫ	120
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	122
ПРИЛОЖЕНИЕ	144

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

CID (ДАС)	– collision induced dissociation (диссоциация, активированная соударениями)
DDA	– Data Dependent Acquisition (алгоритм интеллектуального управления измерениями)
DTT	– дитиотреитол
ESI	– ионизация электрораспылением
HCD (ДАСПЭ)	– higher-energy C-trap dissociation (диссоциация, активированная соударениями при повышенной энергии)
MALDI	– лазерная десорбционная ионизация в присутствии матрицы
PMF	– peptide mass fingerprint (картирование масс пептидов)
ТСЕР	– трис-(2-карбоксиэтил)фосфин
ТЕА	– триэтиламмоний бикарбонат
Tris-HCl	– трис(гидроксиметил)аминометан
БФ	– Британская фармакопея
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГР	– гормон роста
ГФ РФ	– Государственная фармакопея Российской Федерации
ДМФА	– диметилформаид
ЕФ	– Европейская фармакопея
ЖК	– жирные кислоты
ИК	– инфракрасное излучение
ЛС	– лекарственное средство
м.д.	– миллионные доли
МС	– масс-спектрометрия
МС/МС	– тандемная масс-спектрометрия
ОФС	– общая фармакопейная статья
ПСА	– полисиаловая кислота

ПЭГ	– полиэтиленгликоль
РИЧ	– рекомбинантный инсулин человека
РСГ	– рекомбинантный соматотропный гормон человека
СД	– сахарный диабет
УФ	– ультрафиолетовое излучение
Ф.США	– Фармакопея Соединенных Штатов Америки
ЭДТА	– натрия этилендиаминтетраацетат двузамещенный
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В настоящее время фальсификация лекарственных средств (ЛС) является серьезной проблемой. По оценкам экспертов 30-40 % всех ЛС, находящихся на фармацевтическом рынке Российской Федерации, являются контрафактными [1].

С каждым годом применение в терапевтических целях биологически активных пептидов и белков, таких как, например, инсулина, соматотропина, интерферонов, гормонов, факторов роста и т.п., возрастает. Проводятся исследования по модификации известных фармакологических структур с целью получения более активных аналогов, обладающих меньшими побочными эффектами. Для устранения затруднений применения лекарственных средств пептидной и белковой природы (например, невозможности перорального введения, быстроты распада после введения, длительных вторичных эффектов и др.) их модифицируют путем введения дополнительных групп. Вариативность лекарственных форм пептидных препаратов создает дополнительные трудности при разработке унифицированных процедур их контроля. В последние годы сообщалось [2, 3] о подделке препаратов соматотропина в США (Серостим), а в России, по результатам исследования Ассоциации международных фармацевтических производителей, фальсификация гормональных препаратов системного действия занимает второе место. В связи с вышеизложенным, важной задачей является контроль подлинности ЛС пептидной и белковой природы.

Одним из показателей, подлежащим обязательному контролю на соответствие требованиям нормативной технической документации, является подлинность действующего вещества, поскольку замены в аминокислотной последовательности и модификации рекомбинантных пептидов и белков могут привести к фармакологической инактивации, аутоиммунным ответам и другим неблагоприятным эффектам.

В настоящее время контроль качества ЛС пептидной и белковой природы осуществляют в соответствии с требованиями действующей на территории РФ

Государственной Фармакопеи (ГФ РФ) и МУК 4.1/4.2.588-96. Для определения подлинности действующих веществ применяются методики, разработанные в 60-80 годах прошлого столетия. Утверждены следующие фармакопейные статьи (ОФС) на методы контроля: «Определение белка» ОФС 42-0053-07, «Биологические испытания инсулина» ОФС 42-0126-09, «Определение цинка в препаратах инсулина» ОФС 42-0118-09 [4, 5] и «Определение электрофоретической чистоты и молекулярных масс генно-инженерных препаратов» [6]. Оценить подлинность действующего вещества можно только с помощью последней ОФС, однако наиболее надежным является метод тандемной масс-спектрометрии, который позволяет установить аминокислотную последовательность образца [7].

Анализ требований зарубежных фармакопей (Британская Фармакопея (БФ), Европейская Фармакопея (ЕФ), Фармакопея США (Ф. США)) [8 – 12] показал, что при оценке качества ЛС пептидной и белковой природы, а также для обнаружения примесей используются следующие физико-химические методы: ИК-спектроскопия, электрофорез, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Метод ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием в варианте пептидного картирования используется для подтверждения подлинности генно-инженерных полипептидов: глюкагона человеческого, соматотропина, инсулина человеческого, инсулина лизпро. В последних изданиях зарубежных фармакопей метод пептидного картирования введен для всех субстанций инсулинов, а в БФ и ЕФ – для соматотропина [8-11, 13]. В Государственной Фармакопее России XII выпуска стандарты, регламентирующие качество субстанций и готовых лекарственных форм пептидов и белков, отсутствуют, что обуславливает необходимость разработки методик установления подлинности ЛС белковой и пептидной природы, ввиду их жизненной потребности для ряда пациентов [4, 5].

Работы в области контроля качества ЛС пептидной и белковой природы зависят от уровня развития аналитической химии и разработки новых методов

химического анализа. В мировой практике для исследования пептидов и белков наиболее распространен метод ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим, преимущественно тандемным (ВЭЖХ-МС/МС), детектированием. Для установления аминокислотной последовательности описано применение различных ферментов с последующей идентификацией продуктов протеолиза [14 – 20]. Использование данного опыта для установления подлинности ЛС пептидной и белковой природы является целесообразным и перспективным.

Таким образом, разработка унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы путем их протеолиза с применением различных ферментов и их комбинаций и последующим ВЭЖХ-МС/МС определением продуктов деградации, а также постадийная экспериментальная оценка разработанного способа является актуальной задачей.

Цели и задачи исследования.

Цель настоящей работы состояла в разработке унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, позволяющего осуществлять контроль их качества с высокой достоверностью при минимальном времени анализа посредством получения большего количества фрагментных ионов благодаря автоматизации масс-спектрометрического детектирования.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- обосновать алгоритм установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы;
- изучить влияние вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств пептидной и белковой природы на полноту протеолиза действующих веществ и подобрать условия подготовки проб с использованием ферментативного расщепления;
- изучить влияние параметров тандемного масс-спектрометрического детектирования высокого разрешения с использованием режима

интеллектуального управления измерениями на степень идентификации аминокислотной последовательности аналитов;

– провести апробацию разработанного унифицированного способа и подтвердить его пригодность для оценки подлинности лекарственных средств пептидной или белковой природы.

Научная новизна.

1. Разработан унифицированный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, предусматривающий:

– предварительную экспресс-индикацию наличия соединений пептидной и белковой структуры в ЛС спектрофотометрическим методом;

– установление моноизотопной молекулярной массы действующих веществ лекарственных средств методом масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением;

– установление аминокислотной последовательности действующих веществ лекарственных средств с использованием химических (восстановление дисульфидных связей, модификация сульфгидрильных групп), биохимических (ферментативное расщепление с применением набора специфических протеаз) и инструментальных методов (ВЭЖХ, тандемная масс-спектрометрия на основе двух стратегий установления аминокислотной последовательности).

2. Разработаны схемы подготовки проб лекарственных средств для идентификации аминокислотной последовательности методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием пяти протеаз (Asp-N, Arg-C, Glu-C, Lys-C, трипсин) и их комбинаций (Glu-C и трипсин и Asp-N и трипсин).

Показано увеличение количества специфических пептидов в среднем в 2,7 раза при использовании предложенного набора протеаз и их комбинаций по сравнению с принятой методикой трипсинолиза. Выявлено, что вспомогательные компоненты готовых форм лекарственных средств способны замедлять процессы ферментативного расщепления действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы. Установлено, что для увеличения полноты ферментативного расщепления готовых форм

лекарственных средств пептидной и белковой природы требуется повышение температуры с 37 до 40-45 °С, увеличение продолжительности реакции ферментативного расщепления с 2-4 до 6 ч.

3. Обоснованы оптимальные параметры масс-спектрометрического детектирования при использовании алгоритма интеллектуального управления измерениями.

Проведена сравнительная оценка влияния параметров работы масс-спектрометра на количество идентифицированных пептидов. Установлено, что при значениях энергии диссоциации (30 ± 15) %, диапазона детектируемых зарядовых состояний 2-6, времени накопления ионов в ловушке 100 мс, ширины изоляции масс 2 m/z, длительности динамического исключения 60 мс, количества ионов в орбитальной ионной ловушке 5×10^5 , диапазона сканирования детектируемых ионов 300-2000 m/z достигается максимальная степень идентификации аминокислотной последовательности. Показано, что выбранные условия применимы для масс-спектрометров разных типов. Данный факт свидетельствует о принципиальной возможности автоматизации процесса масс-спектрометрического анализа лекарственных средств пептидной и белковой природы.

Практическая значимость. Разработанный способ апробирован при контроле качества лекарственных средств на основе рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин, инсулина глулизин, инсулина детемир, рекомбинантного соматотропного гормона человека, тимозина бета, биологически активных добавок к пище, субстанций орексина А и инсулина лизпро. Показана универсальность данного подхода для исследованных препаратов.

Предложенный унифицированный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы внедрен в Федеральном государственном унитарном предприятии «Научный центр «Сигнал» (ФГУП «НЦ «Сигнал»). На основании полученных результатов аттестованы и внесены в область аккредитации ФГУП «НЦ «Сигнал» органом по

аккредитации ОАО ФНТЦ «Инверсия» методики идентификации рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин и рекомбинантного соматотропного гормона человека в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. Проанализировано более 300 проб лекарственных препаратов различных видов, серий и производителей.

На защиту выносятся:

1. Алгоритм установления подлинности ЛС пептидной и белковой природы, позволяющий повысить степень идентификации аминокислотной последовательности и сократить время анализа.

2. Результаты исследований по разработке схемы ферментативного расщепления действующих веществ ЛС пептидной или белковой природы.

3. Результаты исследований по оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования высокого разрешения с ионизацией электрораспылением при атмосферном давлении с использованием режима интеллектуального управления измерениями.

4. Результаты апробации разработанного способа установления аминокислотной последовательности на действующих веществах ЛС с различной длиной пептидной цепи.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на 5-ой Международной конференции-школе для молодежи «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения» (г. Санкт-Петербург, 2013 г.), II Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации», посвящённой 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина (г. Чебоксары, 2014 г.), 2-ой молодежной школе-конференции «Новые методы аналитической химии» (Туапсинский район, с. Ольгинка, 2014 г.), Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» с международным участием, посвященной памяти проф. М.С. Вигдергауза (г. Самара, 2015 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи и 4 тезиса докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 143 страницах машинописного текста (без учета приложения), содержит 67 рисунков и 14 таблиц, в списке цитируемой литературы 213 источников. Приложение включает 6 рисунков и 8 таблиц на 57 страницах.

Автор выражает искреннюю благодарность руководству Федерального государственного унитарного предприятия «Научный центр «Сигнал», а также сотрудникам первого научно-исследовательского отдела за помощь при выполнении исследований и поддержку в работе над диссертацией.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Роль лекарственных средств пептидной и белковой природы в современной фармакологии

За последние десятилетия индустрия биотехнологии создала фармацевтические продукты, основанные на терапевтических рекомбинантных белковых препаратах, таких как инсулин, интерфероны, цитокины, гормоны, факторы роста, биоинженерные антитела, ферменты и ингибиторы ангиогенеза. Первое поколение биотехнологических ЛС – это нативные рекомбинантные человеческие белки. Второе поколение – это аппликации модифицированных белков с улучшением их специфичности с помощью введенных мутаций или слияний целевого белка с другими пептидами (слитные белки). Третье поколение – это продукция терапевтических белков пациентом после трансформации соответствующего гена [21, 22]. Доля биотехнологических ЛС от объема фармацевтического рынка постоянно увеличивается и, по оценке специалистов, в 2015 г. может достичь 50 % [23].

Для получения ЛС с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами в настоящее время ведутся исследования по получению модифицированных пептидов и белков с помощью таких химически модифицирующих агентов, как моно-метокси- или полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловая кислота (ПСА), жирные кислоты (ЖК) и др. [24].

Пептиды и белки, модифицированные полиэтиленгликолем, обладают пролонгированным временем действия и меньшей иммуногенностью по сравнению с нативными препаратами. К их недостаткам можно отнести плохую биодеструкцию в организме человека и обнаружение вырабатываемыми антителами, которые могут влиять на время жизни конъюгата в циркулирующей крови [25, 26].

По сравнению с ПЭГ-препаратами пептиды и белки, модифицированные ПСА, обладают меньшей токсичностью, т.к. ПСА способна биodeградировать в организме человека. Кроме того, данная модификация приводит к сохранению

активности в организме, пролонгированию времени полувыведения из крови и понижению иммуногенности и антигенности. Существенными недостатками являются небольшие выходы реакций и трудность исследований полученных продуктов [25, 27].

Пролонгированность действия ЖК-производных пептидных и белковых препаратов основана на способности по остатку жирной кислоты связываться с сывороточным альбумином, который является носителем многих метаболитов, ЖК и лекарственных препаратов. Важно отметить, что недостатком ЖК-производных пептидов и белков является меньшее сродство к рецепторам, поэтому требуется введение большего количества препарата [28].

Перспективными препаратами пролонгированного действия являются пептиды и белки, модифицированные гликозидами. Конъюгат пептида хорошо деградирует в организме человека, меньше подвергается протеолизу в потоке циркулирующей крови и менее иммуногенен [24].

1.1.1 Препараты инсулина

На сегодняшний день сахарный диабет (СД) является одним из наиболее распространенных эндокринных заболеваний с высокой частотой и тяжестью осложнений. По оценке всемирной организации здравоохранения, к 2025 г. распространенность СД в индустриально-развитых странах удвоится, а в развивающихся утроится и достигнет в мире почти 400 млн. человек [29]. К его осложнениям относятся такие патологии, как гипогликемическая кома; диабетический кетоацидоз; диабетическая ретинопатия, которая может привести к полной потере зрения; диабетическая нефропатия; диабетическая нейропатия (так называемая диабетическая стопа) [30, 31].

При СД 1 типа (инсулиновая недостаточность) единственным способом лечения является пожизненная заместительная инсулинотерапия. Отсутствие соответствующего лечения может привести к летальному исходу. В связи с этим контроль подлинности препаратов на основе инсулина является жизненно важным.

Инсулин является полипептидным гормоном [32], состоит из двух цепей, причем в составе А-цепи 21 аминокислотный остаток, в составе Б-цепи 30 аминокислотных остатков [33, 34]. Обе цепи гормона соединены посредством двух дисульфидных мостиков. Также в А-цепи имеется третья, внутримолекулярная дисульфидная связь.

Инсулин человека имеет среднюю молекулярную массу 5 807 Да [35] и занимает промежуточное положение между белками и пептидами. Молекула инсулина подвержена дезамидированию при низких значениях рН [36], а при $\text{pH} > 10$ полностью теряет активность из-за разрушения дисульфидных мостиков [37]. Инсулин подвержен действию протеолитических ферментов присутствующих в панкреатической железе, таких как трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы. [38].

В последнее время были введены быстродействующие инсулины, такие как инсулин лизпро, инсулин аспарт и инсулин глулизин, которые биодоступны в течение 10-15 мин после введения [39, 40], а также инсулины пролонгированного действия, такие как инсулин гларгин и инсулин детемир. Первичные структуры рекомбинантного инсулина человека (РИЧ) и его аналогов приведены на рисунке 1. Аминокислотные замены, отличающие аналоги от человеческого инсулина, отмечены серым окрашиванием [41].

В настоящее время лидерами в производстве препаратов инсулина являются такие зарубежные компании как Eli Lilly (США), Sanofi-Aventis (Германия-Франция) и Novo Nordisk (Дания). Среди отечественных производителей следует отметить Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Москва), Фармстандарт (Уфа), ЗАО «Национальные биотехнологии» (Оболенск).



Рис. 1 Структуры (а) человеческого инсулина, (б) инсулина лизпро, (в) инсулина глулизин, (г) инсулина аспарт, (д) инсулина гларгин, и (е) инсулина детемир [41].

1.1.2 Препараты гормона роста

В течение многих лет проблема недостаточности гормона роста (ГР) рассматривалась как заболевание детского возраста. Однако в последние годы показано, что недостаточность ГР у взрослых может проявляться клинически и приводить к серьезным метаболическим нарушениям, которые требуют своевременной диагностики и лечения [42, 43]. ГР является одним из весомых факторов регуляции метаболизма и энергетического гомеостаза. Соматотропин

оказывает влияние на обменные процессы в жировой ткани, печени, скелетной мускулатуре и поджелудочной железе [44].

В печени соматотропин стимулирует глюконеогенез и выполняет важную роль в регуляции секреции триглицеридов. Механизм этого процесса до конца не изучен, но влияние соматотропина на пролиферацию гепатоцитов доказано [45 – 47]. Действие ГР на жировую ткань заключается в стимуляции липолиза [48 – 50]. Также показана роль ГР в регуляции синтеза и секреции инсулина [51]. Известно активирующее влияние соматотропина на центральную нервную систему, которое может быть обусловлено увеличением уровня эндорфинов в мозге [52]. Таким образом, приобретённая недостаточность ГР остается одной из актуальных проблем в эндокринологии.

Заместительная терапия рекомбинантным соматотропным гормоном (РСГ) сводит к минимуму последствия метаболических нарушений и доказывает необходимость ее применения [53].

Соматотропин – белок, вырабатываемый и секретируемый передней долей гипофиза, принадлежит к группе гормонов, включающей пролактины и плацентарные гормоны, состоит из 191 аминокислотного остатка, имеет 2 дисульфидные связи между остатками 35-165 и 182-189 и 4 основных α -спирали [54]. Из других особенностей структуры молекулы гормона роста можно отметить наличие гидрофобного ядра, включающего около 20 аминокислотных остатков. Первичная структура рекомбинантного соматотропного гормона человека представлена на рисунке 2. Серым цветом выделена аминокислотная последовательность, отличающая рекомбинантный соматотропный гормон человека от эндогенного [55].

В настоящее время лидерами в производстве препаратов РСГ являются такие компании как Novo Nordisk (Дания), «Merck Serono S.p.A.» (Италия), Pfizer Inc. (Бельгия), Europharm (UK) Co. (Великобритания), Фармстандарт-Уфавита (Россия).

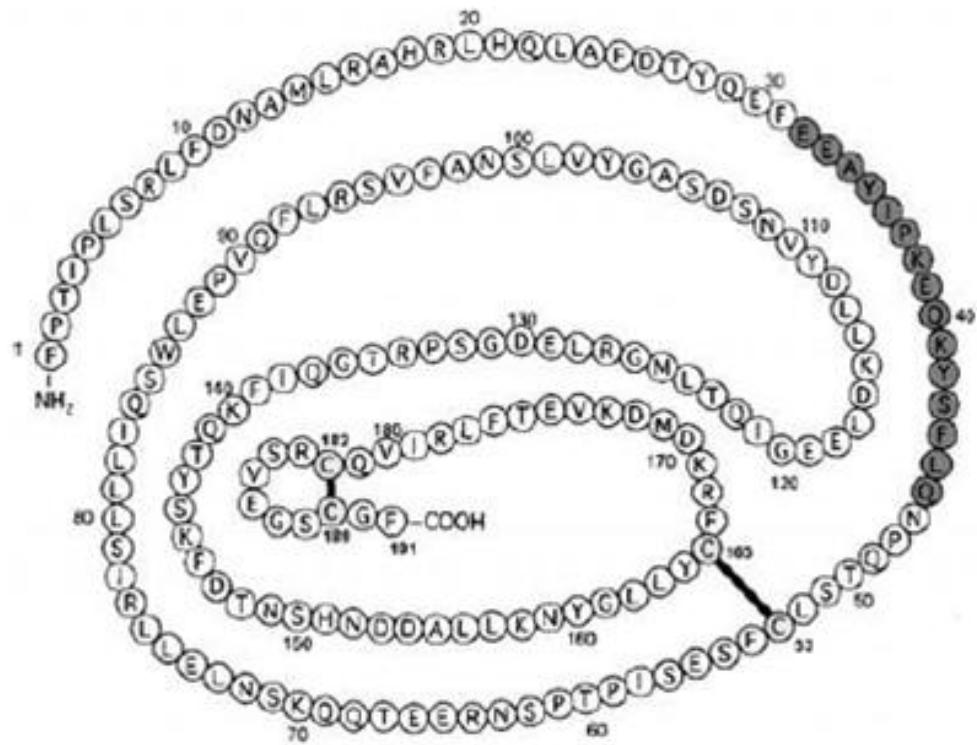


Рис. 2. Структура рекомбинантного гормона роста [55].

1.2 Методы исследования пептидов и белков

1.2.1 Спектрофотометрические методы

В соответствии с ГФ РФ для определения белка предлагается использовать несколько способов [4].

Метод прямого спектрофотометрического определения белка основан на поглощении в диапазоне длин волн 230–300 нм остатками ароматических аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин и гистидин), а также при образовании дисульфидных связей между молекулами цистеина. Использование этого метода ограничено вследствие различного содержания вышеупомянутых аминокислот в составе различных пептидов и белков [56 – 58].

Метод Лоури — один из колориметрических методов количественного определения белков в растворе. Предложен Лоури в 1951 году [59]. Метод основан на биуретовой реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорномолибдено-вольфрамового реактива (или реактива Фолина) в гетеромолибденовый краситель с максимумом поглощения при длине волны 750 нм в результате окисления ароматических аминокислот белка

(главным образом тирозина, а также триптофана и фенилаланина и в меньшей степени цистеина). Развитие окраски достигает максимума через 20-30 мин при комнатной температуре, в дальнейшем идет уменьшение ее интенсивности. Увеличение адсорбции при 750 нм пропорционально концентрации белка. Метод очень чувствителен к наличию в растворе посторонних восстановителей (что затрудняет его использование при определении белка в неочищенных препаратах). Для уменьшения влияния веществ, мешающих определению, проводят дополнительное разведение раствора или осаждение белков трихлоруксусной кислотой. Чувствительность к белку – 10-100 мкг/мл.

Наиболее простым в исполнении и, соответственно, наиболее распространенным, является метод Бредфорда [60], который основан на реакции красителя кумасси с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Связанная форма имеет голубую окраску с максимумом поглощения при $\lambda = 595$ нм. Таким образом, увеличение адсорбции раствора при длине волны, равной 595 нм, пропорционально количеству белка в растворе. Способ даёт хорошее значение концентрации белка в пределах от 2 мкг/мл до 120 мкг/мл [61]. Основным минусом данного метода заключается в том, что краситель связывается только с белками, которые имеют в своем составе аргинин и в меньшей степени – лизин, триптофан, тирозин, фенилаланин и гистидин. Если полипептидная цепь не имеет этих аминокислот, то окрашивания не наблюдается [62].

1.2.2 Хроматографические методы

В настоящее время для разделения и очистки пептидов и белков активно используются хроматографические методы в таких вариантах как обращенно-фазовая [63, 64], нормально-фазовая [64, 65], гель-фильтрационная [64, 66], аффинная [67, 68], иммунная [69]. Наиболее универсальным методом определения чистоты пептидов и белков является обращенно-фазовая хроматография (ОФ ВЭЖХ) [70], основанная на использовании широкого спектра гидрофобных неподвижных фаз [70, 71]. Для разделения компонентов лекарственных средств пептидной и белковой природы чаще остальных используются обращенные фазы с использованием силикагеля с привитыми

алкильными группами C_8 и C_{18} . со средними размерами пор 300 Å [72]. Элюирование лекарственных средств пептидной или белковой структуры или их фрагментов, полученных в результате ферментативного расщепления, в ОФ ВЭЖХ, в основном проводится в режиме градиентного элюирования при $pH=2-3$ при комнатной температуре, поскольку при повышении температуры возможна частичная или полная денатурация белка, что также влияет на хроматографическую подвижность [73 – 75].

1.2.3 Методы масс-спектрометрии

В настоящее время высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (МС) является одним из самых распространенных методов в исследованиях пептидов и белков [76, 77].

О масс-спектрометрии как о методе исследования биологических образцов заговорили с появлением так называемых мягких методов ионизации: электрораспыление или электроспрей (ESI) [78 – 83] и лазерная десорбционная ионизация в присутствии матрицы (MALDI) [84 – 88].

В основе метода электрораспылительной ионизации лежит явление разрушения заряженной частицы жидкости, возникающее в процессе ее испарения в электростатическом поле высокой напряженности, когда силы отталкивания находящихся на ее поверхности зарядов превосходит силы поверхностного натяжения, как это проиллюстрировано на рисунке 3 [89].

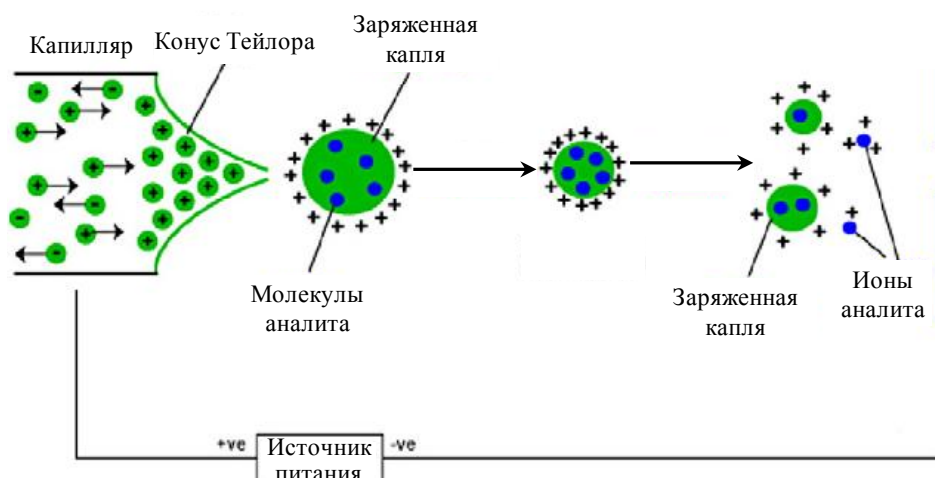


Рис. 3. Схема образования заряженных молекул анализируемого вещества в ходе электрораспылительной ионизации [90].

При ионизации лекарственных препаратов пептидной и белковой природы данным методом обычно используется их водный раствор при кислых значениях рН.

Характерной особенностью электрораспылительной ионизации является образование многозарядных ионов. Поскольку в масс-спектрометрах разделение ионов происходит по соотношению их массы к заряду – m/z , результирующий масс-спектр анализируемого вещества представляется в виде характерного набора ионов с различным числом зарядов на каждом. На рисунке 4 представлен масс-спектр соматотропина, полученный в режиме электрораспылительной ионизации.

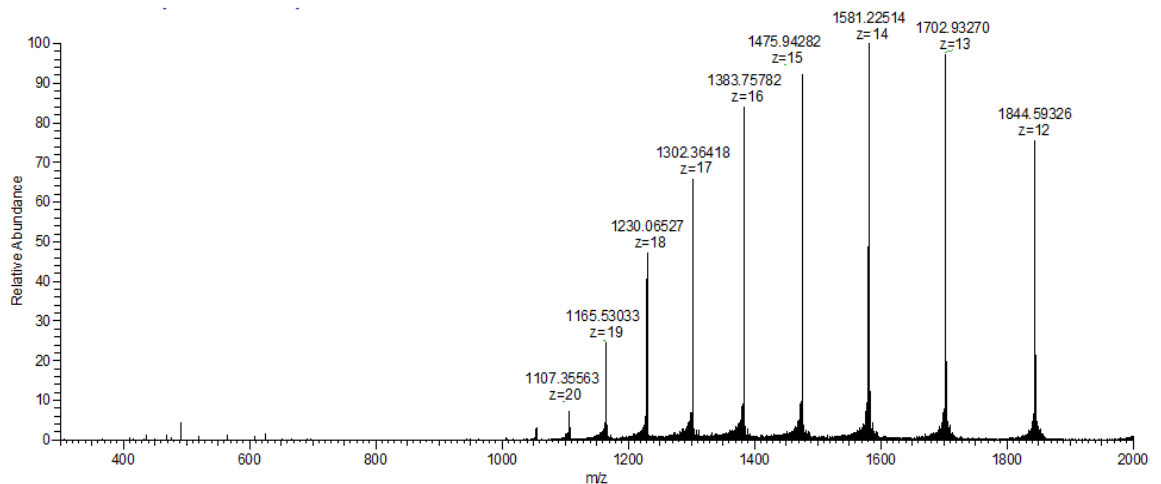


Рис. 4. Многозарядные ионы соматотропина, полученные в режиме электрораспылительной ионизации.

Достоинством многозарядных ионов является возможность получения масс-спектров вторичных ионов при фрагментации ионов-предшественников с различным зарядовым состоянием, что увеличивает степень идентификации аминокислотной последовательности.

При использовании квадрупольных масс-спектрометров или ионных ловушек с верхней границей детектируемых масс на уровне 2 000 Да электрораспылительная ионизация позволяет изучать белки с массой около 100 000 Да. Тем не менее, при анализе белков с помощью данного метода обычно применяют их ферментативные перевары, позволяющие получать более короткие пептиды.

1.2.3.1 Определение молекулярной массы пептидов и белков

Определение молекулярной массы пептидов и белков методом масс-спектрометрии имеет большое значение, так как отражает аминокислотный состав аналита и присутствие модификаций.

Большинство представленных в природе элементов имеют несколько изотопов. Для высокомолекулярных веществ биологического происхождения наибольший вклад в изотопное распределение вносит углерод, имеющий два изотопа – ^{12}C и ^{13}C – с распространенностью 98,9 и 1,1 %, соответственно. В масс-спектрах низкого разрешения изотопное распределение фиксируется в виде единого пика, соответствующего суммарному вкладу изотопов (рисунок 5), и определяется средняя молекулярная масса.

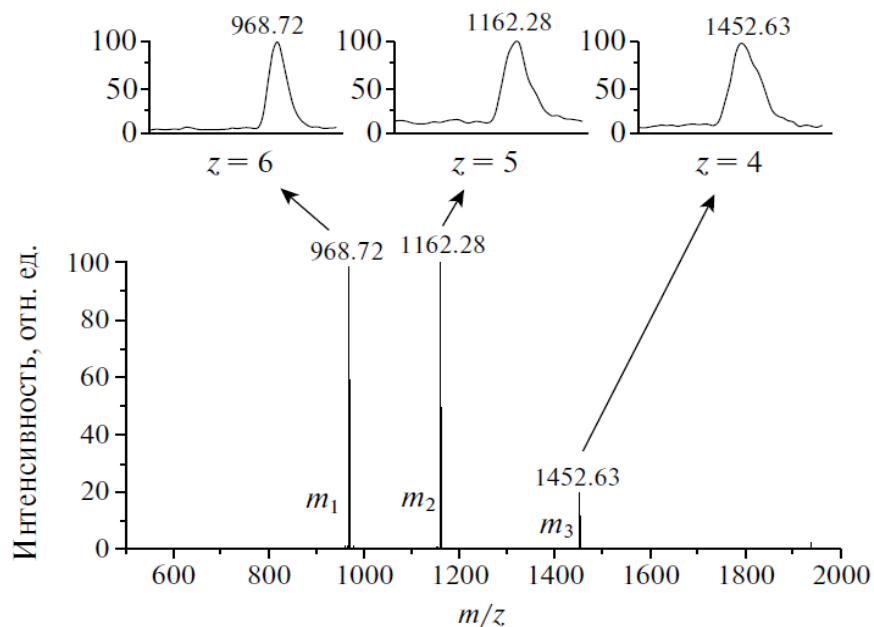


Рис. 5. Масс-спектр низкого разрешения рекомбинантного инсулина человека, полученный в режиме электрораспылительной ионизации (во вставках показаны соответствующие ионы).

Для определения молекулярной массы по масс-спектрам низкого разрешения используется метод деконволюции – расчет средней молекулярной массы иона на основе параметров двух пиков, зарядовые состояния которых отличаются на единицу. Для подсчета значения зарядового состояния индивидуальных ионов и для вычисления молекулярной массы аналита используют пару ионов (например, m_1 и m_2) в масс-спектре исследуемого вещества.

Значение зарядового состояния иона определяют по формуле (1)

$$n_2 = \frac{m_1 - 1}{m_2 - m_1}, \quad (1)$$

где n_2 – зарядовое состояние иона m_2 ;

m_1 и m_2 – значения m/z для мультзарядных ионов в масс-спектре.

Среднюю (по изотопам) молекулярную массу вещества определяют по зарядовому состоянию ионов с использованием формулы (2)

$$M = n * (m - H), \quad (2)$$

где M – молекулярная масса аналита;

n – значение зарядового состояния иона;

m – значение m/z в состоянии n ;

H – масса атома водорода, $H=1$ Да.

В масс-спектрометрах с высокой разрешающей способностью фиксируется набор равноотстоящих пиков изотопных форм мультзарядного иона (рисунок 6). Первый пик в таком кластере соответствует иону, в котором все атомы углерода, входящие в его состав, являются атомами ^{12}C . Масса, соответствующая этому пику, является моноизотопной молекулярной массой.

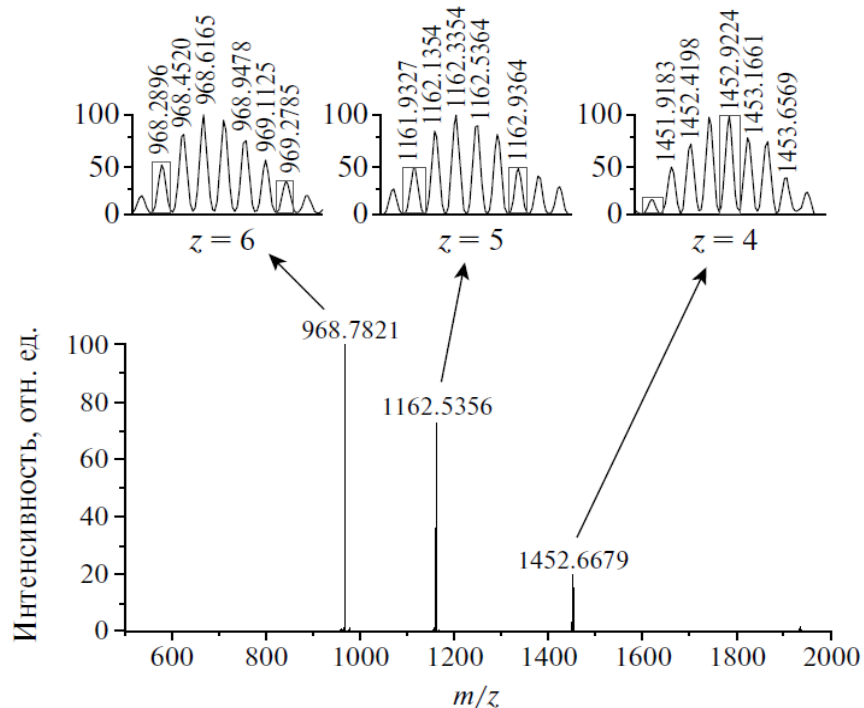


Рис. 6. Масс-спектр высокого разрешения рекомбинантного инсулина человека, полученный в режиме электрораспылительной ионизации (во вставках показаны соответствующие ионы).

В масс-спектрах высокого разрешения зарядовое состояние иона на единицу меньше числа пиков изотопов в интервале массовых чисел 1 Да. Моноизотопную молекулярную массу рассчитывают с использованием формулы (3) (для пика изотопа с наименьшим значением соотношения массы к заряду в кластере изотопов многозарядного иона) по масс-спектральным характеристикам аналитов для различных зарядовых состояний.

$$M_i = n * (m_i - H), \quad (3)$$

где M_i – рассчитанная моноизотопная молекулярная масса исследуемого соединения;

n – значение зарядового состояния иона;

m_i – значение m/z для пика моноизотопного мультитарядного иона;

H – моноизотопная масса водорода, $H=1,0078$.

Определение моноизотопной молекулярной массы для больших белков может быть невозможно вследствие отсутствия пика моноизотопной массы в кластере молекулярного иона из-за вероятности присутствия нескольких более тяжелых изотопов [91].

1.2.3.2 Идентификация пептидов и белков

Одной из важнейших задач определения качества лекарственных средств пептидной и белковой структуры является идентификация белков. Белки идентифицируются главным образом по их аминокислотной последовательности.

При масс-спектрометрическом анализе пептидов и белков различают три подхода [92]:

– «сверху вниз» («top-down») – установление первичной структуры белков исключительно возможностями масс-спектрометрии [93 – 95]. В данном методе получение информации об аминокислотной последовательности пептида происходит за счет выделения узкого диапазона масс ионов-предшественников, их фрагментации и последующей записи масс-спектра фрагментных ионов. Схема эксперимента с использованием данной

стратегии представлена на рисунке 7 [92, 96]. Основой для определения аминокислотной последовательности пептида служит информация, которая содержится в масс-спектрах фрагментных ионов.

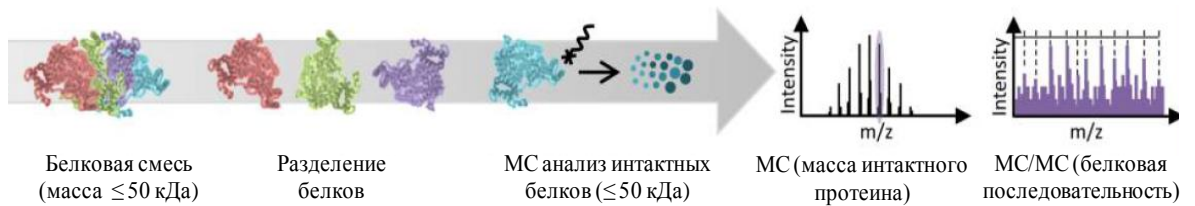


Рис. 7. Схема эксперимента с использованием стратегии «сверху вниз» [92].

Успешная идентификация пептидов с использованием данного подхода продемонстрирована в недавних работах [97 – 105].

– «с середины вниз» («middle-down») – недавно возникший подход, основанный на неполном протеолизе исходного белка с последующим масс-спектрометрическим анализом данных длинных пептидов методом «сверху-вниз» [91]. Таким образом, данный метод комбинирует в себе главные особенности подходов «сверху вниз» и «снизу вверх». Схема эксперимента с использованием данной стратегии представлена на рисунке 8 [92].

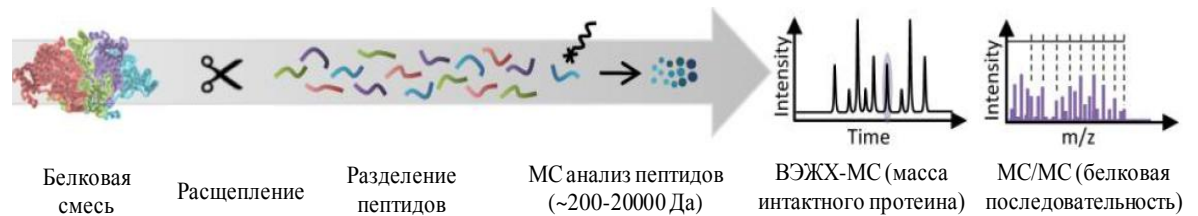


Рис. 8. Схема эксперимента с использованием стратегии «с середины вниз» [92].

Этот подход был предложен Wu с соавторами [106]. При его реализации используют фермент, который «режет» пептид не так часто, как трипсин, что приводит к получению меньшего числа пептидов с большей молекулярной массой по сравнению с фрагментами, получаемыми при трипсинолизе. Примером такого фермента является протеаза Lys-C, которая расщепляет связи Lys-X [107], Asp-N, расщепляющая по остатку аспарагина с N-конца [108], Arg-C и др. [109 – 112]. Также для успешного применения данного метода необходима приборная база, позволяющая получать масс-спектры высокого разрешения и спектры МСⁿ [113, 114].

В работах [91, 115, 116] показано применение данного подхода для получения информации о местах пост-трансляционных модификаций и идентификации конкретных изоформ.

– «снизу вверх» («bottom-up») – наиболее распространенный вариант анализа соединений пептидной структуры [76, 93, 117 – 123].

Эта методика была одновременно предложена пятью группами, независимо друг от друга: Henzel WJ. И др., James P. И др., Roepstorff P. И др., Rappin D.J.C. и др., Yates J.R. и др. [118 – 122]. Образец расщепляется ферментом по заранее известным сайтам. Если речь идет о трипсинолизе, то в белке разрываются пептидные связи, образованные карбоксильными группами лизина и аргинина, если это протеиназа V8 из *Staphylococcus aureus* – то связи Glu-X ($X \neq \text{Pro}$) и т.д. [124]. Схема эксперимента с использованием данной стратегии представлена на рисунке 9 [92].

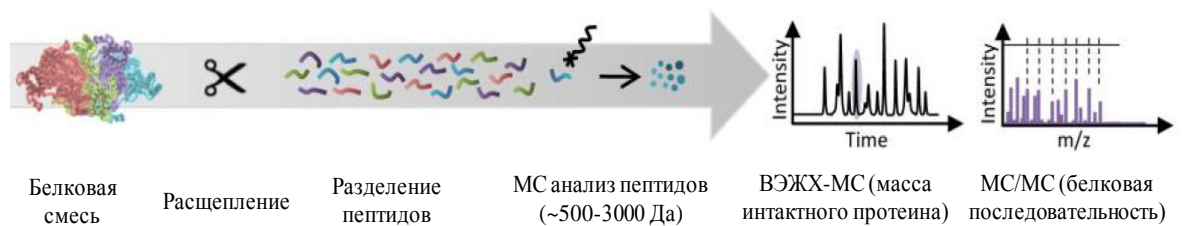


Рис. 9. Схема эксперимента с использованием стратегии «снизу вверх» [92].

После ферментативного расщепления получившуюся смесь пептидов очищают от низкомолекулярных примесей и анализируют на масс-спектрометрах с ионным источником лазерной десорбции-ионизации с участием матрицы (МАЛДИ) или с использованием масс-спектрометров, оснащенных источником ионизации электрораспылением. По полученному спектру масс пептидов производится поиск в базах данных с использованием различных поисковых систем, которые сопоставляют измеренные массы с массами пептидов, гидролизованных теоретически (если заранее задан известный фермент). Такой тип анализа носит название «картирование масс пептидов» (Peptide Mass Fingerprint, PMF), поскольку получаемая карта масс белка уникальна как отпечатки пальцев. Недавние исследования с использованием данного подхода представлены в работах [125 – 129].

Следует отметить, что подход «сверху вниз» позволяет определить пост-трансляционные модификации, однако пригоден для анализа белков с массой до 30 кДа, а с использованием подхода «снизу вверх» возможно исследовать белки с большими молекулярными массами, но при этом получаемые короткие пептиды не всегда являются уникальными, а также затруднено определение модификаций и мутаций [130 – 132]. В качестве решения описанных проблем можно предложить сочетание стратегий «с середины вниз» и «снизу вверх». Данная альтернатива является привлекательной для дальнейших исследований методом ВЭЖХ-МС/МС, поскольку получаемые в результате короткие и средние пептиды позволяют идентифицировать аминокислотные последовательности с выявлением уникальных пептидов и присутствующих модификаций и мутаций.

Использование рекомендованных ферментов для реализации подходов «с середины вниз» и «снизу вверх» возможно по отдельности и в комбинации, что позволяет увеличить количество пептидов, регистрируемых масс-спектрометрическим методом [133]. В результате анализа литературных данных и оценки доступности используемых протеаз были выбраны 5 ферментов, характеристики которых приведены в таблице 1 [92, 124, 134].

Таблица 1 – Сведения о специфичности используемых ферментов

Фермент	Оптимум pH	Основной тип расщепления	Протеолиз не идет
Трипсин	8,0	-Lys-↓-X-; -Arg-↓-X-	-Lys-Pro-
Glu-C	4,0-7,8	-Glu-↓-X-; (-Asp-↓-X-) ¹	-Glu-Pro-; -Glu-Glu-
Asp-N	7,0-8,0	-X-↓-Asp-; -X-↓-cysteic acid	-X-↓-Cys-
Lys-C	8,5-8,8	-Lys-↓-X-	-
Arg-C	7,2-8,0	-Arg-↓-X-	-

Ферментативное расщепление белков может осуществляться в геле или в растворе, а также с использованием концентрирующих фильтров [135]. В первом случае протеолизу предшествует разделение белков по массе (1D-гель

¹ Скорость гидролиза в 3 000 раз ниже основного

электрофорез) или по массе и изоэлектрической точке (2D-гель электрофорез). Использование этой технологии дает возможность применять сильный детергент, такой как додецилсульфат натрия (SDS), для экстракции белков из биологического материала. В данных условиях белки хорошо денатурированы и префракционированы перед воздействием фермента, однако данная методика плохо сопоставима с последующим масс-спектрометрическим количественным анализом, а также требует большого избытка фермента.

Протеолиз в растворе, напротив, хорошо подходит для количественного анализа. Ему предшествуют дополнительные стадии подготовки проб, включающие восстановление и алкилирование, направленные на денатурацию белка, что приводит к разворачиванию аминокислотной цепи и экспозиции аминокислотных сайтов для расщепления протеазами. Денатурирующие условия могут интерферировать с активностью ферментов, но в присутствии низких концентраций денатурирующих агентов, таких как мочевины, большинство протеаз сохраняет активность. В качестве хаотропного агента используют детергенты, например дезоксихолат натрия, характеризующийся стабильностью и химической инертностью по отношению к белкам при повышенных температурах по сравнению, например, с мочевиной [136].

Протеолиз с использованием концентрирующих фильтров объединяет преимущества использования SDS, высоких концентраций хаотропов (6-8 М мочевины) и возможности анализировать белки биологической пробы без предварительного разделения.

Дополнительная структурная информация о пептидах и белках может быть получена при помощи тандемного масс-спектрометрического анализа (МС/МС), который проводится в несколько стадий:

- разделение ионов-предшественников;
- фрагментация этих ионов с образованием вторичных ионов;
- анализ фрагментных ионов [137].

Фрагментация ионов-предшественников в столкновительной ячейке происходит путем разрыва одной из пептидных связей с образованием двух

комплементарных друг другу серий ионов. Вторичные ионы обеих серий обозначаются в соответствии с общепринятой классификацией, предложенной в [138]: фрагменты, содержащие N-конец аминокислотной последовательности, в зависимости разорванной связи обозначаются буквами a, b и c; фрагменты, содержащие C-конец аминокислотной последовательности – буквами x, y и z. На рисунке 10 приведено схематичное изображение места разрыва связи при образовании N-концевых (a, b, c) и C-концевых (x, y, z) фрагментов.

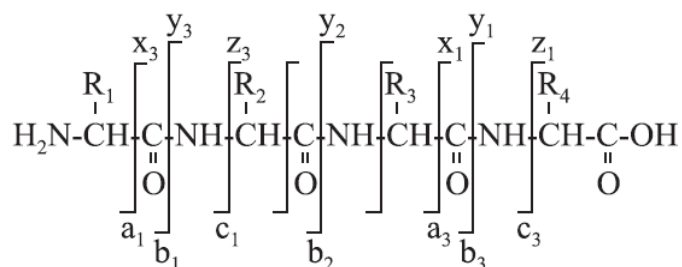


Рис. 10. Схематичное изображение мест разрыва связи при образовании N-концевых (a, b, c) и C-концевых (x, y, z) фрагментов [139].

В настоящее время для фрагментации наиболее часто используется диссоциация, активированная (инициированная) соударениями (CID – collisionally induced dissociation) (ДАС) – в столкновительной ячейке ионы сталкиваются с нейтральными молекулами газа, заполняющего ячейку, что приводит к разрыву ковалентных связей в полипептидной цепи. Фрагментация полипротонированных пептидов, получаемых в случае ионизации электрораспылением, приводит к образованию одновременно b- и y-однозарядных ионов [140]. Разность масс между соседними пиками каждой из серий соответствует массе аминокислотного остатка, расположенного в соответствующем месте последовательности. Следует отметить, что в реальных масс-спектрах y- и b-серии пиков представлены не полностью, что создает определенные трудности при интерпретации масс-спектра [141].

В 2006 г. на орбитальных ловушках фирмы Thermo Scientific появилась опция диссоциация активированная соударениями при повышенной энергии (HCD – higher-energy C-trap dissociation) (ДАСПЭ) – C-ловушка заполнена инертным газом (давление $\sim 5 \times 10^2$ Па) [91]. Использование именно этого

метода диссоциации позволяет получить данные о фрагментных ионах в области низких масс и увеличить количество фрагментных ионов в спектре, недоступных при ДАС [142].

Также существует еще целый ряд вариантов активации разрывов пептидной цепи [143, 144]:

– диссоциация, индуцированная столкновениями с поверхностью (ДИП) [145, 146], при которой фрагментация происходит за счет перехода кинетической энергии разогнанных ионов во внутреннюю при соударении с поверхностью с образованием b- и y-серий фрагментных ионов, как и в случае ДАС и ДАСПЕ;

– инфракрасная многофотонная диссоциация (ИКМФД) [147, 148], при которой фрагментация ионов инициируется за счет поглощения ИК-излучения с энергией фотонов $\sim 0,1$ эВ с образованием ионов b- и y-серий, как и в предыдущем случае;

– диссоциация инфракрасным излучением абсолютно черного тела (ДИИАЧТ) [149, 150] происходит в результате поглощения инфракрасного излучения стенок ячейки Пеннига при нагревании и аналогична ИКМФД;

– ультрафиолетовая фотодиссоциация (УФФД) [151] обусловлена захватом фотона при облучении фторным лазером с рабочей длиной волны 157 нм с образованием ионов преимущественно a- и x-серий ионов;

– диссоциация при захвате электрона (ДЗЭ) [152, 153] происходит вследствие захвата низкоэнергетических (0-1 эВ) электронов полипротонированными молекулами пептидов в ячейке Пеннинга масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса с последующей фрагментацией с образованием c- и z-серий фрагментных ионов;

– диссоциация при переносе электрона (ДПЭ) [154, 155] при которой протонированные пептиды фрагментируются вследствие переноса электрона от анион-радикала с образованием c- и z-серий фрагментных ионов как и при ДЗЭ.

Каждый из перечисленных методов диссоциации полипептидной цепи имеет свои достоинства и недостатки. Комбинации двух или более методов

активации обычно дают больше структурной и фундаментальной информации о диссоциации, чем только один из подходов [156 – 159]. Таким образом, получение наиболее полной картины о структуре исследуемого вещества при использовании различных вариантов активации разрывов с образованием характерных спектров фрагментации диктует необходимость развития данных методов.

В последние годы, с развитием приборостроения и разработкой программного обеспечения для сбора и обработки данных, увеличились скорость и чувствительность, а также повысились качество данных и надежность результатов анализа. При этом исследователи получают гигабайты данных в течение нескольких часов, что затрудняет анализ результатов вручную [160]. Также различаются форматы данных, получаемые в масс-спектрометрических исследованиях, в зависимости от фирмы-производителя оборудования. Таким образом, обработка экспериментальных данных в исследованиях пептидов и белков представляет собой сложную задачу, для решения которой требуются обширные знания многих пакетов программ, имеющих различные алгоритмы, требования к формату данных и пользовательские интерфейсы.

На практике пептиды идентифицируют, как правило, используя системы поиска по базам данных белков, например, Mascot [161], SEQUEST [162], X!Tandem [163], Inspect [164], OMSSA [165], MassMatrix [166], CruX [167], MuriMatch [168], MS-GFDB [169] и др.

Наиболее распространенными поисковыми системами являются первые три из перечисленного выше списка.

Поисковая система Mascot основана на алгоритме MOWSE (MOlecular Weight Search), предложенном в 1993 году Rappin с соавт. Ознакомиться с ресурсом можно на сайте <http://www.matrixscience.com> [170]. Данный алгоритм использует поиск по массовым «отпечаткам пальцев» пептидов. Вначале проводится сравнение масс пептидов из базы данных с экспериментальными данными масс пептидов с учетом заданной погрешности. Затем для каждого

совпадения рассчитывается величина Score (так называемая величина уровня достоверности) в соответствии с формулой 4.

$$Score = \frac{50\,000}{M_{prot} \times \prod_n m_{i,j}}, \quad (4)$$

где M_{prot} — молекулярная масса для каждого совпавшего белка,

Π — произведение, которое рассчитывается из Mowse-матрицы весов M для каждого совпадения экспериментальных данных и масс пептидов, рассчитанных из записей в геномной базе данных [171].

Данный алгоритм может быть применен для MS/MS-поиска. В этом случае в формуле для Score роль белка выполняет пептид, а фрагмент — роль пептида. Сумма же Score пептидов дает Score для белка [161, 171].

Поисковая система Sequest основана на отдельной идентификации каждого масс-спектра [162]. Ознакомиться с ресурсом можно на сайте <http://proteomicsresource.washington.edu/protocols06/sequest.php> и <http://fields.scripps.edu/sequest/index.html>.

Вначале из белковой базы данных отбираются пептиды, соответствующие массе родительского иона исследуемого пептида. Для каждого кандидата генерируется теоретический масс-спектр фрагментации и сверяется с экспериментальными данными [172]. Затем проводят кросс-корреляционный анализ спектров, который сводится к вычислению целочисленной функции $R(\tau)$ по уравнению 5.

$$R(\tau) = \sum_{i=0}^{n-1} x[i]y[i + \tau], \quad (5)$$

где n — число каналов в масс-спектре;

$x[i]$ и $y[i]$ — интенсивность сигналов масс-спектра на i -ом канале;

τ — смещение рассчитанного спектра относительно экспериментального.

Данная функция максимальна при $\tau = 0$ [173].

Поисковая система X!Tandem наиболее развита, так как является программным обеспечением с открытым исходным кодом [163]. Ознакомиться с ресурсом можно на сайте <http://www.thegpm.org/tandem>.

В данном алгоритме рассчитанный и экспериментальный масс-спектры приводятся к виду многомерного вектора из $n = m_{prt}/\Delta m$, где m_{prt} – масса родительского иона, а Δm – максимальная ошибка при определении массы дочернего иона. В рассчитанный масс-спектр включаются массы ионов серий и массы их ионов с нейтральными потерями (NH_3 и H_2O). Для оценки совпадения рассчитанного и экспериментального спектра используется рейтинг, вычисляемый по формуле (6)

$$x = n_b!n_y! \sum_{i=0}^n I_i P_i, \quad (6)$$

где n_b и n_y – число обнаруженных в экспериментальном масс-спектре ионов b- и y-серий соответственно;

$\sum_{i=0}^n I_i P_i$ – скалярное произведение векторов экспериментального и рассчитанного масс-спектров.

Для оценки достоверности идентификации белка вычисляется рейтинг белка E_{pro} по формуле (7), основанный на достоверности e каждого спектра пептида этого белка.

$$E_{pro} = \sqrt{M} \prod_{i=1}^n e_i(x_i^*), \quad (7)$$

где M – общее число спектров;

n – количество спектров, соотнесенных с белком [174].

Также X!Tandem выполняет идентификацию пептидов с неполным или неспецифическим расщеплением или при наличии модификаций в них за относительно короткое время [175].

Описанные алгоритмы не лишены недостатков. Например, Mascot присваивает высокие значения индекса коротким пептидам, которые не всегда являются уникальными для исследуемого белка, также при анализе протеолитических смесей пептидов в списке кандидатов присутствует множество последовательностей с близкими значениями Score, но программа окончательном рапорте оставляет только одну последовательность.

Недостатком алгоритма Sequest является высокая сложность вычислений и обобщений спектров. А X!Tandem, как вероятностный подход, в отдельных случаях не позволяет провести достоверную идентификацию.

Краткое описание более 100 различных алгоритмов и пакетов программ обработки масс-спектрометрических данных по пептидам и белкам представлены на сайтах http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry_software и <http://www.ms-utils.org>.

Использование баз данных для идентификации белков и пептидов позволяет расшифровывать масс-спектры сложных смесей за короткое время [176]. Почти все известные в настоящий момент аминокислотные последовательности белков и пептидов объединены в базы данных, которые находятся в открытом доступе в сети Интернет [91]. Каждая из них имеет свой формат хранения данных, различную степень избыточности, взаимосвязи с родственными или аналогичными базами данных. Все базы данных можно разделить на пять типов. Первый тип – это архивные базы данных, в которых информация добавляется исследователями. К таким базам данных относятся GenBank, EMBL, PDB. Второй тип – это курируемые базы данных – содержание записей курируется специалистами, к ним относятся, например, Swiss-Prot. Третий тип – автоматические базы данных, в них записи генерируются компьютерными программами, к ним относятся, например, TrEMBL. Следующий тип – производные базы данных, которые пополняются за счет обработки данных из баз данных первых двух типов. Сюда входят SCOP, PFAM, GO и др. Пятый тип – интегрированные базы данных, которые объединяют информацию из различных баз. К такому типу относится ENTREZ [177].

Определение аминокислотной последовательности пептидов и белков без использования поисковых программ и баз данных называется *de novo* секвенированием. Такой подход применяется для идентификации не описанных ранее белков, при наличии неисследованных мутаций, пост-трансляционных модификаций и т.д. Применяемые алгоритмы *de novo*

секвенирования основаны на различных математических методах. Первые алгоритмы определения аминокислотной последовательности [178, 179] представляли собой перебор всех возможных комбинаций аминокислот, составляющих массу родительского иона, фрагментацию которых сравнивали с экспериментальным масс-спектром. Очевидно, что погрешность измерения массы родительского иона влечет за собой увеличение количества соответствующих ему комбинаций.

Еще один подход представляет собой рассмотрение малой части последовательности (тэга), к которой добавляются с обеих сторон аминокислоты, пока не будет достигнута соответствующая масса родительского иона [180 – 183]. При этом неполная фрагментация пептида может привести к потере кандидатных последовательностей.

В 1990 г. С. Bartels была предложена теория графов [184]. Ее суть состоит в следующем: каждому пику в масс-спектре сопоставляется вершина графа, между двумя вершинами проводится ребро, если разница масс между соответствующими пиками в спектре равна массе одного или нескольких аминокислотных остатков. Также в граф добавляются вершины N- и C- концов. Секвенирование *de novo* проводится за счет поиска пути в графе от N-конца к C-концу. Примеры использования теоретико-графового подхода описаны в работах [185 – 190] и используются в алгоритмах Lutefisk, Sherenga.

Динамическое программирование – это метод декомпозиции задач, который позволяет решить задачу об антисимметричных путях в графе спектра [191]. Использование данного метода в алгоритмах PEAKS, PepNovo, и AUDENS и др. приводится в работах [191, 192 – 195].

Для идентификации пептидов также используются Скрытые Марковские модели [196]. Натренированная СММ определяет модель воспроизведения спектров, которая используется для оценки степени похожести теоретического спектра полученной последовательности-кандидата и экспериментального спектра. Более того, помимо предсказания хороших последовательностей СММ позволяет определить достоверность таких предсказаний [197]. Данный

алгоритм применяется в программе NovoHMM [198].

Одним из новых алгоритмов, не основанных на теоретико-графовом подходе, является предложенный М. Savitski с соавт. Линейный алгоритм секвенирования [199] с высокой скоростью работы и эффективностью.

Алгоритм PEAKS [193] применяет измененную версию алгоритма *de novo* секвенирования, которая основана на динамическом программировании [200]. В отличие от теоретико-графового подхода PEAKS может идентифицировать аминокислотную последовательность при отсутствии некоторых пиков. При этом учитываются еще такие факторы, как интенсивность пиков, совпадение масс, наличие разных типов ионов и др. Также данный алгоритм проводит предварительную обработку спектров. Точность и чувствительность алгоритмов PEAKS обеспечиваются встроенной статистической проверкой и фильтрацией результатов. Тщательно продуманный интерфейс позволяет визуализировать полученные результаты и анализировать каждую идентификацию. Результаты могут быть легко экспортированы в формат HTML и различные текстовые форматы. На основании вышеизложенного данный алгоритм и использовался нами в дальнейшей работе.

1.3 Оценка подлинности лекарственных средств пептидной природы

В работе [201] исследовали препарат рекомбинантного соматотропного гормона человека Genotropin[®]. Методом высокоэффективной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием было установлено, что содержание основного продукта с молекулярной массой 22126,8 Да составляло 84,4 % и также были обнаружены минорные примеси – 15,6 %. Дальнейшие исследования ферментативного перевара образца Genotropin[®] методом tandemной масс-спектрометрии показали различия в массах нескольких пептидов. Были идентифицированы аминокислотные замены в остатках M₁₄, M₁₂₅, M₁₇₀, диметилирование K₇₀ или обмен на аргинин, деамидирование N₁₄₉ и N₁₅₂, а также окисление M₁₄, M₁₂₅ и M₁₇₀. Эти изменения последовательности составляют 2 % рекомбинантного белка.

В статьях [202, 203] приведены результаты идентификации ряда доступных через интернет соединений пептидной природы: PEG-MGF, GHRP-2, GHRP-6 и Ipamorelin (двух различных фирм-производителей каждого соединения), три различных образца фрагмента гормона роста 176-191 и по одному образцу MGF, TB-500, Sermorelin, CJC-1295 и Long-R3-IGF-1. Идентификацию препаратов проводили на основании изотопного распределения многозарядных ионов пептидов, определения точных масс соединений, полученных с использованием орбитальной ионной ловушки, и спектров фрагментации в ионной ловушке. Результаты анализа показали, что большая часть препаратов не обладала высокой степенью очистки, многие содержали примесные компоненты. Также в ходе работы установлено несоответствие содержимого виал заявленной маркировке для образцов препаратов Ipamorelin (вместо заявленного соединения были Sermorelin и CJC-1295) и PEG-MGF (вместо PEG-MGF был обнаружен GHRP-2). При идентификации содержимого виал с Long-R3-IGF-1 и одной из виал PEG-MGF заявленные соединения обнаружены не были.

Используемый в данных работах метод ВЭЖХ-МС/МС является дорогостоящим и долгим, поэтому необходимо проведение предварительных исследований с применением простых в исполнении и дешевых методов. Выявить фальсификат, не содержащий в своем составе пептидов и белков, позволит спектрофотометрический метод. Установление аминокислотного состава по моноизотопной молекулярной массе не требует длительной процедуры подготовки проб. И только убедившись в соответствии теоретической и экспериментальной моноизотопных молекулярных масс следует приступать в исследованиям с применением масс-спектрометрического секвенирования. Масс-спектрометрия высокого разрешения при использовании алгоритма интеллектуального управления измерениями автоматически выбирает ион-прекурсор для дальнейшей фрагментации, тем самым позволив применять данный метод для различных ЛС и получать большее количество фрагментных масс-спектров.

Анализ приведенных литературных данных позволяет заключить, что для проведения исследований по оценке подлинности действующих веществ ЛС на основе рекомбинантных пептидов и белков используются методы пептидного картирования и масс-спектрометрического секвенирования. Преимуществом последнего является быстрота установления аминокислотной последовательности, простота интерпретации полученных результатов, надежность. К недостаткам данного метода можно отнести то, что полная или даже частичная интерпретация масс-спектра возможна лишь в том случае, когда серии пиков представлены достаточно полно.

Представленные результаты исследований лекарственных средств пептидной и белковой природы характеризуются ограниченным набором масс-спектрометрических данных вследствие ферментативного расщепления одной протеазой (трипсин), а также выбора определенного иона-прекурсора для дальнейшей фрагментации.

Таким образом, разработка унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, основанной на использовании набора нескольких специфических протеаз и их комбинации, а также применении различных подходов установления их аминокислотной последовательности и автоматизации процесса масс-спектрометрического анализа позволит повысить достоверность результатов вследствие получения большего количества масс-спектрометрических данных, а также избежать длительных и дорогостоящих процедур посредством предварительных исследований с применением простых в исполнении и дешевых методов.

Глава 2 Материалы и методы исследования

2.1 Материалы

В работе использовались следующие реактивы и материалы:

– калий двухромовокислый, кислота серная концентрированная (все «Sigma», США) – для подготовки посуды;

– кумасси бриллиантовый голубой G-250, спирт этиловый, ортофосфорная кислота (все «Sigma», США), фильтровальная бумага N. 1 («Whatman», Германия) – для оценки наличия соединений пептидной или белковой природы спектрофотометрическим методом;

– тиомочевина, натриевая соль дезоксихолиевой кислоты, натрия этиленадиаминтетраацетат двузамещённый (ЭДТА), трис(гидроксиметил)-аминометан (Tris-HCl), 1М раствор дитиотреитола, 0,5 М раствор трис-(2-карбоксиитил)фосфина (TCEP) (все «Sigma», США) – для восстановления дисульфидных связей;

– 4-винилпиридин, N,N-диметилформаид, бумага индикаторная «Hydrion pH Jumdo dispenser» (все «Sigma», США) – для модификации сульфгидрильных групп;

– триэтиламмония гидрокарбонат («Fluka», Германия), кальция хлорид, 1мМ раствор соляной кислоты, трипсин из свиной поджелудочной железы, эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8, эндопротеиназа Asp-N из *Pseudomonas fragi*, эндопротеиназа Lys-C из *Lysobacter enzymogenes*, эндопротеиназа Arg-C из подчелюстной железы мыши (все «Sigma», США), фильтры центрифужные с диаметром пор 0,22 мкм в комплекте с микроцентрифужными пробирками вместимостью 2,0 мл («Agilent Technologies», США) – для ферментативного расщепления;

– ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ, метанол для ВЭЖХ (все «Merck», Германия), муравьиная кислота («Fluka», Германия) – для приготовления подвижных фаз;

– калибровочный раствор для QExactive («Thermo Scientific», США) – для калибровки масс-спектрометра.

Все растворители и реагенты были аналитической степени чистоты, растворы для подготовки проб готовили с использованием деионизованной воды.

2.2 Стандартные образцы

В работе использовались следующие стандартные образцы:

- инсулин человека, (European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard), («Fluka», Германия);
- инсулин лизпро, (European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard), («Fluka», Германия);
- инсулин аспарт (European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard), («Fluka», Германия);
- инсулин гларгин, (European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard), («Fluka», Германия);
- рекомбинантный соматотропный гормон, (European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard), («Fluka», Германия).

2.3 Исследуемые образцы

В работе использовались лекарственные средства различных партий на основе:

- рекомбинантного инсулина человека: Инсуман Рапид ГТ («Sanofi Aventis», Германия), Хумулин Регуляр («Eli Lilly», Франция), Актрапид НМ («Novo Nordisk», Дания), Ринсулин Р («ГЕРОФАРМ-Био», Россия) и Биосулин («Фармстандарт», Россия).
- инсулина лизпро: Хумалог и Хумалог Микс 25 («Eli Lilly», Франция);
- инсулина аспарт: Новомикс Пенфилл, Новомикс ФлексПен, Новорапид Пенфилл и Новорапид ФлексПен («Novo Nordisk», Дания);
- инсулина глулизин: Апидра Солостар и Апидра («Sanofi Aventis», Германия);
- инсулина детемир: Левемир Пенфилл и Левемир ФлексПен («Novo Nordisk», Дания);

– рекомбинантного соматотропного гормона: Растан («Фармстандарт», Россия), Генотропин («Pfizer MFG», Бельгия), Джинтропин («Europharm (UK) Co.», Великобритания) и Сайзен («Merck Serono S.p.A.», Италия).

А также две биологически активные добавки к пище для улучшения функционального состояния поджелудочной железы и сердечно-сосудистой системы, незарегистрированный в РФ препарат «Тимозин бета» и субстанцию «Орексин А».

2.4 Вспомогательное оборудование и средства измерения

Работу проводили с использованием следующего вспомогательного оборудования:

– для получения деионизованной воды использовали дистиллятор «ДЭ-4-2М» (Россия), установку для получения деионизованной воды NANOPure («Thermo Scientific», США) и иономер лабораторный, тип И-160МИ, (ООО «Измерительная техника», Россия);

– для определения массы использовали шпатель металлический из нержавеющей стали 150 × 5 мм («Heinz Herenz Medizinal bedarf GmbH», Германия) и весы аналитические Sartorius Expert LE225D («Sartorius», Германия);

– для отбора жидкостей использовали дозаторы переменного объема 10-100; 100-1000; 1000-5000 мкл и наконечники для дозаторов вместимостью 0,1-10,0; 10,0-100,0; 50,0-1000,0; 1000,0-10000,0 мкл (все «Biohit», Германия);

– для подготовки проб использовали пробирки микроцентрифужные полипропиленовые «LoBindProtein» вместимостью 1,5 и 2,0 мл («Eppendorf», Германия), виалы стеклянные вместимостью 15 мл с герметично завинчивающимися крышками, виалы стеклянные с герметично завинчивающимися крышками вместимостью 2 мл, вставки стеклянные вместимостью 0,2 мл (все «Supelco», США), колбы мерные вместимостью 10 и 1000 мл («Duran», США), шкаф сушильный («СНОЛ», Россия), ванну ультразвуковую («Серьга», Россия), микрошриц 100 мкл («Hamilton»,

Швейцария), вибро-экстрактор VORTEX K-550 («ИКА», Германия), термомиксер «Comfort Eppendorf» («Eppendorf», Германия),

– для хранения проб, реактивов и стандартных образцов использовали холодильник бытовой («Атлант», Беларусь) и морозильник медицинский MDF-192 («SANYO», Япония)

– для оценки наличия соединений пептидной или белковой природы спектроскопическим методом использовали спектрофотометр Agilent 8453 с кюветами длиной 10 мм («Agilent Technologies», США),

– оценку степени протеолиза проводили с использованием диодно-матричного детектора Accela PDA, соединенного с высокоэффективным жидкостным хроматографом Accela Pump, оснащенного встроенным дегазатором, оборудованного системой автоматического ввода пробы Accela Autosampler, и блоком для термостатирования хроматографической колонки («Thermo Scientific» США);

– ВЭЖХ-МС/МС анализ проводили с использованием жидкостного хроматографа модели UltiMate 3000 RSLC «Dionex», оснащенного насосом HPG-3400RS, 6-и канальным дегазатором SRD-3600, оборудованного системой автоматического ввода пробы WPS-3000TSL Analytical с масс-спектрометрическим детектором QExactive с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении («Thermo Scientific» США), ЭВМ («Dell electronics», США).

– хроматографическая колонка ZORBAX 300SB-C18 длиной 250 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер сорбента 5,0 мкм с размером пор 300 Å («Agilent Technologies», США).

2.5 Приготовление рабочих и буферных растворов

2.5.1 Подготовка деионизованной воды

Дистиллированную воду, получаемую с использованием дистиллятора и применяемую для приготовления элюентов, пропускали через установку для получения деионизованной воды (удельное электрическое сопротивление воды

должно быть не менее $18 \text{ Мом} \times \text{см}^{-1}$). Далее определяли значение рН полученной деионизованной воды с использованием рН-метра. Оно должно находиться в пределах от 5,4 до 6,6.

2.5.2 Приготовление реактива Бредфорда

Реактив Бредфорда готовили следующим образом: в мерной колбе из темного стекла, вместимостью 1000 мл на аналитических весах взвешивали (100 ± 2) мг красителя кумасси ярко-синий G-250, добавляли 50 мл этилового спирта, 100 мл фосфорной кислоты, доводили водой до метки, перемешивали и затем фильтровали через бумагу для удаления нерастворившегося красителя. Качество реактива проверяли, определяя оптическую плотность при $\lambda = 465 \text{ нм}$ (значение D должно быть от 1,3 до 1,5) [204].

После приготовления реактива на колбу наклеивали этикетку с указанием наименования раствора, его концентрации и даты приготовления. Срок хранения раствора при температуре $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ не более 1-го месяца.

2.5.3 Приготовление 5 % водного раствора муравьиной кислоты

Для приготовления 10 мл раствора в виалу вместимостью 15 мл дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл переносили 0,4 мл муравьиной кислоты и дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-10,0) мл добавляли 9,6 мл деионизованной воды. Виалу закрывали крышкой и тщательно перемешивали на вортексе в течение 1 мин.

После приготовления раствора на виалу наклеивали этикетку с указанием наименования раствора, его концентрации и даты приготовления. Срок хранения раствора при температуре $(4,0 \pm 1,0) \text{ }^\circ\text{C}$ не более 1-го месяца.

2.5.4 Приготовление 0,1 % водного раствора гидроксида натрия

В мерной колбе вместимостью 100 мл на аналитических весах взвешивали навеску $(100,0 \pm 0,2)$ мг гидроксида натрия, добавляли около 50 мл деионизованной воды, перемешивали вручную до полного растворения

(визуальный контроль). Доводили деионизованной водой объем раствора до 100 мл.

После приготовления раствора на флакон наклеивали этикетку с указанием наименования раствора, его концентрации и даты приготовления. Срок хранения раствора при температуре $(4,0 \pm 1,0)$ °С не более 1-го месяца.

2.5.5 Приготовление денатурирующего буферного раствора

На аналитических весах готовили навески натриевой соли дезоксихолиевой кислоты, тиомочевины, ЭДТА и Tris-HCl. В мерную колбу вместимостью 10 мл вносили 1,52 г тиомочевины, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-10,0) мл добавляли 8 мл воды, перемешивали вручную до полного растворения (визуальный контроль). Добавляли 49,86 мг натриевой соли дезоксихолиевой кислоты, 9,306 мг ЭДТА и 90,75 мг Tris-HCl. Доводили водой объем денатурирующего раствора до 10 мл. Определяли pH полученного раствора путем сравнения цвета индикаторной бумаги после нанесения образца с эталонной цветовой шкалой. Оно должно находиться в пределах 8,0. Если значение pH превышает это значение – его понижают добавлением 5 % водного раствора муравьиной кислоты, если значение pH ниже – его повышают добавлением 0,1 % водного раствора гидроксида натрия.

После приготовления раствора на пробирку наклеивали этикетку с указанием наименования раствора, его концентрации и даты приготовления. Срок хранения растворов при температуре $(4,0 \pm 1,0)$ °С не более 7 дней.

2.5.6 Приготовление раствора для восстановления дисульфидных связей

В пробирку микроцентрифужную объемом 1,5 мл с помощью дозатора механического с варьируемым объемом дозирования (10,0-100,0) мкл вносили 132,95 мкл денатурирующего буфера, приготовленного по описанной ранее схеме, затем дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования

(0,5-10) мкл добавляли 4 мкл 500 мМ раствора трис-2-карбоксиитилфосфина гидрохлорида и 26,1 мкл 1 М раствора дитиотреитола.

Рабочий раствор реагента готовили непосредственно перед использованием. Раствор хранению не подлежит.

2.5.7 Приготовление раствора для модификации сульфгидрильных групп

В пробирку микроцентрифужную объемом 1,5 мл с помощью дозатора механического с варьируемым объемом дозирования (0,5-10,0) мкл вносили 10 мкл 4-винилпиридина и дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (10,0-100,0) мкл добавляли 90 мкл N,N-диметилформамида и 100 мкл денатурирующего буфера. Определяли рН полученного раствора путем сравнения цвета индикаторной бумаги после нанесения образца с эталонной цветовой шкалой. Оно не должно превышать 9,0. Если значение рН превышает это значение – его понижают добавлением 5 % водного раствора муравьиной кислоты.

Рабочий раствор для модификации сульфгидрильных групп готовили непосредственно перед использованием. Раствор хранению не подлежит.

2.5.8 Приготовление буферного раствора для проведения ферментативного расщепления

В виале вместимостью 15 мл на аналитических весах взвешивали навеску 3,33 мг хлорида кальция, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл вносили 400 мкл 1 М раствора триэтиламмония гидрокарбоната, с помощью дозатора механического с варьируемым объемом дозирования (1,0-10,0) мл добавляли 9,6 мл воды. Полученный раствор перемешивали с использованием вортекса.

Раствор готовили непосредственно перед использованием. Раствор хранению не подлежит.

2.5.9 Приготовление раствора трипсина из свиной поджелудочной железы

Для получения раствора трипсина с концентрацией 200 мкг/мл в виалу, содержащую 20 мкг лиофилизата фермента, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (10,0-100,0) мкл добавляли 100 мкл 1 мМ раствора HCl.

Приготовленный раствор может храниться при температуре (2 – 8) °С не более двух недель, при минус 20 °С – до 4 недель. Раствор трипсина сохраняет активность как минимум до 3 циклов замораживания-размораживания.

2.5.10 Приготовление раствора эндопротеиназы Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8

Для получения раствора эндопротеиназы Glu-C с концентрацией 100 мкг/мл в виалу, содержащую 25 мкг лиофилизата фермента, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (10,0-100,0) мкл добавляли 250 мкл воды.

Приготовленный раствор может храниться в замороженном виде в течение нескольких недель. Замороженный раствор может быть разморожен, а потом снова заморожен несколько раз без потери активности.

2.5.11 Приготовление раствора эндопротеиназы Asp-N из *Pseudomonas fragi*

Для получения раствора эндопротеиназы Asp-N с концентрацией 100 мкг/мл в виалу, содержащую 2 мкг лиофилизата фермента, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (10,0-100,0) мкл добавляли 20 мкл воды. Полученный раствор также содержит 10 мМ трис-HCl и имеет pH = 8.

Приготовленный раствор может храниться в замороженном виде в течение нескольких недель.

2.5.12 Приготовление раствора эндопротеиназы Lys-C из *Lysobacter enzymogenes*

Для получения раствора эндопротеиназы Lys-C с концентрацией 100 мкг/мл в виалу, содержащую 5 мкг лиофилизата фермента, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (10,0-100,0) мкл добавляли 50 мкл воды. Полученный раствор также содержит Tricine, 10 мМ ЭДТА и имеет pH = 8.

Приготовленный раствор может храниться в замороженном виде в течение нескольких недель.

2.5.13 Приготовление раствора эндопротеиназы Arg-C из подчелюстной железы мыши

Для получения раствора эндопротеиназы Arg-C с концентрацией 100 мкг/мл в виалу, содержащую 5 мкг лиофилизата фермента, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (10,0-100,0) мкл добавляли 50 мкл 1 мМ раствора HCl.

Приготовленный раствор может храниться в замороженном виде в течение нескольких недель. После первой недели хранения замороженный раствор теряет 50 % своей активности.

2.5.14 Приготовление растворов стандартных образцов

В виале вместимостью 15 мл на аналитических весах взвешивали (10 ± 2) мг стандартного образца. Количество деионизованной воды V , мл, которое необходимо добавить, вычисляется по формуле 8.

$$V = \frac{m \times \mu}{c \times 100}, \quad (8)$$

где, μ – массовая доля вещества (%), указанная в паспорте на образец;

m – масса навески, мг;

c – концентрация раствора ($c=1,0$ мг/мл).

Расчетное количество деионизованной воды отбирали дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-10,0) мл. В виалы с

навесками добавляли требуемое количество деионизованной воды, закрывали крышками и тщательно перемешивали на вортексе в течение 1 мин.

В хроматографическую виалу вместимостью 15 мл дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл вносили 1,0 мл стандартного раствора в деионизованной воде с концентрацией 1 мг/мл, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-10,0) мл добавляли 9,0 мл метанола, закрывали крышкой, тщательно перемешивали на орбитальном шейкере в течение 1 мин и обрабатывали в ультразвуковой ванне (УЗВ) в течение 5 мин. Полученный раствор с концентрацией 0,1 мг/мл отбирали в виалу вместимостью 2 мл и наносили маркировку.

Срок хранения приготовленных растворов стандартных образцов в холодильнике при температуре $(4,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ не более 7 сут.

2.5.15 Приготовление растворов лизатов стандартных образцов

В хроматографическую виалу вместимостью 15 мл дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл вносили 1,0 мл стандартного раствора в деионизованной воде с концентрацией 0,1 мг/мл, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-10,0) мл добавляли 9,0 мл метанола, закрывали крышкой, тщательно перемешивали на орбитальном шейкере в течение 1 мин и обрабатывали в УЗВ в течение 5 мин. После чего 10 мкл полученного раствора переносили в пробирку микроцентрифужную объёмом 2,0 мл, добавляли 10 мкл раствора для восстановления дисульфидных связей, затем полученную смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре $42 ^\circ\text{C}$.

В раствор после восстановления добавляли 1,8 мкл раствора для модификации сульфгидрильных групп. Полученный раствор выдерживали 1 час в темноте при комнатной температуре.

Затем образцы разбавляли буфером для ферментативного расщепления в 10 раз и подвергали обработке каждым из перечисленных ферментов в соотношении фермент : субстрат 1:50, инкубируя в течение 6 ч при

температуре 40 °С. Протеолиз останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл 5 % муравьиной кислоты. Полученный раствор центрифугировали с использованием центрифужных фильтров при 13 000-15 000 об/мин в течение 15-20 мин, отбирали фильтрат и переносили во вставки вместимостью 0,2 мл, которые помещали в виалы вместимостью 2 мл.

После инкубации в течение 6 ч с эндопротеиназами Glu-C и Asp-N в растворы дополнительно вносили трипсин в соотношении фермент : субстрат 1:50 и инкубировали еще в течение 6 ч. Протеолиз останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл 5 % муравьиной кислоты. Полученные растворы центрифугировали с использованием центрифужных фильтров при 13 000-15 000 об/мин в течение 15-20 мин, отбирали фильтраты и переносили во вставки вместимостью 0,2 мл, которые помещали в виалы вместимостью 2 мл.

Срок хранения приготовленных растворов лизатов стандартных образцов в холодильнике при температуре $(4,0 \pm 1,0)$ °С не более 7 сут.

2.5.16 Приготовление растворов исследуемых образцов

В виале вместимостью 15 мл на аналитических весах взвешивали (10 ± 2) мг исследуемого образца лекарственного средства. В виалы с навесками дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-10,0) мл добавляли 10,0 мл деионизованной воды, закрывали крышкой и тщательно перемешивали на вортексе в течение 1 мин.

В хроматографическую виалу вместимостью 15 мл дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл вносили 1,0 мл исследуемого раствора в деионизованной воде с концентрацией 1 мг/мл, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-10,0) мл добавляли 9,0 мл метанола, закрывали крышкой, тщательно перемешивали на орбитальном шейкере в течение 1 мин и обрабатывали в УЗВ в течение 5 мин. Полученный раствор с концентрацией 0,1 мг/мл отбирали в виалу вместимостью 2 мл и наносили маркировку.

Срок хранения растворов исследуемых образцов при температуре $(4,0 \pm 1,0)$ °C не более 72 часов.

2.5.17 Приготовление растворов лизатов исследуемых образцов

В хроматографическую виалу вместимостью 15 мл дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл вносили 1,0 мл исследуемого раствора в деионизованной воде с концентрацией 0,1 мг/мл, дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (1,0-10,0) мл добавляли 9,0 мл метанола, закрывали крышкой, тщательно перемешивали на орбитальном шейкере в течение 1 мин и обрабатывали в УЗВ в течение 5 мин. После чего 10 мкл полученного раствора переносили в пробирку микроцентрифужную объемом 2,0 мл, добавляли 10 мкл раствора для восстановления дисульфидных связей, затем полученную смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре 42 °C.

В раствор после восстановления добавляли 1,8 мкл раствора для модификации сульфгидрильных групп. Полученный раствор выдерживают 1 час в темноте при комнатной температуре.

Затем образцы разбавляли буфером для ферментативного расщепления в 10 раз и подвергали обработке каждым из перечисленных ферментов в соотношении фермент : субстрат 1:50, инкубируя в течение 6 ч при температуре 40 °C. Протеолиз останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл 5 % муравьиной кислоты. Полученный раствор центрифугировали с использованием центрифужных фильтров при 13 000-15 000 об/мин в течение 15-20 мин, отбирали фильтрат и переносили во вставки вместимостью 0,2 мл, которые помещали в виалы вместимостью 2 мл.

После инкубации в течение 6 ч с эндопротеиназами Glu-C и Asp-N в раствор дополнительно вносили трипсин в соотношении фермент : субстрат 1:50 и инкубировали еще в течение 6 ч. Протеолиз останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл 5 % муравьиной кислоты. Полученные растворы центрифугировали с использованием центрифужных фильтров при 13 000-

15 000 об/мин в течение 15-20 мин, отбирали фильтраты и переносили во вставки вместимостью 0,2 мл, которые помещали в виалы вместимостью 2 мл.

Срок хранения растворов лизатов исследуемых образцов при температуре $(4,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ – не более 72 часов.

2.5.18 Приготовление подвижной фазы для высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для проведения хроматографического анализа используется двухкомпонентная подвижная жидкая фаза:

– компонент А – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил-деионизованная вода в соотношении 5:95;

– компонент В – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле марки «для ВЭЖХ»;

Для приготовления компонента А в мерную колбу емкостью 1000 мл наливали около 500 мл деионизованной воды. Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл вносили 1 мл муравьиной кислоты, 50 мл ацетонитрила, отмеренного с помощью цилиндра мерного вместимостью 50 мл и доливали деионизованной водой до метки. Мерную колбу помещали в УЗВ, дегазировали раствор в течение 5 мин. Приготовленный раствор переливали в бутылку объемом 1000 мл, плотно закрывали крышкой и тщательно перемешивали.

Для приготовления компонента В в мерную колбу емкостью 1000 мл заливали около 500 мл ацетонитрила. Дозатором механическим с варьируемым объемом дозирования (0,1-1,0) мл вносили 1 мл муравьиной кислоты, 50 мл деионизованной воды, отмеренной с помощью цилиндра мерного вместимостью 50 мл, и доливали ацетонитрилом до метки. Мерную колбу помещали в УЗВ, дегазировали раствор в течение 5 мин. Приготовленный раствор переливали в бутылку объемом 1000 мл, плотно закрывали крышкой и тщательно перемешивали.

Срок хранения приготовленных растворов при температуре $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ не более трех дней.

2.6 Техника эксперимента

2.6.1 Качественное определение наличия веществ пептидной природы по методике Бредфорда

Метод основан на окрашивании белка красителем [204]. При растворении красителя кумасси ярко-синего G-250 в кислоте он дает красно-коричневую окраску, но при связывании с белком в том же растворе окраска становится синей. Определение осуществляли с помощью реактива Бредфорда, приготовленного по п. 2.5.2.

К 100 мкл образца лекарственного средства пептидной или белковой природы дозатором механическим с варьруемым объемом дозирования (1,0-5,0) мл добавляли 5 мл раствора кумасси синего G-250. Через 15-20 мин измеряли оптическую плотность раствора при $\lambda = 595$ нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против раствора сравнения, содержащего растворитель и реактив Бредфорда.

2.6.2 Изучение влияния вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств пептидной или белковой природы на полноту ферментативного расщепления

Зависимость степени протеолиза от концентрации фермента

Для определения зависимости степени протеолиза от концентрации фермента образцы стандартных растворов и готовых форм РИЧ и РСГ подвергали восстановлению дисульфидных связей и модификации сульфгидрильных групп. Затем образцы разбавляли буфером для ферментативного расщепления в 10 раз и разделяли на 8 аликвотных проб. Семь проб из восьми обрабатывали протеазой в соотношении фермент : субстрат 1:10000, 1:5000, 1:1000, 1:500, 1:100, 1:50 и 1:20 соответственно. Восьмую пробу использовали в качестве отрицательного контроля и инкубировали с остальными пробами серии в одинаковых условиях без

добавления фермента в течение 8 ч при температуре 38 °С. Эксперимент проводили для всех протеаз в пяти повторах для каждой серии. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл муравьиной кислоты.

Зависимость степени протеолиза от температуры инкубации

Для определения зависимости степени протеолиза от температуры инкубации образцы стандартных растворов и готовых форм РИЧ и РСГ подвергали восстановлению дисульфидных связей и модификации сульфгидрильных групп. Затем образцы разбавляли буфером для ферментативного расщепления в 10 раз и разделяли на 7 аликвотных проб. Шесть проб из семи обрабатывали протеазой, в соотношении фермент : субстрат 1 : 50 для каждой пробы. Инкубацию проводили в течение 8 ч при температуре 5, 25, 38, 45, 50 и 80 °С. Седьмую пробу использовали в качестве отрицательного контроля и инкубировали без добавления фермента. Эксперимент проводили для всех протеаз в пяти повторах. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл муравьиной кислоты.

Зависимость степени протеолиза от времени инкубации

Для определения зависимости степени протеолиза от времени инкубации образцы стандартных растворов и готовых форм РИЧ и РСГ подвергали восстановлению дисульфидных связей и модификации сульфгидрильных групп. Затем образцы разбавляли буфером для ферментативного расщепления в 10 раз и разделяли на 9 аликвотных проб. Восемь проб из девяти обрабатывали протеазой в соотношении фермент : субстрат 1 : 50. Для каждой пробы инкубацию проводили в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 ч, соответственно. Девятую пробу использовали в качестве отрицательного контроля и инкубировали без добавления фермента. Эксперимент проводили для всех протеаз в пяти повторах. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл муравьиной кислоты.

Зависимость степени протеолиза от рН среды

Для определения зависимости степени протеолиза от рН среды образцы стандартных растворов и готовых форм РИЧ и РСГ подвергали

восстановлению дисульфидных связей и модификации сульфгидрильных групп. Затем образцы разбавляли буфером для ферментативного расщепления в 10 раз и разделяли на 11 аликвотных проб. Десять проб из одиннадцати обрабатывали протеазой в соотношении фермент : субстрат 1 : 50. Для каждой пробы инкубацию проводили при значениях рН от 1 до 10 в течение 8 ч. Одиннадцатую пробу использовали в качестве отрицательного контроля и инкубировали без добавления фермента. Эксперимент проводили для всех протеаз в пяти повторах. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл муравьиной кислоты.

2.6.3 Условия хроматографического разделения

Подвижная фаза компонент А – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил-вода (5/95 %, об/об.);
 компонент В – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Режим градиентный

хроматографического
 элюирования

Время, мин	Соотношение компонентов подвижной фазы		Скорость потока, мкл/мин
	А, %	В, %	
0,0	95	5	500
2,0	95	5	500
20,0	5	95	500
25,0	5	95	500
25,1	95	5	500
30,0	95	5	500

Температура термостата

колонок 30 °С

Температура термостата

отделения для проб 10 °С

Объем ввода пробы 3 мкл

Время анализа 30 мин

2.6.4 Условия спектрофотометрического детектирования

Измерения выполняли в спектральном диапазоне 200-900 нм.

2.6.5 Условия масс-спектрометрического детектирования

Условия масс-спектрометрического детектирования приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Условия масс-спектрометрического детектирования

Наименование параметра	Значение
Масс-спектрометрический детектор	Гибридный масс-спектрометр QExactive с источником ионизации HESI-II
Режим источника ионизации	Электростатическое распыление при атмосферном давлении
Разрешающая способность	35 000
Тип ячейки соударительной диссоциации	Ячейка высокоэнергетической соударительной диссоциации (HCD)
Энергия ионизации	(30 ± 15) %
Детектируемое зарядовое состояние	2-5
Режим сканирования	Data dependent mode
Фильтр масс для изоляции прекурсоров	Квадрупольный фильтр масс
Ширина изоляции масс	2,5 m/z
Диапазон детектируемых масс	300-2000 m/z
Полярность детектируемых ионов	Детектирование положительных ионов
Количество ионов в орбитальной ионной ловушке	5×10^5
Время накопления ионов	100 мс
Предшественник	Моноизотопный пик кластера ионов
Число сканирований	4
Длительность динамического исключения	60 с
Напряжение на распылителе	4,5 кВ
Скорость потока газа-осушителя	5 ед.
Скорость потока вспомогательного газа	10 ед.
Скорость потока газа на распылителе	40 ед.
Температура на капилляре	350 °С
Температура распылителя	270 °С

Процедуру калибровки масс-спектрометра с орбитальной ионной ловушкой проводили с использованием калибровочного раствора.

Для сбора и обработки масс-спектрометрических данных использовалась программа Xcalibur v.2.2

2.6.6 Определение моноизотопной молекулярной массы действующего вещества лекарственного средства

Теоретическую моноизотопную молекулярную массу исследуемых соединений рассчитывали с использованием программного комплекса ACD/Lab, версия 12.0 («Advanced Chemistry Development, Inc.», Канада), либо с использованием формулы (9).

$$M_{i(C_m H_n N_l O_k S_p)} = m(M_{iC}) + n(M_{iH}) + l(M_{iN}) + k(M_{iO}) + p(M_{iS}), \quad (9)$$

где $M_{i(C_m H_n N_l O_k S_p)}$ – моноизотопная молекулярная масса аналита;

m, n, l, k, p – число атомов C, H, N, O и S в молекуле, соответственно;

$M_{iC}, M_{iH}, M_{iN}, M_{iO}, M_{iS}$ – массы основных изотопов элементов C, H, N, O и S, соответственно.

По значению точных отношений масс к заряду m/z ($\delta = \pm 5$ ppm) многозарядных ионов белков, с использованием программы обработки данных Xcalibur 2.2, рассчитывали моноизотопную молекулярную массу действующего вещества по формуле (3) для пика изотопа с наименьшим значением соотношения массы к заряду в кластере изотопов мультитарядного иона.

Допустимая ошибка рассчитанной молекулярной массы составляет $\pm 0,03$ Да. Если различия в рассчитанных массах между определениями превышают границы допустимой ошибки, то проводят дополнительную калибровку шкалы масс прибора и выполняют анализ пробы еще для трех определений молекулярной массы действующего вещества лекарственного средства. За результат измерения молекулярной массы действующего вещества стандартного и исследуемого растворов принимали среднее арифметическое значение расчетной массы для каждого из определений по формуле 10.

$$Mr_{cp} = \frac{\sum_1^n Mr_{расч}}{n}, \quad (10)$$

где Mr_{cp} – среднее значение молекулярной массы действующего вещества лекарственного средства из n определений;

$Mr_{расч}$ – рассчитанные значения молекулярной массы действующего вещества лекарственного средства в n определениях;

n – количество определений, в которых различия в значениях измеренных молекулярной массы белка между определениями не превысили границ допустимой ошибки.

2.6.7 Обработка результатов с использованием специализированного программного обеспечения

Для обработки результатов масс-спектрометрических исследований применяли специализированное программное обеспечение PEAKS Studio 7.0, разработанное «Bioinformatics Solutions Inc.», Канада.

Для идентификации использовали установки, приведенные в таблице 3.

Таблица 3 – Установки программного обеспечения PEAKS Studio 7.0

Наименование параметра	Значение
Фермент	Specified by each sample
Количество нереализованных разрывов:	3
Модификации	unspecified PTMs and common mutations with PEAKS PTM
Точность измерения массы иона прекурсора, ppm:	15,0
Тип молекулярного иона:	monoisotopic mass
Точность измерения массы иона продукта, Да:	0,1
Минимальное зарядовое состояние	2
Максимальное зарядовое состояние	5
Аминокислотная последовательность	LekSredstva.fasta

Глава 3 Результаты и обсуждение

3.1 Алгоритм установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы

Как уже упоминалось ранее, в соответствии с зарубежными фармакопеями [8 – 12] для оценки подлинности ЛС пептидной и белковой природы применяются методы обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием.

С использованием диодно-матричного детектора в диапазоне измерений 200-900 нм были получены хроматограммы для стандартных растворов рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин и рекомбинантного соматотропного гормона человека, представленные на рисунке 11. В качестве неподвижной фазы использовали колонку Zorbax 300SB-C18, 250 x 2,1 мм, размер частиц 5 мкм, размер пор 300 Å. В качестве подвижной фазы использовали 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил : вода в соотношении 5 : 95 (об.) (А) и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (Б). Скорость потока подвижной фазы была постоянной и составляла 0.5 мл/мин. Состав элюата изменялся в соответствии с градиентом: 0,00 мин – 5 % Б; 2,00-20,00 мин – 5-95 % Б; 20,00-25,00 мин – 95 % Б; 25,00-25,01 мин – 95-5 % Б; 25,01-30,00 мин – 5 % Б. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 30 мин. Для воспроизводимости времен удерживания использовали термостатирование колонки (30 °С). Объем вводимой пробы – 3 мкл.

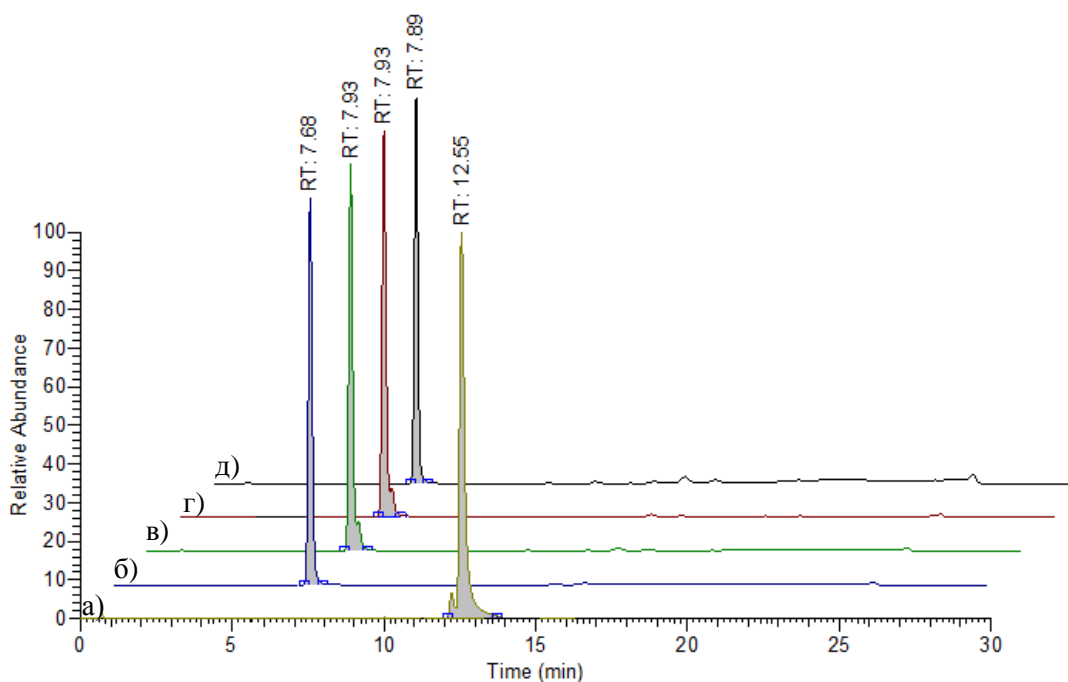


Рис. 11. Хроматограммы стандартных растворов рекомбинантного соматотропного гормона человека (а), инсулина гларгин (б), рекомбинантного инсулина человека (в), инсулина лизпро (г) и инсулина аспарт (д), полученные с использованием диодно-матричного детектора.

Как видно на представленных хроматограммах, препараты инсулина аспарт (д) и инсулина лизпро (г) имеют очень близкие хроматографические характеристики с рекомбинантным инсулином человека (в) – 7,89; 7,93 и 7,93 мин, соответственно, что свидетельствует о незначительных различиях в их гидрофобных свойствах. Присутствие двух остатков аргинина в конце В-цепи и замена аспарагина на глицин в положении 21 А-цепи молекулы инсулина гларгина по сравнению с рекомбинантным инсулином человека приводят к смещению времени удерживания на 0,21 мин (б). В связи с различным аминокислотным составом препаратов инсулина (б-д) и рекомбинантного соматотропного гормона (а) их поведение при хроматографическом разделении значительно различается.

Данные результаты показывают, что использование ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием не может считаться достоверным методом установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы.

В соответствии с последними редакциями зарубежных фармакопей [8 – 12] применение метода ВЭЖХ-МС в варианте пептидного картирования

позволяет получать информацию об аминокислотном составе действующего вещества, но не о его аминокислотной последовательности. В некоторых случаях таких данных недостаточно. Например, рекомбинантный инсулин человека и инсулин лизпро отличаются тем, что в положениях В28 и В29 лизин и пролин меняются местами.

В связи с вышесказанным установление подлинности лекарственных средств белковой и пептидной природы путем подтверждения заявленной производителем аминокислотной последовательности действующего вещества методом тандемной масс-спектрометрии представляется наиболее надежным.

Предлагаемый алгоритм установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, представлен на рисунке 12.

Он включает в себя несколько стадий. Во-первых, для сокращения времени исследований использовали предварительную экспресс-индикацию наличия соединений пептидной и белковой структуры в ЛС спектрофотометрическим методом. При положительном результате следующим шагом будет установление соответствия теоретической и экспериментальной моноизотопной молекулярной массы действующего вещества ЛС методом масс-спектрометрии высокого разрешения. Как известно, массы некоторых аминокислот отличаются менее чем на 1 Да. Так, лизин (128,0949) и глутамин (128,0586) различаются на 0,0363 Да, фенилаланин (147,0684) и окисленный метионин (147,0354) на 0,0330 Да, тирозин (163,0633) и дважды окисленный метионин (163,0303) на 0,0329 Да, гидроксипролин (113,0477) и лейцин/изолейцин (113,0841) на 0,0364 Да [91]. При замене в аминокислотной последовательности хотя бы одной аминокислоты на соответствующую ей изобарную средняя масса останется неизменной, но действующее вещество уже не будет отвечать требованиям подлинности. Установление моноизотопной молекулярной массы анализа позволит зафиксировать такого рода замены и оценить подлинность лекарственных препаратов, действующими веществами которых являются пептиды или белки.

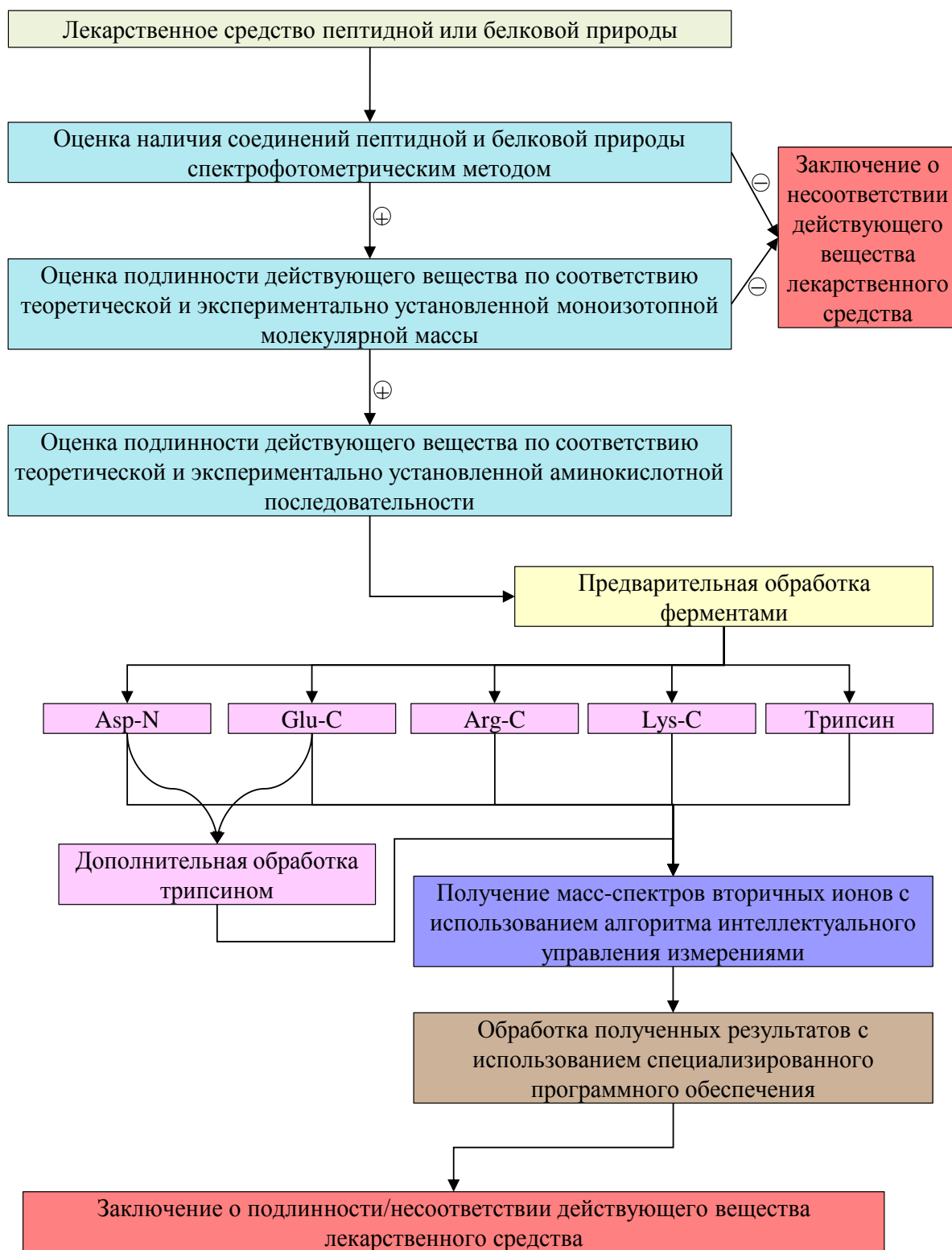


Рис. 12. Алгоритм установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы

При получении положительного результата на следующем этапе необходимо установить аминокислотную последовательность действующего вещества ЛС методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Для этого требуется предварительная обработка ферментами с целью

расщепления белка по заранее известным аминокислотным группировкам, получение масс-спектров фрагментных ионов с использованием алгоритма интеллектуального управления измерениями и обработка полученных результатов с использованием специализированного программного обеспечения. На основании проведенных исследований делается заключение о подлинности действующего вещества лекарственного средства. С целью повышения достоверности получаемых результатов использовали подходы, называемые снизу вверх и с середины вниз. Для увеличения эффективности секвенирования действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой структуры применяли пять ферментов, расщепляющих образец по различным аминокислотным группировкам и их комбинации. При получении масс-спектров второго порядка использовали диссоциацию, активируемую соударениями при повышенной энергии с образованием ионов *b*- и *y*-серий. Также для повышения точности получаемых результатов применяли масс-спектрометр высокого разрешения.

3.2 Оценка наличия соединений пептидной или белковой природы спектрофотометрическим методом

Для сокращения времени исследований использовали предварительную экспресс-индикацию наличия соединений пептидной и белковой структуры в лекарственных препаратах методом Бредфорда. Следует помнить, что кумасси G-250 взаимодействует с боковыми цепями определенных аминокислот, входящих в состав белковой молекулы. Таким образом, белки, не несущие в своем составе аргинина, и в меньшей степени – циклических аминокислот, определить данным методом невозможно. В этом случае использовали прямое спектрофотометрическое определение наличия белков в диапазоне длин волн 200–220 нм. При получении отрицательного результата дальнейшие исследования не проводили, и делали заключение о несоответствии подлинности действующего вещества заявленному. При положительном результате на следующем этапе исследований устанавливали соответствие теоретической и экспериментальной моноизотопных молекулярных масс

действующего вещества лекарственного средства, полученной методом масс-спектрометрии высокого разрешения.

Использование данного этапа позволило избежать долгих и дорогостоящих исследований при установлении подлинности действующих веществ биологически активных добавок для улучшения функционального состояния поджелудочной железы и сердечнососудистой системы. В первом случае в составе был заявлен пептид с последовательностью Lys-Glu-Asp-Trp (KEDW), во втором – Ala-Glu-Asp-Arg (AEDR). Наличие в составе обоих пептидов таких аминокислот как аргинин, лизин и триптофан позволяет использовать метод Бредфорда. Результаты экспресс-индикации показали отсутствие в данных препаратах соединений пептидной и белковой природы.

3.3 Оценка подлинности действующего вещества лекарственного средства по соответствию теоретической и экспериментально установленной моноизотопных молекулярных масс

Предварительную оценку подлинности действующего вещества лекарственного средства можно провести по соответствию расчетной моноизотопной молекулярной массы исследуемого анализа теоретической. Теоретическую моноизотопную молекулярную массу рассчитывали по формуле (9).

При использовании масс-спектрометра высокого разрешения ошибка определения соотношения массы к заряду составляет менее 5 м.д., что дает возможность определения всех пиков изотопов многозарядного иона и позволяет вычислять значение зарядового состояния иона (на единицу меньше числа пиков изотопов в интервале массовых чисел 1 Да).

Для стандартных образцов РСГ, РИЧ, инсулина лизпро, инсулина аспарт и инсулина гларгин моноизотопную молекулярную массу рассчитывали с использованием формулы (3) (для пика изотопа с наименьшим значением соотношения массы к заряду в кластере изотопов многозарядного иона) по масс-спектральным характеристикам изученных образцов для различных зарядовых состояний. Экспериментальные значения усредняли в соответствии

с формулой (10) и сравнивали с теоретическими. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты оценки моноизотопной молекулярной массы стандартных образцов методом масс-спектрометрии высокого разрешения

Действующее вещество	z	m/z	M _p , Да	M _c , Да	M _{ит} , Да	Δ, Да
Рекомбинантный соматотропный гормон	15	1702,2408	22116,03	22115,76	22115,79	0,03
	14	1580,6595	22115,12			
	13	1475,4158	22116,12			
Рекомбинантный инсулин человека	6	968,2926	5803,7088	5803,67	5803,64	0,03
	5	1161,7374	5803,6480			
	4	1451,9207	5803,6516			
Инсулин лизпро	6	968,2900	5803,6932	5803,65	5803,64	0,01
	5	1161,7343	5803,6325			
	4	1451,9162	5803,6336			
Инсулин гларгин	6	1010,8177	6058,8594	6058,84	6058,82	0,02
	5	1212,7764	6058,8430			
	4	1515,7128	6058,8200			
Инсулин аспарт	6	971,2840	5821,6572	5821,62	5821,61	0,01
	5	1165,3294	5821,6080			
	4	1456,4098	5821,6080			
M _p – рассчитанная моноизотопная молекулярная масса; M _c – молекулярная масса, усредненная по трем рассчитанным значениям; M _{ит} – теоретическая моноизотопная молекулярная масса.						

Из полученных данных следует, что определенные моноизотопные молекулярные массы для рекомбинантного соматотропного гормона, инсулина гларгин, инсулина аспарт, позволяют делать выводы о подлинности действующего вещества в ЛС, т.к. величина ошибки составляет 0,01-0,03 Да. Однако, для препаратов рекомбинантного инсулина человека и инсулина лизпро, обладающих идентичными массами, подлинность можно оценить только при установлении аминокислотной последовательности, что требует проведения исследований с использованием специфических протеаз.

При получении расчетной моноизотопной молекулярной массы, отличной от теоретической, дальнейшие исследования не проводили и делали заключение о несоответствии подлинности действующего вещества заявленному.

3.4 Оценка подлинности действующего вещества лекарственного средства по соответствию теоретической и экспериментально установленной аминокислотной последовательности

Аминокислотную последовательность определяли с использованием подходов снизу вверх и с середины вниз, при которых образец расщепляется ферментом по заранее известным аминокислотным группировкам. При реализации подхода снизу вверх использовали Glu-C и трипсин, а для подхода с середины вниз – Lys-C, Asp-N и Arg-C. С целью получения дополнительной информации проводили обработку трипсином лизатов пептидов после расщепления протеазами Glu-C и Asp-N. Для повышения производительности и достоверности установления аминокислотной последовательности представляется целесообразным использовать алгоритм интеллектуального управления измерениями, позволяющий в соответствии с заданными настройками автоматически выбирать ион-предшественник для фрагментации.

3.4.1 Изучение влияния вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств пептидной или белковой природы на полноту ферментативного расщепления

Для получения достоверных результатов при определении подлинности ЛС пептидной или белковой природы необходимо добиться полноты ферментативного расщепления путем оптимизации условий его проведения по четырем параметрам: рН среды, соотношение фермент : субстрат, температура инкубации и время инкубации с ферментом. При этом надо убедиться, что вспомогательные компоненты готовых форм ЛС не оказывают влияния на полноту ферментативного расщепления. До недавнего времени к вспомогательным веществам предъявляли требования фармакологической и

химической индифферентности. Однако выяснилось, что эти вещества могут в значительной степени влиять на фармакологическую активность лекарственных веществ: усиливать действие лекарственных средств или снижать их активность, изменять характер действия под влиянием разных причин, а именно комплексообразования, молекулярных реакций и др. [205].

Оценку проводили путем сравнения степени протеолиза стандартных растворов РИЧ и РСГ и лекарственных средств «Актрапид НМ» и «Растан» в различных экспериментах.

РИЧ состоит из двух цепей, соединенных между собой дисульфидными мостиками. После стадии восстановления и алкилирования в растворе присутствовали соответствующие субъединицы в индивидуальном состоянии. А-цепь подвергается расщеплению только при воздействии эндопротеиназой Glu-C, поэтому определение степени протеолиза проводили по изменению количества В-цепи в ходе эксперимента. РСГ состоит из одной полипептидной цепи изменения содержания которой и оценивали.

Степень протеолиза определяли по соотношению белка, подвергшегося расщеплению к его же количеству в отрицательном контроле методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием в диапазоне 200-900 нм. Расчет проводили для каждой из проб во всех экспериментальных сериях по формуле (11)

$$DH = \frac{S_1 - S_x}{S_1} * 100, \quad (11)$$

где DH – степень протеолиза (%),

S_1 – площадь пика, соответствующего белку, подвергшемуся расщеплению, в отрицательном контроле,

S_x – площадь пика, соответствующего белку, подвергшемуся расщеплению, в эксперименте,

100 – коэффициент пересчета в проценты.

Обработку результатов исследований осуществляли методами математической статистики с использованием пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel – 2010 и Statistica 10.0.

Зависимость степени протеолиза от концентрации фермента

В соответствии с описанной в разделе 2.6.2 техникой эксперимента были подготовлены ферментативные перевары стандартных растворов рекомбинантного инсулина человека и рекомбинантного соматотропного гормона человека, а также лекарственных средств «Актрапид НМ» и «Растан».

Степень протеолиза для каждой из семи проб во всех экспериментальных сериях рассчитывали по формуле (11). На рисунках 13 и 14 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартного раствора РИЧ и лекарственного средства «Актрапид НМ» различными протеазами в зависимости от соотношения фермент : субстрат.

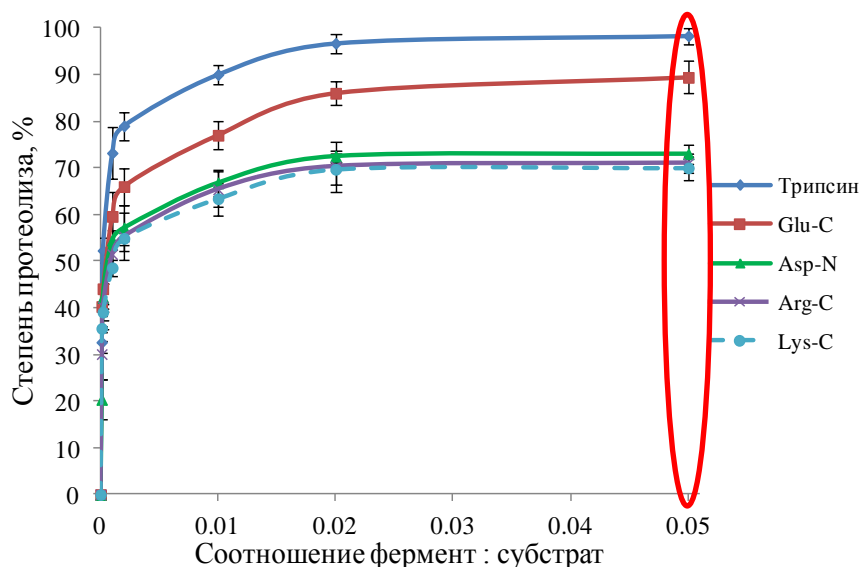


Рис. 13. График зависимостей степени протеолиза стандартного раствора РИЧ от соотношения фермент : субстрат в пробе.

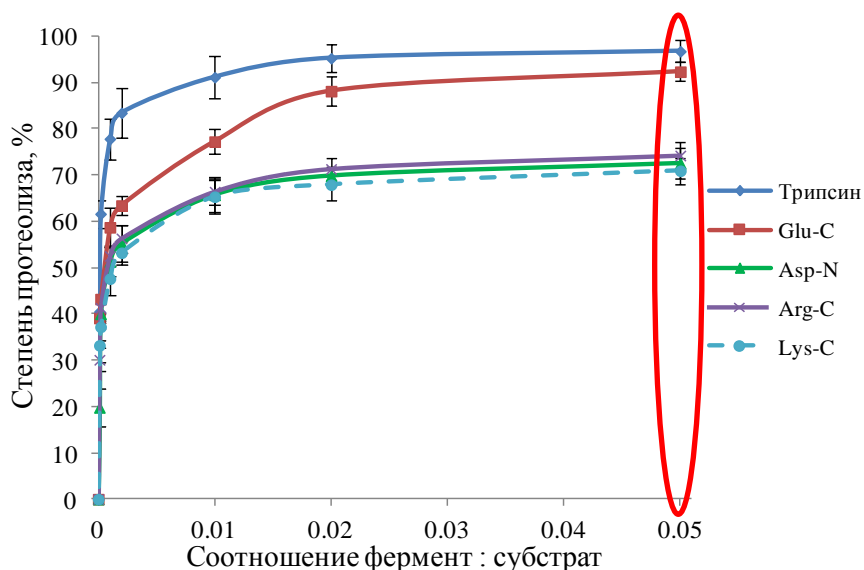


Рис. 14. График зависимостей степени протеолиза лекарственного средства «Актрапид НМ» от соотношения фермент : субстрат в пробе.

На рисунках 15 и 16 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартного раствора РСГ и лекарственного средства «Растан» различными протеазами в зависимости от соотношения фермент : субстрат.

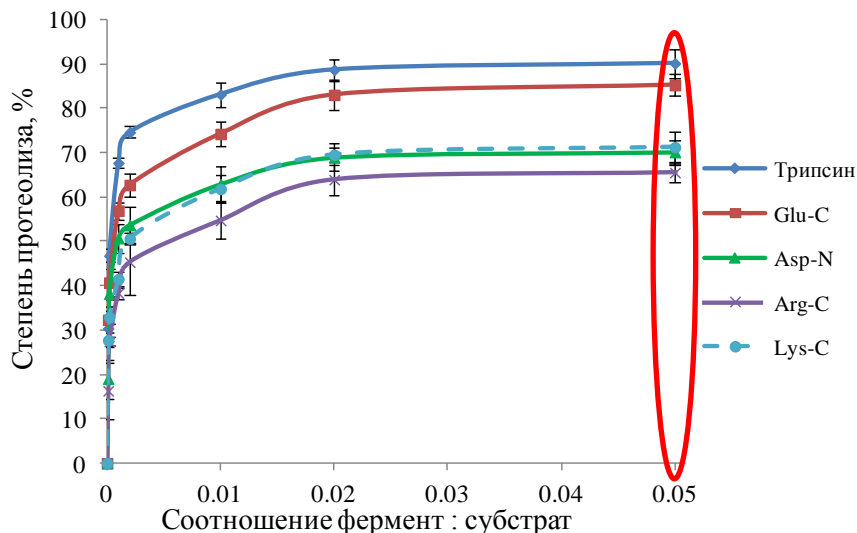


Рис. 15. График зависимостей степени протеолиза стандартного раствора РСГ от соотношения фермент : субстрат в пробе.

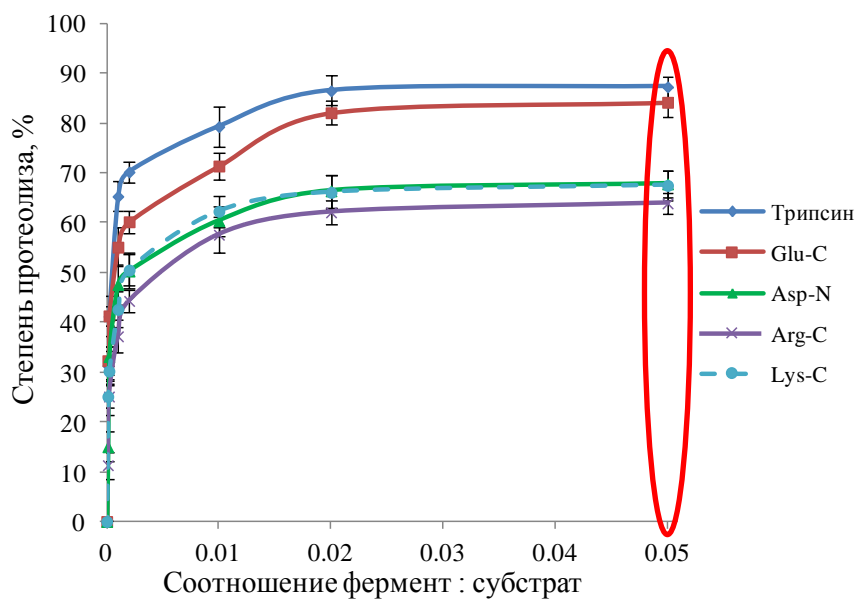


Рис. 16. График зависимостей степени протеолиза лекарственного средства «Растан» от соотношения фермент : субстрат в пробе.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что вспомогательные компоненты готовых форм исследуемых лекарственных средств не оказывают влияния на полноту протеолиза, максимальное расщепление исследуемых анализов достигается при добавлении фермента в пробу в соотношении 1 : 20 для всех вышеперечисленных протеаз, однако незначительно превышает

степень протеолиза при соотношении 1 : 50, которое и будем использовать в дальнейших исследованиях. Полученные результаты соответствуют описанным в литературе [124, 134] условиям проведения ферментативного расщепления.

Зависимость степени протеолиза от температуры инкубации

В соответствии с описанной в разделе 2.6.2 техникой эксперимента были подготовлены ферментативные перевары стандартных растворов рекомбинантного инсулина человека и рекомбинантного соматотропного гормона человека, а также лекарственных средств «Актрапид НМ» и «Растан».

Степень протеолиза для каждой из шести проб во всех экспериментальных сериях рассчитывали по формуле (11). На рисунках 17 и 18 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартного раствора РИЧ и лекарственного средства «Актрапид НМ» различными протеазами в зависимости от температуры инкубации.

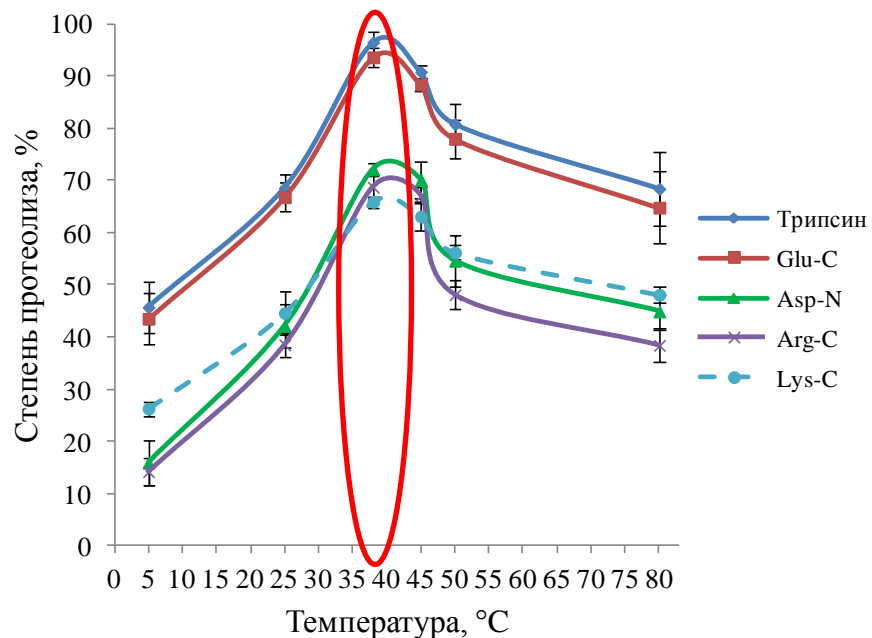


Рис. 17. График зависимостей степени протеолиза стандартного раствора РИЧ от температуры инкубации.

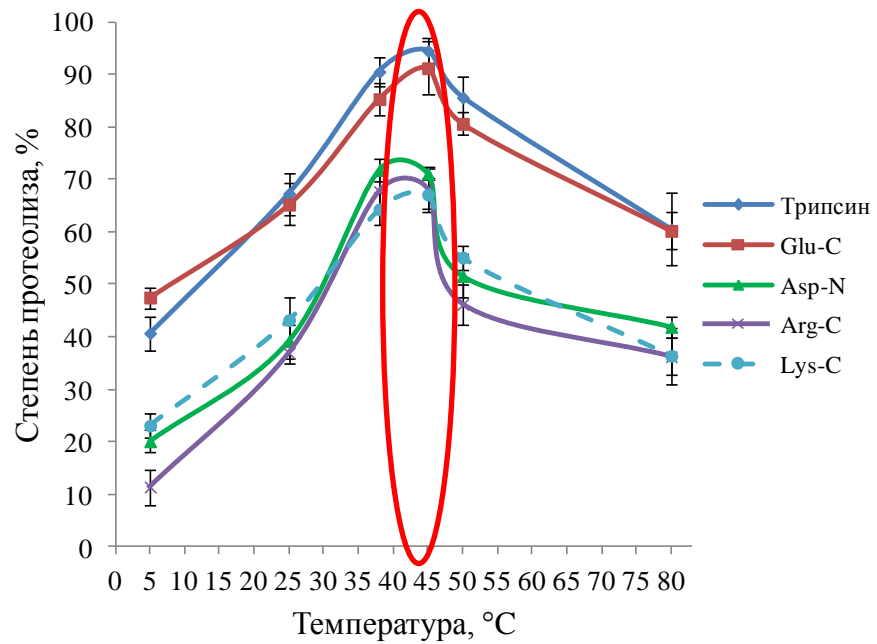


Рис. 18. График зависимостей степени протеолиза лекарственного средства «Актрапид НМ» от температуры инкубации.

На рисунках 19 и 20 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартного раствора РСГ и лекарственного средства «Растан» различными протеазами в зависимости от температуры инкубации.

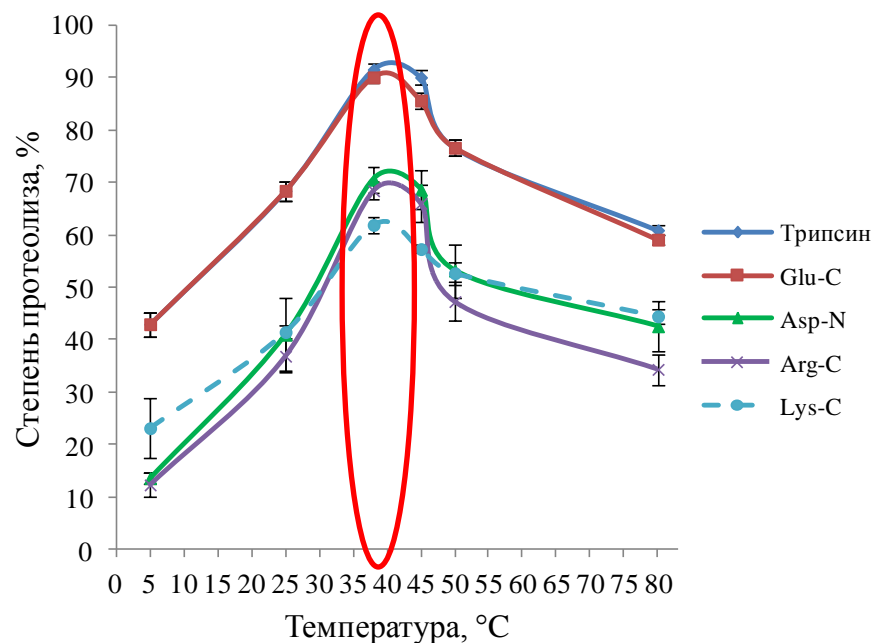


Рис. 19. График зависимостей степени протеолиза стандартного раствора РСГ от температуры инкубации.

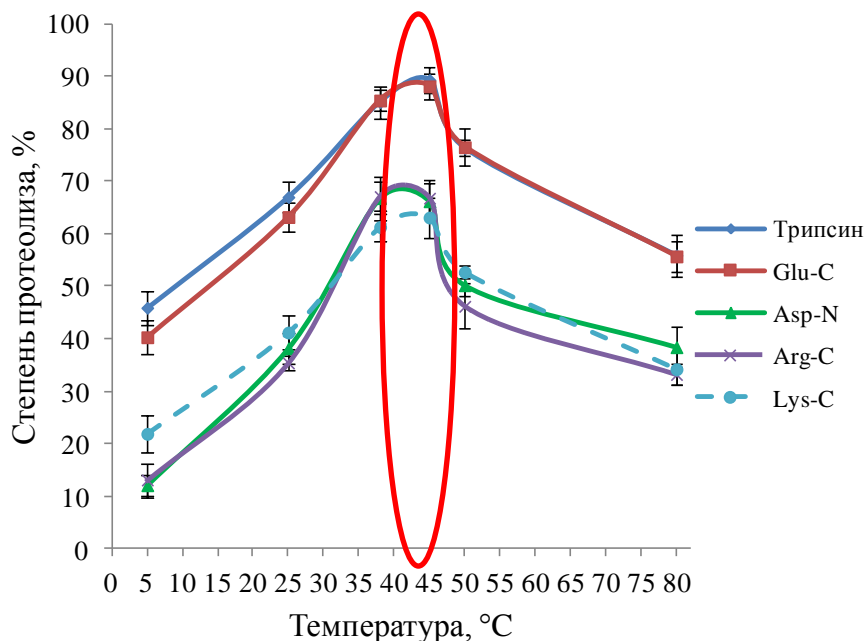


Рис. 20. График зависимостей степени протеолиза лекарственного средства «Растан» от температуры инкубации

Из экспериментальных данных следует, что температурный оптимум ферментативного расщепления исследуемых аналитов совпадает для исследуемых протеаз и находится в интервале от 40 до 45 °C. Полученные результаты отличаются от описанных в литературе [124, 134] условий, где оптимальными являются 37-38 °C. Возможно, наличие стабилизаторов в готовых формах лекарственных средств, препятствующих реакциям деградации действующего вещества, приводит к необходимости повышения температуры реакции ферментативного расщепления.

Зависимость степени протеолиза от времени инкубации

В соответствии с описанной в разделе 2.6.2 техникой эксперимента были подготовлены ферментативные перевары стандартных растворов РИЧ и РСГ, а также лекарственных средств «Актрапид НМ» и «Растан».

Степень протеолиза для каждой из восьми проб во всех экспериментальных сериях рассчитывали по формуле (11). На рисунках 21 и 22 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартного раствора РИЧ и лекарственного средства «Актрапид НМ» различными протеазами в зависимости от времени инкубации.

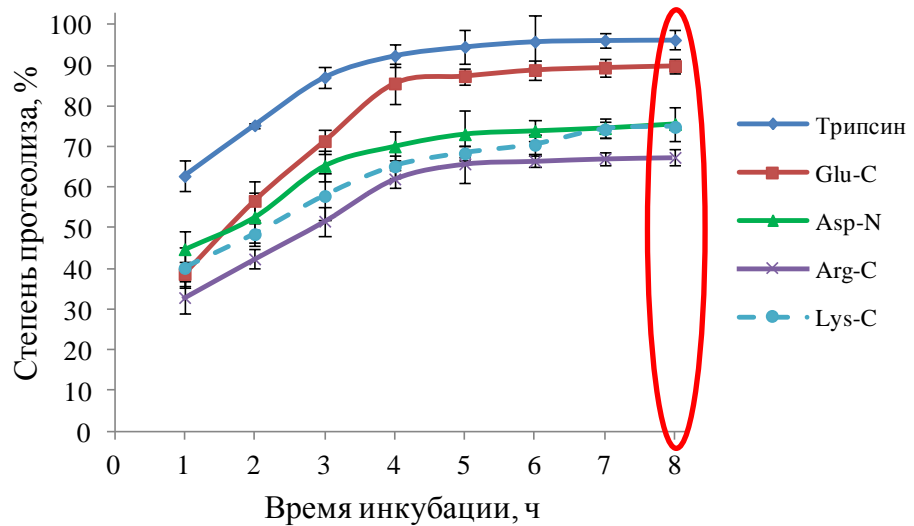


Рис. 21. График зависимостей степени протеолиза стандартного раствора РИЧ от времени инкубации.

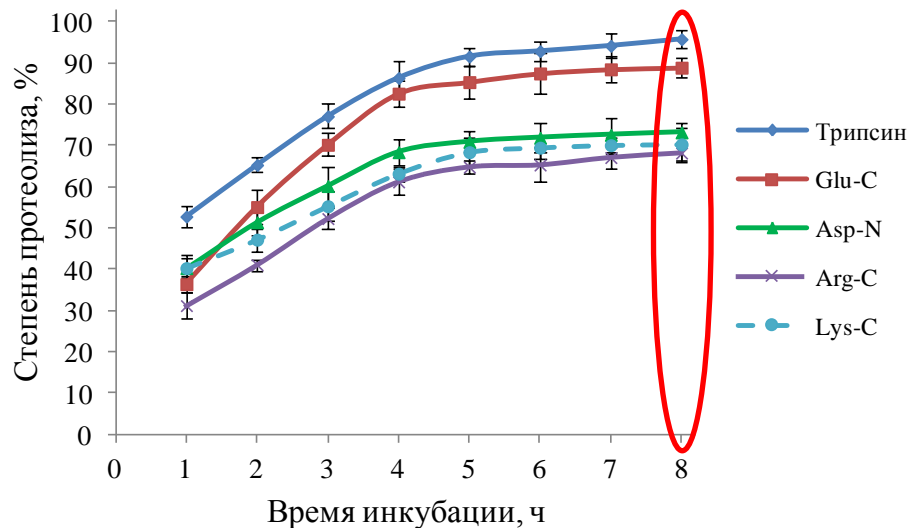


Рис. 22. График зависимостей степени протеолиза лекарственного средства «Актрапид НМ» от времени инкубации.

На рисунках 23 и 24 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартного раствора РСГ и лекарственного средства «Растан» различными протеазами в зависимости от времени инкубации.

Анализ кинетических кривых показывает, что наиболее интенсивно расщепление исследуемых аналитов протекает в первые 6 ч, затем степень протеолиза меняется незначительно и достигает максимума при инкубации в течение 8 ч для всех изученных протеаз. Оптимальной продолжительностью процедуры обработки ферментом можно считать 6 ч.

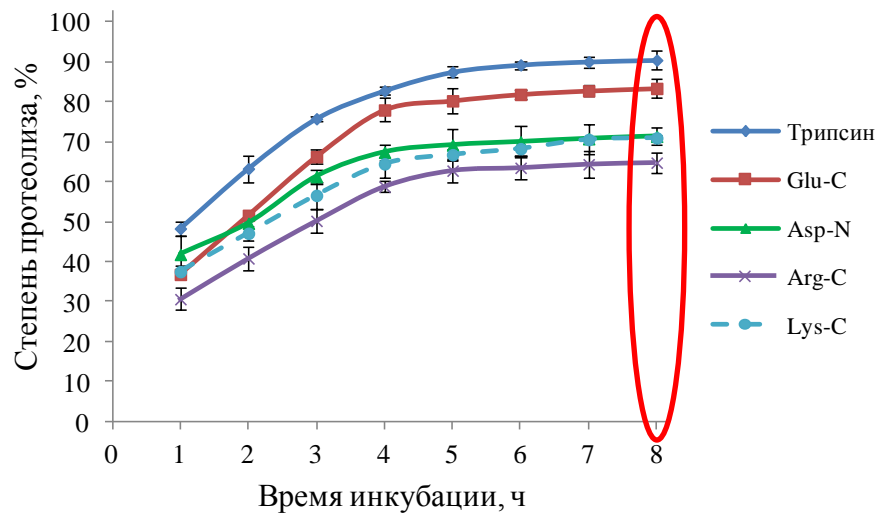


Рис. 23. График зависимостей степени протеолиза стандартного раствора РСГ от времени инкубации.

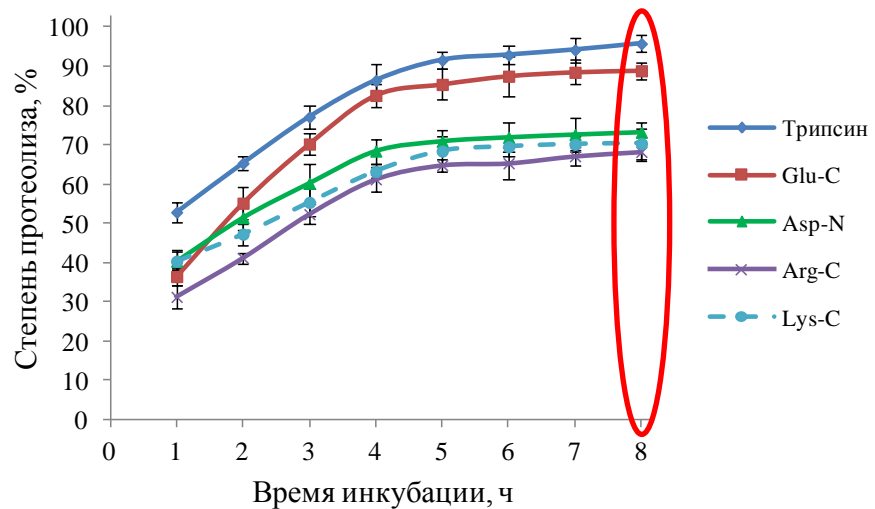


Рис. 24. График зависимостей степени протеолиза лекарственного средства «Растан» от времени инкубации.

Полученные результаты отличаются от описанных в литературе [124, 134] условий, где протеолиз длится в течение 2-4 ч. Вероятнее всего, это также можно объяснить присутствием стабилизаторов в готовых формах лекарственных средств, что приводит к увеличению продолжительности реакции ферментативного расщепления.

Зависимость степени протеолиза от pH среды

В соответствии с описанной в разделе 2.6.2 техникой эксперимента были подготовлены ферментативные перевары стандартных растворов РИЧ и РСГ, а также лекарственных средств «Актрапид НМ» и «Растан».

Степень протеолиза для каждой из десяти проб во всех экспериментальных сериях рассчитывали по формуле (11). На рисунках 25 и 26 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартного раствора РИЧ и лекарственного средства «Актрапид НМ» различными протеазами в зависимости от рН среды.

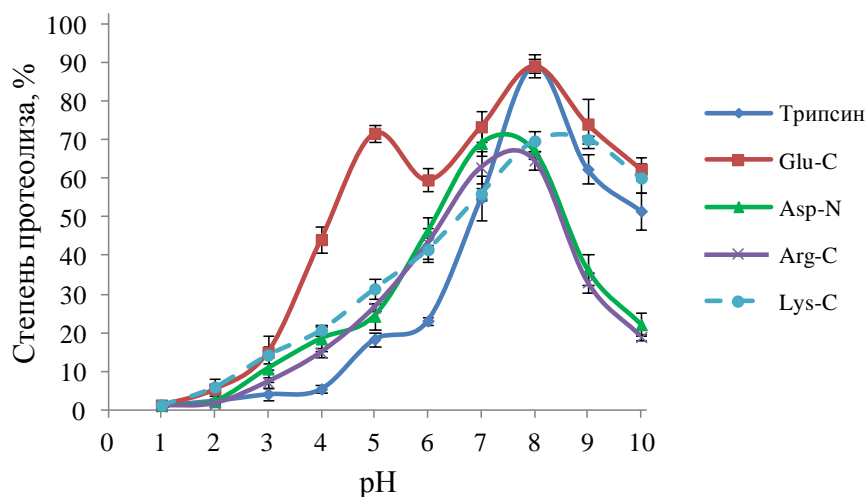


Рис. 25. График зависимостей степени протеолиза стандартного раствора РИЧ от рН среды.

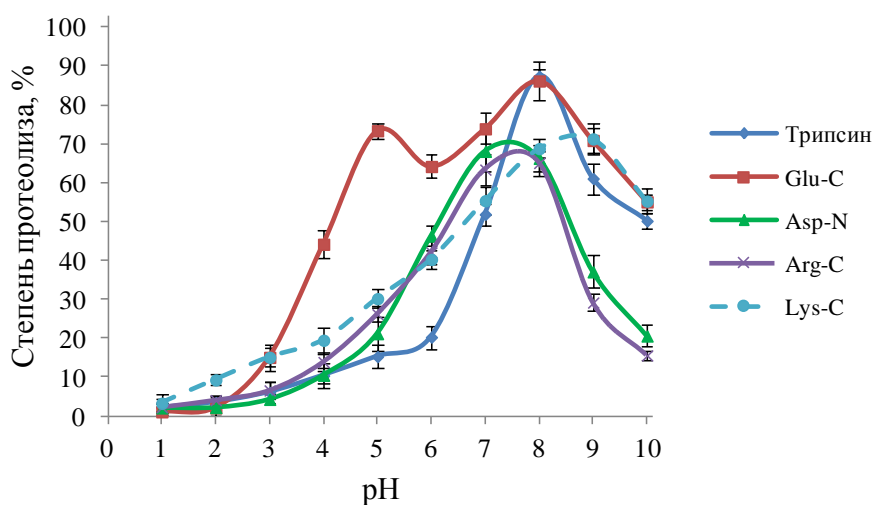


Рис. 26. График зависимостей степени протеолиза лекарственного средства «Актрапид НМ» от рН среды.

На рисунках 27 и 28 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартного раствора РСГ и лекарственного средства «Растан» различными протеазами в зависимости от рН среды.

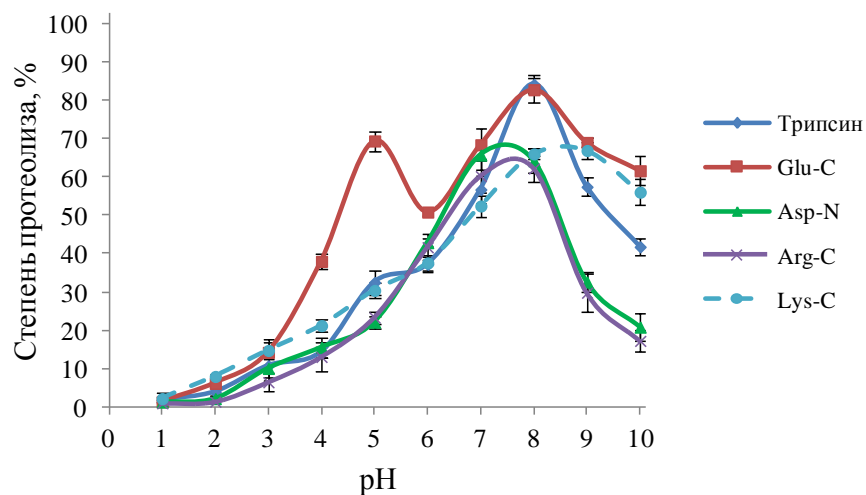


Рис. 27. График зависимостей степени протеолиза стандартного раствора РСГ от pH среды.

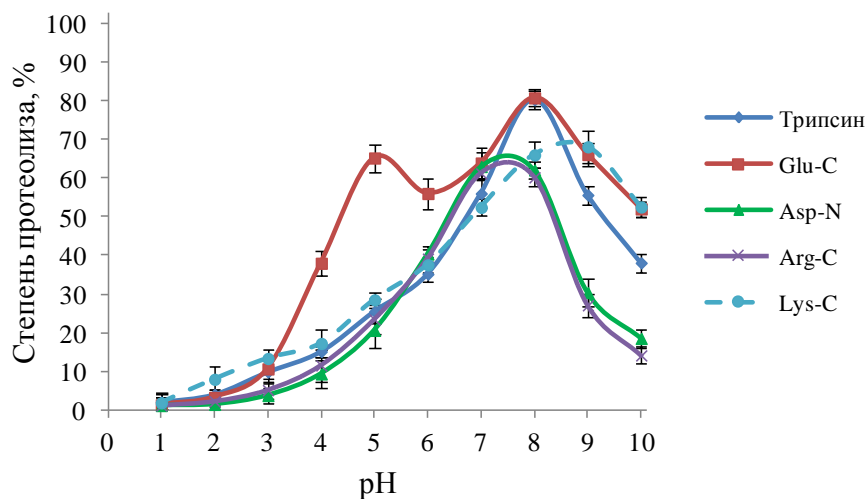


Рис. 28. График зависимостей степени протеолиза лекарственного средства «Растан» от pH среды.

Из полученных данных следует, что максимальное расщепление исследуемых лекарственных средств достигается в интервале 7,0-8,0 для Asp-N и Arg-C, 8,0-9,0 для Lys-C, в области значений pH ~ 8,0 для трипсина и Glu-C, причем последний фермент имеет еще одну точку максимума в области 5,0 pH. Полученные результаты соответствуют описанным в литературе [124, 134] условиям проведения ферментативного расщепления для таких протеаз как Lys-C, Asp-N, Arg-C и трипсин. Исключение составляет эндопротеаза Glu-C для которой рекомендуемое значение pH среды составляет 4,0. Изменение ферментативной активности в зависимости от pH среды связано с изменением ионизации ферментов, субстрата или фермент-субстратного комплекса.

Таким образом, в ходе выполненных экспериментальных исследований были выбраны условия ферментативного расщепления действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы (таблица 5).

Таблица 5 – Условия подготовки проб лекарственных средств с использованием ферментативного расщепления

Фермент	Соотношение фермент : субстрат	Температура, °С	Время, ч	pH среды
Трипсин	1 : 50	40–45	6	~ 8,0
Glu-C	1 : 50	40–45	6	~ 8,0
Asp-N	1 : 50	40–45	6	7,0–8,0
Lys-C	1 : 50	40–45	6	8,0–9,0
Arg-C	1 : 50	40–45	6	7,0–8,0

Сравнение с литературными данными [124, 134] позволяет сделать вывод о том, что для увеличения полноты ферментативного расщепления готовых форм лекарственных средств пептидной и белковой природы требуется повышение температуры с 37 до 40–45 °С, увеличение продолжительности реакции ферментативного расщепления с 2–4 до 6 ч. При этом соотношения фермент : субстрат соответствуют литературным данным, а pH среды отлична лишь для эндопротеиназы Glu-C. Таким образом, установлена способность вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств, предположительно, стабилизаторов, замедлять процессы ферментативного расщепления действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы.

3.4.2 Получение масс-спектров фрагментных ионов с использованием алгоритма интеллектуального управления измерениями

Для повышения производительности и достоверности контроля подлинности ЛС пептидной и белковой природы представляется целесообразным использовать алгоритм интеллектуального управления измерениями (Data Dependent Acquisition (DDA)), позволяющий в соответствии с заданными настройками автоматически выбирать большее число ионов-

предшественников для фрагментации, а следовательно, получать максимальное количество информации за время проведения одного анализа [206]. Данный алгоритм реализуется во всех масс-спектрометрах высокого разрешения.

Группой А. Kalli проводились исследования по оптимизации условий анализа при интеллектуальном управлении измерениями с использованием масс-спектрометра высокого разрешения с орбитальной ловушкой LTQ-Orbitrap [207]. Показаны эффекты оптимизации таких параметров как продолжительность динамического исключения, время накопления ионов, число MS/MS экспериментов, энергия соударений [208, 209], разрешающая способность [210].

Для успешного применения данного алгоритма необходимо получить интенсивные сигналы ионов-предшественников исследуемых соединений для их дальнейшей фрагментации. На интенсивность сигнала влияют такие параметры источника ионизации как потенциал, прикладываемый к капилляру и его температура [211]. Для получения в автоматическом режиме информативных масс-спектров фрагментных ионов необходима оптимизация параметров работы масс-спектрометра. Для детектора с орбитальной ионной ловушкой это энергия соударений, диапазон детектируемых зарядовых состояний, время накопления ионов в ловушке, ширина изоляции масс, длительность динамического исключения, количество ионов в орбитальной ионной ловушке, диапазон сканирования детектируемых ионов [212].

Оценку влияния вышеуказанных параметров на результаты анализа проводили на примере стандартного раствора РИЧ для масс-спектрометра с орбитальной ионной ловушкой QExactive. Были выбраны два характеристичных иона пептидов, полученных после расщепления трипсином: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK $[M+3H]^{3+}$ с m/z 666,3381 и GFFYTPK $[M+2H]^{2+}$ с m/z 430,2213. Масс-хроматограммы полученного лизата РИЧ представлены на рисунке 29.

Критерием выбора оптимальных значений параметров источника ионизации является максимальная интенсивность выбранных ионов в масс-спектре.

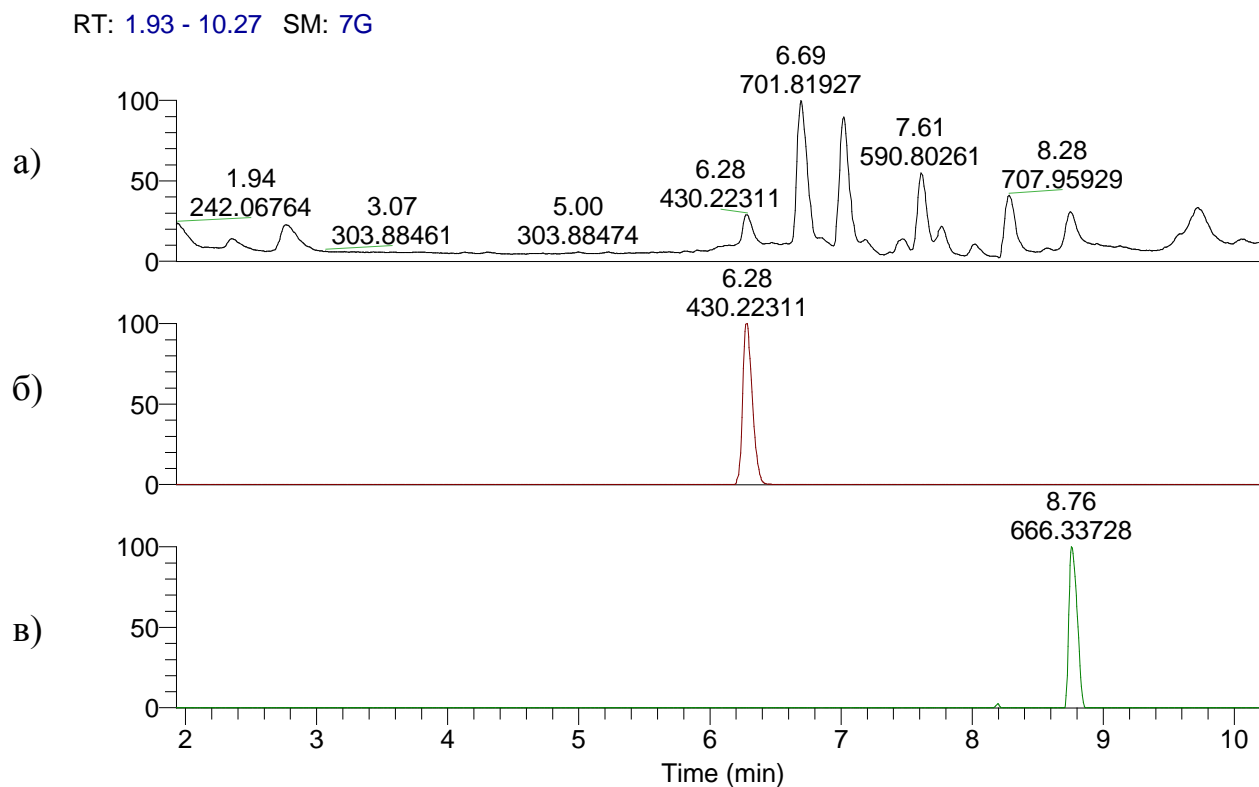


Рис. 29. Масс-хроматограмма раствора трипсинолизата рекомбинантного инсулина человека (а-масс-хроматограмма по полному ионному току, б-масс-хроматограмма по выделенному иону с m/z 430.2213, в – масс-хроматограмма по выделенному иону с m/z 666.3381).

Для установления оптимального значения потенциала на капилляре сравнивали площади пиков соответствующих ионов при значении напряжения от 2 до 6 кВ с шагом в 0,5 кВ. Полученные результаты представлены на рисунке 30.

Из полученных результатов видно, что с увеличением потенциала на капилляре возрастает интенсивность сигнала за счет увеличения количества ионов в источнике. Значение напряжения, при котором интенсивность сигнала максимальна, составляет 4,5 кВ. Это соответствует рекомендуемому диапазону величин данного параметра для масс-спектрометрического анализа высокомолекулярных соединений – 3-6 кВ [213]. При напряжении на капилляре выше 5 кВ уровень интенсивность выбранных ионов в масс-спектре снижается вследствие их фрагментации.

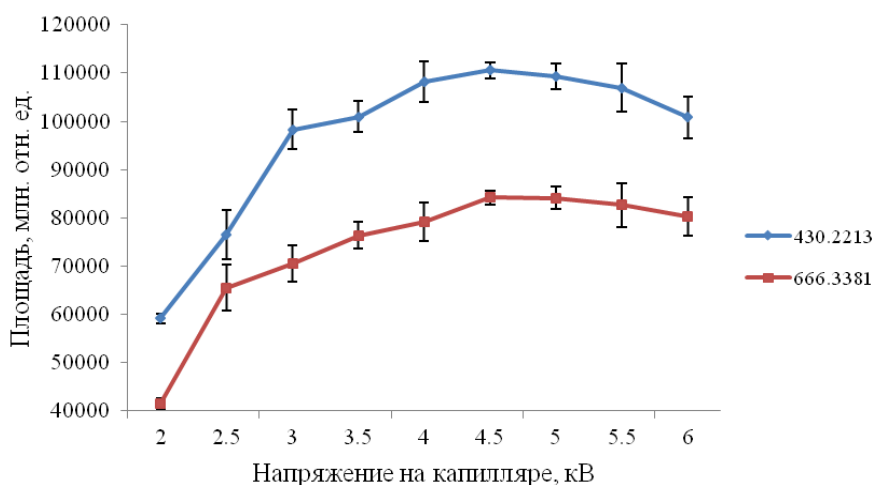


Рис. 30. Зависимость площадей пиков ионов с массами 430,2213 и 666,3381 от потенциала на капилляре источника электрораспыления.

Для установления оптимального значения температуры капилляра сравнивали площади соответствующих ионов РИЧ при значениях оптимизируемого параметра от 50 до 400 °С с шагом в 50 °С. Полученные результаты представлены на рисунке 31.

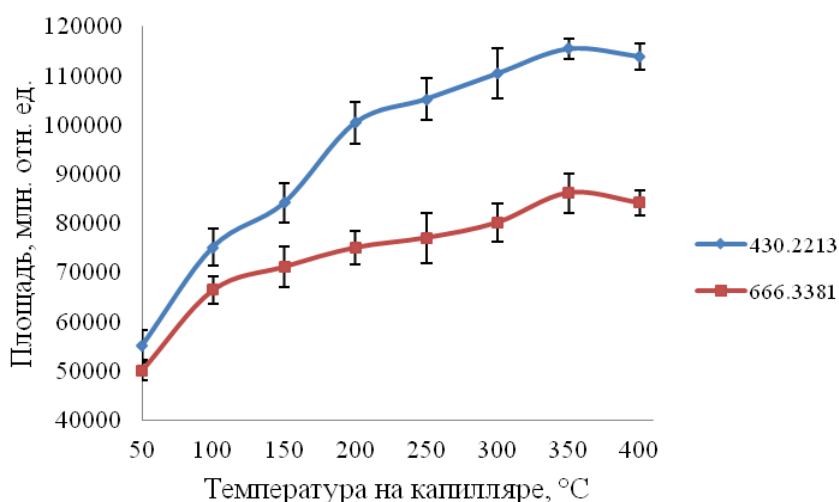


Рис. 31. Зависимость площадей пиков ионов с массами 430,2213 и 666,3381 от температуры капилляра.

Из полученных результатов следует, что при используемом в работе потоке подвижной фазы $0,5 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$ оптимальное значение температуры капилляра составляет 350 °С. При температуре 400 °С интенсивность выбранных ионов РИЧ снижается вследствие их деструкции.

Для получения масс-спектров фрагментных ионов использовали профилирование энергии столкновений для HCD фрагментации со значением $(30 \pm 15) \%$. Таким образом результирующий спектр содержит как и ионы-

предшественники, так и мелкие фрагменты, следовательно будет более информативен для автоматической обработки специализированным программным обеспечением.

Диапазон детектируемых зарядовых состояний в автоматическом режиме устанавливали от 2 до 6. Однозарядные ионы не использовали для МС/МС экспериментов, поскольку эти спектры, в основном, принадлежали матрице. Полученные в ходе протеолиза короткие однозарядные пептиды не влияют на степень идентификации аминокислотной последовательности, поскольку для поиска белков по базам данных требуются пептиды, состоящие минимум из 6-7 аминокислот.

Для оценки влияния времени накопления ионов в орбитальной ионной ловушке на количество идентифицированных пептидов сравнивали число идентифицированных пептидов при значениях оптимизируемого параметра от 40 до 200 с шагом в 20 мс. Результаты представлены на рисунке 32.

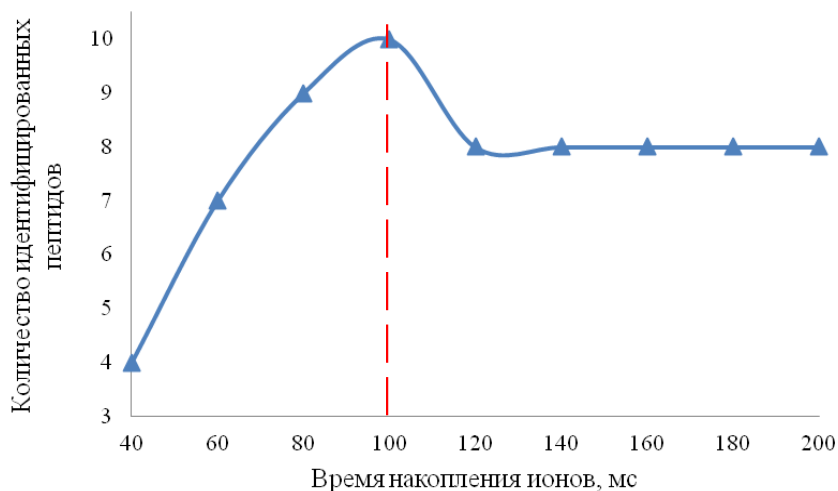


Рис. 32. Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от времени накопления ионов в орбитальной ионной ловушке.

Из полученных результатов следует, что максимальное число идентификаций достигается при 100 мс накопления.

Для оценки оптимального значения количества ионов в орбитальной ионной ловушке сравнивали количество идентифицированных пептидов при вариации значений данного параметра от 2×10^4 до 5×10^6 . Полученные результаты представлены на рисунке 33.

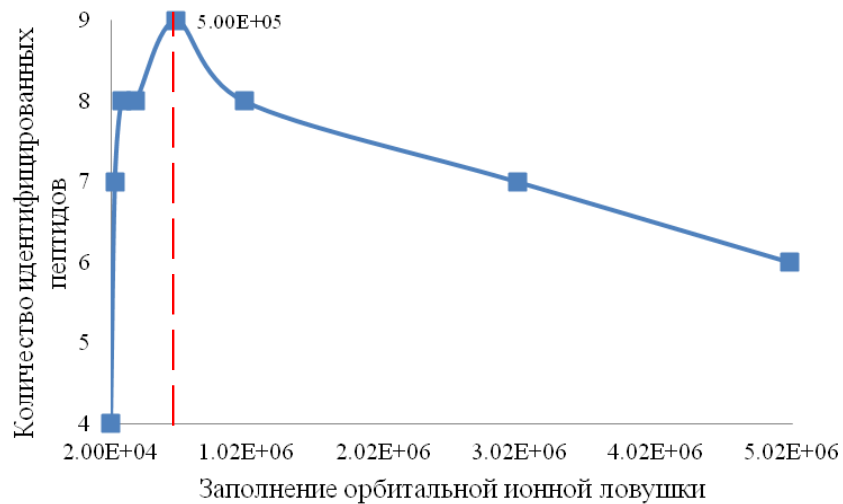


Рис. 33. Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от количества ионов в орбитальной ионной ловушке.

Из полученных результатов следует, что необходимое значение количества ионов в орбитальной ионной ловушке составляет 5×10^5 .

Важно отметить, что количество и время накопления ионов в орбитальной ионной ловушке не являются независимыми параметрами. Получением масс-спектров второго порядка в автоматическом режиме будет управлять параметр, заданное значение которого достигается в первую очередь, т.е. если накопление установленного количества ионов в орбитальной ионной ловушке занимает меньше заданного времени накопления ионов, то измерениями будет управлять второй параметр, а если больше – первый.

Величина минимального сигнала иона-предшественника автоматически выбирается программным обеспечением Xcalibur 2.2 в зависимости от установленного параметра количества ионов в орбитальной ионной ловушке. При низких минимальных значениях данного параметра масс-спектр вторичных ионов включает очень много информации, что может привести к значительным нагрузкам на вычислительную систему, а при высоких значениях данного параметра не будут получены масс-спектры вторичных ионов пептидов с небольшими интенсивностями ионов-предшественников и, следовательно, степень идентификации аминокислотной последовательности снизится.

Продолжительность динамического исключения является еще одним параметром алгоритма интеллектуального управления измерениями. При использовании данного параметра фрагментированный ион помещается в список исключений и не подвергается повторной фрагментации в течение определенного времени. Для оптимизации длительности динамического исключения сравнивали количество идентифицированных пептидов при значениях от 20 до 110 мс с шагом в 10 мс. Полученные результаты представлены на рисунке 34.

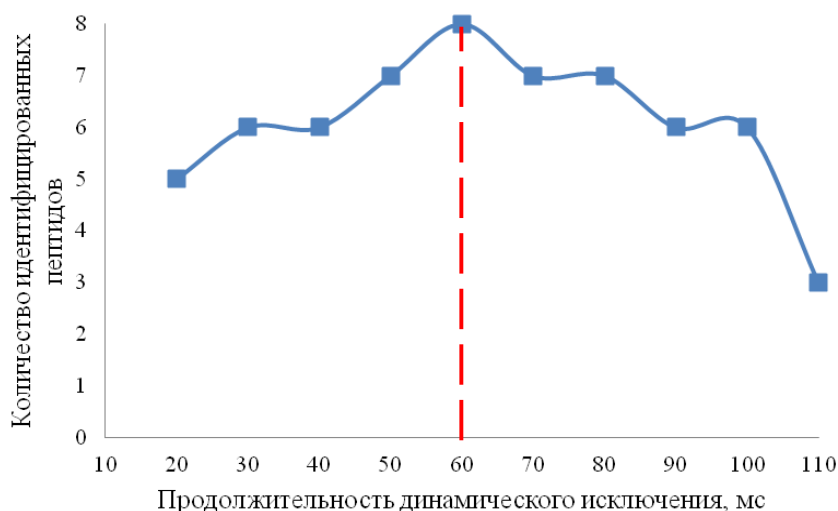


Рис. 34. Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от значения продолжительности динамического исключения.

Из полученных результатов следует, что максимальное число идентификаций достигается при продолжительности динамического исключения 60 мс. Для масс-спектрометров с орбитальной ионной ловушкой максимальное число исключений ионов составляет 500.

Для изоляции ионов-предшественников в режиме интеллектуального управления измерениями используется параметр диапазон ширины изоляции масс. С целью оптимизации данного параметра сравнивали количество идентифицированных пептидов при значениях от 1 до 4 шагом в 0,5 m/z . Полученные результаты приведены на рисунке 35.

Полученные результаты показали, что оптимальное значение данного параметра составляет 2,0 m/z . Установка узкого диапазона ширины изоляции масс приводит к снижению чувствительности вследствие потери

информативных ионов, а широкий диапазон изоляции масс может привести к совместной изоляции и со-фрагментации соседних пептидов, что отрицательно сказывается на степени идентификации аминокислотной последовательности.

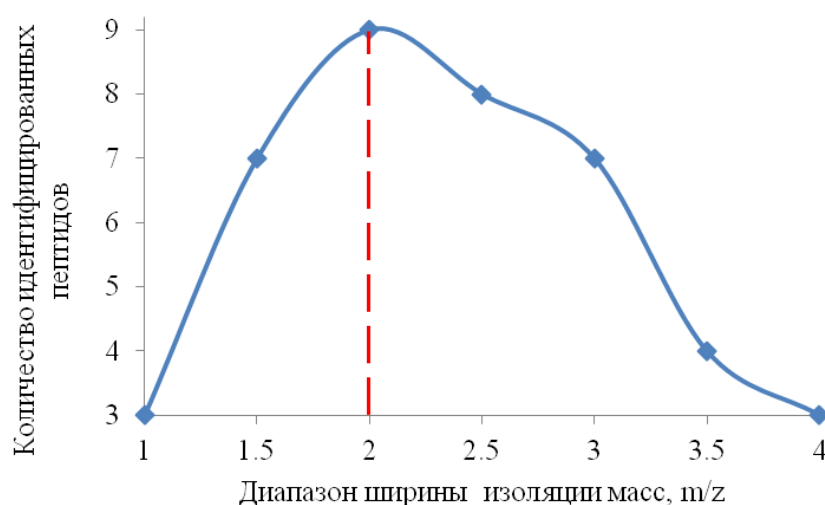


Рис. 35. Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от диапазона ширины изоляции масс.

При использовании интеллектуального управления измерениями была задействована опция, при которой для фрагментации отбирается моноизотопный пик из общего кластера изотопного распределения. Применение данного параметра значительно влияет на полноту идентификации аминокислотной последовательности.

Для установления оптимального значения диапазона сканирования детектируемых ионов сравнивали количество идентифицированных пептидов при значениях диапазонов масс детектируемых ионов 50-1500, 300-2000 и 500-2000 m/z. Результаты представлены на рисунке 36.

Основываясь на полученных результатах можно сделать вывод, что при диапазоне регистрации масс детектируемых ионов 300-2000 m/z идентифицируется наибольшее количество пептидов, поскольку данный интервал позволяет детектировать короткие пептиды, но при этом не перегружен масс-спектрами вторичных ионов матрицы.

По результатам масс-спектрометрического анализа рекомбинантного инсулина человека, расщепленного трипсином, с использованием

оптимизированных параметров режима интеллектуального управления измерениями в растворе идентифицировано 10 пептидов.

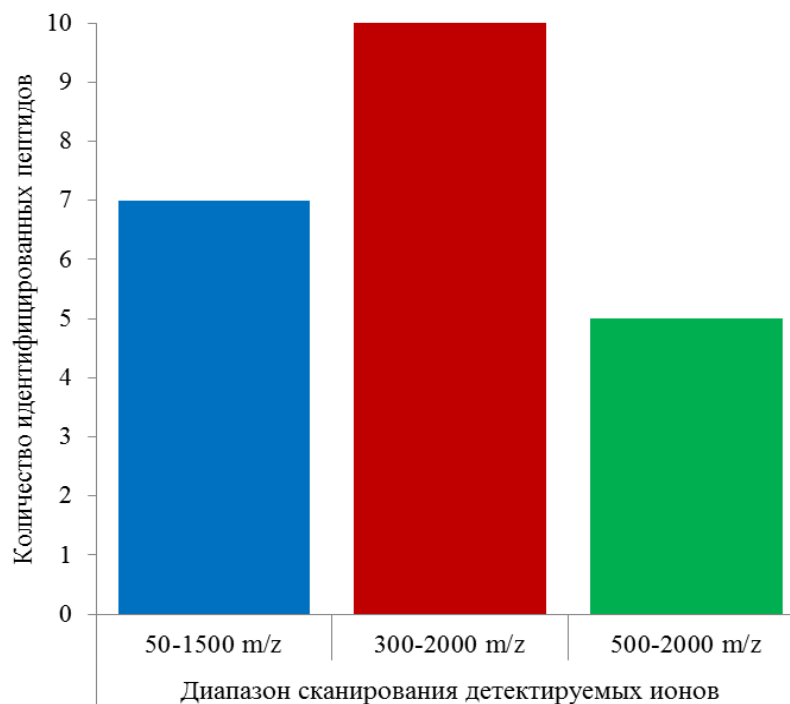


Рис. 36. Зависимость количества идентифицированных пептидов от диапазона сканирования детектируемых ионов для РИЧ.

В результате проведенных исследований были выбраны параметры масс-спектрометрического детектирования с использованием режима интеллектуального управления измерениями. Условия, применяемые для оценки подлинности действующих веществ пептидной и белковой природы, представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Параметры масс-спектрометрического детектирования с использованием режима интеллектуального управления измерениями

№ п/п	Наименование параметра	Значение
1	Тип источника ионизации	HESI II
2	Напряжение на капилляре распылителя	4,5 кВ
3	Температура распылителя	270 °С
4	Температура капилляра	350 °С
5	Тип ячейки соударительной диссоциации	Ячейка высокоэнергетической соударительной диссоциации (HCD)
6	Энергия диссоциации	(30 ± 15) %

№ п/п	Наименование параметра	Значение
7	Детектируемое зарядовое состояние	2-6
8	Количество ионов в орбитальной ионной ловушке	5×10^5
9	Время накопления ионов	100 мс
10	Продолжительность динамического исключения	60 мс
11	Фильтр масс для изоляции прекурсоров	Квадрупольный фильтр масс
12	Ширина изоляции масс	2,5 m/z
13	Прекурсор	Моноизотопный пик из общего изотопного распределения
14	Диапазон детектируемых масс	300-2000 m/z
15	Разрешение масс-спектрометра	35 000

Для апробации разработанного метода масс-спектрометрического детектирования с использованием режима интеллектуального управления измерениями был проанализирован препарат «Растан» на основе РСГ.

Масс-хроматограмма полученного трипсинолизата РСГ представлена на рисунке 37. По результатам масс-спектрометрического анализа в растворе идентифицировано 54 пептида.

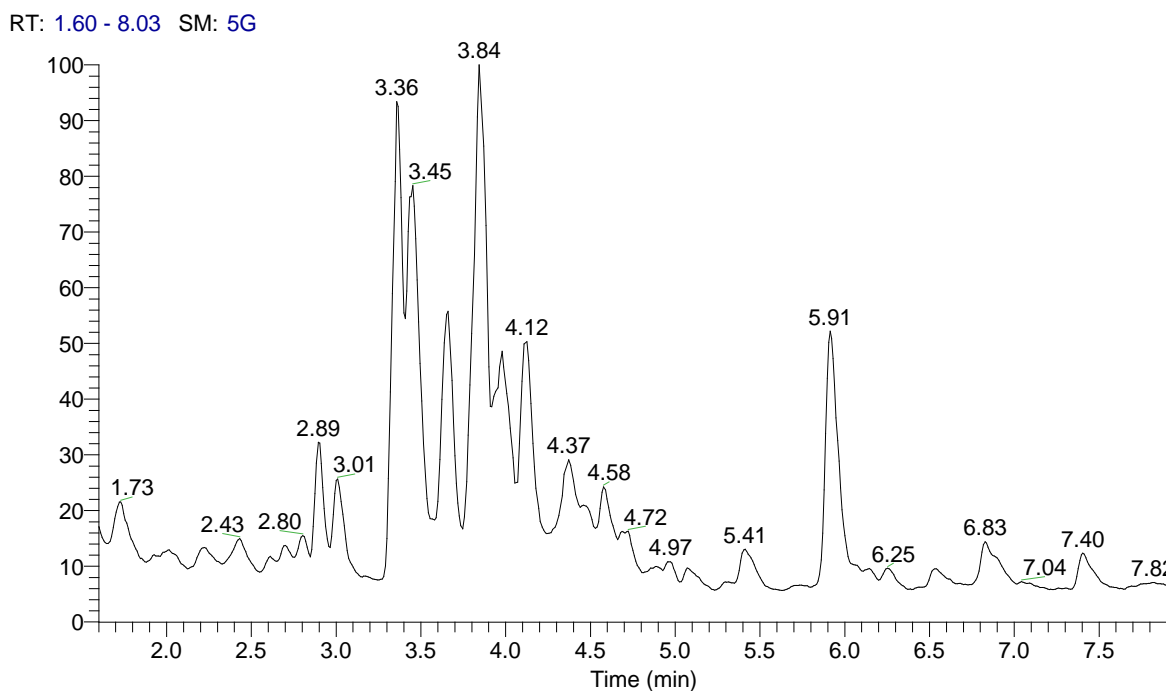


Рис. 37. Масс-хроматограмма раствора трипсинолизата соматотропина.

Влияние выбранных параметров режима интеллектуального управления измерениями на интенсивность аналитических сигналов исследовали на примере раствора РСГ после обработки трипсином. На рисунке 38 представлены значения площадей хроматографических пиков, построенных по выделенным ионам.

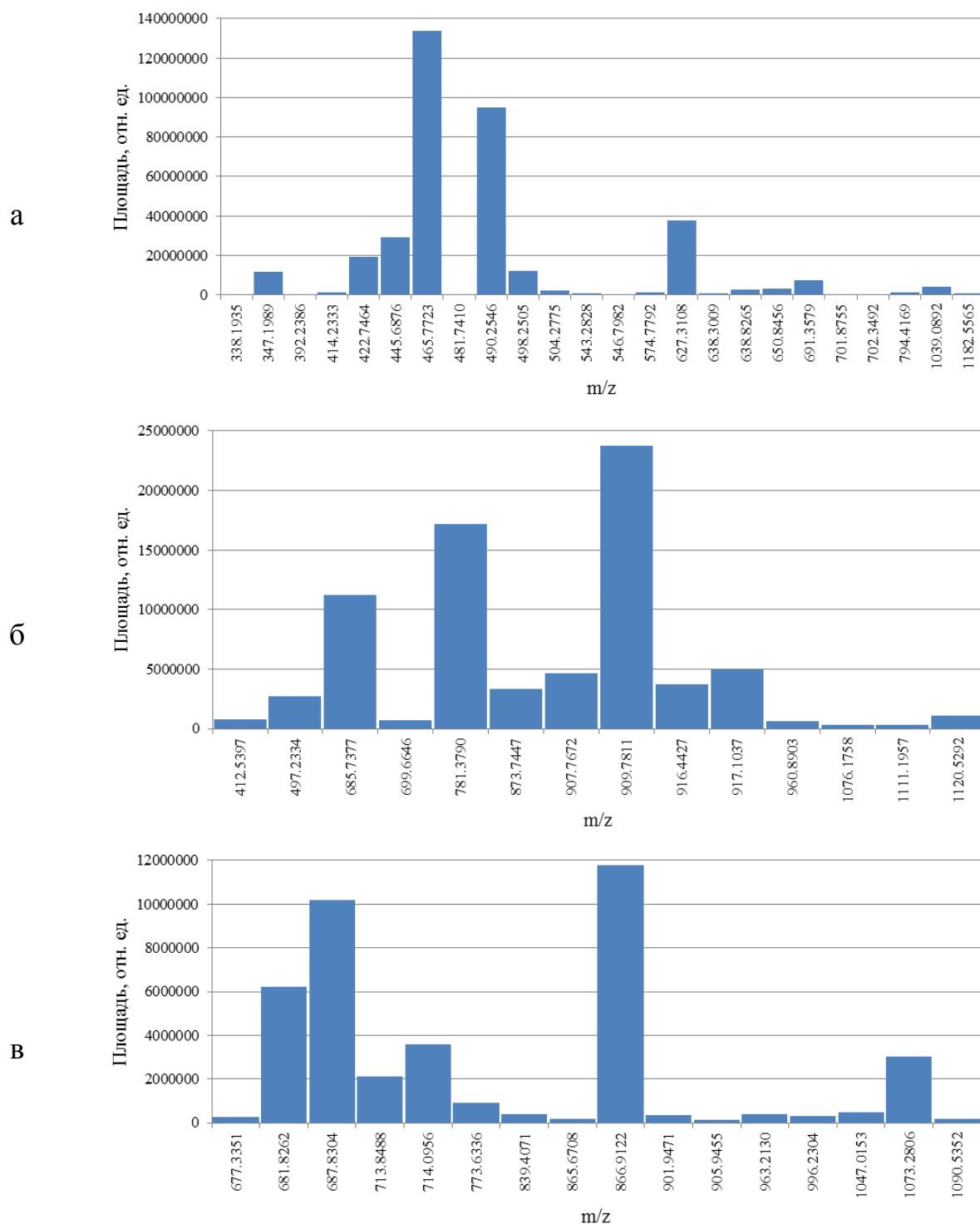


Рис. 38. Площади хроматографических пиков идентифицированных пептидов (а - для пептидов с ионами в зарядовом состоянии 2+, б - для пептидов с ионами в зарядовом состоянии 3+, в - для пептидов с ионами в зарядовом состоянии 4+).

На основании приведенных данных выявлено, что наибольшая интенсивность хроматографических пиков характерна для немодифицированных коротких пептидов, в масс-спектре которых пик с максимальной интенсивностью является двухзарядным. Для рекомбинантного инсулина человека наблюдается аналогичная зависимость.

Однако соотношение количества получаемых ионов в различных зарядовых состояниях для РИЧ и РСГ после ферментативного расщепления трипсином при выбранных условиях анализа оказалось различным. На рисунке 39 приведены соответствующие круговые диаграммы.

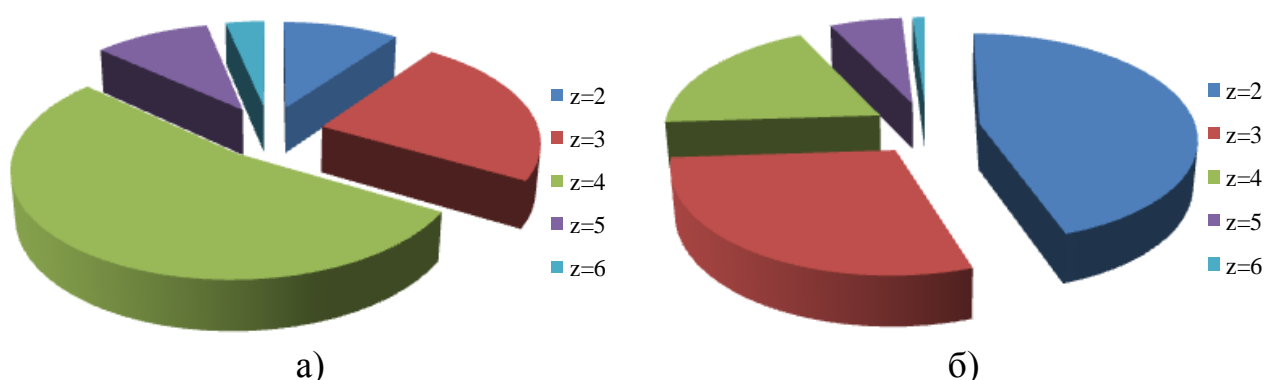


Рис. 39. Круговые диаграммы, показывающие распределение количества ионов по их зарядовым состояниям (а - для рекомбинантного инсулина человека, б – рекомбинантного соматотропного гормона человека)

Анализ данных, представленных на рисунке 39, показывает, что для РИЧ характерно образование ионов в зарядовом состоянии +4, а для РСГ - +2. Это связано с действием трипсина, после обработки которым рекомбинантного соматотропного гормона получают более короткие пептиды.

Из вышесказанного можно сделать вывод, что количество получаемых ионов в различных зарядовых состояниях не зависит от условий масс-спектрометрического анализа и обусловлено, аминокислотной последовательностью аналита и применяемым ферментом.

Выбранные условия масс-спектрометрического детектирования с использованием режима интеллектуального управления измерениями также использовались на приборах Orbitrap Fusion, Agilent Q-TOF и Shimadzu IT-TOF. Применяемые параметры приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Применение выбранных параметров в масс-спектрометрах различных типов

№ п/п	Наименование параметра	Thermo Scientific QExactive	Thermo Scientific Orbitrap Fusion	Agilent Q-TOF 6530	Shimadzu IT-TOF
1	Энергия диссоциации	+	+	+	+
2	Детектируемое зарядовое состояние	+	+	+	+
3	Количество ионов в орбитальной ионной ловушке	+	+	-	-
4	Время накопления ионов	+	+	-	-
5	Продолжительность динамического исключения	+	+	+	+
6	Ширина изоляции масс	+	+	+	+
7	Прекурсор	+	+	+	+
8	Диапазон детектируемых масс	+	+	+	+
* – энергия диссоциации рассчитывается управляющей программой автоматически в зависимости от величины m/z					

С использованием выбранных параметров были проанализированы трипсинолизаты препарата рекомбинантного инсулина человека на масс-спектрометрах разных типов. Степень идентификации аминокислотной последовательности для всех приборов составила 100 %. Данный факт свидетельствует о подходящих значениях выбранных параметров и принципиальной возможности автоматизации процесса масс-спектрометрического анализа лекарственных средств пептидной и белковой природы.

3.4.3 Обработка полученных результатов с использованием специализированного программного обеспечения

На основании приведенных в Главе 1 данных для подтверждения аминокислотной последовательности действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы было выбрано программное обеспечение PEAKS Studio 7.0 («Bioinformatics Solutions Inc.», Канада).

Данный программный продукт начинает работу с загрузки исходных масс-спектрометрических данных, затем проводит *de novo* секвенирование, выполняет поиск пептидов и белков по базам данных, определение пост-трансляционных модификаций из собственной базы данных в автоматическом режиме и не требует вмешательства пользователей. На рисунке 40 показан алгоритм работы программного обеспечения PEAKS Studio.

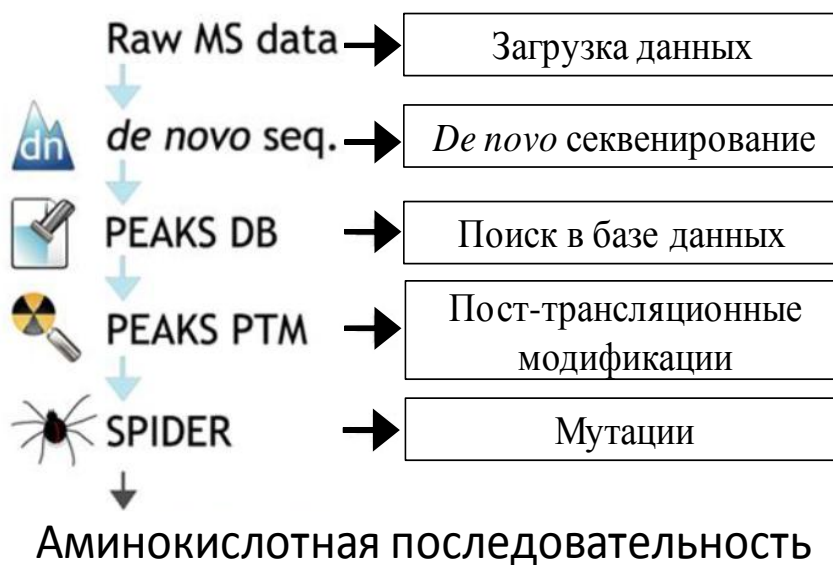


Рис. 40. Алгоритм работы PEAKS Studio 7.0.

Для обработки данных серии экспериментов с использованием различных специфических протеаз создавали проект, в который вносили полученные результаты. На рисунке 41 представлен внешний вид окна создания проекта. В соответствующих разделах указывали используемый фермент, тип масс-спектрометрического анализатора и фрагментации.

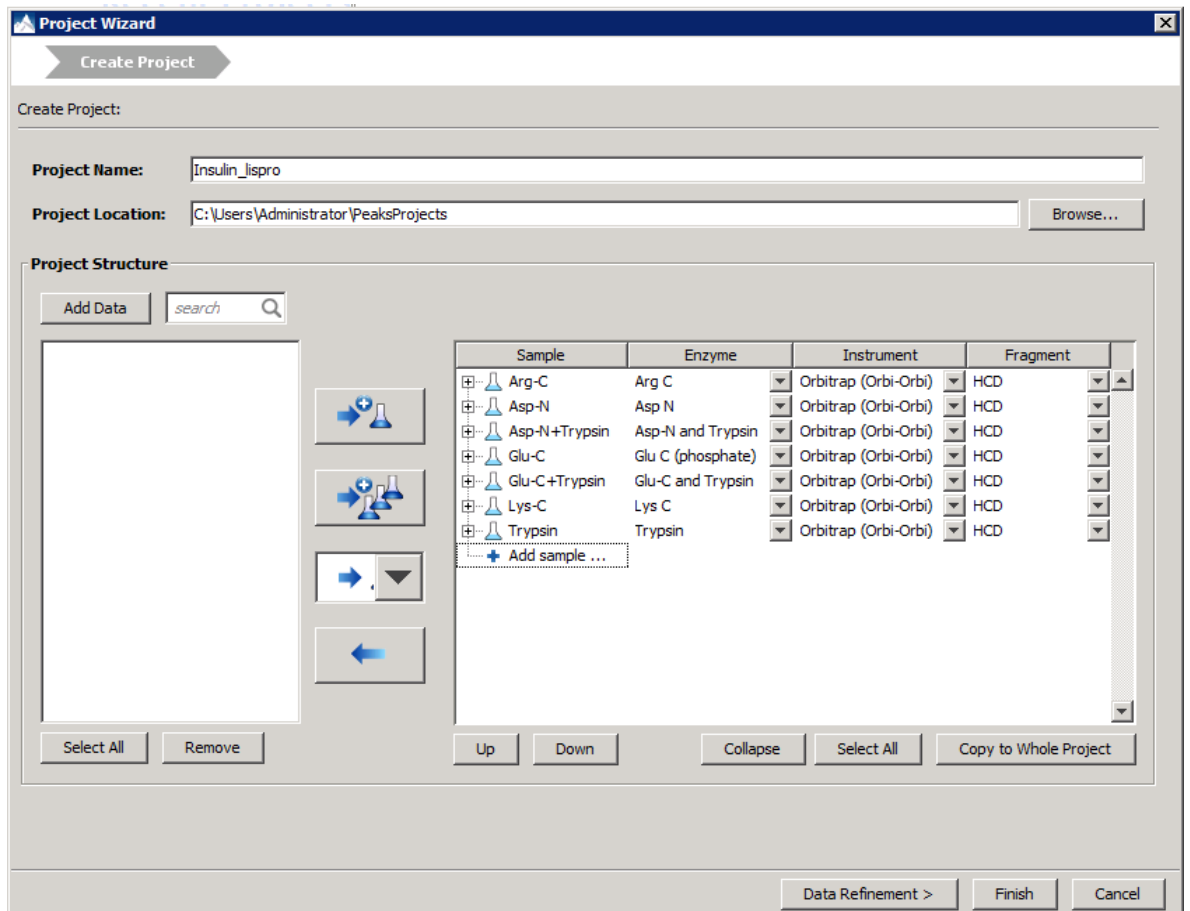
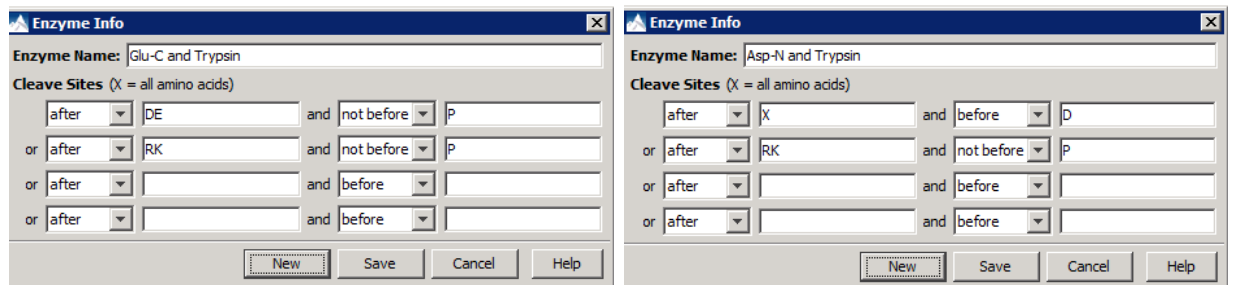


Рис. 41 – Внешний вид окна создания проекта PEAKS Studio.

Данный программный комплекс располагает достаточным набором ферментов для указания параметров идентификации и предусматривает возможность создания различных комбинаций пользователем. Согласно представленному ранее алгоритму мы использовали сочетание таких протеаз как Glu-C и трипсин, а также Asp-N и трипсин. Данные пары были нами добавлены в базу данных ферментов (рисунок 42).



а)

б)

Рис. 42. Созданные комбинации используемых ферментов: (а) Glu-C и трипсин, (б) Asp-N и трипсин.

В соответствии с условиями проведения масс-спектрометрического анализа ограничивали диапазон обработки данных для ионов с зарядовыми состояниями от 2 до 6. Внешний вид окна уточнения параметров обработки данных представлен на рисунке 43.

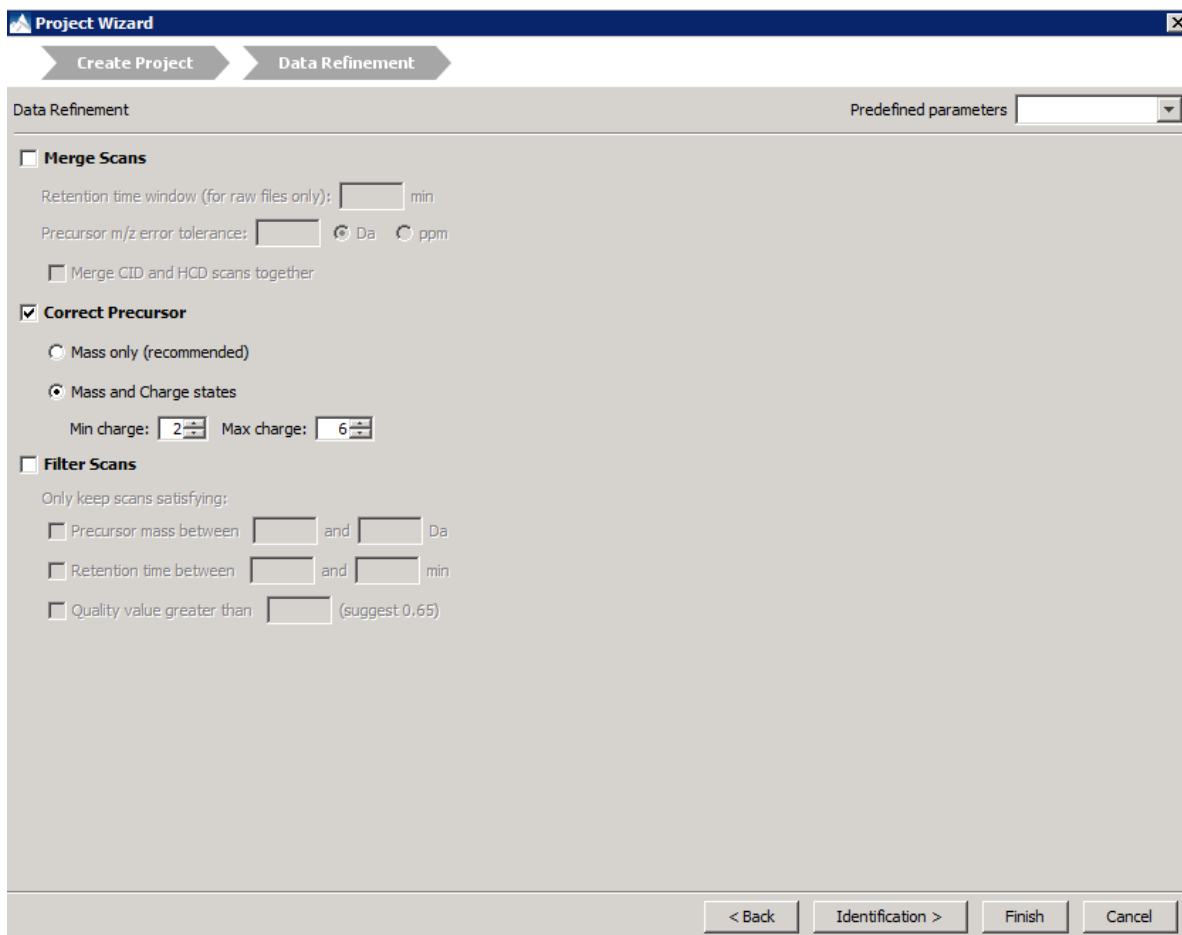


Рис. 43. Внешний вид окна уточнения параметров обработки данных.

Для идентификации аминокислотной последовательности необходимо указать несколько параметров:

- точность измерения массы иона прекурсора;
- точность измерения массы фрагментного иона;
- тип молекулярного иона;
- тип используемой протеазы;
- количество нереализованных разрывов;
- модификации;
- используемую базу данных.

Для увеличения степени идентификации аминокислотной последовательности, по опыту большинства исследователей, учитывали до трех пропусков сайтов разрезания и неспецифическое расщепление с обоих концов пептида. Внешний вид окна настройки параметров идентификации представлен на рисунке 44.

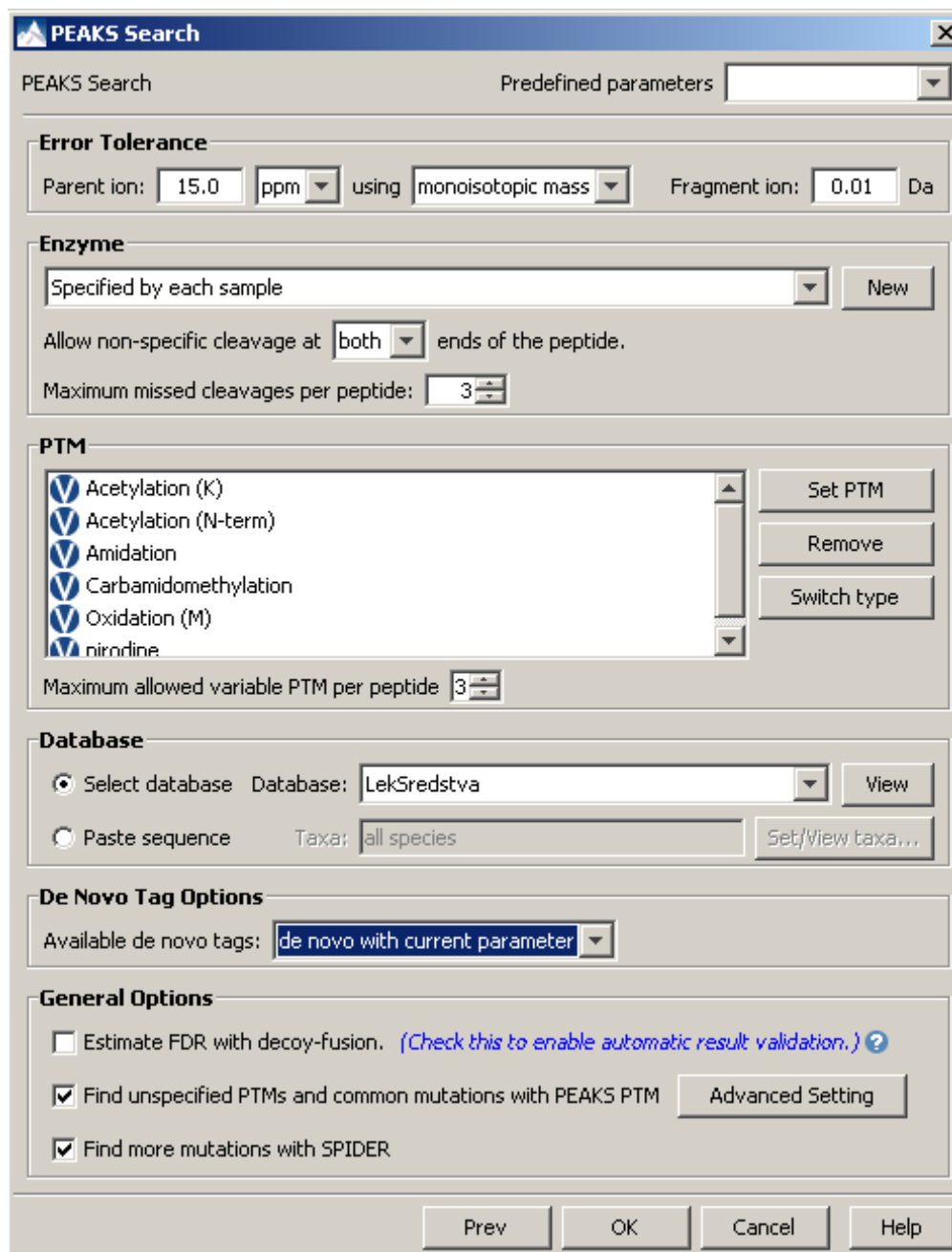


Рис. 44. Внешний вид окна настройки параметров идентификации

Пост-трансляционные модификации и мутации выбирали в автоматическом режиме из собственной базы данных программного обеспечения, которое включает 485 основных модификаций (рисунок 45).

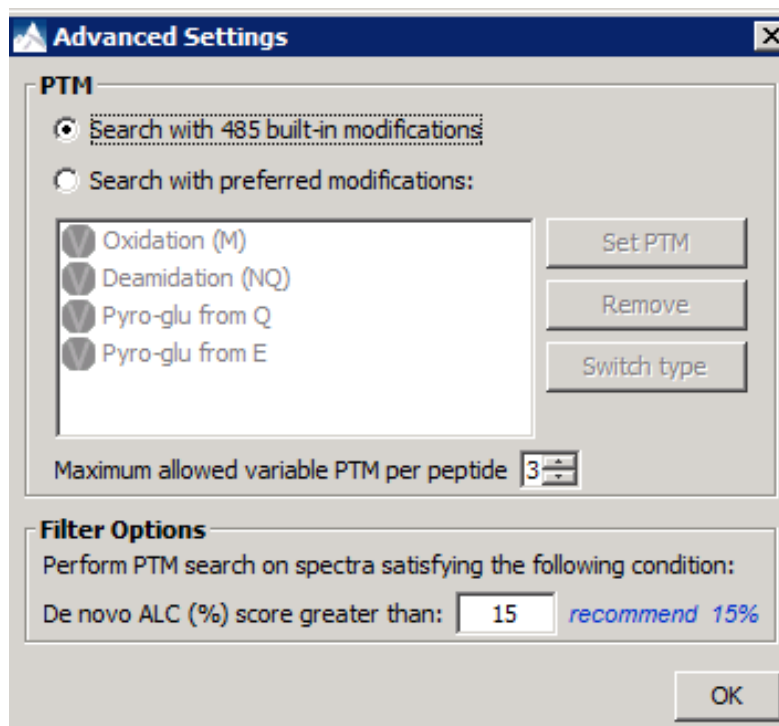


Рис. 45. Внешний вид окна настройки параметров идентификации

С целью сокращения времени обработки масс-спектрометрических данных использовали собственную базу аминокислотных последовательностей действующих веществ ЛС пептидной и белковой природы в формате .fasta (рисунок 46). В нее вошли аминокислотные последовательности рекомбинантного инсулина человека, инсулина глулизин, инсулина гларгин, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина детемир, рекомбинантного соматотропного гормона, тимозина бета и орексина А.

```
>insulin_human
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
>insulin_aspart
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT
>insulin_lispro
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT
>insulin_glargine
GIVEQCCTSICSLYQLENYCGFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR
>insulin_glulisine
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPET
>insulin_detemir
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKP
>somatotropin_human
FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYEQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPT
PSNREETQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFNLSL VYGASDSNVYDLLKDLEEG
IQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIV
QCRSVEGSCGF
>orexin_A
PEPLPDCCRQLTCSRLYELLHGAGNHAAGILTL
>timozin_beta
SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPLPSKETIEQEKQAGES
```

Рис. 46. Созданная база данных аминокислотных последовательностей действующих веществ исследуемых лекарственных средств LekSredstva.fasta.










Преимуществом алгоритма SPIDER является возможность обработки серии экспериментальных данных с использованием всех применяемых ферментов одновременно.

Получаемые результаты могут быть представлены в виде таблицы и графически. Таблица содержит следующие сведения:

- а) Accession: название белка в базе данных;
- б) -10lgP: доверительная оценка белка;
- в) Coverage: процент идентификации последовательности белка;
- г) #Peptides: количество пептидов с высокой степенью совпадения;
- д) #Unique: количество уникальных пептидов;
- е) PTM: идентифицированные пост-трансляционные модификации;
- ж) Avg. Mass: средняя масса белка;
- з) Description: информация о белке в базе данных.

Пример результата обработки эксперимента со стандартным раствором инсулина лизпро представлен в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты обработки данных анализа ЛС на основе инсулина лизпро

Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass
<u>Insulin Lispro</u>	241.87	100	66	36	<ul style="list-style-type: none">  Ацетилирование (K) (+42,01)  Деамидирование (NQ) (+0,98)  Дегидрирование (-18,01)  Формилирование (+27,99)  Формилирование (N-конец белка) (+27,99)  Метилловый эфир (+14,02)  Пиро-форма для Q (-17,03)  S-пиридилэтилирование (+105,06)  Аддукт с натрием (+21,98) 	5796

В графическом варианте представления результатов идентифицированные участки в белковой последовательности показаны жирным шрифтом на сером фоне. Выявленные модификации отображаются

выше последовательности белка и представлены в виде цветных значков с начальной буквой модификации (рисунок 47).

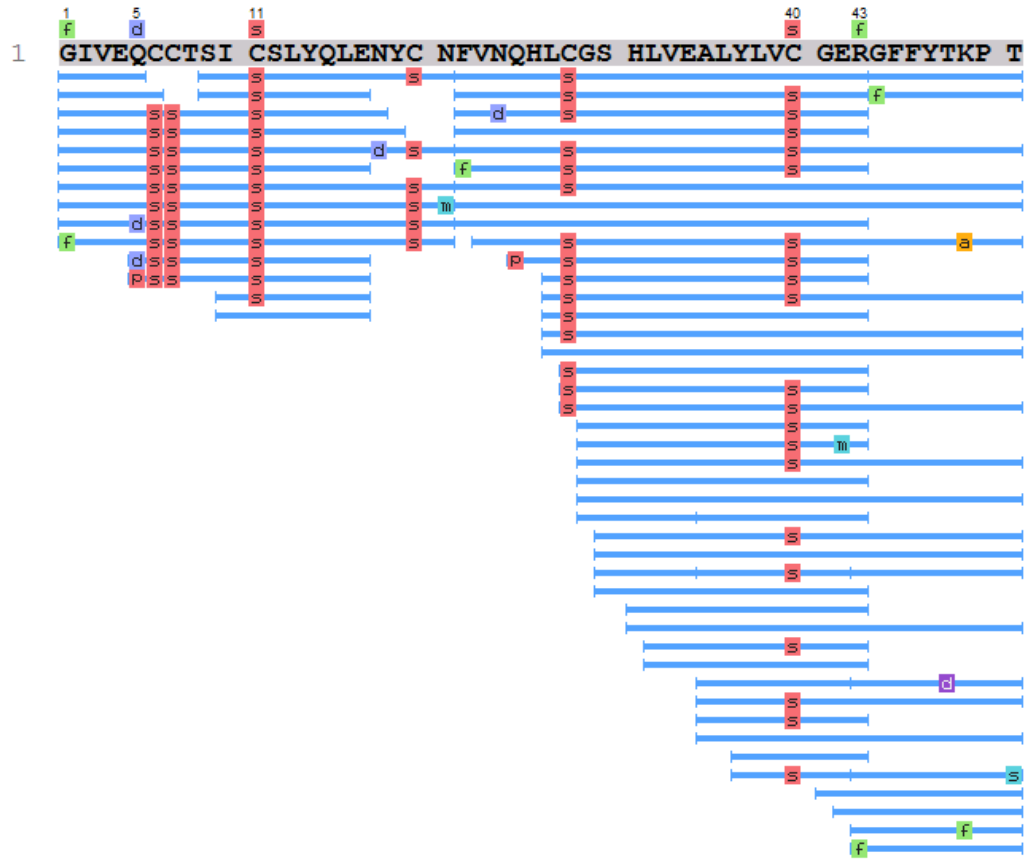


Рис. 47. Графическое представление результатов идентификации стандартного раствора инсулина лизпро.

Также программа позволяет просматривать таблицу найденных пептидов и обработанные масс-спектры интересующих участков белка (рисунок 48).

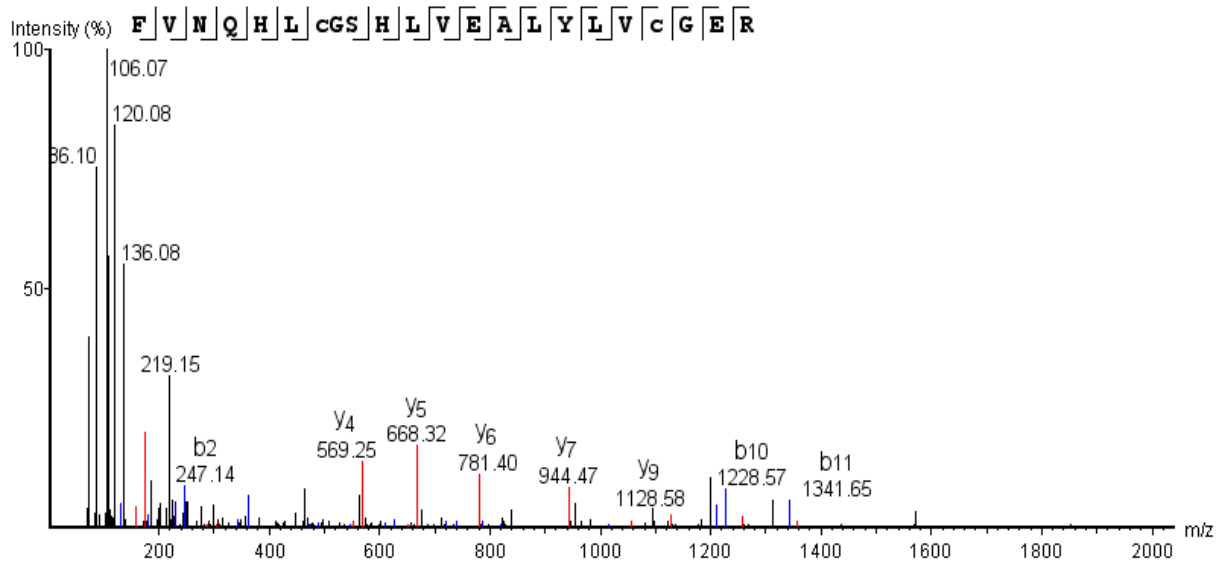


Рис. 48. Масс-спектр идентифицированного пептида стандартного раствора инсулина лизпро, автоматически обработанный программным комплексом PEAKS Studio 7.0.

Использование нескольких протеаз а также их комбинаций позволяет повысить достоверность идентификации аминокислотной последовательности благодаря увеличению количества различных пептидов. На рисунке 49 представлена диаграмма Эйлера-Венна, показывающая количество идентифицированных пептидов для стандартного раствора инсулина лизпро после обработки ферментом Glu-C, трипсином, а также их комбинации.

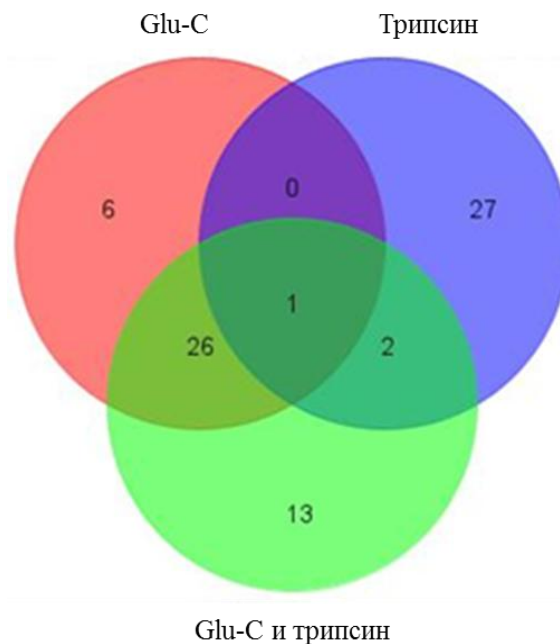


Рис. 49. Диаграмма Эйлера-Венна, показывающая количество идентифицированных пептидов при использовании фермента Glu-C, трипсина и их совместного использования.

Из представленных данных следует, что при обработке инсулина лизпро эндопротеазой Glu-C с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 7.0 идентифицировано 33 пептида, трипсином – 30 и их комбинации – 42. При этом сочетание двух протеаз дает 13 уникальных пептидов, а использование Glu-C и трипсина по отдельности – 6 и 27 соответственно. Таким образом, целесообразно использовать вышеуказанные ферменты как в индивидуальном состоянии, так и в комбинации.

Аналогично были проанализированы пептиды, полученные для стандартного раствора инсулина лизпро после обработки ферментом Asp-N, трипсином, а также их комбинации. На рисунке 50 приведена соответствующая диаграмма Эйлера-Венна.

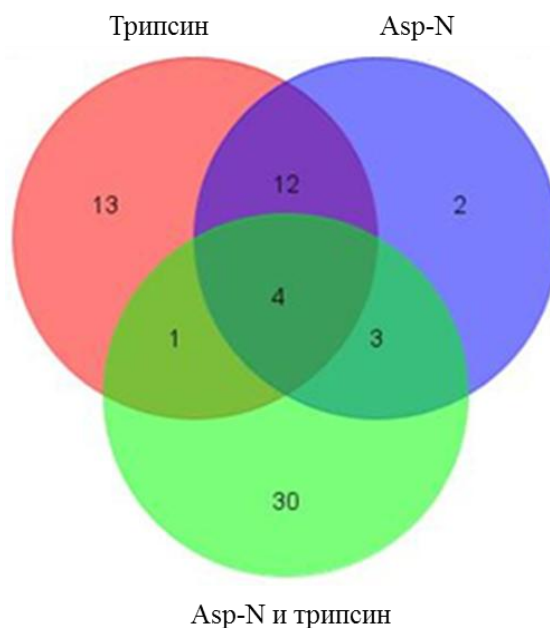


Рис. 50. Диаграмма Эйлера-Венна, показывающая количество идентифицированных пептидов при использовании фермента Asp-N, трипсина и их совместного использования

Из представленных данных следует, что при обработке инсулина лизпро эндопротеазой Asp-N с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 7.0 идентифицирован 21 пептид, трипсином - 30 и их комбинации – 38. При этом сочетание двух протеаз дает 30 уникальных пептидов, а использование Asp-N и трипсина по отдельности - 2 и 13 соответственно. Таким образом, целесообразно использовать вышеуказанные ферменты как в индивидуальном состоянии, так и в комбинации, как и в случае Glu-C и трипсина.

На рисунке 51 показано количество идентифицированных пептидов обнаруженных для стандартных растворов рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин и рекомбинантного соматотропного гормона человека после обработки пятью используемыми протеазами и их комбинациями в сравнении со стандартной методикой с использованием только трипсина.

Приведенные результаты позволяют сделать вывод о преимуществе использования пяти протеаз и их комбинации, поскольку количество идентифицированных пептидов в среднем в 2,7 раз больше, чем при применении стандартной методики с трипсином.

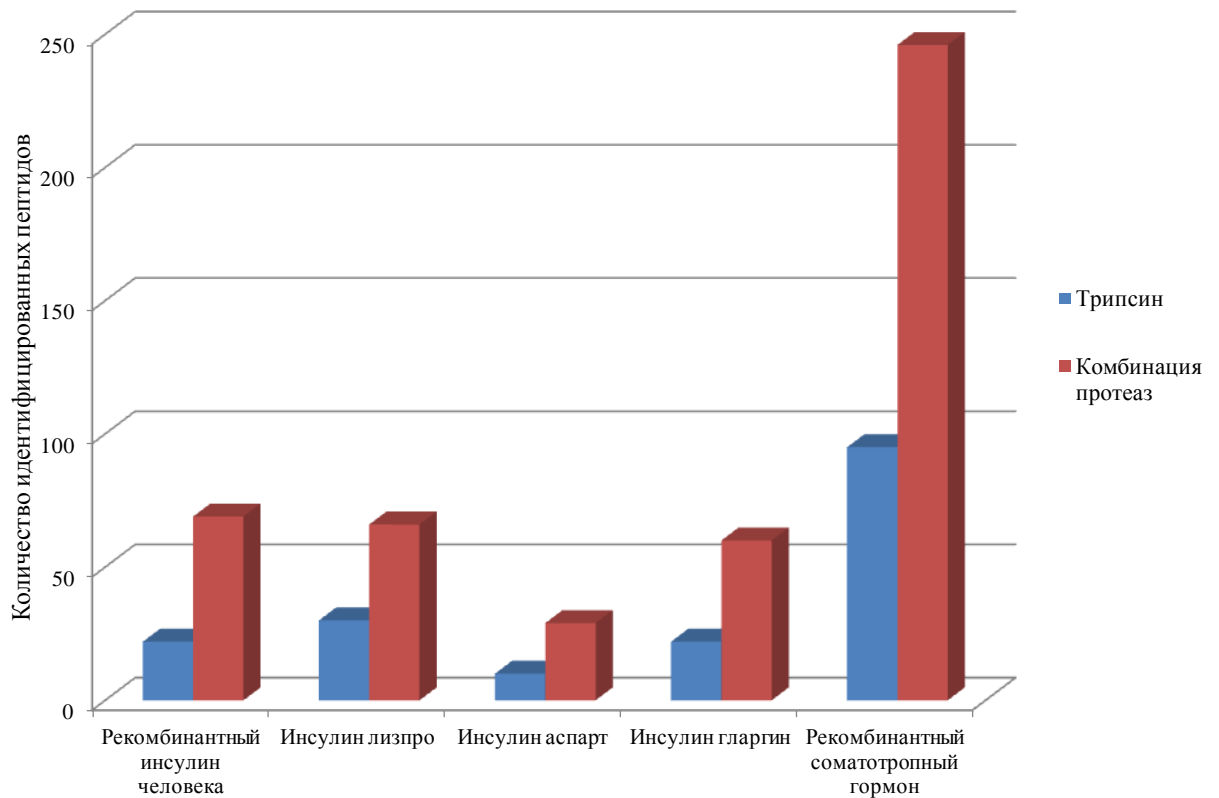


Рис. 51. Диаграмма, показывающая количество идентифицированных пептидов при использовании комбинаций используемых протеаз и трипсина.

С использованием программного обеспечения PEAKS Studio 7.0, алгоритма SPIDER, базы данных LekSredstva.fasta провели исследования стандартных растворов рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина гларгин, инсулина аспарт и рекомбинантного соматотропного гормона человека. В результате внесенных изменений степень идентификации аминокислотной последовательности для всех анализов составила 100 %.

Глава 4. Апробация унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы

На последнем этапе исследований требовалось провести апробацию унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной или белковой природы. Для этого были закуплены в интернет-магазинах и розничных сетях аптек г. Москвы препараты пептидной и белковой природы.

4.1 Подлинные лекарственные средства

4.1.1 Препараты инсулина

Для апробации разработанного способа установления подлинности лекарственных средств было закуплено 17 препаратов, действующим веществом которых является инсулин: 5 препаратов рекомбинантного инсулина человека, 2 препарата инсулина глулизин, 2 препарата инсулина гларгин, 2 препарата инсулина лизпро, 4 препарата инсулина аспарт, 2 препарата инсулина детемир различных производителей и различных партий. Все исследуемые ЛС представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Исследуемые препараты инсулина

№ п/п	Название	Модификация	Производитель
1	Инсуман Рапид ГТ	Рекомбинантный инсулин человека	Sanofi Aventis
2	Хумулин Регуляр		Eli Lilly
3	Актрапид		NovoNordisk
4	Ринсулин Р		ГЕРОФАРМ-Био
5	Биосулин Р		Фармстандарт
6	Хумалог	Инсулин лизпро	Eli Lilly
7	Хумалог Микс 25		
8	Апидра Солостар	Инсулин глулизин	Sanofi Aventis
9	Апидра		
10	Лантус Солостар	Инсулин-гларгин	Sanofi Aventis
11	Лантус		

№ п/п	Название	Модификация	Производитель
12	Новомикс Пенфилл	Инсулин-аспарт	NovoNordisk
13	Новомикс ФлексПен		
4	Новорапид Пенфилл		
15	Новорапид ФлексПен		
16	Левемир ФлексПен	Инсулин детемир	NovoNordisk
17	Левемир Пенфилл		

На первом этапе исследований с использованием спектрофотометрического метода было установлено, что все образцы содержат вещества с пептидной связью.

На следующем этапе для указанных в таблице 9 ЛС рассчитали молекулярную массу с использованием формулы (9) (для пика изотопа с наименьшим значением соотношения массы к заряду в кластере изотопов многозарядного иона) по масс-спектральным характеристикам представленных образцов для зарядовых состояний 4, 5 и 6. Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс усредняли и сравнивали с теоретическими. Полученные результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс исследуемых ЛС на основе инсулина

Название ЛС	Действующее вещество	M_c , Да	M_{IT} , Да	Δ , Да
Инсуман Рапид ГТ	Рекомбинантный инсулин человека	5803,67	5803,64	0,03
Хумулин Регуляр		5803,67		0,03
Актрапид		5803,66		0,02
Ринсулин Р		5803,67		0,03
Биосулин Р		5803,66		0,02
Хумалог	Инсулин лизпро	5803,65	5803,64	0,01
Хумалог Микс 25		5803,66		0,02
Апидра Солостар	Инсулин глулизин	5818,67	5818,64	0,03
Апидра		5818,66		0,02

Название ЛС	Действующее вещество	M _c , Да	M _{тг} , Да	Δ, Да
Лантус Солостар	Инсулин гларгин	6058,84	6058,82	0,02
Лантус		6058,85		0,03
Новомикс Пенфилл	Инсулин аспарт	5821,62	5821,61	0,01
Новомикс ФлексПен		5821,64		0,03
Новорапид Пенфилл		5821,63		0,02
Новорапид ФлексПен		5821,63		0,02
Левемир ФлексПен	Инсулин детемир	5912,80	5912,79	0,01
Левемир Пенфилл		5912,81		0,02
M _c –молекулярная масса, усредненная по трем рассчитанным значениям; M _{тг} – теоретическая моноизотопная молекулярная масса.				

Из полученных данных следует, что определенные моноизотопные молекулярные массы для рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина глулизин, инсулина гларгин, инсулина аспарт и инсулина детемир, соответствуют заявленной производителем моноизотопной молекулярной массе, а величина ошибки ее определения не превышает 0,03 Да.

Далее с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 7.0 устанавливали аминокислотную последовательность исследуемых ЛС.

Для всех исследуемых препаратов рекомбинантного инсулина человека было идентифицировано 69 пептидов, приведенных в таблице П1 Приложения, из которых 37 являются уникальными для данного действующего вещества. Степень идентификации аминокислотной последовательности составила 100 %.

Графический результат идентификации аминокислотной последовательности действующего вещества ЛС на основе рекомбинантного инсулина человека показан на рисунке 52.

В результате проведенных исследований установлено, что аминокислотная последовательность всех ЛС на основе рекомбинантного инсулина человека соответствует заявленной производителем.

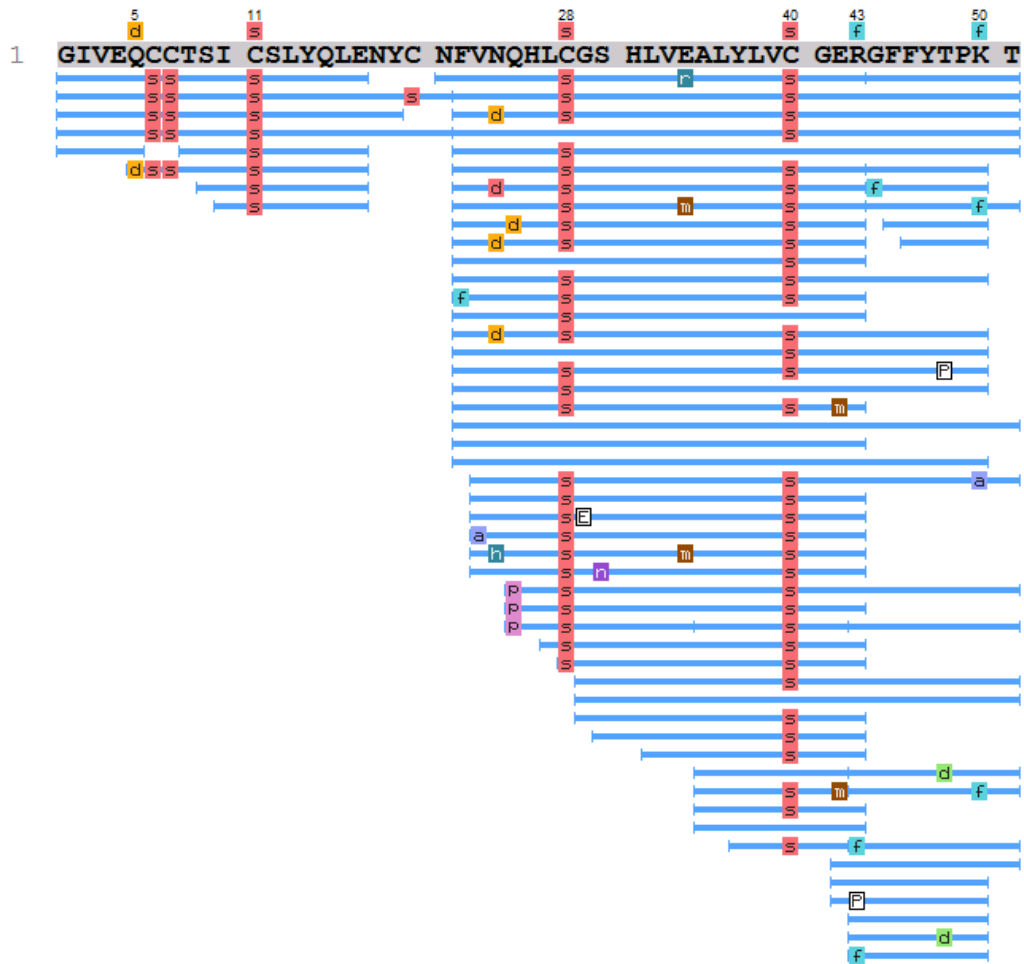


Рис. 52. Графический результат идентификации действующего вещества ЛС на основе рекомбинантного инсулина человека.

Для всех исследуемых препаратов инсулина лизпро было идентифицировано 66 пептидов, приведенных в таблице П2 Приложения, из которых 36 являются уникальными для данного действующего вещества. Степень идентификации аминокислотной последовательности составила 100 %.

Графический результат идентификации аминокислотной последовательности действующего вещества ЛС на основе инсулин лизпро показан на рисунке 53 и соответствует результатам, полученным для стандартного раствора (рисунок 47).

В результате проведенных исследований установлено, что аминокислотная последовательность всех ЛС на основе инсулина лизпро соответствует заявленной производителем.

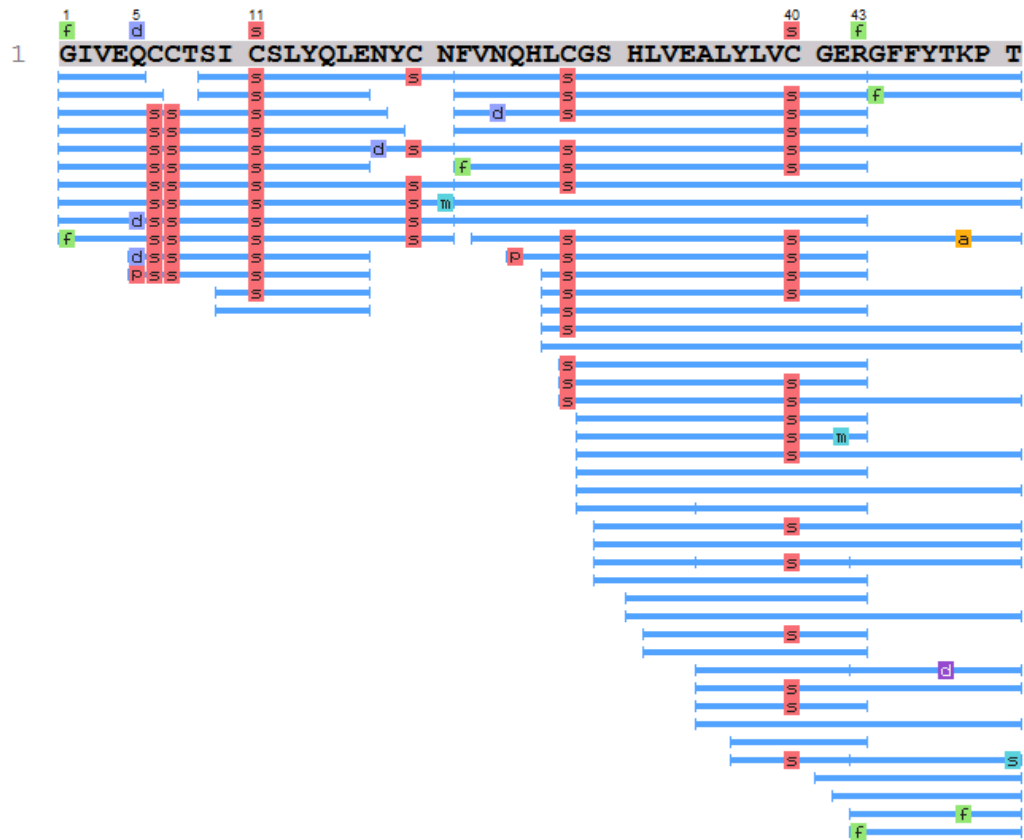


Рис. 53. Графический результат идентификации действующего вещества ЛС на основе инсулина лизпро.

Для всех исследуемых препаратов инсулина аспарт было идентифицировано 29 пептидов, приведенных в таблице ПЗ Приложения, из которых 18 являются уникальными для данного действующего вещества. Степень идентификации аминокислотной последовательности составила 100 %.

Графический результат идентификации аминокислотной последовательности действующего вещества ЛС на основе инсулина аспарт показан на рисунке 54.

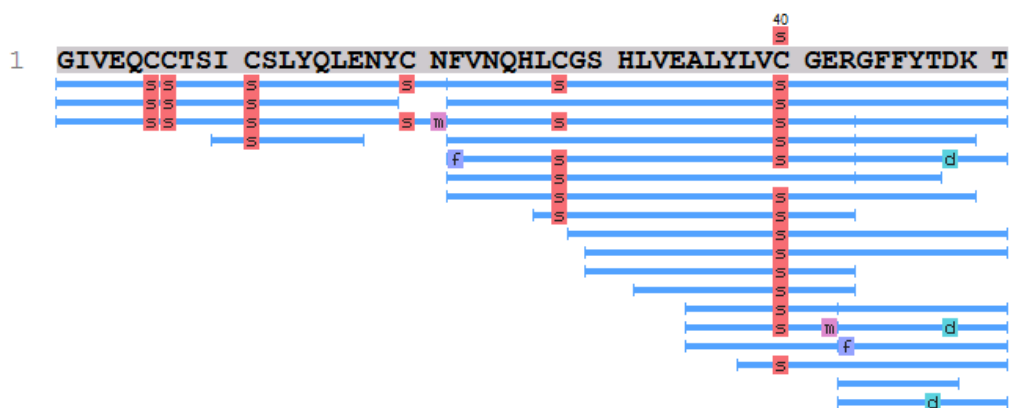


Рис. 54. Графический результат идентификации действующего вещества ЛС на основе инсулина аспарт.

В результате проведенных исследований установлено, что аминокислотная последовательность всех ЛС на основе инсулина аспарт соответствует заявленной производителем.

Для всех исследуемых препаратов инсулина гларгин было идентифицировано 60 пептидов, приведенных в таблице П4, из которых 31 являются уникальными для данного действующего вещества. Степень идентификации аминокислотной последовательности составила 100 %.

Графический результат идентификации аминокислотной последовательности действующего вещества ЛС на основе инсулина гларгин показан на рисунке 55.

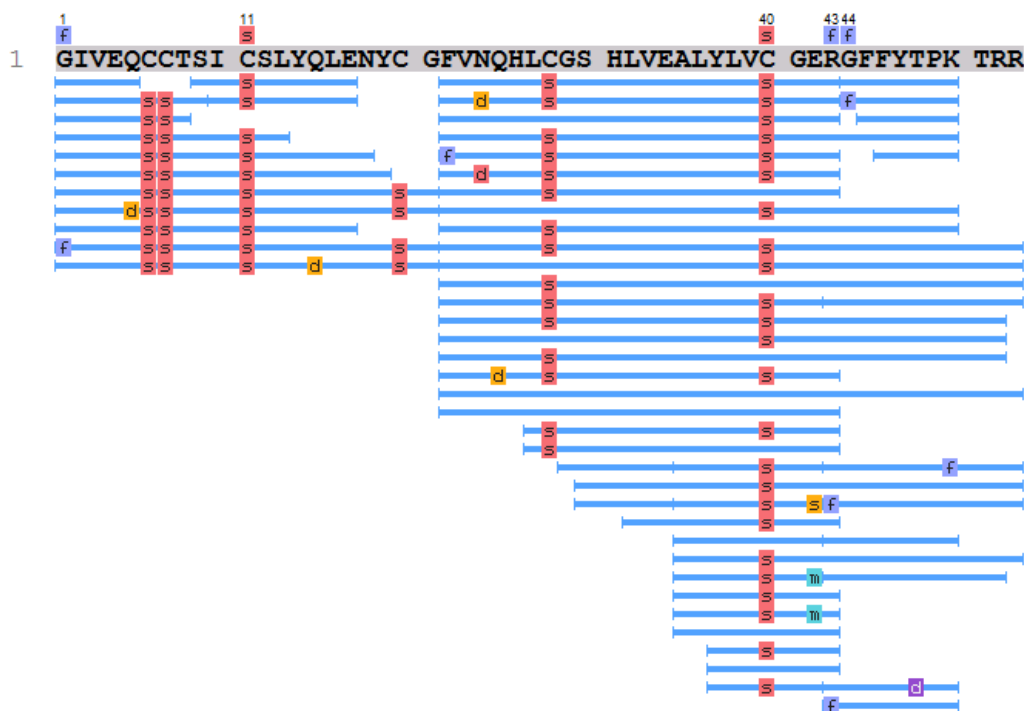


Рис. 55. Графический результат идентификации действующего вещества ЛС на основе инсулина гларгин.

В результате проведенных исследований установлено, что аминокислотная последовательность всех ЛС на основе инсулина гларгин соответствует заявленной производителем.

Для всех исследуемых препаратов инсулина глулизин было идентифицировано 51 пептид, которые приведены в таблице П5 Приложения. Из них 28 являются уникальными для данного действующего вещества. Степень идентификации аминокислотной последовательности составила 100 %.

Графический результат идентификации аминокислотной последовательности действующего вещества ЛС на основе инсулина глужизин показан на рисунке 56.

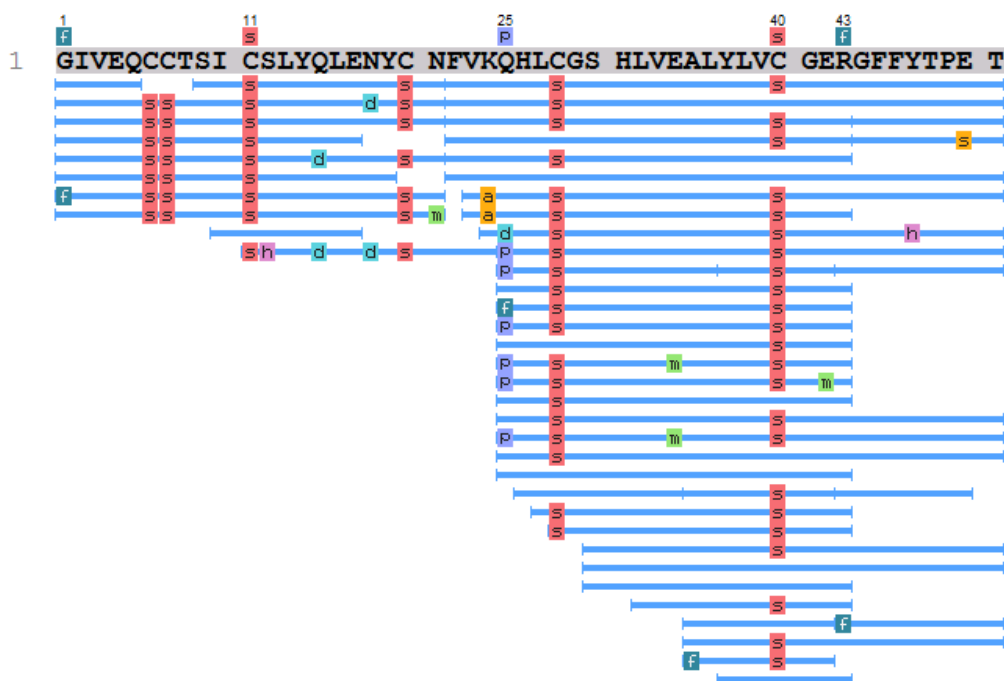


Рис. 56. Графический результат идентификации действующего вещества ЛС на основе инсулина глужизин.

В результате проведенных исследований установлено, что аминокислотная последовательность всех ЛС на основе инсулина глужизин соответствует заявленной производителем.

Для всех исследуемых препаратов инсулина детемир было идентифицировано 70 пептидов, приведенных в таблице П6 Приложения, из которых 36 являются уникальными для данного действующего вещества. Степень идентификации аминокислотной последовательности составила 100 %.

Графический результат идентификации аминокислотной последовательности действующего вещества ЛС на основе инсулина детемир показан на рисунке 57.

В результате проведенных исследований установлено, что аминокислотная последовательность всех ЛС на основе инсулина детемир соответствует заявленной производителем.

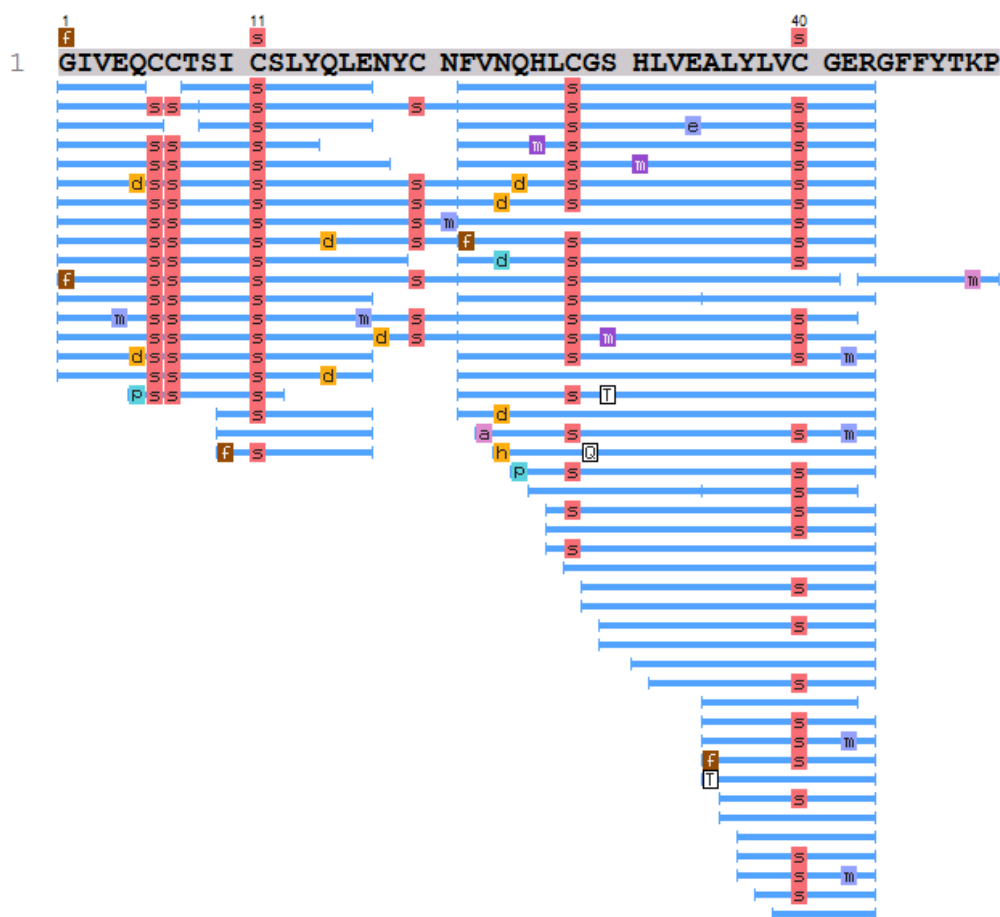


Рис. 57. Графический результат идентификации действующего вещества ЛС на основе инсулина детемир.

4.1.2 Препараты рекомбинантного соматотропного гормона

Для апробации разработанного способа установления подлинности лекарственных средств было закуплено 4 препарата, действующим веществом которых является рекомбинантный соматотропный гормон человека. Все исследуемые ЛС представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Исследуемые препараты рекомбинантного соматотропного гормона человека

№ п/п	Название	Модификация	Производитель
1	Растан	Рекомбинантный соматотропный гормон человека	Фармстандарт
2	Генотропин		Pfizer MFG
3	Джинтропин		Europarm (UK) Co.
4	Сайзен		Мерк Сероно С.п.А.

На первом этапе исследований с использованием спектрофотометрического метода было установлено, что все образцы содержат вещества белковой природы.

На следующем этапе для указанных в таблице 11 ЛС рассчитали молекулярную массу с использованием формулы (9) (для пика изотопа с наименьшим значением соотношения массы к заряду в кластере изотопов многозарядного иона) по масс-спектральным характеристикам представленных образцов для зарядовых состояний 13, 14 и 15. Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс усредняли и сравнивали с теоретическими. Полученные результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс исследуемых ЛС на основе рекомбинантного соматотропного гормона человека

Название ЛС	Действующее вещество	M_c , Да	M_{it} , Да	Δ , Да
Растан	Рекомбинантный соматотропный гормон человека	22115,76	22115,79	0,03
Генотропин		22115,77		0,02
Джинтропин		22115,76		0,03
Сайзен		22115,78		0,01
M_c – молекулярная масса, усредненная по трем рассчитанным значениям; M_{it} – теоретическая моноизотопная молекулярная масса.				

Из полученных данных следует, что определенные моноизотопные молекулярные массы для рекомбинантного соматотропного гормона человека соответствуют заявленной производителем моноизотопной молекулярной массе, а величина ошибки ее определения не превышает 0,03 Да.

Далее с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 7.0 устанавливали аминокислотную последовательность исследуемых ЛС.

Графический результат идентификации аминокислотной последовательности действующего вещества ЛС на основе рекомбинантного соматотропного гормона человека показан на рисунке 58.

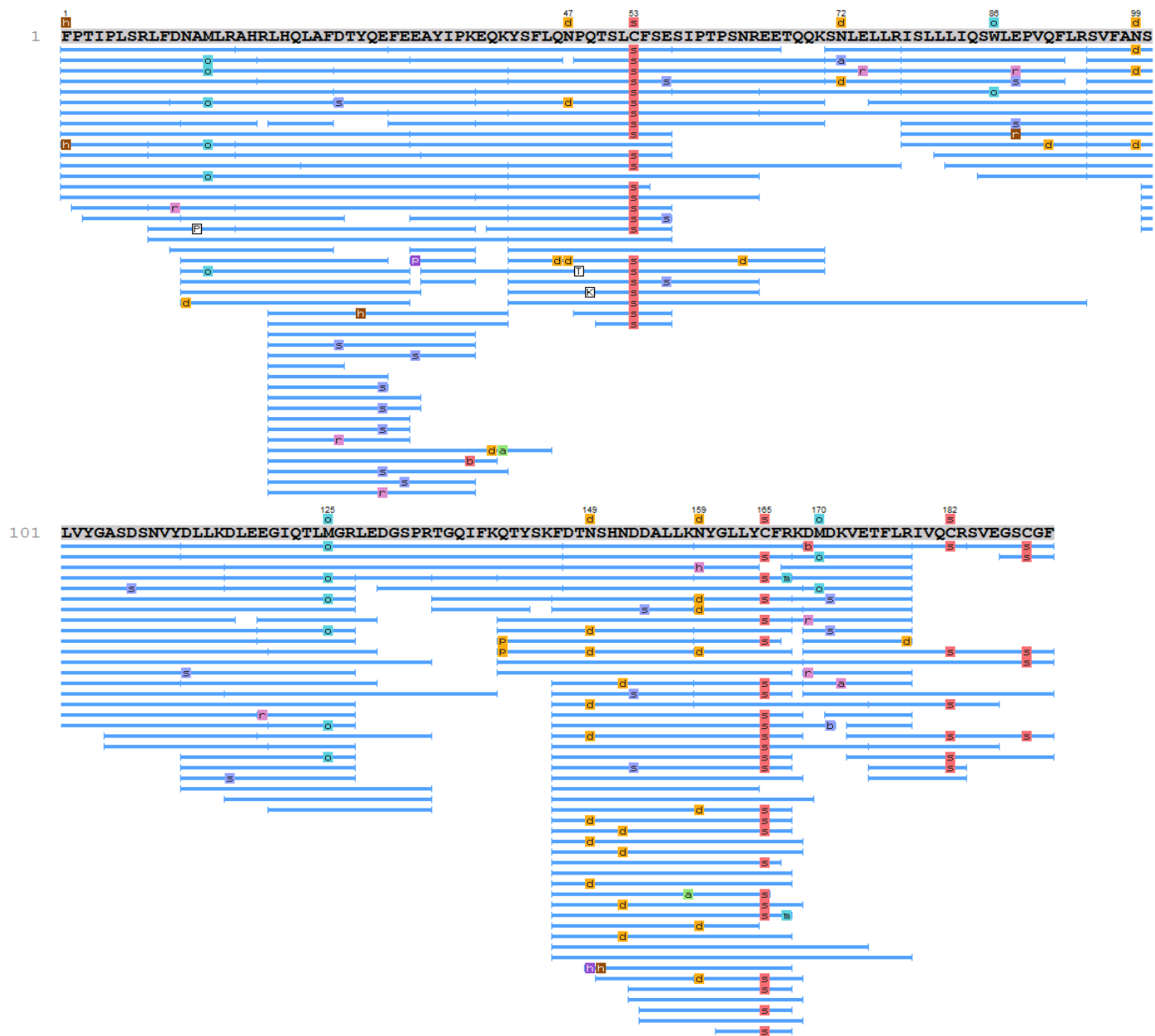


Рис. 58. Графический результат идентификации действующего вещества ЛС на основе рекомбинантного соматотропного гормона человека.

Для всех исследуемых препаратов рекомбинантного соматотропного гормона человека было идентифицировано 246 пептидов, приведенных в таблице П7 Приложения, из которых 150 являются уникальными для данного действующего вещества. Степень идентификации аминокислотной последовательности составила 100 %.

В результате проведенных исследований установлено, что аминокислотная последовательность всех ЛС на основе рекомбинантного соматотропного гормона человека соответствует заявленной производителем.

4.2 Фальсифицированные лекарственные средства и субстанции

На стадии оценки наличия соединений пептидной и белковой природы спектрофотометрическим методом были выявлены два фальсификата биологически активных добавок для улучшения функционального состояния поджелудочной железы и сердечнососудистой системы. И в первом и во втором случае результаты анализа содержимого капсул по методу Бредфорда показали отсутствие в данных препаратах соединений пептидной и белковой природы.

На стадии установления соответствия теоретической и экспериментальной моноизотопных молекулярных масс действующего вещества ЛС методом масс-спектрометрии высокого разрешения были выявлены фальсификаты субстанции «Орексин А» и препарата «Тимозин бета». Метод Бредфорда показал наличие в данных образцах соединений пептидной и белковой природы.

Орексин А является пептидом с аминокислотной последовательностью pGlu-Pro-Leu-Pro-Asp-Cys-Cys-Arg-Gln-Arg-Lys-Thr-Cys-Ser-Cys-Arg-Leu-Tyr-Glu-Leu-Leu-His-Gly-Ala-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Leu (pEPLPDCCR QRLTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL). Моноизотопная молекулярная масса составляет 3558,71 Да. На рисунке 59 приведена масс-хроматограмма данной субстанции.

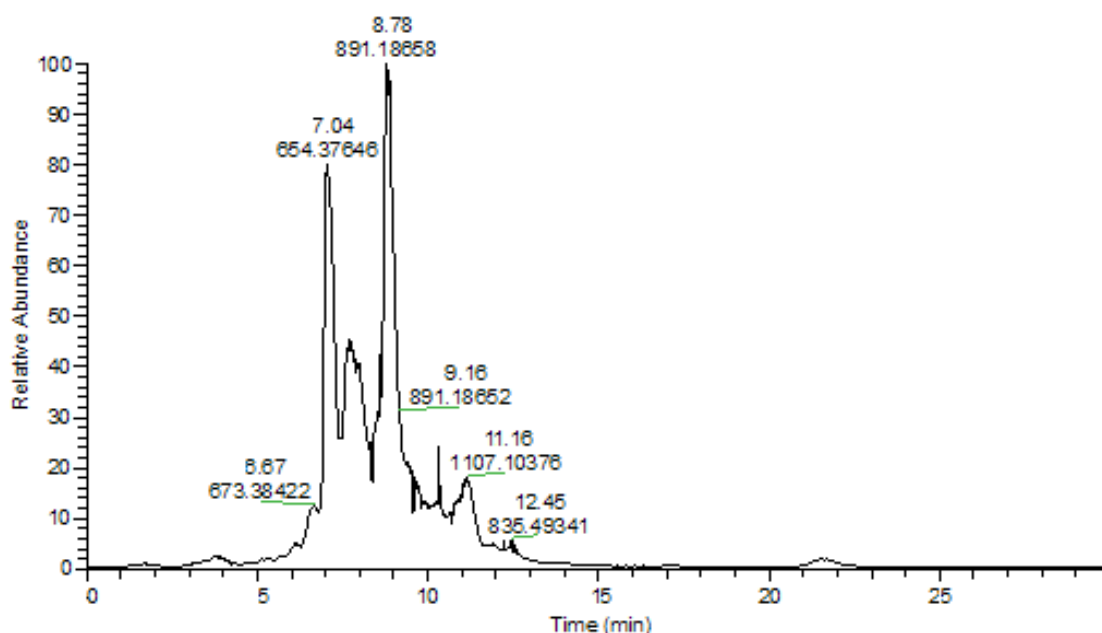


Рис. 59. Масс-хроматограмма субстанции «Орексин А».

Из представленной на рисунке 59 масс-хроматограммы видно, что данная субстанция не обладает высокой степенью очистки. Методом масс-спектрометрии высокого разрешения было установлено наличие в субстанции действующего компонента и четырех примесей пептидной природы. Соответствующая хроматограмма, построенная по выделенным ионам, приведена на рисунке 60.

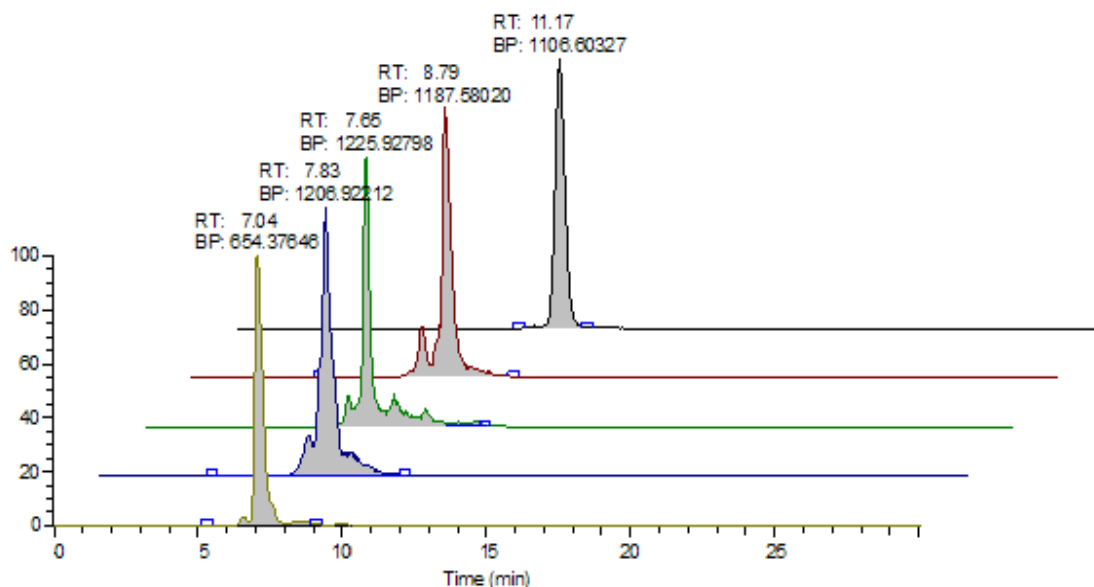


Рис. 60. Масс-хроматограммы действующего вещества субстанции «Орексин А» и его примесей.

В соответствии с формулой (9) рассчитали молекулярную массу (для пика изотопа с наименьшим значением отношения массы к заряду в кластере

изотопов многозарядного иона) по масс-спектральным характеристикам представленных образцов для различных зарядовых состояний. Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс усредняли. По значению площадей пиков оценили процентное соотношение действующего вещества и примесей. Полученные результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты экспериментальных исследований субстанции «Орексин А»

RT	Площадь, отн. ед.	Площадь, %	z	m/z	M _p , Да	M _c , Да
7,04	2,44 × 10 ¹⁰	27,6	2	980,5615	1959,107	1959,111
			3	654,0461	1959,115	
7,65	9,29 × 10 ⁹	10,1	3	1225,261	3672,759	3672,758
			4	919,1971	3672,757	
			5	735,5590	3672,756	
7,83	9,13 × 10 ⁹	10,4	3	1206,255	3615,742	3615,736
			4	904,9410	3615,733	
			5	724,1547	3615,7344	
8,79	3,95 × 10 ¹⁰	44,7	3	1187,247	3558,718	3558,718
			4	890,6875	3558,719	
			5	712,7515	3558,718	
11,17	6,32 × 10 ⁹	7,20	2	1106,603	2211,190	2211,190
			3	738,0712	2211,190	

M_p – рассчитанная моноизотопная молекулярная масса;
M_c – усредненная молекулярная масса.

В работе не проводили идентификацию данных примесей, но можно предположить, что они являются продуктами деградации заявленного пептида вследствие нарушения условий хранения и модифицированными производными действующего вещества.

Тимозин бета является синтетическим аналогом человеческого тимозина бета 4 с аминокислотной последовательностью Ser-Asp-Lys-Pro-Asp-Met-Ala-Glu-Ile-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Ser-Lys-Leu-Lys-Lys-Thr-Glu-Thr-Gln-Glu-Lys-Asn-Pro-Leu-Pro-Ser-Lys-Glu-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-Ala-Gly-Glu-Ser (SDK

PDMAEIEKFDKSKLKKKTETQEKPLPSKETIEQEKQAGES). Моноизотопная молекулярная масса составляет 4918,475 Да. На рисунке 61 приведена масс-хроматограмма данного препарата. Видно, что исследуемый препарат содержит один основной пик и два примесных со сходными хроматографическими характеристиками, что свидетельствует о незначительных различиях в аминокислотных последовательностях данных соединений.

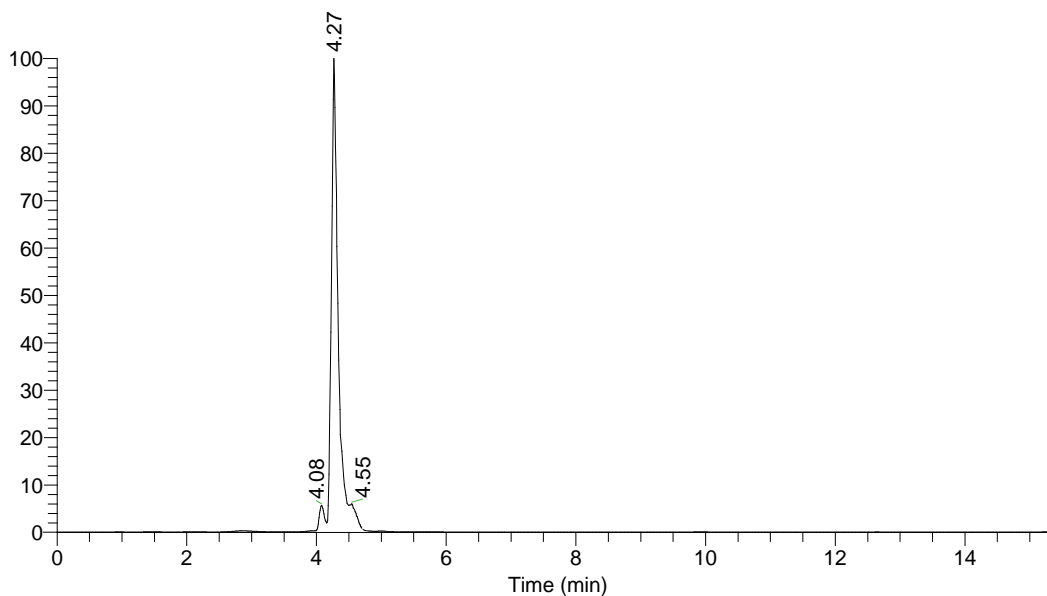


Рис. 61. Масс-хроматограмма препарата «Гимозин бета».

Масс-спектры, соответствующие каждому из трех соединений приведены на рисунках 62-64. Во вставках показаны соответствующие кластеры изотопных пиков многозарядных ионов.

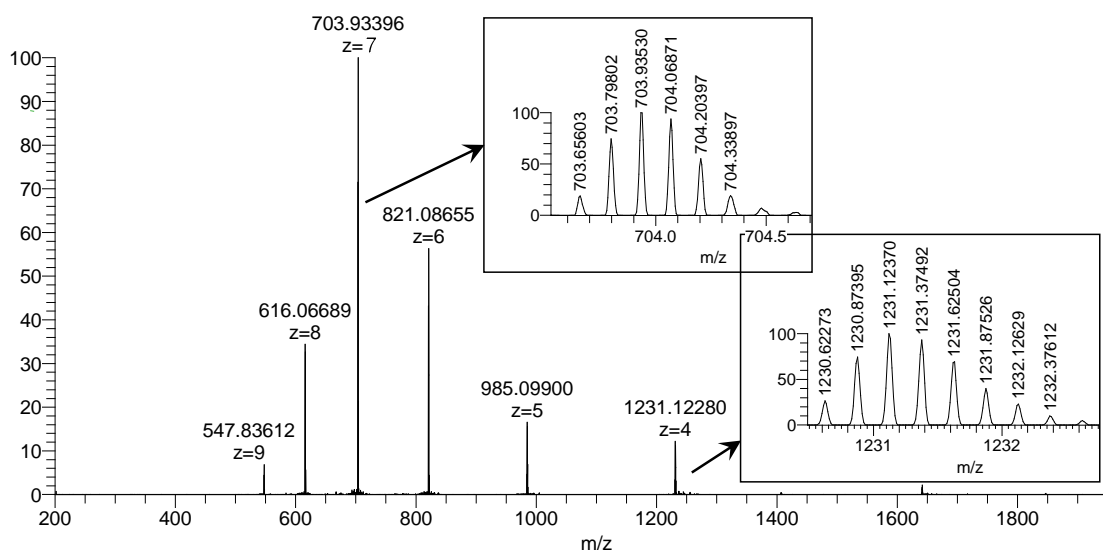


Рис. 62. Масс-спектр вещества со временем выхода 4,08 мин.

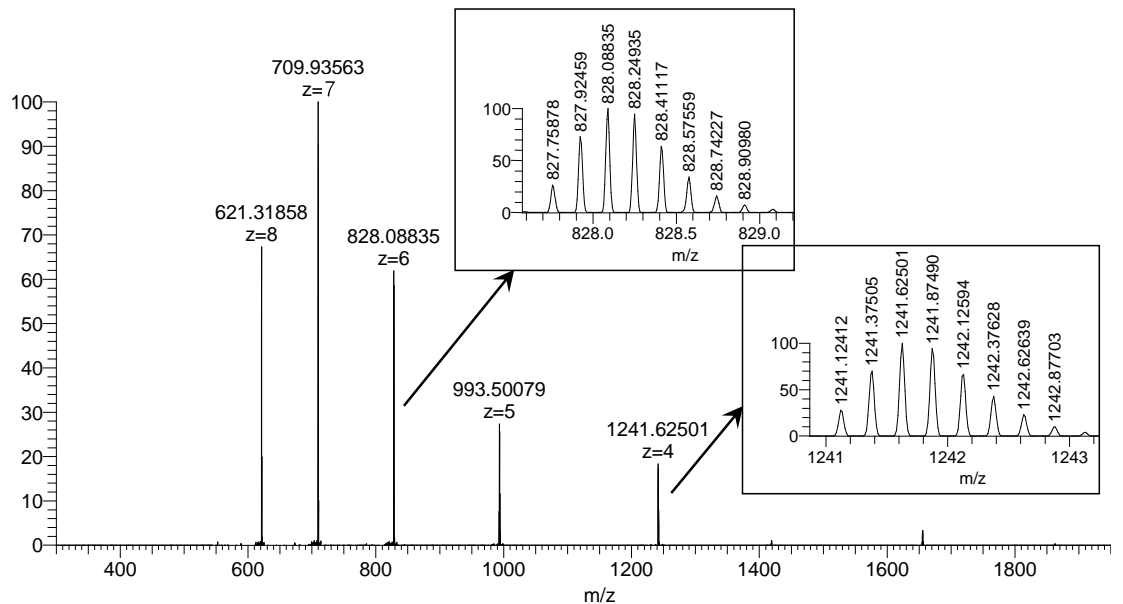


Рис. 63. Масс-спектр вещества со временем выхода 4,27 мин.

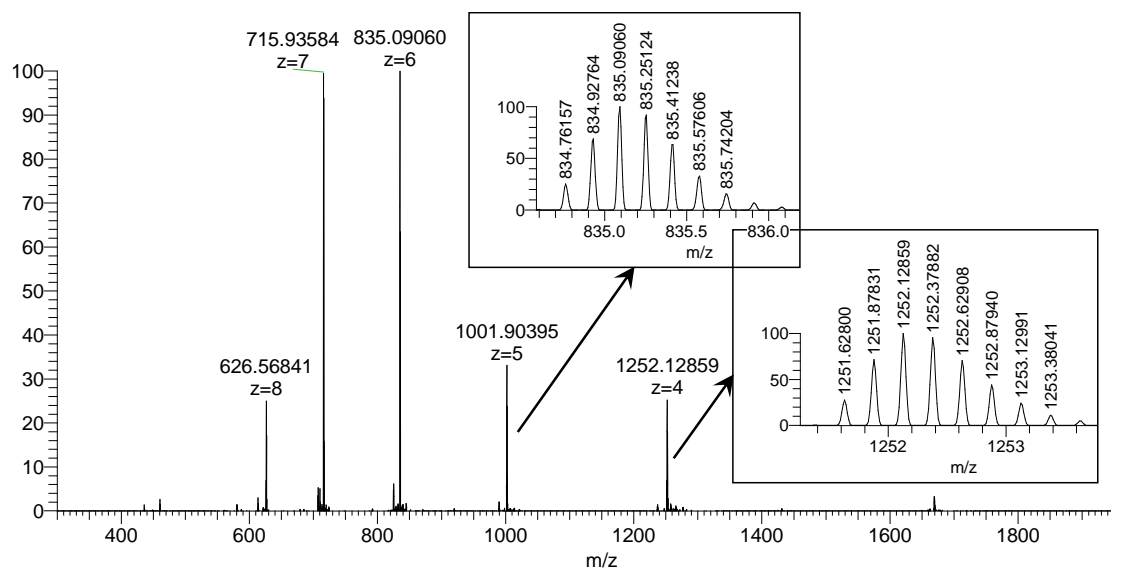


Рис. 64. Масс-спектр вещества со временем выхода 4,55 мин.

В соответствии с формулой (9) рассчитали молекулярную массу (для пика изотопа с наименьшим значением соотношения массы к заряду в кластере изотопов многозарядного иона) по масс-спектральным характеристикам для различных зарядовых состояний. Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс усредняли. По значению площадей пиков оценили процентное соотношение действующего вещества и примесей. Полученные результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты экспериментальных исследований препарата «Тимозин бета»

RT	Площадь, отн. ед.	Площадь, %	z	m/z	M _p , Да	M _c , Да
4,08	$3,16 \times 10^9$	4,4	4	1230,621	4918,453	4918,485
			5	984,6985	4918,453	
			6	820,7586	4918,505	
			7	703,6556	4918,534	
			8	615,8201	4918,498	
			9	547,5043	4918,468	
4,27	$6,39 \times 10^{10}$	88	4	1241,124	4960,465	4960,498
			5	993,1010	4960,466	
			6	827,7588	4960,506	
			7	709,6561	4960,538	
			8	621,0723	4960,516	
4,55	$5,55 \times 10^9$	7,6	4	1251,628	5002,481	5002,505
			5	1001,5045	5002,484	
			6	834,7616	5002,522	
			7	715,6556	5002,534	
			8	626,3205	5002,502	

M_p – рассчитанная моноизотопная молекулярная масса;
M_c – усредненная молекулярная масса.

Из данных таблицы 14 следует, что пик со временем выхода 4,08 мин соответствует действующему веществу препарата «Тимозин бета». Экспериментальная моноизотопная молекулярная масса основного пика больше теоретической на 42,01 Да, а разница между пиками со временами выхода 4,27 и 4,55 мин также составляет 42,01 Да. На основании полученных результатов можно предположить о модификации аминокислотной последовательности, а именно об ацилировании.

Для доказательства присутствия предполагаемой модификации в аминокислотной последовательности проводили ферментативное расщепление с использованием пяти протеаз и их комбинаций с дальнейшим масс-спектрометрическим секвенированием основного пика с применением алгоритма интеллектуального управления измерениями.

Для исследуемого соединения было идентифицировано 139 пептидов, приведенных в таблице П8 Приложения, из которых 62 являются уникальными. Степень идентификации аминокислотной последовательности составила 100 %.

Графический результат идентификации аминокислотной последовательности основного пика препарата «Тимозин бета» показан на рисунке 64.

Полученные результаты доказывают ацилирование остатка серина в первом положении. Соединение со временем выхода 4,55 мин, отличающееся по массе от основного пика на 42,01 Да, вероятнее всего, является диацилированным производным действующего вещества препарата «Тимозин бета».

На стадии установления соответствия теоретической и экспериментальной аминокислотной последовательности действующего вещества ЛС методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения с предварительной обработкой пятью специфическими ферментами и их комбинациями был выявлен фальсификат субстанции инсулина лизпро. Метод Бредфорда показал наличие в представленном образце соединений пептидной и белковой природы. Экспериментально установленная моноизотопная масса соответствовала теоретической. При этом, как показано на рисунке 66, 100 % степень идентификации аминокислотной последовательности соответствовала рекомбинантному инсулину человека, а для инсулина лизпро она составила 96 %.

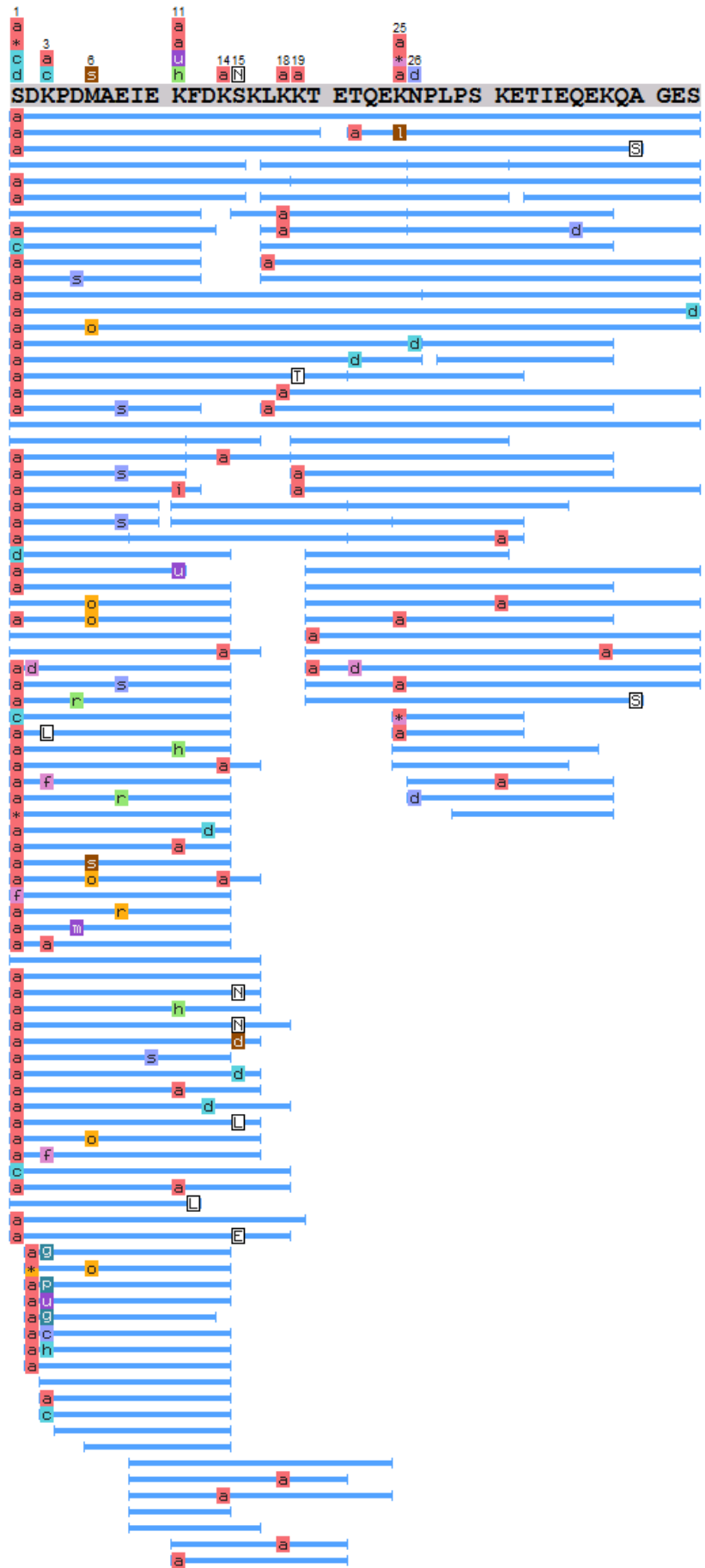


Рис. 65. Графический результат идентификации основного пика препарата «Тимозин бета».

Accession	-10lgP	Coverage	#Peptides	#Unique	PTM	Avg Mass	Description
Proteins							
insulin_human	241.87	100%	69	37		5796	insulin_human
insulin_aspart	221.02	98%	26	12		5814	insulin_aspart
insulin_lispro	195.47	96%	19	6		5796	insulin_lispro
insulin_gulisine	185.28	86%	15	7		5811	insulin_gulisine
insulin_detemir	183.90	85%	16	2		5695	insulin_detemir
insulin_glargine	180.74	84%	16	0		6051	insulin_glargine
somatotropin_human	30.52	3%	2	2		22129	somatotropin_human

Рис. 66. Результат идентификации действующего вещества препарата на основе инсулин лизпро.

На рисунке 67 приведены масс-спектры для пептидов RGFFYTPKT ($z=3$) и FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTP ($z=4$), подтверждающие аминокислотную последовательность рекомбинантного инсулина человека.

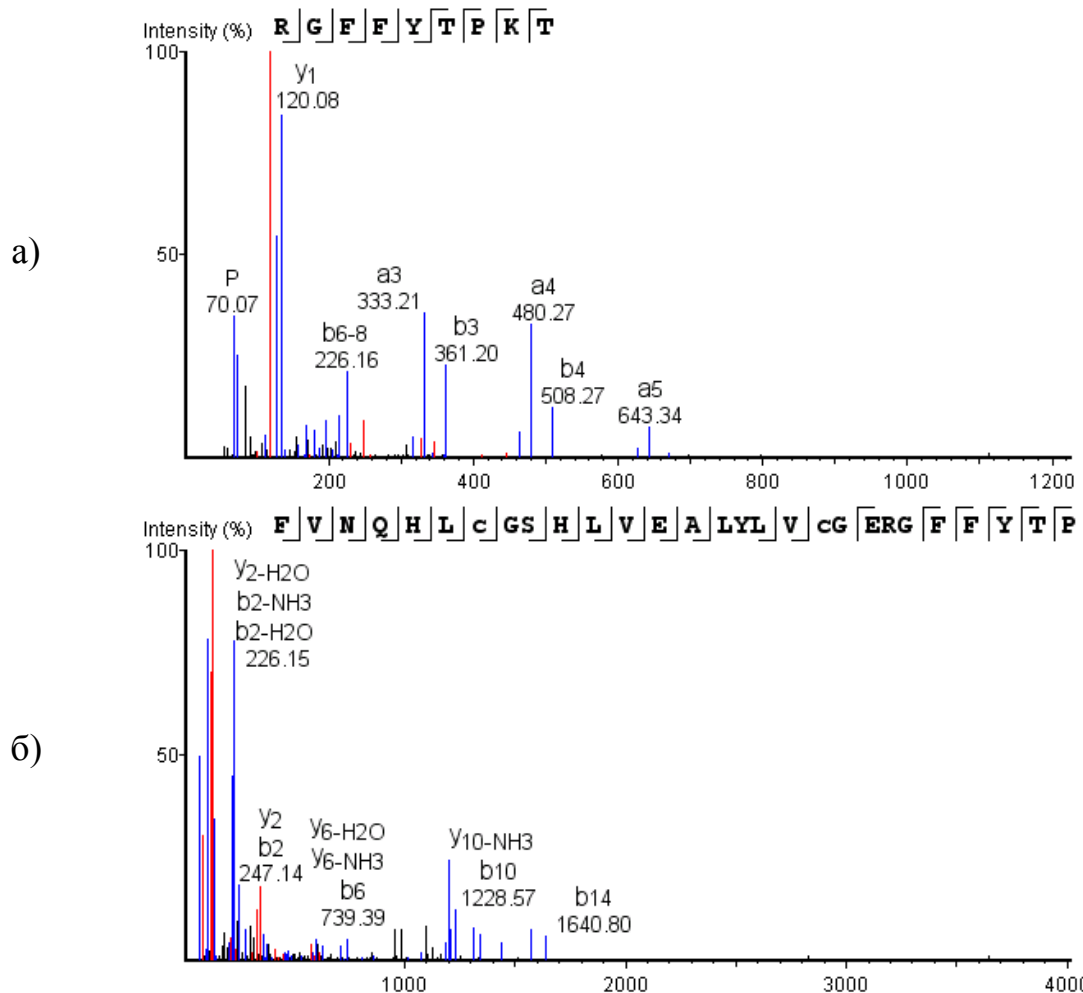


Рис. 67. Масс-спектры фрагментных ионов для пептидов RGFFYTPKT (а) и FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTP (б), соответствующие аминокислотной последовательности рекомбинантного инсулина человека.

Кроме того, присутствие пролина и лизина в положениях 28 и 29 Б-цепи, соответственно, подтверждается еще 27 пептидами. На основании приведенных данных можно сделать заключение о фальсификации данной субстанции.

Таким образом, с использованием указанного способа проанализировано более 300 образцов лекарственных препаратов различных видов, серий и производителей. Выявлены две фальсифицированные биологически активных добавки к пище, одно лекарственное средство и две субстанции. Два образца биологически активных добавок к пище для улучшения функционального состояния поджелудочной железы и сердечнососудистой системы не содержали в своем составе соединений пептидной и белковой структуры, препарат «Тимозин бета» являлся модифицированным аналогом действующего вещества. В субстанции «Орексин А» установлено наличие заявленного действующего вещества, при этом выявлено значительное количество примесей, являющихся продуктами его деградации вследствие нарушений условий транспортировки и хранения. В субстанции инсулина лизпро идентифицирован рекомбинантный инсулин человека.

Унифицированный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы показал свою работоспособность в исследованиях ЛС пептидной и белковой природы.

На основании полученных результатов аттестованы и внесены в область аккредитации ФГУП «НЦ «Сигнал» органом по аккредитации ОАО ФНТЦ «Инверсия» методики идентификации рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин и рекомбинантного соматотропного гормона человека в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием, что подтверждается свидетельствами об аттестации, приведенными на рисунках П1-П5 Приложения. Предложенный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы используется в ФГУП «НЦ «Сигнал», что подтверждается актом внедрения, приведенным на рисунке П6 Приложения.

ВЫВОДЫ

1. Предложен унифицированный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, включающий в себя сочетание двух подходов к анализу аминокислотной последовательности исследуемых соединений («снизу вверх» и «с середины вниз»); использование пяти специфических ферментов (Asp-N, Arg-C, Glu-C, Lys-C, трипсин) и их комбинаций (Glu-C и трипсин, Asp-N и трипсин); применение тандемной масс-спектрометрии при высоком разрешении с использованием режима интеллектуального управления измерениями; а также применение программного обеспечения, позволяющего проводить обработку результатов серии экспериментов, что позволило повысить степень идентификации аминокислотно последовательности и уменьшить число ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

2. Обоснован алгоритм установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, предусматривающий предварительную экспресс-индикацию наличия соединений пептидной и белковой структуры в ЛС спектрофотометрическим методом, установление моноизотопной молекулярной массы действующих веществ лекарственных средств методом масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением, и установление аминокислотной последовательности действующих веществ лекарственных средств с использованием химических, биохимических и инструментальных методов, позволяющий сократить время исследований и повысить достоверность получаемых результатов.

3. Разработаны схемы подготовки проб лекарственных средств для идентификации аминокислотной последовательности методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием пяти протеаз (Asp-N, Arg-C, Glu-C, Lys-C, трипсин) и их комбинаций (Glu-C и трипсин и Asp-N и трипсин). Показано увеличение количества специфических пептидов в среднем в 2,7 раза при использовании предложенного набора протеаз и их комбинаций по сравнению с принятой методикой трипсинолиза. Выявлено, что вспомогательные компоненты готовых

форм лекарственных средств способны замедлять процессы ферментативного расщепления действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы. Установлено, что для увеличения полноты ферментативного расщепления готовых форм лекарственных средств пептидной и белковой природы требуется повышение температуры с 37 до 40-45 °С, увеличение продолжительности реакции ферментативного расщепления с 2-4 до 6 ч.

4. Обоснованы оптимальные параметры масс-спектрометрического детектирования при использовании алгоритма интеллектуального управления измерениями. Проведена сравнительная оценка влияния параметров работы масс-спектрометра на количество идентифицированных пептидов. Установлено, что при значениях энергии диссоциации (30 ± 15) %, диапазона детектируемых зарядовых состояний 2-6, времени накопления ионов в ловушке 100 мс, ширины изоляции масс 2 m/z, длительности динамического исключения 60 мс, количества ионов в орбитальной ионной ловушке 5×10^5 , диапазона сканирования детектируемых ионов 300-2000 m/z достигается максимальная степень идентификации аминокислотной последовательности. Показано, что выбранные условия применимы для масс-спектрометров разных типов. Данный факт свидетельствует о принципиальной возможности автоматизации процесса масс-спектрометрического анализа лекарственных средств пептидной и белковой природы.

5. Аттестованы и внесены в область аккредитации ФГУП «НЦ «Сигнал» органом по аккредитации ОАО ФНТЦ «Инверсия» пять методик идентификации действующих веществ лекарственных средств белковой и пептидной природы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием, что подтверждается свидетельствами об аттестации.

6. Предложенный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы используется в ФГУП «НЦ «Сигнал», что подтверждается актом внедрения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Круглый стол «Правовые аспекты борьбы с фальсификацией лекарственных средств» [электронный ресурс] // сайт. URL: <http://pharmaandlaw.ru/kruglyjj-stol-pravovye-aspekty-borby/>. (дата обращения 10.01.2015).
2. Ушкалова Е. Проблемы фальсификации антибиотиков // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005. Т. 7. № 2. С. 167-173.
3. Посылкина О., Хромых А. Внедрение эффективных систем защиты фармацевтических логистических цепей от проникновения фальсифицированной продукции // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2013. Т. 23. № 18 (161). С. 240-246.
4. Государственная фармакопея РФ. 12-ое издание. Ч. 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2008. 704 с.
5. Государственная фармакопея РФ. 12-ое издание. Ч. 2. М. : Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2010. 600 с.
6. Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96. «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям». М.: Информационно-издательский центр Минздрава России. 1998. 128 с.
7. Walpurgis K., Krug O., Thomas A., Laussmann T., Schänzer W., Thevis M. Detection of an unknown fusion protein in confiscated black market products // Drug Test Anal. 2014. V. 6. № 11-12. P. 1117-1124.
8. British Pharmacopoeia 2014, London: Bernan, 2013. 5860 p.
9. Европейская фармакопея 7-ое издание. Т.1. М.: Ремедиум, 2011, 1812 с.
10. Европейская фармакопея 7-ое издание. Т.2. Ч. 1. М.: Ремедиум, 2011, 3176 с.
11. Европейская фармакопея 7-ое издание. Т.2. Ч. 2. М.: Ремедиум, 2011, 4504 с.
12. United States Pharmacopoeia: USP 27-NF 22. Rockville: Inc., 2009. 3013 p.

13. Ковалева С., Исаева И., Лутцева А. Проблемы стандартизации гормональных препаратов пептидно-белковой природы // Рос. хим. ж. 2005. Т. XLIX. № 1. С. 135-145.

14. Ni W., Dai S., Karger B., Zhou Z. Analysis of isoaspartic acid by selective proteolysis with Asp-N and electron transfer dissociation mass spectrometry // Anal. Chem. 2010. V. 82. № 1. P. 7485-7491.

15. Ni W., Lin M., Salinas P., Savickas P., Wu S., Karger B. Complete mapping of a cystine knot and nested disulfides of recombinant human arylsulfatase a by multi-enzyme digestion and LC-MS analysis using CID and ETD // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2013. V. 24. № 1. P. 125-133.

16. Ko B., Brodbelt J. Enhanced electron transfer dissociation of peptides modified at C-terminus with fixed charges // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012. V. 23. № 11. P. 1991-2000.

17. Running W., Ravipaty S., Karty J., Reilly J. A Top-down/Bottom-up study of the ribosomal proteins of caulobacter crescentus // J. Proteome Res. 2007. V. 6. № 1. P. 337-347.

18. Wattenberg A., Organ A., Schneider K., Tyldesley R., Bordoli R., Bateman R. Sequence dependent fragmentation of peptides generated by MALDI quadrupole time-of-flight (MALDI Q-TOF) mass spectrometry and its implications for protein identification // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2002. V. 13. № 7. P. 772-783.

19. Torosantucci R., Mozziconacci O., Sharov V., Schöneich C., Jiskoot W. Chemical modifications in aggregates of recombinant human insulin induced by metal-catalyzed oxidation: covalent cross-linking via michael addition to tyrosine oxidation products // Pharm. Res. 2012. V. 29. № 8. P. 2276-2293.

20. Engel L., Saveliev S., Urh M., Simpson D., Jones R., Wood K. Using endoproteinases Asp-N and Glu-C to improve protein characterization [электронный ресурс] // сайт. URL: [http:// www.promega.com/pubhub](http://www.promega.com/pubhub) (дата обращения: 10.10.2014).

21. Информационно-аналитический обзор мировой и российской индустрии разработки лекарств. Центр Высоких Технологий «ХимРар». 2009. № 8. стр. 11.

22. Хасабов Н., Земскова Н. Биологические лекарственные средства и их биоаналоги: определение, вопросы качества, идентичности и безопасности // Вестник Росздравнадзора. 2008. № 6. С. 34-38.

23. Проценко М., Ягудина Р. Биотехнологические лекарственные средства и биоподобные препараты: обзор практического применения и нормативной базы регулирования обращения // Фармакоэкономика. 2010. Т. 3, № 4. С. 13-21.

24. Корчажникова М., Назимов И., Глубоков Ю., Безуглов В. Хроматографический и масс-спектрометрический анализ гликозилированного генно-инженерного инсулина человека // Вестник МИТХТ. 2008. Т. 4. № 5. С. 37-39.

25. Gregoriadis G., Jain S., Papaioannou I., Laing P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids // Int. J. Pharmaceutics. 2005. V. 300. № 1-2. P. 125-130.

26. Caliceti P., Veronese F. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates // Adv. Drug Delivery Rev. 2003. V. 55. № 10. P. 1261-1277.

27. Корчажникова М., Назимов И., Глубоков Ю., Безуглов В. Исследование полисиалированного генно-инженерного инсулина человека // Вестник МИТХТ. 2009. Т. 4. № 2. С. 77-79.

28. Гусаров Д., Гусарова В., Миронов А., Баирамашвили Д. Инсулины пролонгированного действия: структура и фармакологический эффект // Биофармацевтическая химия. 2009. Т. 1. № 1. С. 3-11.

29. Анциферов М. Применение аналогов инсулина гларгин (Лантус) и глулизин (Апидра) у больных сахарным диабетом: оптимальная комбинация для достижения целей лечения // Фарматека. 2008. Т. 157. № 3. С. 22-27.

30. Muggeo M. Accelerated complications in Type 2 diabetes mellitus : the need for greater awareness and earlier detection // *Diabet Med.* 1998. V. 15. №. 4. P. S60-62.

31. Ершов К., Серяпина А., Спиридонов В., Парыгина Е., Редозубов Э. Исследование эффективности перорального нанокompозитного препарата инсулина // *Медицина и образование в Сибири.* 2013. № 4. С. 30-36.

32. Farias R., Lopez Vinals A., Posse E., Morero R. Relationship between isoelectric point of native and chemically modified insulin and liposomal fusion // *Biochem J.* 1989. V. 264. № 1. P. 285-287.

33. Owens D. New horizons-alternative routes for insulin therapy // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002. V. 1. № 7. P. 529-540.

34. Brange J., Volund A. Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999. V. 35. № 2-3. P. 307-335.

35. Ladish M., Kohlmann K. Recombinant Human Insulin // *Biotechnol. Prog.* 1992. V. 8. № 6. P. 469-478.

36. Pingel M., Volund A. Stability of insulin preparations // *Diabetes.* 1972. V. 21. № 7. P. 805-813.

37. Cavallini D., Fderici G., Barboni E., Marcucci M. Formation of Persulfide Groups in Alkaline Treated Insulin // *FEBS Lett.* 1970. V. 10. № 2. P. 125-128.

38. Markussen J. Proteolytic Degradation of proinsulin and of the intermediate forms: Application to Synthesis and Biosynthesis of insulin. Proceedings of the Symposium on Proinsulin, Insulin and C-peptide. Tokushima, 1978. P.50-62.

39. Barnett A., Owens D. Insulin analogues // *Lancet.* 1997. V. 349. № 1. P. 47-51.

40. Becker R., Frick A., Burger F. Insulin glulisine, a new rapid-acting insulin analogue, displays a rapid time-action profile in obese non-diabetic subjects // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2005. V. 113. № 8. P. 435-443.

41. Thevis M., Thomas A., Schänzer W. Insulin // *Doping in Sports. Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin: Springer, 2010. P. 209-226.

42. Вакс В., Герасименко О., Дзеранова Л. Приобретённая недостаточность гормона роста у взрослых: этиология, клинические проявления, диагностика и возможности лечения // Ожирение и метаболизм. 2011. № 2. С. 11-17.

43. Крылов Ю., Бобырев В. Фармакология. М.: ВХНМЦ МЗ РФ, 1999. 352 с.

44. Воротникова С., Пигарова Е., Дзеранова Л. Метаболические эффекты гормона роста // Ожирение и метаболизм. 2011. № 4. С. 55-59.

45. Ghanaat F., Tayek J. Growth hormone administration increases glucose production by preventing the expected decrease in glycogenolysis seen with fasting in healthy volunteers // Metab. Clin. Exp. 2005. V. 54. № 5. P. 604-609.

46. Kaplan W., Sunehag A., Dao H., Haymond M. Shortterms effects of recombinant human growth hormone and feeding on gluconeogenesis in humans // Metabolism. 2008. V. 57. № 6. P. 725-732.

47. Lindberg-Larsen R., Möller N., Schmitz O., Nielsen S., Andersen M., Orskov H., Jörgensen J. The impact of pegvisomant treatment on substrate metabolism and insulin sensitivity in patients with acromegaly // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2007. V. 92. № 5. P. 1724-1728.

48. Mavalli M., DiGirolamo D., Fan Y., Riddle R., Campbell K., van Groen T., Frank S., Sperling M., Esser K., Bamman M., Clemens T. Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice // J. Clin. Invest. 2010. V. 120. № 11. P. 4007-4020.

49. Kotelevtsev Y., Holmes M., Burchell A., Houston P., Schmol D., Jamieson P., Best R., Brown R., Edwards C., Seckl J., Mullins J. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997. V. 94. № 26. P. 14924-14929.

50. Kelder B., Berryman D., Clark R., Li A., List E., Kopchick J. CIDE-A gene expression is decreased in white adipose tissue of growth hormone receptor/binding

protein gene disrupted mice and with high-fat feeding of normal mice // Growth Horm. IGH Res. 2007. V. 17. № 4. P. 346-351.

51. Guo Y., Lu Y., Houle D., Robertson K., Tang Z., Kopchick J., Liu Y., Liu J. Pancreatic islet-specific expression of an insulin-like growth factor-I transgene compensates islet cell growth in growth hormone receptor gene-deficient mice // Endocrinology. 2005. V. 146. № 6. P. 2602-2609.

52. Baum H., Katznelson L., Sherman J., Biller B., Hayden D., Schoenfeld D., Cannistraro K., Klibanski A. Effects of physiological growth hormone (GH) therapy on cognition and quality of life in patients with adult-onset GH deficiency // J. Clin. Endoc. Metab. 1998. V. 83. № 9. P. 3184-3189.

53. Нагаева Е. Метаболический эффект гормона роста при гипопитуитаризме у взрослых // Ожирение и метаболизм. 2010. № 1. С. 21-27.

54. Воробьев И., Мирошников А. Гормон роста человека: структура, функции и биотехнологический потенциал // Рос. Хим. Ж. 2005. Т. XLIX. № 1. С. 46-54.

55. Irie M., Ueki M., Kishikawa Y., Nishii M., Kawahara T. 20K-GH and its use in detecting GH abuse // Growth Horm. IGH Res. 2009. V. 19. № 4. P. 352-356.

56. Козлов А., Слепышева В. Определение белка в сыворотке крови [электронный ресурс] // сайт. URL: http://www.terramedica.spb.ru/ld3_2005/kozlov.htm. (дата обращения 10.10.2014).

57. Рошаль Е., Сенаторова В., Шолин А., Барсуков Е., Тимохина Е. УФ-спектрофотометрическое определение ароматических аминокислот // Хим.-фарм. ж. 1991. Т. 25. № 4. С. 80-83.

58. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. М.: Мир. 1980. 581 с.

59. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // The Journal of Biological Chemistry. 1952. V. 193. P. 265-275.

60. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248-254.

61. Кнорре Д., Мызина С. Биологическая химия. М.: Высшая школа, 2000. 479 с.
62. Суховская И., Борвинская Е., Смирнов Л., Немова Н. Сравнительный анализ методов определения концентрации белка – спектрофотометрии в диапазоне 200-220 нм и по бредфорд // Труды Карельского научного центра РАН. 2010. № 2. С. 68-71.
63. Schluter H. Reversed-Phase Chromatography // J. Chromat. Libr. 2000. V. 61. P. 147-234.
64. Jungbauer A., Machold C. Chromatography of proteins // J. Chromat. Libr. 2004. V. 69. Part B. P. 669-737.
65. Caude M., Jarde A. Normal-phase liquid chromatography // Chrom. Sci. Ser. 1998. V. 78. P. 325-363.
66. Rögner M. Size Exclusion Chromatography // J. Chromat. Libr. 2000. V. 61. P. 89-145.
67. Anspach F. Affinity chromatography // J. Chromat. Libr. 2004. V. 69. Part A. P. 139-169.
68. Cuatrecasas P., Wilchek M. Affinity chromatography // Encyclopedia of Biological Chemistry. 2004. V. 1. P. 51-56.
69. Hage D., Nelson M. Chromatographic immunoassays // Anal. Chem. 2001. V. 73. P. 198A-205A.
70. Хеншен А., Хупе К., Лотшпайх Ф., Вельтер В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. Москва. Мир. 1988. 688 с.
71. Harvey D. Modern analytical chemistry. USA: The McGraw-Hill Companies. 2000. 816 p.
72. Яшин Я., Яшин А. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы // Рос. хим. ж. 2003. Т. XLVII. № 1. С. 64-79.
73. Kroeff E., Owens R., Campbell E., Johnson R., Marks H. Production scale purification of biosynthetic human insulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. 1989. V. 461. P. 45-61.

74. Seino S., Funakoshi A., Fu Z., Vinik A. Identification of insulin variants in patients with hyperinsulinemia by reversed-phase high-performance liquid chromatography // *Diabetes*. 1985. V. 34. № 1. P. 1-7.

75. Остерман Л. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука. 1985. 536 с.

76. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics // *Nature*. 2003. V. 422. № 6928. P. 198-207.

77. Mann M., Hendrickson R., Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry // *Annu. Rev. Biochem.* 2001. V. 70. P. 437-473.

78. Fenn J., Mann M., Meng C., Wong S., Whitehouse C. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules // *Science*. 1989. V. 246. № 4926. P. 264-271.

79. Fenn J., Mann M., Meng C., Wong S., Whitehouse C. Electrospray ionization-principles and practice // *Mass Spectrom. Rev.* 1990. V. 9. № 1. P. 37-70.

80. Wong S., Meng C., Fenn J. Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols) // *J. Phys. Chem.* 1988. V. 92. № 2. P. 546-550.

81. Wilm M., Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. № 1. P. 1-8.

82. Whitehouse C., Dreyer R., Yamashita M., Fenn J. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers // *Anal. Chem.* 1985. V. 57. № 3. P. 675-679.

83. Yamashita M., Fenn J. Electrospray Ion-Source – Another Variation on the Free-Jet Theme // *J. Phys. Chem.* 1984. V. 88. № 20. P. 4451-4459.

84. Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules // *Anal. Chem.* 1985. V. 57. № 14. P. 2935-2939.

85. Karas M., Bachman D., Bahr U., Hillenkamp F. Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987. V. 78. P. 53-68.

86. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988. V. 2. № 8. P. 151-153.

87. Karas M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. № 20. P. 2299-2301.

88. Hillenkamp F., Karas M. Matrix-assisted laser desorption/ionization, an experience // *Int. J. Mass Spectrom.* 2000. V. 200. № 1-3. P. 71-77.

89. Soares R., Franco C., Pires E. Mass spectrometry and animal science: Protein identification strategies and particularities of farm animal species // *J. proteomics.* 2012. V. 75. № 14. P. 4190-4206.

90. Clerens S., Cornellison C., Deb-Choudhury S. Developing the wool proteome // *J. Proteomics.* 2010. V.73. № 9. P. 1722–1731.

91. Лебедев А., Артеменко К., Самгина Т. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. М.: Техносфера. 2012. 180 с.

92. Switzar L., Giera M., Niessen W. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. № 3. P. 1067-1077.

93. Bogdanov B., Smith R. Proteomics by FTICR mass-spectrometry: top-down and bottom-up // *Mass Spectrom. Rev.* 2005. V. 24. № 2. P. 168-200.

94. Kinter M., Sherman N. Protein Sequencing and identification using tandem mass spectrometry. Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry. Desidero D., Nibbering N., Editors. New York: John Wiley & Sonc Inc. 2000. 320 p.

95. Liebler D. Introduction to proteomics. Tools for the New Biology. Totowa, NJ: Humana Press. 2002. 210 p.

96. Reid G., McLuckey S. «Top down» protein characterization via tandem mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2002. V. 37. № 7. P. 663-675.

97. Ross P., Huang Y., Marchese J., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlet-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D. Multiplexed protein quantitation in

Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents // *Mol. Cell. Proteomics*. 2004. V. 3. № 12. P. 1154-1169.

98. Ryan C., Souda P., Halgang F., Wong D., Loo J., Faull K., Whitelegge J. Confident assignment of intact mass tags to human salivary cystatins using top-down Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010. V. 21. № 6. P. 908-917.

99. Calligaris D., Villard C., Terras L., Braguer D., Verdier-Pinard P., Lafitte D. MALDI in-source decay of high mass protein isoforms: application to alpha- and beta-tubulin variants // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. № 14. P. 6176-6184.

100. Meyer B., Papatiriu D., Karas M. 100 % protein sequence coverage: a modern form of surrealism in proteomics // *Amino Acids*. 2011. V. 41. № 2. P. 291-310.

101. Theberge R., Infusini G., Tong W., McComb M., Costello C. Top-down analysis of small plasma proteins using an LTQ-Orbitrap. Potential for mass spectrometry-based clinical assays for transthyretin and hemoglobin // *Int. J. Mass Spectrom.* 2011. V. 300. № 2-3. P. 130-142.

102. Xu F., Xu Q., Dong X., Guy M., Guner H., Hacker T., Ge Y. Top-down high-resolution electron capture dissociation mass spectrometry for comprehensive characterization of post-translational modifications in Rhesus monkey cardiac troponin I // *Int. J. Mass Spectrom.* 2011. V. 305. № 2-3. P. 95-102.

103. Nicolardi S., Andreoni A., Tabares L., van der Burgt Y., Canters G., Deelder A., Hensbergen P. Top-down FTICR MS for the identification of fluorescent labeling efficiency and specificity of the Cu-protein azurin // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 5. P. 2512-2520.

104. Kellie J., Catherman A., Durbin K., Tran J., Tipton J., Norris J., Witkowski C. 2nd, Thomas P., Kelleher N. Robust analysis of the yeast proteome under 50 kDa by molecular-mass-based fractionation and top-down mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 1. P. 209-215.

105. Breuker, K., Jin M., Han X., Jiang H., McLafferty F. Top-down identification and characterization of biomolecules by mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2008. V. 19. № 8. P. 1045-1053.

106. Wu S., Kim J., Hancock W., Karger B. Extended Range Proteomic Analysis (ERPA): a new and sensitive LC-MS platform for high sequence coverage of complex proteins with extensive post-translational modifications-comprehensive analysis of beta-casein and epidermal growth factor receptor (EGFR) // *J. Proteome Res.* 2005. V. 4. № 4. P. 1155-1170.

107. Raijmakers R., Neerincx P., Mohammed S. Heck A. Cleavage specificities of the brother and sister proteases Lys-C and Lys-N // *Chem. Commun.* 2010. V. 46. № 46. P. 8827-8829.

108. Ahn J., Cao M., Yu Y. Engen J. Accessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1834. № 6. P. 1222-1229.

109. Swatkoski S., Gutierrez P., Ginter J. Petrov A., Dinman J., Edwards N., Fenselau C. Integration of residue-specific acid cleavage into proteomic workflows // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. № 11. P. 4525-4527.

110. Smith B. Chemical cleavage of polypeptides // *Methods Mol. Biol.* 2003. V. 211. P. 63-82.

111. Crimmins D.; Mische S.; Denslow N. Chemical cleavage of proteins in solution // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2005. V. 11. № 4. P. 1-11.

112. Wu C., Tran J., Zamdborg L. Durbin K., Li M., Ahlf D., Early B., Thomas P., Sweedler J., Kelleher N. A protease for 'middle-down' proteomics // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 8. P. 822-824.

113. Roepstorff P. MALDI-TOF mass spectrometry in protein chemistry // *EXS.* 2000. V. 88. P. 81-97.

114. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high performance technique of mass analysis // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. № 6. P. 1156-1162.

115. Wu S., Kim J., Bandle R., Liotta L., Petricoin E., Karger B. Dynamic profiling of the post-translational modifications and interaction partners of epidermal growth factor receptor signaling after stimulation by epidermal growth factor using Extended Range Proteomic Analysis (ERPA) // *Mol. Cell Proteomics*. 2006. V. 5. № 9. P. 1610-1627.
116. Kalli A., Sweredoski M., Hess S. Data-Dependent Middle-Down Nano-Liquid Chromatography–Electron Capture Dissociation–Tandem Mass Spectrometry: An Application for the Analysis of Unfractionated Histones // *Anal. Chem*. 2013. V. 85. № 7. P. 3501-3507.
117. Cottrell J. Protein identification by peptide mass fingerprinting // *Pept. Res*. 1994. V. 7. № 3. P. 115-124.
118. Henzel W., Billeci T., Stults J., Wong S., Grimley C., Watanabe C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. № 11. P. 5011-5015.
119. James P., Quadroni M., Carafoli E., Gonnet G. Protein identification by mass profile fingerprinting // *Biochem Biophys. Res. Commun*. 1993. V. 195. № 1. P. 58-64.
120. Mann M., Hojrup P., Roepstorff P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. // *Biol. Mass Spectrom*. 1993. V. 22. № 6. P. 338-345.
121. Pappin D. J., Hojrup P., Bleasby A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. // *Curr. Biol*. 1993. V. 3. № 6. P. 327-332.
122. Yates J., Speicher S., Griffin P., Hunkapiller T. Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification // *Anal. Biochem*. 1993. V. 214. № 2. P. 397-408.
123. Washburn M., Wolters D., Yates J. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology // *Nat. Biotechnol*. 2001. V. 19. № 3. P. 242-247.

124. Zhang Y., Fonslow B., Shan B., Baek M., Yates J. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. № 4. P. 2343-2394.

125. Yang Z., Ke J., Hayes M., Bryant M., Tse F. A sensitive and high-throughput LC–MS/MS method for the quantification of pegylated-interferon-a-2a in human serum using monolithic C18 solid phase extraction for enrichment // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009. V. 877. № 18-19. P. 1737-1742.

126. Paulech J., Solis N., Cordwell S. Characterization of reaction conditions providing rapid and specific cysteine alkylation for peptide-based mass spectrometry // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013. V. 1834. № 1. P. 372-379.

127. Cannon J., Nakasone M., Fushman D., Fenselau C. Proteomic identification and analysis of K63-linked ubiquitin conjugates // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 22. P. 10121-10128.

128. Mo J., Tymiak A., Chen G. Structural mass spectrometry in biologics discovery: advances and future trends // *Drug Discovery Today.* 2012. V. 17. № 23-24. P. 1323-1330.

129. Contrepolis K., Ezan E., Mann C., Fenaille F. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the fast profiling of histone post-translational modifications // *J. Proteome Res.* 2010. V. 9. № 10. P. 5501-5509.

130. Forbes A., Patrie S., Taylor G., Kim Y., Jiang L., Kelleher N. Targeted analysis and discovery of posttranslational modifications in proteins from methanogenic archaea by top-down MS // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 9. P. 2678-2683.

131. Boyne M., Pesavento J., Mizzen C., Kelleher N. Precise characterization of human histones in the H2A gene family by top down mass spectrometry // *J. Proteome Res.* 2006. V. 5. № 2. P. 248-253.

132. Siuti N., Roth M., Mizzen C., Kelleher N., Pesavento J. Gene-specific characterization of human histone H2B by electron capture dissociation // *J. Proteome Res.* 2006 V. 5. № 2. P. 233-239.

133. Glatter T., Ludwig C., Ahrne E., Aebersold R., Heck A., Schmidt A. Large-scale quantitative assessment of different in-solution protein digestion protocols reveals superior cleavage efficiency of tandem Lys-C/Trypsin proteolysis over trypsin digestion // *J. Proteome Res.* 2012. V. 11. № 11. P. 5145-5156.

134. Дарбре А. Практическая химия белка. М.: Мир. 1989. 623 с.

135. Wisniewski J., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis // *Nature Methods.* 2009. V. 6. № 5. P. 359-362.

136. Proc J., Kuzyk M., Hardie D., Yang J., Smith D., Jackson A., Parker C., Borchers C. A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin // *J. Proteome Res.* 2010. V. 9. № 10. P. 5422-5437.

137. Веренчиков А., Краснов Н., Галь Л. Тандемные масс-спектрометры в биохимии // *Научное приборостроение.* 2004. Т. 14. № 2. С. 4-23.

138. 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.

139. Демидов Е., Пельтек С. Протеомика // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2014. Т. 18. № 1. С. 166-174.

140. Sleno L., Volmer D. Ion activation methods for tandem mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2004. V. 39. № 10. P. 1091-1112.

141. Papayannopoulos L. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides // *Mass Spectrom. Rev.* 1995. V. 14. № 1. P. 49-73.

142. Olsen J., Macek B., Lange O., Makarov A., Horning S., Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis // *Nature Methods.* 2007. V. 4. № 9. P. 709-712.

143. Jonsson A. Mass spectrometry for protein and peptide characterization // *Cell. Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. № 7. P. 868-884.

144. Принципы масс-спектрометрии в приложении к биомолекулам. Под ред. Ласкин Дж., Лифшиц Х. М., Техносфера. 2012. 608 с.

145. Dongre A., Jones J., Somogyi A., Wysocki V. Influence of peptide composition gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. № 35. P. 8365-8374.

146. Laskin J. Energetics and dynamics of peptide fragmentation from multiple-collision activation and surface-induced dissociation studies // *Eur. J. Mass Spectrom.* 2004. V. 10. № 2. P. 259-267.

147. Little D., Speir J., Senko M., Oconnor P., McLafferty F. Infrared multiphoton dissociation of large multiply-charged ions for biomolecule sequencing // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. № 18. P. 2809-2815.

148. Payne A., Glish G. Thermally assisted infrared multiphoton photodissociation in a quadrupole ion trap // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. № 15. P. 3542-3548.

149. Price W., Schnier P., Williams E. Tandem mass spectrometry of large biomolecule ions by blackbody infrared radiative dissociation // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. № 5. P. 859-866.

150. Ge Y., Horn D., McLafferty F. Blackbody infrared radiative dissociation of larger (42 KD) multiply charged proteins // *Int. J. Mass Spectrom.* 2001. V. 210-211. P. 203-214.

151. Thompson M., Cui W., Reilly J. Mass spectrometry: Fragmentation of singly charged peptide ions by photodissociation at $\lambda = 157$ nm // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. V. 43. № 36. P. 4791-4794.

152. Zubarev R., Haselmann K., Budnik B., Kjeldsen F., Jensen F. Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation: A historical perspective and modern ideas // *Eur. J. Mass Spectrom.* 2002. V. 8. № 5. P. 337-349.

153. Zubarev R. Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase // *Mass Spectrom. Rev.* 2003. V. 22. № 1. P. 57-77.

154. Syka J., Coon J., Schroeder M., Shabanowitz J., Hunt D. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 26. P. 9528-9533.

155. Chrisman P., Pitted S., McLuckey S. Parallel ion parking: Improving conversion of parents to first-generation products in electron transfer dissociation // *Anal. Chem.* 2005.V. 77. № 10. P. 3411-3414.

156. Nielsen M., Savitski M., Zubarev R. Improving protein identification using complementary fragmentation techniques in fourier transform mass spectrometry // *Mol. Cell Proteomics.* 2005. V. 4. № 6. P. 835-845.

157. Mechref Y. Use of CID/ETD mass spectrometry to analyze glycopeptides // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2012. V. 12. № 11-12. P.1-11.

158. Chi H., Chen H., He K., Wu L., Yang B., Sun R., Liu J., Zeng W., Song C., He S., Dong M. pNovo+: de novo peptide sequencing using complementary HCD and ETD tandem mass spectra // *J. Proteome Res.* 2013.V. 12. № 2. P. 615-625.

159. Good D., Rutishauser D. Employment of complementary dissociation techniques for body fluid characterization and biomarker discovery // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 1002. P. 223-232.

160. Pedrioli P., Eng J., Hubley R., Vogelzang M., Deutsch E., Raught B., Pratt B., Nilsson E., Angeletti R., Apweiler R., Cheung K., Costello C., Hermjakob H., Huang S., Julian R., Kapp E., McComb M., Oliver S., Omenn G., Paton N., Simpson R., Smith R., Taylor C., Zhu W., Aebersold R. A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. №11. P. 1459-1466.

161. Perkins D., Pappin D., Creasy D., Cottrell J. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data // *Electrophoresis.* 1999. V. 20. № 18. P. 3551-3567.

162. Eng J., McCormack A., Yates J. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database // *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 1994. V. 5. № 11. P. 976-989.

163. Craig R., Beavis R. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra // *Bioinformatics.* 2004. V. 20. № 9. P. 1466-1467.

164. Tanner S., Shu H., Frank A., Wang L., Zandi E., Mumby M., Pevzner P., Bafna V. InsPecT: identification of posttranslationally modified peptides from tandem mass spectra // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. № 14. P. 4626-4639.

165. Geer L., Markey S., Kowalak J., Wagner L., Xu M., Maynard D., Yang X., Shi W., Bryant S. Open mass spectrometry search algorithm // *J. Proteome Res.* 2004. V. 3. № 5. P. 958-964.

166. Xu H., Freitas M. MassMatrix: a database search program for rapid characterization of proteins and peptides from tandem mass spectrometry data // *Proteomics.* 2009. V. 9. № 6. P. 1548-1555.

167. Park C., Klammer A., Kall L., MacCoss M., Noble W. Rapid and accurate peptide identification from tandem mass spectra // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. № 7. P. 3022-3027.

168. Tabb D., Fernando C., Chambers M. MyriMatch: highly accurate tandem mass spectral peptide identification by multivariate hypergeometric analysis // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. № 2. P. 654-661.

169. Kim S., Mischerikow N., Bandeira N., Navarro J., Wich L., Mohammed S., Heck A., Pevzner P. The generating function of CID, ETD, and CID/ETD pairs of tandem mass spectra: applications to database search // *Mol Cell Proteomics.* 2010. V. 9. № 12. P. 2840-2852.

170. Pappin D., Hojrup P., Bleasby A. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting // *Curr. Biol.* 1993. V. 3. № 6. P. 327-332.

171. Автономов Д., Агрон И., Кононихин А., Николаев Е. Создание базы данных точных массово-временных меток для качественного и количественного подхода в исследовании протеома мочи человека с использованием изотопного мечения // *Труды МФТИ.* 2009. Т. 1. № 1. С. 24-29.

172. Yates J. 3rd, Eng J., McCormack A. Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. № 18. P. 3202-3210.

173. Лютвинский Я. Метод распознавания аминокислотных последовательностей в масс-спектрах пептидов для задач протеомики. Дис. канд. техн. наук. Санкт-Петербург. 2007. 130 с.

174. Fenyo D., Beavis R. A method for assessing the statistical significance of mass spectrometry-based protein identifications using general scoring schemes // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. № 4. P. 768-774.

175. Craig R., Beavis R. A method for reducing the time required to match protein sequences with tandem mass spectra // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. V. 17. № 20. P. 2310-2316.

176. Sparkman D. Informatics and mass-spectral databases in the evaluation of environmental mass spectral data. Saint Albans: ILMPublications. 2012. 528 p.

177. Объединенный центр вычислительной биологии и информатики [электронный ресурс] // сайт. URL: <http://www.jcbi.ru/index.html> (дата обращения: 10.10.2014).

178. Katakuse I., Ichihara T., Nakabushi H., Matsuo T., Matsuda H., Wada Y., Hayashi A. Secondary ion mass spectra of tryptic peptides of human hemoglobin chains // *Biomed. Mass Spectrom.* 1984. V. 11. № 8. P. 396-399.

179. Hamm C., Wilson W., Harvan D. Peptide sequencing program // *Comput. Appl. Biosci.* 1986. V. 2. № 2. P. 115-118.

180. Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1988. V. 16. № 1-12. P. 99-111.

181. Johnson R., Martin S., Biemann K., Stults J., 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.

182. Ishikawa K., Niva Y. Computer-aided peptide sequencing by fast atom bombardment mass spectrometry // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1986. V. 13. № 8. P. 373-380.

183. Siegel M., Bauman N. An efficient algorithm for sequencing peptides using fast atom bombardment mass spectral data // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1988. V. 15. № 6. P. 333-343.

184. Bartels C. Fast algorithm for peptide sequencing by mass spectroscopy // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1990. V. 19. № 6. P. 363-368.

185. Dancik V., Addona T., Clauser K., Vath J., Pevzner P. De novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry // *J. Comput. Biol.* 1999. V. 6. № 3-4. P. 327-342.

186. Taylor A., Johnson R. Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry // *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 1997. V. 11. № 9. P. 1067-1075.

187. Taylor A., Johnson R. Implementation and uses of automated de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. № 11. P. 2594-2604.

188. Fernandez-de-Cossio J., Gonzalez J., Betancourt L., Besada V., Padron G., Shimonishi Y., Takao T. Automated interpretation of high-energy collision-induced dissociation spectra of singly protonated peptides by 'SeqMS', a software aid for de novo sequencing by tandem mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998. V. 12. № 23. P. 1867-1878.

189. Scigelova M., Maroto F., Dufresne C., Vazquez J. High-throughput de novo sequencing // *Proc. 50th ASMS Conf. Mass Spectrom. and Allied Topics.* Orlando. Florida. June 2-6. 2002.

190. Zhong H., Li L. An algorithm for interpretation of low-energy collision-induced dissociation product ion spectra for de novo sequencing of peptides // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. V. 19. № 8. P. 1084-1096.

191. Chen T., Kao M., Tepel M., Rush J., Church G. A dynamic programming approach to de novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry // *J. Comput. Biol.* 2001. V. 8. № 3. P. 325-337.

192. Bafna V., Edwards N. SCOPE: a probabilistic model for scoring tandem mass spectra against a peptide database // *Bioinformatics*. 2001. V. 17. № S1. P. S13-S21.

193. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. V. 17. № 20. P. 2337-2342.

194. Grossmann J., Roos F., Cieliebak M., Lipta Z., Mathis L., Muller M., Gruissem W., Baginsky S. AUDENS: a tool for automated peptide de novo sequencing // *J. Proteome Res.* 2005. V. 4. № 5. P. 1768-1774.

195. Fernandez-de-Cossio J., Gonzalez J., Besada V. A computer program to aid the sequencing of peptides in collision-activated decomposition experiments // *Comput. Appl. Biosci.* 1995. V. 11. № 4. P. 427-434.

196. Fischer B., Roth V., Roos F., Grossmann J., Baginsky S., Widmayer P., Grulssem W., Buhmann J. NovoHMM: a hidden Markov model for de novo peptide sequencing // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. № 22. P. 7265-7273.

197. Певцов С. Исследование эффективности существующих алгоритмов идентификации пептидов // *Масс-спектрометрия*. 2006. Т. 3. № 4. С. 255-264.

198. Frank A., Pevzner P. PepNovo: de novo peptide sequencing via probabilistic network modeling // *Analytical Chemistry*. 2005. V. 77. № 4. P. 964-973.

199. Savitski M., Nielsen M., Kjeldsen F., Zubarev R. Proteomics-grade de novo sequencing approach // *J. Proteome Res.* 2005. V. 4. № 6. P. 2348-2354.

200. Ma B., Zhang K., Liang C. An Effective Algorithm for Peptide De Novo Sequencing from MS/MS Spectra // *J. Comput. Syst. Sci.* 2005. V. 70. № 3. P. 418-430.

201. Hepner F., Czasar E., Roitinger E. Mass-spectrometrical analysis of recombinant human growth hormone (Genotropin®) reveals amino acid substitutions in 2 % of the expressed protein // *Proteome Science*. 2005. V. 3. № 1. P. 1-12.

202. Зверева И., Семенистая Е., Кротов Г., Родченков Г. Идентификация допинговых соединений пептидной природы, распространяемых через интернет // Аналитика. 2014. № 3. С. 58-70.

203. Semenistaya E., Zvereva I., Thomas A., Thevis M., Krotov G., Rodchenkov G. Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipramorelin // Drug Test Anal. 2015. doi: 10.1002/dta.1787.

204. Японская фармакопея [электронный ресурс] // сайт. URL:<http://gmpua.com/Pharmacopeia/JP/Japanese%20Pharmacopoeia%2015%20Ed.pdf> (дата обращения 10.10.2014 г.)

205. Гаврилов А. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов. М.: Гэотар-Медиа. 2010. 624 с.

206. Лютвинский Я.И., Петров Д.М., Веренчиков А.Н., Хасин Ю.И., Гаврик М.А. Система регистрации для параллельного анализа в ВПМС-тандемах // Научное приборостроение. 2004. Т. 14. №2. Стр. 80-91.

207. Kalli A., Smith G., Sweredoski M., Hess S. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers // J. Proteome Res. 2013. V. 12. № 7. P. 3071-3086.

208. Zhang Y., Wen Z., Washburn M., Florens L. Effect of dynamic exclusion duration on spectral count based quantitative proteomics // Anal. Chem. 2009. V. 81. № 15. P. 6317-6326.

209. Andrews G., Dean R., Hawkrigde A., Muddiman D. Improving proteome coverage on a LTQ-Orbitrap using design of experiments // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2011. V. 22. № 4. P. 773-783.

210. Kim M., Kandasamy K., Chaerkady R., Pandey A. Assessment of resolution parameters for CID-based shotgun proteomic experiments on the LTQ-Orbitrap mass spectrometer // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2010. V. 21. № 9. P. 1606-1611.

211. Gaucher S., Taylor S., Fahy E., Zhang B., Warnock D., Ghosh S., Gibson B. Expanded coverage of the human heart mitochondrial proteome using

multidimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry // J. Proteome Res. 2004. V. 3. № 3. P. 495-505.

212. Kalli A., Hess S. Effect of mass spectrometric parameters on peptide and protein identification rates for shotgun proteomic experiments on an LTQ-orbitrap mass analyzer // Proteomics. 2012. V. 12. № 1. P. 21-31.

213. Smith R., Loo J., Edmonds C., Barinaga C., Udseth H. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization // Anal. Chem. 1990. V. 62, № 9. P. 882-899.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П1 – Результаты идентификации пептидов рекомбинантного инсулина человека

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
1	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2696.3354	675.0907	4	9.83	S-пиридилэтилирование
2	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	2591.2776	864.7673	3	12.36	S-пиридилэтилирование
3	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPK. T	3536.7524	885.1950	4	8.19	S-пиридилэтилирование
4	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKT	3637.8003	910.4575	4	8.29	S-пиридилэтилирование
5	N.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2319.1292	580.7927	4	7.18	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование
6	C.GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1749.8872	438.4811	4	6.99	S-пиридилэтилирование
7	R.GFFYTPKT	959.4752	480.7447	2	7.17	
8	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK.T	3326.6367	666.3398	5	8.71	
9	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2591.2776	648.8268	4	10.71	S-пиридилэтилирование
10	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT	3427.6846	686.5505	5	8.68	
11	R.GFFYTPK(+27.99)T	987.4702	494.7424	2	7.55	Формилирование
12	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVCGER.G	2486.2197	622.5652	4	8.28	
13	E.ALYLVC(+105.06)GE.R	971.4786	486.7499	2	6.13	S-пиридилэтилирование
14	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06) N.F	2802.2314	701.5653	4	7.99	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
15	N.FVNQ(+.98)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2697.3196	675.3375	4	10.26	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
16	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVE(+14.02)ALYLVC(+105.06)GER.G	2710.3511	678.5959	4	9.84	S-пиридилэтилирование; метиловый эфир
17	R.GFFYTPK.T	858.4276	430.2212	2	7.12	
18	R.G(+27.99)FFYTPK.T	886.4225	887.4390	1	7.16	Формилирование
19	N.FVN(+.98)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPK.T	3537.7366	708.5582	5	8.18	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
20	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GE(+14.02)R.G	2710.3511	678.5939	4	10.29	S-пиридилэтилирование; метиловый эфир
21	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2071.0383	691.3552	3	7.05	S-пиридилэтилирование
22	E.RGFFYTPKT	1115.5763	372.8683	3	5.73	
23	E.ALVLVCGE.R	866.4208	867.4337	1	6.91	
24	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGERGFFYTPK.T	3431.6946	687.3509	5	8.34	S-пиридилэтилирование
25	F.V(+42.01)NQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2591.2776	519.2618	5	10.31	Ацетилирование (N-конец); S-пиридилэтилирование
26	N.F(+27.99)VNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2724.3303	682.0880	4	9.71	Формилирование; S-пиридилэтилирование
27	G.SHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1692.8657	424.2258	4	6.89	S-пиридилэтилирование
28	E.RGFFYTPK.T	1014.5287	508.2743	2	5.65	
29	E.ALVLVC(+105.06)GER.G	1127.5797	564.8000	2	5.58	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
30	E.ALVLVCGER.G	1022.5219	512.2711	2	6.32	
31	E.R(+27.99)GFFYTPK.T	1042.5236	522.2722	2	6.46	Формилирование
32	N.FVN(+.98)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2697.3196	675.3433	4	7.38	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
33	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT	3532.7424	707.5588	5	8.20	S-пиридилэтилирование
34	E.RGFFYT(-18.01)PKT	1097.5658	366.8648	3	5.75	Дегидрирование
35	C.GSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT	2586.2939	647.5840	4	8.45	
36	E.Q(+.98)C(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE.N	1805.7827	452.4558	4	6.22	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
37	H.LVEALYLVC(+105.06)GER.G	1468.7748	490.6011	3	7.03	S-пиридилэтилирование
38	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPK.T	3431.6946	687.3516	5	7.97	S-пиридилэтилирование
39	F.VN(+162.05)QHLC(+105.06)GSHLVE(+14.02)ALYLVC(+105.06) GER.G	2725.3354	682.3317	4	11.16	Гексоза (NSY); S-пиридилэтилирование; метилвый эфир
40	E.RGFFYTPK(+27.99)T	1143.5713	382.1996	3	6.08	Формилирование
41	N.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTP KT	3260.5940	653.1293	5	7.76	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование
42	F.FYTPK.T	654.3377	655.3483	1	6.23	
43	C.GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKT	2691.3518	539.2797	5	7.65	S-пиридилэтилирование
44	GIVEQ.C	544.2856	545.2956	1	2.29	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
45	G.FFYTPK.T	801.4061	401.7105	2	7.18	
46	F.VNQHLC(+105.06)GS(+176.03)HLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2725.2993	682.3235	4	11.57	S-пиридилэтилирование; N-глюкуронирование
47	C.NFVNQHLC(+105.06)GSHLVE(+37.95)ALYLVC(+105.06)GER.G	2848.3254	713.0908	4	9.76	S-пиридилэтилирование; замена 2 протонов на кальций
48	T.SIC(+105.06)SLYQLE.N	1159.5583	580.7873	2	6.55	S-пиридилэтилирование
49	E.ALYLVC(+105.06)GE(+14.02).R	985.4943	493.7572	2	6.34	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
50	F.VNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2549.2671	638.3282	4	6.80	S-пиридилэтилирование
51	S.IC(+105.06)SLYQLE.N	1072.5262	537.2742	2	6.32	S-пиридилэтилирование
52	N.FVN(+.98)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKT	3638.7842	910.7100	4	7.87	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
53	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKT	3532.7424	707.5606	5	8.02	S-пиридилэтилирование
54	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE.N	2203.0151	551.7653	4	6.66	S-пиридилэтилирование
55	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYCN.F	2697.1736	900.0664	3	8.44	S-пиридилэтилирование
56	G.ERGFFYTPK.T	1143.5713	382.1995	3	5.77	
57	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENY.C	2480.1213	621.0394	4	6.90	S-пиридилэтилирование
58	L.C(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1957.9542	490.5007	4	6.75	S-пиридилэтилирование
59	E.R(+27.99)GFFYTPKT	1143.5713	572.7960	2	6.47	Формилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
60	N.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVE.A	1209.5601	404.1964	3	4.90	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование
61	F.VNQHLHC(+105.06)E(sub G)SHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2621.2883	656.3206	4	9.97	S-пиридилэтилирование; неопределенные модификации
62	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYP (sub T)PK.T	3532.7576	707.5604	5	8.21	S-пиридилэтилирование; неопределенные модификации
63	G.ERGGFFYTPKT	1244.6189	415.8826	3	5.85	
64	F.VNQHLHC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGGFFYTPK (+42.01)T	3532.7424	589.8022	6	9.06	S-пиридилэтилирование; ацетилирование (K)
65	L.YLVC(+105.06)GE.R	787.3574	788.3710	1	6.17	S-пиридилэтилирование
66	C.TSIC(+105.06)SLYQLE.N	1260.6060	631.3141	2	6.69	S-пиридилэтилирование
67	N.FVN(+28.03)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2724.3669	682.0925	4	7.12	Диметилирование; S-пиридилэтилирование
68	G.EP(sub R)GFFYTPK.T	1084.5229	543.2690	2	7.45	Неопределенные модификации
69	E.RGGFFYT(-18.01)PK.T	996.5181	333.1815	3	5.68	Дегидрирование

Таблица П2 – Результаты идентификации пептидов инсулина лизпро

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
1	C.GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1749.8872	438.4811	4	6.95	S-пиридилэтилирование
2	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGGFFYTKPT	3427.6846	686.5518	5	8.75	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
3	E.ALYLVC(+105.06)GE.R	971.4786	486.7491	2	6.08	S-пиридилэтилирование
4	C.GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTKPT	2691.3518	673.8488	4	7.54	S-пиридилэтилирование
5	C.GSHLVEALYLVCGER.G	1644.8293	549.2874	3	7.88	
6	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	2591.2776	519.2657	5	7.69	S-пиридилэтилирование
7	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	1965.9805	492.5048	4	7.90	S-пиридилэтилирование
8	G.ERGFYTKPT	1244.6189	415.8827	3	5.48	
9	C.GSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT	2586.2939	647.5858	4	8.35	
10	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT	3532.7424	589.8015	6	8.20	S-пиридилэтилирование
11	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTKPT	3637.8003	728.5712	5	7.44	S-пиридилэтилирование
12	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVCGER.G	2486.2197	622.5651	4	8.24	
13	G.SHLVEALYLVCGERGFFYTKPT	2529.2725	633.3281	4	8.27	
14	E.R(+27.99)GFFYTKPT	1143.5713	572.7966	2	6.17	Формилирование
15	N.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2319.1292	580.7933	4	7.16	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование
16	E.RGFYTKPT	1115.5763	558.7989	2	5.32	
17	S.HLVEALYLVCGER.G	1500.7759	501.2681	3	7.51	
18	L.C(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	1852.8964	464.2336	4	7.59	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
19	E.ALYLVCGE.R	866.4208	867.4337	1	6.88	
20	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2071.0383	518.7700	4	7.02	S-пиридилэтилирование
21	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2696.3354	675.0949	4	6.94	S-пиридилэтилирование
22	R.GFFYTKPT	959.4752	960.4883	1	5.86	
23	E.ALYLVCGER.G	1022.5219	512.2712	2	6.27	
24	E.ALYLVC(+105.06)GER.G	1127.5797	376.8688	3	5.52	S-пиридилэтилирование
25	G(+27.99)IVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N.F	2830.2263	708.5669	4	7.23	Формилирование (N-конец); S-пиридилэтилирование
26	E.ALYLVC(+105.06)GERGFFYTKPT	2069.0444	518.2720	4	6.76	S-пиридилэтилирование
27	S.ICSLYQLE.N	967.4684	484.7444	2	7.01	
28	H.LCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT	2802.3872	701.6093	4	8.89	
29	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTKPT	3012.5029	754.1368	4	7.61	S-пиридилэтилирование
30	S.HLVEALYLVCGERGFFYTKPT	2442.2405	611.5687	4	8.16	
31	L.C(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1957.9542	490.4987	4	6.71	S-пиридилэтилирование
32	R.G(+27.99)FFYTKPT	987.4702	494.7451	2	6.89	Формилирование
33	E.Q(-17.03)C(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE.N	1787.7721	596.9349	3	6.42	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
34	G.SHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTKPT	2634.3303	659.5930	4	7.47	S-пиридилэтилирование
35	T.SIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N.F	1758.7745	587.2692	3	6.41	S-пиридилэтилирование
36	E.RGFFYT(-18.01)KPT	1097.5658	366.8648	3	5.34	Дегидрирование
37	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT	2907.4451	727.8721	4	8.38	S-пиридилэтилирование
38	GIVEQ.C	544.2856	545.2960	1	2.22	
39	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2591.2776	648.8312	4	7.43	S-пиридилэтилирование
40	G.SHLVEALYLVCGER.G	1587.8079	530.2787	3	7.73	
41	H.LVEALYLVCGER.G	1363.7169	682.8698	2	7.88	
42	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N(+14.02).F	2816.2471	564.2592	5	6.78	S-пиридилэтилирование; метилвый эфир
43	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENY.C	2480.1213	621.0408	4	6.87	S-пиридилэтилирование
44	S.IC(+105.06)SLYQLE.N	1072.5262	537.2739	2	6.27	S-пиридилэтилирование
45	C.GSHLVEALYLVC(+105.06)GE(+14.02)R.G	1763.9028	441.9855	4	7.20	S-пиридилэтилирование; метилвый эфир
46	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N.F	2802.2314	701.5712	4	6.61	S-пиридилэтилирование
47	N.FVN(+.98)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2697.3196	675.3450	4	7.32	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
48	L.YLVC(+105.06)GE.R	787.3574	788.3684	1	6.14	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
49	N.F(+27.99)VNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2724.3303	682.0934	4	7.69	Формилирование; S-пиридилэтилирование
50	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLEN.Y	2317.0581	773.3648	3	6.49	S-пиридилэтилирование
51	G.SHLVE.A	583.2966	584.3062	1	1.85	
52	C.GSHLVE.A	640.3180	321.1673	2	1.99	
53	T.SIC(+105.06)SLYQLE.N	1159.5583	580.7833	2	6.51	S-пиридилэтилирование
54	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE.N	2203.0151	551.7651	4	6.61	S-пиридилэтилирование
55	E.ALVLVCGERGGFFYTKPT	1963.9866	655.6747	3	7.46	
56	E.RGFFYTKPT(+21.98)	1137.5582	569.7879	2	5.35	Аддукт с натрием
57	C.GERGGFFYTKPT	1301.6404	434.8896	3	5.50	
58	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLEN(+.98)YC (+105.06)N.F	2803.2153	561.6558	5	6.87	S-пиридилэтилирование; деамидирование (NQ)
59	E.RGFFYTK(+27.99)PT	1143.5713	382.1999	3	5.65	Формилирование
60	E.Q(+.98)C(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE.N	1805.7827	452.4556	4	6.20	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
61	L.YLVCGER.G	838.4007	420.2098	2	4.54	
62	H.LVEALYLVC(+105.06)GER.G	1468.7748	490.6013	3	7.00	S-пиридилэтилирование
63	GIVEQ(+.98)C(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC (+105.06)N.F	2803.2153	561.6559	5	6.48	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
64	F.VNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTK(+42.01)PT	3532.7424	884.1996	4	8.85	S-пиридилэтилирование; ацетилирование (K)
65	GIVEQC.C	647.2949	648.3061	1	4.16	
66	L.C(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTKPT	2899.4189	725.8664	4	7.35	S-пиридилэтилирование

Таблица ПЗ – Результаты идентификации пептидов инсулина аспарт

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
1	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2071.0383	518.7702	4	7.04	S-пиридилэтилирование
2	E.ALYLVC(+105.06)GE.R	971.4786	486.7498	2	6.08	S-пиридилэтилирование
3	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	2591.2776	648.8323	4	7.82	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
4	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2696.3354	675.0953	4	6.95	S-пиридилэтилирование
5	N.F(+27.99)VNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2724.3303	682.0948	4	7.68	Формилирование; S-пиридилэтилирование
6	G.SHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTDKT	2652.3047	664.0885	4	7.49	S-пиридилэтилирование
7	E.RGFFYTD.K	904.4079	453.2144	2	6.25	
8	E.RGFFYTDKT	1133.5505	378.8600	3	5.64	
9	R.GFFYTDK.T	876.4017	439.2108	2	5.89	
10	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2591.2776	648.8315	4	7.42	S-пиридилэтилирование
11	R.GFFYTDKT	977.4494	489.7351	2	5.91	
12	E.RGFFYTD(-18.01)KT	1115.5399	372.8562	3	5.46	Дегидрирование
13	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTDK. T	3554.7268	711.9573	5	7.49	S-пиридилэтилирование
14	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTDK T	3655.7744	732.1672	5	7.46	S-пиридилэтилирование
15	R.GFFYT.D	633.2798	634.2908	1	6.84	
16	R.GFFYTD(-18.01)KT	959.4388	480.7300	2	6.22	Дегидрирование
17	E.ALYLVCGE.R	866.4208	434.2206	2	6.90	
18	C.GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTDKT	2709.3259	678.3422	4	7.62	S-пиридилэтилирование
19	G.SHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1692.8657	424.2262	4	6.87	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
20	S.IC(+105.06)SLYQLE.N	1072.5262	537.2742	2	6.29	S-пиридилэтилирование
21	E.R(+27.99)GFFYTDKT	1161.5454	581.7833	2	6.21	Формилирование
22	H.LVEALYLVC(+105.06)GER.G	1468.7748	490.6014	3	7.00	S-пиридилэтилирование
23	E.ALYLVC(+105.06)GE(+14.02).R	985.4943	493.7574	2	6.31	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
24	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENY.C	2480.1213	621.0416	4	6.91	S-пиридилэтилирование
25	E.RGFFYT(-18.01)DKT	1115.5399	372.8549	3	5.44	Дегидрирование
26	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N(+14.02).F	2816.2471	564.2601	5	6.83	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
27	Y.LVC(+105.06)GERGFFYTDKT	1739.8341	435.9686	4	5.67	S-пиридилэтилирование
28	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTDKT	3550.7166	711.1562	5	7.88	S-пиридилэтилирование
29	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N.F	2802.2314	935.0891	3	6.69	S-пиридилэтилирование

Таблица П4 – Результаты идентификации пептидов инсулина гларгин

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
1	G.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	2591.2776	648.8285	4	7.77	S-пиридилэтилирование
2	G.FVNQHLCGSHLVEALYLVCGER.G	2486.2197	622.5653	4	8.32	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
3	G.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2696.3354	675.0925	4	6.97	S-пиридилэтилирование
4	E.RGFFYTPKTRR	1427.7786	357.9537	4	4.80	
5	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2071.0383	518.7674	4	7.07	S-пиридилэтилирование
6	G.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGERGFFYTPK.T	3431.6946	687.3484	5	8.29	S-пиридилэтилирование
7	G.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKT R.R	3793.9014	759.7921	5	7.42	S-пиридилэтилирование
8	E.ALYLVC(+105.06)GE.R	971.4786	486.7480	2	6.13	S-пиридилэтилирование
9	E.ALYLVC(+105.06)GER.G	1127.5797	564.7989	2	5.58	S-пиридилэтилирование
10	E.R(+27.99)GFFYTPKTRR	1455.7734	364.9507	4	5.50	Формилирование
11	G.FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR	3739.8867	624.3261	6	8.20	
12	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	1965.9805	492.5051	4	7.99	S-пиридилэтилирование
13	E.ALYLVCGER.G	1022.5219	512.2701	2	6.33	
14	G.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKT RR	3950.0024	659.3438	6	7.22	S-пиридилэтилирование
15	E.ALYLVCGE.R	866.4208	867.4312	1	6.93	
16	R.GFFYTPK.T	858.4276	859.4382	1	6.26	
17	E.RGFFYTPK.T	1014.5287	508.2735	2	5.67	
18	G.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPK. T	3536.7524	708.3612	5	7.60	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
19	G.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GE.R	2540.2344	636.0692	4	7.34	S-пиридилэтилирование
20	E.ALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKTRR	2381.2466	477.2588	5	6.26	S-пиридилэтилирование
21	GIVEQ.C	544.2856	545.2943	1	2.30	
22	G.FVN(+.98)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2697.3196	675.3383	4	7.36	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
23	H.LVEALYLVC(+105.06)GER.G	1468.7748	490.5998	3	7.03	S-пиридилэтилирование
24	G.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPK.T	3431.6946	687.3483	5	7.97	S-пиридилэтилирование
25	E.RGFFYTPK(+27.99)TRR	1455.7734	364.9511	4	5.02	Формилирование
26	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)G.F	2745.2100	550.0538	5	6.88	S-пиридилэтилирование
27	G.F(+27.99)VNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2724.3303	682.0911	4	7.71	Формилирование; S-пиридилэтилирование
28	E.R(+27.99)GFFYTPK.T	1042.5236	522.2711	2	6.48	Формилирование
29	G.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2591.2776	648.8306	4	7.48	S-пиридилэтилирование
30	G.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR	3844.9446	641.8386	6	7.84	S-пиридилэтилирование
31	GIVEQ(+.98)C(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)G.F	2746.1938	550.2510	5	6.97	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
32	L.YLVC(+105.06)GE.R	787.3574	788.3677	1	6.18	S-пиридилэтилирование
33	F.FYTPK.T	654.3377	655.3482	1	6.28	
34	G.SHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKTRR	2946.5327	590.3171	5	7.14	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
35	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SL.Y	1669.7666	835.8942	2	5.83	S-пиридилэтилирование
36	R.G(+27.99)FFYTPK.T	886.4225	444.2187	2	7.20	Формилирование
37	G.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTR.R	3688.8435	615.8184	6	8.07	S-пиридилэтилирование
38	L.YLVCGER.G	838.4007	420.2099	2	4.66	
39	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE.N	2203.0151	551.7641	4	6.72	S-пиридилэтилирование
40	E.RGFFYT(-18.01)PK.T	996.5181	333.1810	3	5.71	Дегидрирование
41	G.FVN(+28.03)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2724.3669	545.8751	5	7.72	Диметилирование; S-пиридилэтилирование
42	G.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKTRR	3844.9446	641.8340	6	7.56	S-пиридилэтилирование
43	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENY.C	2480.1213	621.0410	4	6.96	S-пиридилэтилирование
44	G.FVNQ(+.98)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2697.3196	675.3412	4	7.43	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
45	G(+27.99)IVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)G.F	2773.2048	694.3128	4	7.37	Формилирование (N-конец); S-пиридилэтилирование
46	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)T.S	1061.4674	531.7441	2	3.47	S-пиридилэтилирование
47	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQ(+.98)LENYC(+105.06)G.F	2746.1938	550.2514	5	6.61	S-пиридилэтилирование; деамидирование (NQ)
48	E.RGFFYTPKTR.R	1271.6775	318.9278	4	5.31	
49	E.ALYLVC(+105.06)GE(+14.02)R.G	1141.5953	381.5407	3	5.89	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
50	G.FFYTPK.T	801.4061	401.7115	2	5.70	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
51	E.ALYLVC(+105.06)GE(+14.02).R	985.4943	493.7556	2	6.34	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
52	C.GSHLVE.A	640.3180	321.1665	2	2.15	
53	G.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPKTR.R	3688.8435	738.7806	5	7.77	S-пиридилэтилирование
54	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLEN.Y	2317.0581	580.2753	4	6.53	S-пиридилэтилирование
55	L.YLVC(+105.06)GER.G	943.4586	472.7382	2	5.59	S-пиридилэтилирование
56	G.SHLVE.A	583.2966	584.3053	1	1.96	
57	T.SIC(+105.06)SLYQLE.N	1159.5583	580.7877	2	6.55	S-пиридилэтилирование
58	S.IC(+105.06)SLYQLE.N	1072.5262	537.2723	2	6.33	S-пиридилэтилирование
59	E.ALYLVC(+105.06)GE(+21.98).R	993.4606	497.7370	2	6.15	S-пиридилэтилирование; аддукт с натрием
60	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TS.I	1148.4995	575.2598	2	2.92	S-пиридилэтилирование

Таблица П5 – Результаты идентификации пептидов инсулина глулизин

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
1	K.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPET	3261.5415	816.3973	4	7.98	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование
2	K.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2319.1292	774.0549	3	7.18	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование
3	K.Q(+27.99)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2364.1506	592.0485	4	7.12	Формилирование; S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
4	K.QHLCGSHLVEALYLVCGER.G	2126.0400	532.5199	4	8.02	
5	N.FVKQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPET	3652.7998	731.5753	5	7.54	S-пиридилэтилирование
6	E.ALYLVC(+105.06)GE.R	971.4786	486.7493	2	6.16	S-пиридилэтилирование
7	F.VK(+42.01)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPET	3547.7419	710.5600	5	7.87	Ацетилирование (K); S-пиридилэтилирование
8	N.FVKQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGERGFFYTPET	3547.7419	710.5634	5	8.25	S-пиридилэтилирование
9	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLEN(+.98)YC(+105.06)N.F	2803.2153	701.8171	4	6.54	S-пиридилэтилирование; деамидирование (NQ)
10	K.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GE(+14.02)R.G	2333.1448	584.2973	4	7.48	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование; метиловый эфир
11	E.RGFFYTPET	1116.5239	559.2733	2	6.46	
12	E.RGFFYTPE.T	1015.4763	508.7485	2	6.52	
13	N.FVKQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2710.3875	452.7416	6	6.64	S-пиридилэтилирование
14	Q.HLCGSHLVE.A	993.4702	497.7454	2	4.36	
15	R.GFFYTPET	960.4229	961.4348	1	7.11	
16	N.FVKQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2605.3296	652.3441	4	7.06	S-пиридилэтилирование
17	K.QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	2231.0979	558.7846	4	7.52	S-пиридилэтилирование
18	K.QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPET	3278.5681	1093.8700	3	7.67	S-пиридилэтилирование
19	E.R(+27.99)GFFYTPET	1144.5189	573.2695	2	7.09	Формилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
20	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2071.0383	518.7696	4	7.10	S-пиридилэтилирование
21	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQ(+.98)LENYC(+105.06)N.F	2803.2153	561.6555	5	6.90	S-пиридилэтилирование; деамидирование (NQ)
22	G(+27.99)IVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N.F	2830.2263	708.5676	4	7.28	Формилирование (N-конец); S-пиридилэтилирование
23	N.FVKQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	2605.3296	652.3448	4	7.40	S-пиридилэтилирование
24	G.SHLVEALYLVCGER.G	1587.8079	530.2794	3	7.78	
25	K.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVE(+14.02)ALYLVC(+105.06)GERGFFYTPET	3275.5571	819.9002	4	8.11	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование; метиловый эфир
26	K.QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2336.1558	468.2418	5	6.75	S-пиридилэтилирование
27	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N.F	2802.2314	701.5701	4	6.71	S-пиридилэтилирование
28	K.QHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2231.0979	447.2287	5	7.17	S-пиридилэтилирование
29	E.ALYLVCGE.R	866.4208	867.4332	1	6.93	
30	S.ICSLYQLE.N	967.4684	484.7438	2	7.05	
31	H.LVEALYLVC(+105.06)GER.G	1468.7748	490.6012	3	7.03	S-пиридилэтилирование
32	V.KQ(+.98)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFY(+162.05)TPET	3569.7000	893.4423	4	7.85	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование; гексоза (NSY)
33	N.FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPET	3442.6841	689.5490	5	8.87	
34	E.ALYLVC(+105.06)GERGFFYTPET	2069.9919	691.0117	3	7.36	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
35	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENY.C	2480.1213	621.0407	4	6.92	S-пиридилэтилирование
36	G.SHLVEALYLVCGERGFFYTPET	2530.2202	844.4193	3	8.72	
37	GIVEQ.C	544.2856	545.2961	1	2.31	
38	T.SIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N.F	1758.7745	587.2690	3	6.46	S-пиридилэтилирование
39	K.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVEAL.Y	1393.6813	465.5706	3	6.18	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование
40	G.SHLVEALYLVC(+105.06)GERGFFYTPET	2635.2781	879.4349	3	7.93	S-пиридилэтилирование
41	L.C(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1957.9542	490.4991	4	6.76	S-пиридилэтилирование
42	K.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVE(+14.02)ALYLVC(+105.06)GER.G	2333.1448	584.2957	4	7.30	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
43	R.GFFYTPE(+21.98)T	982.4048	492.2115	2	6.95	Аддукт с натрием
44	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N(+14.02).F	2816.2471	564.2597	5	6.81	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
45	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE.N	2203.0151	551.7651	4	6.68	S-пиридилэтилирование
46	L.YLVCGER.G	838.4007	420.2101	2	4.65	
47	F.VK(+42.01)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2605.3296	522.0760	5	7.03	Ацетилирование (K); S-пиридилэтилирование
48	K.QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGERGFFYTPET	3173.5103	794.3929	4	8.42	S-пиридилэтилирование
49	I.C(+105.06)S(+162.05)LYQ(+.98)LEN(+.98)YC(+105.06)NFVK.Q	2096.9111	699.9841	3	4.83	S-пиридилэтилирование; гексоза (NSY); деамидирование (NQ)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
50	L.YLVC(+105.06)GE.R	787.3574	788.3695	1	6.18	S-пиридилэтилирование
51	E.A(+27.99)LYLVC(+105.06)GE.R	999.4735	500.7469	2	7.62	Формилирование; S-пиридилэтилирование

Таблица П6 – Результаты идентификации пептидов инсулина детемир

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
1	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	2591.2776	648.8320	4	7.68	S-пиридилэтилирование
2	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVCGER.G	1965.9805	492.5050	4	7.89	S-пиридилэтилирование
3	C.GSHLVEALYLVCGER.G	1644.8293	549.2865	3	7.96	
4	G.SHLVEALYLVCGER.G	1587.8079	530.2799	3	7.78	
5	C.GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1749.8872	438.4811	4	7.03	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
6	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2696.3354	675.0954	4	6.99	S-пиридилэтилирование
7	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVCGER.G	2486.2197	622.5638	4	7.84	
8	E.ALYLVC(+105.06)GER.G	1127.5797	376.8692	3	5.47	S-пиридилэтилирование
9	N.Q(-17.03)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2319.1292	580.7928	4	7.24	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование
10	H.LC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2071.0383	518.7698	4	7.09	S-пиридилэтилирование
11	L.CGSHLVEALYLVCGER.G	1747.8385	583.6241	3	8.04	
12	N.FVNQHLCGSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2591.2776	648.8317	4	7.42	S-пиридилэтилирование
13	E.ALYLVCGER.G	1022.5219	1023.5338	1	6.25	
14	N.FVN(+.98)QHLCGSHLVEALYLVCGER.G	2487.2039	622.8160	4	8.55	Деамидирование (NQ)
15	N.F(+27.99)VNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2724.3303	682.0938	4	7.75	Формилирование; S-пиридилэтилирование
16	G.SHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1692.8657	424.2260	4	6.91	S-пиридилэтилирование
17	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GE.R	2540.2344	636.0704	4	7.38	S-пиридилэтилирование
18	S.HLVEALYLVCGER.G	1500.7759	501.2685	3	7.60	
19	H.LCGSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	1965.9805	492.5052	4	7.60	S-пиридилэтилирование
20	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06) N.F	2802.2314	701.5706	4	6.71	S-пиридилэтилирование
21	A.LYLVC(+105.06)GER.G	1056.5426	529.2805	2	5.52	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
22	E.A(+27.99)LYLVC(+105.06)GER.G	1155.5746	578.7972	2	7.03	Формилирование; S-пиридилэтилирование
23	Y.LVC(+105.06)GER.G	780.3952	391.2062	2	5.50	S-пиридилэтилирование
24	E.ALYLVC(+105.06)GE(+14.02)R.G	1141.5953	381.5410	3	5.68	S-пиридилэтилирование; метиловый эфир
25	E.ALYLVC(+105.06)GE.R	971.4786	486.7493	2	6.17	S-пиридилэтилирование
26	A.LYLVCGER.G	951.4847	476.7523	2	6.10	
27	N.FVNQHLC(+105.06)GT(sub S)HLVEALYLVCGER.G	2605.2935	652.3339	4	7.98	S-пиридилэтилирование; неопределенные модификации
28	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENY.C	2480.1213	621.0407	4	6.95	S-пиридилэтилирование
29	T.SIC(+105.06)SLYQLE.N	1159.5583	580.7862	2	6.60	S-пиридилэтилирование
30	G(+27.99)IVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC (+105.06)N.F	2830.2263	708.5677	4	7.36	Формилирование (N-конец); S-пиридилэтилирование
31	S.ICSLYQLE.N	967.4684	484.7442	2	6.98	
32	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE.N	2203.0151	551.7650	4	6.69	S-пиридилэтилирование
33	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLEN(+.98)YC (+105.06)N.F	2803.2153	561.6545	5	6.60	S-пиридилэтилирование; деамидирование (NQ)
34	GIVEQ(+.98)C(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC (+105.06)N.F	2803.2153	561.6542	5	6.57	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
35	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQ(+.98)LENYC (+105.06)N.F	2803.2153	561.6558	5	6.89	S-пиридилэтилирование; Деамидирование (NQ)
36	GIVEQ.C	544.2856	545.2960	1	2.37	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
37	N.FVN(+.98)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2697.3196	450.5636	6	7.40	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
38	L.YLVCGER.G	838.4007	420.2098	2	4.72	
39	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06) N(+14.02).F	2816.2471	564.2593	5	6.79	S-пиридилэтилирование; метиловый эфир
40	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQ(+.98)LE.N	2203.9993	735.6793	3	6.78	S-пиридилэтилирование; деамидирование (NQ)
41	L.VCGER.G	562.2533	563.2545	1	7.84	
42	T.SIC(+105.06)SLYQLENYC(+105.06)N.F	1758.7745	587.2686	3	6.49	S-пиридилэтилирование
43	N.FVNQHLC(+105.06)GS(+14.02)HLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2710.3511	452.7353	6	7.09	S-пиридилэтилирование; метилование
44	E.T(sub A)LYLVCGER.G	1052.5325	527.2764	2	6.05	Неопределенные модификации
45	E.ALYLVCGE.R	866.4208	867.4335	1	6.87	
46	GIVEQ(+.98)C(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE.N	2203.9993	552.0119	4	6.76	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
47	E.RGFFYTK(+210.20)P	1224.7271	409.2522	3	13.09	Миристоилирование
48	N.FVN(+28.03)QHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2724.3669	545.8768	5	7.75	Диметилирование; S-пиридилэтилирование
49	GIVEQC.C	647.2949	648.3051	1	4.32	
50	C.TSIC(+105.06)SLYQLE.N	1260.6060	631.3121	2	6.61	S-пиридилэтилирование
51	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)T.S	1061.4674	531.7436	2	3.64	S-пиридилэтилирование
52	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC.G.E	2306.1340	577.5434	4	8.19	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
53	L.YLVC(+105.06)GE(+14.02)R.G	957.4742	479.7475	2	5.77	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
54	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GE(+14.02)R.G	2710.3511	543.0811	5	7.25	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
55	S.IC(+105.06)SLYQLE.N	1072.5262	537.2744	2	6.36	S-пиридилэтилирование
56	GIVE(+14.02)QC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLE (+14.02)NYC(+105.06)N.F	2830.2627	708.5656	4	6.89	Метилловый эфир; S-пиридилэтилирование
57	Q.HLCGSHLVE.A	993.4702	497.7455	2	4.26	
58	N.FVNQHLC(+105.06)GSH(+14.02)LVEALYLVC(+105.06)GER.G	2710.3511	452.7347	6	7.19	S-пиридилэтилирование; метилование
59	V.N(+162.05)QHLCQ(sub G)SHLVEALYLVCGER.G	2514.1995	629.5620	4	8.46	Гексоза (NSY); неопределенные модификации
60	L.YLVC(+105.06)GER.G	943.4586	472.7388	2	5.50	S-пиридилэтилирование
61	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVE(+28.03)ALYLVC(+105.06)GER.G	2724.3669	455.0643	6	7.20	S-пиридилэтилирование; этилирование
62	F.V(+42.01)NQHLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GE (+14.02)R.G	2605.2935	652.3301	4	7.80	Ацетилирование (N-конец); S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
63	N.FVNQHLC(+105.06)GSHLVE.A	1586.7664	794.3946	2	5.01	S-пиридилэтилирование
64	N.FVNQH(+14.02)LC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2710.3511	678.5979	4	7.19	Метилование; S-пиридилэтилирование
65	N.FVNQ(+.98)HLC(+105.06)GSHLVEALYLVC(+105.06)GER.G	2697.3196	540.4766	5	7.24	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
66	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLYQLEN.Y	2317.0581	580.2755	4	6.57	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
67	E.Q(-17.03)C(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)S.L	1141.4395	381.4894	3	4.07	Пиро-форма для Q; S-пиридилэтилирование
68	H.LVEALYLVC(+105.06)GER.G	1468.7748	490.6007	3	7.07	S-пиридилэтилирование
69	GIVEQC(+105.06)C(+105.06)TSIC(+105.06)SLY.Q	1832.8300	459.2170	4	6.16	S-пиридилэтилирование
70	S.I(+27.99)C(+105.06)SLYQLE.N	1100.5212	551.2716	2	7.58	Формилирование (N-конец); S-пиридилэтилирование

Таблица П7 – Результаты идентификации пептидов рекомбинантного соматотропного гормона

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
1	K.FDTNSHNDDALLKNYGLLYC(+105.06)FR.K	2723.2803	681.8347	4	3.97	S-пиридилэтилирование
2	R.LHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQK.Y	2726.3228	909.7841	3	3.93	
3	K.FDTN(+.98)SHNDDALLKNYGLLYC(+105.06)FR.K	2724.2642	682.0762	4	4.10	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
4	E.EAYIPKEQKYSFLQNPQTS LC(+105.06)FSE.S	2954.4160	985.8149	3	3.60	S-пиридилэтилирование
5	D.NAMLRHRLHQLAFDITYQEFEE	2589.2546	648.3232	4	3.47	
6	K.FDTN(+.98)SHNDDALLKNYGLLYCFRK.D	2747.3013	916.7785	3	4.14	Деамидирование (NQ)
7	K.FDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRK.D	2746.3174	687.5867	4	3.99	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
8	K.FDTNSHNDDALLKKNYGLLYC(+105.06)FRK.D	2851.3750	951.4689	3	3.66	S-пиридилэтилирование
9	K.FDTNSHN(+.98)DDALLKKNYGLLYCFRK.D	2747.3013	687.8354	4	4.18	Деамидирование (NQ)
10	K.FDTN(+.98)SHNDDALLKKNYGLLYCFR.K	2619.2063	874.0793	3	4.52	Деамидирование (NQ)
11	K.FDTNSHNDDALLKKNYGLLYCFR.K	2618.2224	655.5649	4	4.37	
12	R.LHQLAFDITYQEFEEAYIPK.E	2341.1265	781.3918	3	4.17	
13	K.YSFLQNPQTSLC(+105.06)FSESIPTPSNREETQKSNLELLR.I	4289.1064	1073.2860	4	3.80	S-пиридилэтилирование
14	N.SLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGR.L	3085.5278	1029.5182	3	6.70	
15	D.NAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEE.A	2718.2971	907.1088	3	3.49	
16	D.NAMLRAHRLHQLAFDITYQE.F	2313.1436	772.0577	3	2.97	
17	K.FDTNSHN(+.98)DDALLKKNYGLLYC(+105.06)FR.K	2724.2642	909.0999	3	4.11	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
18	E.QKYSFLQNPQTSLC(+105.06)FSE.S	2123.9985	709.0095	3	3.63	S-пиридилэтилирование
19	K.YSFLQNPQ(sub Q)TSLC(+105.06)FSESIPTPSNR.E	2720.3267	907.7870	3	3.87	S-пиридилэтилирование; неопределенные модификации
20	R.SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGR.L	3603.7766	901.9532	4	6.85	
21	R.AHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQK.Y	3090.5198	1031.1823	3	3.61	
22	R.SVFANSLVYGASDSNVYDLLK.D	2261.1216	1131.5718	2	4.40	
23	K.FDTNSHN(+.98)DDALLKKNYGLLYCFR.K	2619.2063	655.8125	4	4.51	Деамидирование (NQ)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
24	E.FEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLC(+105.06)FSE.S	3230.5269	1077.8535	3	3.74	S-пиридилэтилирование
25	E.AYIPKEQKYSFLQNPQTSLC(+105.06)FSE.S	2825.3733	942.8018	3	3.57	S-пиридилэтилирование
26	R.AHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPK.E	2705.3237	677.3430	4	3.87	
27	K.YSFLQ(+.98)N(+.98)PQTSLC(+105.06)FSEIPTPSN(+.98)REET QQK.S	3466.5874	867.6500	4	3.69	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
28	E.EGIQTLMGRLE.D	1245.6387	623.8286	2	3.95	
29	FPTIPLSRLFD.N	1304.7128	653.3688	2	4.86	
30	E.TFLRIVQCRSVE.G	1449.7762	484.2678	3	3.36	
31	K.YSFLQNPQTSLC(+105.06)FSEIPTPSNR.E	2720.2905	907.7712	3	3.80	S-пиридилэтилирование
32	R.EETQKSNLELLR.I	1586.8264	794.4221	2	2.69	
33	K.DLEEGIQTLMGR.L	1360.6656	681.3409	2	4.19	
34	R.EETQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLR.S	3623.0085	906.7607	4	6.58	
35	K.FDTNSHN(+.98)DDALLKNYGLLYC(+105.06)FRK.D	2852.3591	951.7966	3	3.79	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
36	R.SVFANSLVYGASDSNVYD(+21.98)LLKDLEEGIQTLMGR.L	3625.7585	1209.5912	3	6.86	Аддукт с натрием
37	R.TGQIFKQTYSK.F	1299.6823	650.8500	2	1.30	
38	R.ISLLLIQSWLEPVQFLR.S	2054.1929	685.7394	3	5.91	
39	R.KDMDKVETFLR.I	1380.7072	461.2446	3	2.88	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
40	K.EQKYSFLQNPQTSLC(+105.06)FSESIPTPSNR.E	3105.4866	1036.1705	3	3.63	S-пиридилэтилирование
41	E.GIQTLMGRLE.D	1116.5961	559.3072	2	3.76	
42	E.TFLRIVQC(+105.06)RSVE.G	1554.8340	519.2871	3	2.96	S-пиридилэтилирование
43	K.FDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLR.I	3980.9189	797.1938	5	4.71	
44	G.ASDSNVYDLLKDLE.E	1580.7570	791.3885	2	4.56	
45	K.DMDKVETFLR.I	1252.6122	418.5458	3	3.32	
46	R.LHQLAFDITYQE(+21.98)FE.E	1661.7338	831.8755	2	3.80	Аддукт с натрием
47	K.YSFLQNPQTSLC(+105.06)FSESIPTPSNREETQKK.S	3463.6353	866.9178	4	3.62	S-пиридилэтилирование
48	K.FDTNSHNDDALLK.N	1488.6844	745.3530	2	2.13	
49	H.RLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQK.Y	2882.4238	961.8182	3	3.71	
50	R.SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSPR.T	4358.1377	1090.5435	4	6.78	
51	E.SIPTPSNREE.T	1128.5411	565.2800	2	0.88	
52	R.LHQLAFDITYQEFEE.A	1768.7944	885.4080	2	3.74	
53	R.AHRLHQLAFDITYQEFEE.E	2003.9490	1002.9859	2	3.41	
54	R.LHQLAFDITYQEFEE(+21.98)EAYIPK.E	2363.1086	1182.5631	2	4.12	Аддукт с натрием
55	R.SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLM(+15.99)GR.L	3619.7715	1207.5999	3	6.09	Окисление (M)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
56	K.N(+.98)YGLLYCFRK.D	1276.6274	639.3222	2	4.05	Деамидирование (NQ)
57	K.NYGLLYCFRK.D	1275.6434	638.8302	2	3.82	
58	D.NAMLRHRLHQLAFD.T	1791.9314	598.3199	3	2.82	
59	K.YSFLQNPQTSLC(+105.06)FSE.S	1867.8451	623.6241	3	3.88	S-пиридилэтилирование
60	R.ISLLLIQSWLEPVQ(+.98)FLR.S	2055.1768	1028.6078	2	5.97	Деамидирование (NQ)
61	K.N(+.98)YGLLYC(+105.06)FR.K	1253.5903	627.8042	2	3.96	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
62	K.NYGLLYC(+105.06)FR.K	1252.6063	418.5445	3	3.74	S-пиридилэтилирование
63	R.LHQLAFDITYQEFEE	1639.7518	820.8864	2	3.77	
64	D.N(+.98)AMLRHRLHQLAFDITYQEFEE	2590.2385	864.4241	3	3.71	Деамидирование (NQ)
65	K.QTYSKFDTNSHNDDALLKKNYGLLYCFRK	3225.5188	807.3874	4	4.22	
66	K.QTYSKFDTNSHNDDALLKKNYGLLYC(+105.06)FR.K	3330.5767	667.1243	5	3.85	S-пиридилэтилирование
67	K.NYGLLYCFRK	1147.5485	574.7825	2	4.32	
68	FPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQK.Y	4962.5278	993.5159	5	5.03	
69	R.LHQLAFDITYQE.F	1363.6407	682.8303	2	3.19	
70	K.FDTNSHNDDALLKKNYGLLYCFRKDMDKVE.T	3463.6177	866.9149	4	4.12	
71	E.EGIQTLMGRLEDGSPR.T	1757.8730	586.9672	3	3.61	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
72	K.EQKYSFLQN(+.98)PQTSLC(+105.06)FSESIPTPSNREETQQK.S	3849.8154	963.4676	4	3.49	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
73	K.DLEEGIQTLM(+15.99)GR.L	1376.6605	689.3386	2	3.41	Окисление (M)
74	R.LHQLAFDITYQE(+21.98)FEEAYIPKEQK.Y	2748.3047	917.1074	3	3.93	Аддукт с натрием
75	K.FDTNSHNDDALLKNYGLLYC(+105.06)FR(+14.02).K	2737.2959	913.4417	3	4.05	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
76	D.NAM(+15.99)LRAHRLHQLAFDITYQEFEE.E	2605.2495	652.3216	4	3.38	Окисление (M)
77	K.DLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFK.Q	2789.4016	930.8104	3	4.64	
78	Y.DLLKDLEEGIQTLMGR.L	1829.9557	915.9911	2	6.17	
79	E.EAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSE.S	2849.3582	950.7958	3	3.87	
80	K.YSFLQNPQTSLC(+105.06)FSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISL LLIQSWLEPVQFLR.S	6325.2886	1266.0706	5	6.30	S-пиридилэтилирование
81	K.YSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQK.S	3358.5776	840.6547	4	3.95	
82	K.YSFLQNPQTSLC(+105.06)FSE(+21.98)SIPTPSNR.E	2742.2725	915.0970	3	3.84	S-пиридилэтилирование; аддукт с натрием
83	K.FDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRDK.M	2861.3442	954.7921	3	4.04	
84	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEE.E	3875.9568	1292.9972	3	4.93	
85	R.LHQLAFD(+21.98)TYQEFEEAYIPK.E	2363.1086	1182.5629	2	4.10	Аддукт с натрием
86	K.FDTN(+.98)SHNDDALLKNYGLLYC(+105.06)FRK.D	2852.3591	571.4813	5	3.78	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
87	E.LLRISLLLIQSWLEPVQFLR.S	2436.4619	813.1639	3	6.04	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
88	E.EGIQTLMGR.L	1003.5121	502.7658	2	3.09	
89	K.EQKYSFLQNPQTSLC(+105.06)FSE.S	2253.0413	752.0240	3	3.65	S-пиридилэтилирование
90	F.DTYQEFEEAYIPK.E	1631.7355	816.8769	2	3.59	
91	F.DTNSHNDDALLK.N	1341.6161	671.8165	2	1.20	
92	K.FDTNSHND(+21.98)DALLKNYGLLYC(+105.06)FR.K	2745.2622	916.0961	3	3.96	Аддукт с натрием; S-пиридилэтилирование
93	R.ISLLLIQSWLEPVQF.L	1785.0076	893.5134	2	5.94	
94	E.EGIQTLM(+15.99)GR.L	1019.5070	510.7631	2	1.44	Окисление (M)
95	K.NYGLLYC(+105.06)FRK.D	1380.7012	691.3604	2	3.31	S-пиридилэтилирование
96	R.LFDNAML.R.A	978.4957	490.2568	2	3.35	
97	E.EAYIPKEQK.Y	1104.5814	553.3004	2	0.84	
98	FPTIPLSRLFDNAM(+15.99)LRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQK.Y	4978.5229	996.7154	5	4.82	Окисление (M)
99	K.FDTNSHNDDALLKNYGLLY.C	2212.0437	738.3564	3	4.03	
100	F.DTNSHNDDALLKNYGLLYC(+105.06)FR.K	2576.2117	645.0614	4	3.93	S-пиридилэтилирование
101	F.DTYQEFEEAYIPKEQK.Y	2016.9316	1009.4753	2	3.31	
102	R.AHRLHQLAFDTYQE.F	1727.8379	864.9296	2	2.79	
103	E.FEEAYIPKEQK.Y	1380.6925	691.3564	2	1.95	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
104	K.FDTNSHNDDALLKKNYGLLYC(+105.06)FRKDMDKVE.T	3568.6755	714.7452	5	3.80	S-пиридилэтилирование
105	Q.SWLEPVQFLR.S	1273.6819	637.8505	2	4.47	
106	H.RLHQLAFDITYQEF.E	1795.8529	599.6271	3	3.62	
107	K.FDTNSHNDDALLKKNYGLLYC(+105.06)F.R	2567.1790	856.7346	3	4.34	S-пиридилэтилирование
108	K.YSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNR.E	2615.2327	872.7524	3	4.11	
109	K.DMDKVETFLRIVQC(+105.06)RSVEGSC(+105.06)GF	2828.3447	708.0964	4	4.09	S-пиридилэтилирование
110	Y.DLLKDLEEGIQTLM(+15.99)GR.L	1845.9506	616.3256	3	5.41	Окисление (M)
111	R.LHQLAFDITYQE(+21.98)FEE.A	1790.7764	896.3974	2	3.76	Аддукт с натрием
112	N.DDALLKKNYGLLYC(+105.06)FR.K	1907.9603	636.9962	3	4.14	S-пиридилэтилирование
113	K.QTYSKFDTNSHNDDALLK.N	2095.9810	699.6689	3	2.45	
114	K.FDTN(+.98)SHNDDALLK.N	1489.6685	745.8455	2	2.48	Деамидирование (NQ)
115	R.SVFAN(+.98)SLVYGASDSNVYDLLKDLE.E	2619.2590	1310.6434	2	5.05	Деамидирование (NQ)
116	FPTIPLSRLFDNAML.R.A	1890.0186	631.0162	3	4.96	
117	F.DTNSHNDDALLKKNYGLLYCFRK.D	2599.2488	867.4248	3	3.99	
118	K.D(+226.08)MDKVETFLR.I	1478.6897	740.3458	2	2.89	Биотинилирование
119	K.DMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF	2618.2290	873.7529	3	4.60	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
120	N.DDALLKNYGLLYCFRK.D	1930.9974	644.6736	3	4.21	
121	E.GIQTLMGRLEDGSPR.T	1628.8304	543.9530	3	3.42	
122	R.ISLLLIQSW(+15.99)LEPVQFLR.S	2070.1877	1036.0984	2	5.95	Окисление (HW)
123	K.QTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRK.D	3353.6138	671.7311	5	3.90	
124	K.FDTNSHNDDALLKN(+.98)YGLLY.C	2213.0276	738.6900	3	4.09	Деамидирование (NQ)
125	N.SLVYGASDSNVYDLLKDLE.E	2100.0261	1051.0245	2	4.84	
126	R.ISLLLIQSWLE(+17.03)PVQFLR.S	2071.2192	1036.6169	2	5.96	Замена протона ионом аммония
127	FPTIPLSR.L	929.5334	465.7747	2	3.42	
128	R.TGQIFKQTY.S	1084.5553	543.2871	2	2.65	
129	K.Q(-17.03)TYSKFDTNSHNDDALLK.N	2078.9546	693.9948	3	2.87	Пиро-форма для Q
130	N.SLVYGASDSNVYDLLKDLEE.G	2229.0688	1115.5465	2	4.85	
131	P.TIPLSRLFD.N	1060.5917	531.3049	2	4.17	
132	E.EAYIPK.E	719.3854	360.7016	2	1.07	
133	K.SN(+.98)LELLR.I	844.4654	423.2403	2	3.27	Деамидирование (NQ)
134	R.SVFANSLVYGASDSNVY.D	1791.8315	896.9271	2	3.86	
135	K.SNLELLR.I	843.4814	422.7497	2	2.99	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
136	K.N(+.98)YGLLYCFR.K	1148.5325	575.2751	2	4.49	Деамидирование (NQ)
137	K.DLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKF.D	3543.7666	886.9503	4	4.63	
138	E.DGSPRTGQIFKQTYSKF.D	1958.9850	654.0031	3	3.07	
139	K.DMDKVETFLRIVQCRSVEGSC(+105.06)GF	2723.2869	908.7734	3	4.34	S-пиридилэтилирование
140	E.TFLRIVQC(+105.06)R.S	1239.6910	414.2393	3	2.83	S-пиридилэтилирование
141	R.LFDNAM(+15.99)LR.A	994.4906	498.2536	2	2.77	Окисление (M)
142	L.LLIQSWLEPVQFLR.S	1740.9927	871.5044	2	5.23	
143	E.GIQTLMGR.L	874.4695	438.2440	2	2.80	
144	G.ASDSNVYDLLKDL EE.G	1709.7996	855.9106	2	4.57	
145	R.LHQLAFDTYQEFEEAYIPK(+226.08)EQ.K	2824.3054	1413.1565	2	3.90	Биотинилирование
146	R.SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDL EE.G	2747.3176	1374.6725	2	5.09	
147	K.DMD(+21.98)KVETFLR.I	1274.5941	638.3047	2	3.32	Аддукт с натрием
148	T.N(+162.05)S(+162.05)HNDDALLKNYGLLYCFR.K	2620.2114	656.0624	4	4.54	Гексоза (N); гексоза (NSY)
149	K.SN(-17.03)LELLR.I	826.4548	414.2357	2	3.01	Отщепление аммиака (N)
150	K.VETFLR.I	763.4228	382.7195	2	2.73	
151	R.AHRLHQLAFDTYQEFEE.A	2132.9915	712.0073	3	3.41	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
152	R.LHQLAFDTYQEFEE(+21.98)AYIPK.E	2363.1086	788.7108	3	4.14	Аддукт с натрием
153	R.KDM(+15.99)DKVETFLR.I	1396.7020	466.5756	3	2.57	Окисление (M)
154	D.DALLKNYGLLYCFRK.D	1815.9705	606.3323	3	4.10	
155	K.NYGLLYC(+105.06)FR(+14.02).K	1266.6219	634.3210	2	3.84	S-пиридилэтилирование; метилловый эфир
156	R.LHQLAFDTYQE(+21.98).F	1385.6228	693.8203	2	3.21	Аддукт с натрием
157	R.TGQIFK.Q	692.3857	347.2016	2	1.51	
158	Y.DLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPR.T	2584.3167	862.4480	3	6.20	
159	K.FDTNSHNDDALLKNYGLLYC(+105.06)FRKDMD(+356.19).K	3568.6577	893.1793	4	3.79	S-пиридилэтилирование; биотин полиэтиленоксид амин
160	K.EQKYSFLQNPQTS LC(+105.06)FSESIPTPSNREETQKK.S	3848.8315	770.7764	5	3.49	S-пиридилэтилирование
161	K.QTYSKFD TN(+.98)SHNDDALLK.N	2096.9651	699.9992	3	2.61	Деамидирование (NQ)
162	R.KDMD(+21.98)KVETFLR.I	1402.6891	702.3524	2	2.89	Аддукт с натрием
163	K.Q(-17.03)TYSKFD TN(+.98)SHNDDALLK.N	2079.9385	694.3243	3	2.98	Пиро-форма для Q; деамидирование (NQ)
164	K.VETFLRIVQC(+105.06)RSVEGSCGF	2234.0977	745.7089	3	3.82	S-пиридилэтилирование
165	R.LFD(+53.92)NAML R.A	1032.4149	517.2165	2	3.37	Замена 2 протонов на железо
166	K.DMDKVETFLR(+.98).I	1253.5962	627.8143	2	3.39	Деамидирование (R)
167	K.VETFLRIVQC(+105.06)RSVEGSC(+105.06)GF	2339.1555	585.7982	4	3.54	S-пиридилэтилирование

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
168	L.LIQSWLEPVQFLR.S	1627.9086	814.9633	2	4.81	
169	R.IVQC(+105.06)R.S	722.3898	362.2034	2	0.69	S-пиридилэтилирование
170	R.SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLE.E	2618.2751	873.7683	3	5.09	
171	N.SLVYGASDSNVYDLLK.D	1742.8727	872.4449	2	4.00	
172	F.D(+21.98)TYQEFEEAYIPK.E	1653.7174	827.8676	2	3.62	Аддукт с натрием
173	E.EAYIPKEQKYSFLQ.N	1742.8878	872.4543	2	3.27	
174	Y.DLLKDLEEGIQTLMGRLE.D	2072.0823	1037.0504	2	6.65	
175	M.DKVETFLR.I	1006.5447	504.2810	2	2.67	
176	E.AYIPKEQK.Y	975.5389	488.7781	2	0.82	
177	E.FEEAYIPK.E	995.4963	498.7574	2	2.74	
178	K.N(+.98)YGLLYC(+105.06)FRK.D	1381.6852	691.8522	2	3.56	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
179	N.SHNDDALLK.N	1011.4985	506.7589	2	1.09	
180	K.NYGLLYC(+105.06)F.R	1096.5051	549.2609	2	4.31	S-пиридилэтилирование
181	R.LHQLAFD(+53.92)TYQEFEE	1693.6711	847.8471	2	3.81	Замена 2 протонов на железо
182	D.NAMLRAH.R	811.4123	406.7150	2	0.85	
183	K.DM(+15.99)DKVETFLR.I	1268.6071	635.3117	2	2.96	Окисление (M)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
184	F.RKDMDKVETFLR.I	1536.8082	385.2102	4	2.71	
185	E.SIPTPSNR.E	870.4559	436.2375	2	0.85	
186	N.PQTSLC(+105.06)FSE.S	1115.4957	558.7571	2	2.75	S-пиридилэтилирование
187	FPTIPLSRLFDNAMLRAH.R	2098.1145	700.3814	3	4.70	
188	K.FDTNSHND(+21.98)DALLK.N	1510.6664	756.3429	2	2.22	Аддукт с натрием
189	R.KD(+53.92)MDKVETFLR.I	1434.6263	718.3217	2	2.91	Замена 2 протонов на железо
190	K.YSFLQNPQTSLC(+105.06)F.S	1651.7704	826.8921	2	4.18	S-пиридилэтилирование
191	N.PQTSLC(+105.06)FSESIPTPSNREETQQK.S	2711.2861	904.7706	3	2.95	S-пиридилэтилирование
192	E.GIQTLM(+15.99)GR.L	890.4644	446.2416	2	1.10	Окисление (M)
193	R.SVFAN(+.98)SLVYGASDSNVYDLLK.D	2262.1055	1132.0651	2	4.36	Деамидирование (NQ)
194	E.TFLRIVQCR.S	1134.6332	568.3259	2	3.27	
195	R.LFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQK.Y	4051.0049	1013.7607	4	4.26	
196	D.DALLKNYGLLYC(+105.06)FR.K	1792.9333	598.6536	3	4.05	S-пиридилэтилирование
197	K.SNLE(+53.92)LLR.I	897.4007	449.7084	2	3.00	Замена 2 протонов на железо
198	K.YSFLQNPQTSLC(+105.06)FSE(+21.98).S	1889.8270	945.9225	2	3.88	S-пиридилэтилирование; аддукт с натрием
199	K.FDTNSHN(+.98)DDALLK.N	1489.6685	497.5660	3	2.46	Деамидирование (NQ)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
200	K.DLEEGIQTLMGRLEDGSPR.T	2115.0266	1058.5222	2	4.67	
201	R.SVEGSC(+105.06)GF	889.3640	445.6905	2	1.62	S-пиридилэтилирование
202	E.GSC(+105.06)GF	574.2209	288.1186	2	1.19	S-пиридилэтилирование
203	R.SVFAN(+.98)SLVYGASDSNVY.D	1792.8156	897.4162	2	3.78	Деамидирование (NQ)
204	K.FDTNSHNDD(+21.98)ALLK.N	1510.6664	756.3414	2	2.16	Аддукт с натрием
205	R.ISLLLIQSWLE(+21.98)PVQF.L	1806.9895	904.5107	2	5.95	Аддукт с натрием
206	Q.LAFDTYQEFEEAYIPKEQK.Y	2348.1211	783.7167	3	3.93	
207	K.YSFLQNPQTSLCFSE.S	1762.7872	882.4040	2	4.19	
208	R.ISLLLIQSWLE(+53.92)PVQFLR.S	2108.1121	1055.0656	2	5.94	Замена 2 протонов на железо
209	F.DNAMLRAHRLHQLAF.D	1791.9314	598.3185	3	3.12	
210	K.FDTNSHNDDALLKN(+.98)YGLLYC(+105.06)FR.K	2724.2642	545.8633	5	4.08	Деамидирование (NQ); S-пиридилэтилирование
211	R.LHQLAF.D	727.4017	364.7091	2	3.26	
212	FPTIPLSR LFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPK.E	4577.3315	916.4768	5	5.24	
213	F(+162.05)PTIPLSR.L	1091.5862	546.8013	2	3.41	Гексоза
214	Y.DLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKF.D	4013.0566	1004.2725	4	5.91	
215	R.LEDGSPR.T	772.3715	387.1918	2	0.76	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
216	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAF.D	2963.6067	741.9095	4	4.64	
217	R.LHQLAFD.T	842.4286	422.2234	2	2.96	
218	K.DMDK(+26.02)VETFLR.I	1278.6278	640.3221	2	3.58	Ацетальдегид +26
219	R.LHQLAFDITYQE(+53.92)FEEAYIPK.E	2395.0459	1198.5322	2	4.15	Замена 2 протонов на железо
220	Y.DLLKDLEEGIQTLM(+15.99)GRLEDGSPRTGQIFKQTYSKF.D	4029.0515	806.8190	5	5.29	Окисление (M)
221	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQ.L	2632.4172	659.1138	4	4.33	
222	K.FDTNSHNDDALLK(+42.01)NYGLLYC(+105.06).F	2462.1213	1232.0717	2	4.84	Ацетилирование (K); S-пиридилэтилирование
223	F.DNAM(+15.99)LRAHRLHQLAF.D	1807.9264	603.6503	3	2.84	Окисление (M)
224	E.AYIPK.E	590.3428	296.1803	2	0.96	
225	K.D(+53.92)MDKVETFLR.I	1306.5315	654.2746	2	3.34	Замена 2 протонов на железо
226	E.E(-18.01)AYIPK.E	701.3748	351.6959	2	1.09	Пиро-форма для E
227	R.LHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQ(+.98)K(+42.01)YSFL.Q	3279.5652	1094.1809	3	3.82	Деамидирование (NQ); ацетилирование (K)
228	N.SLVYGASDSNVY.D	1273.5826	637.7999	2	3.09	
229	Y.GLLYC(+105.06)FR.K	975.5000	488.7584	2	3.31	S-пиридилэтилирование
230	FPTIPLSRLF.D	1189.6859	595.8508	2	4.88	
231	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQE.F	3599.8459	900.9724	4	4.64	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
232	R.ISLLLIQSWLE(+21.98)PVQFLR.S	2076.1748	1039.0950	2	5.91	Аддукт с натрием
233	E.E(+53.92)GIQTLMGR.L	1057.4314	529.7250	2	3.12	Замена 2 протонов на железо
234	R.LFDNP(sub A)MLR.A	1004.5113	503.2645	2	4.09	Неопределенные модификации
235	Y.DLLKD(+21.98)LEEGIQTLMGR.L	1851.9376	926.9769	2	6.18	Аддукт с натрием
236	Q.TSLC(+105.06)FSE.S	890.3844	446.2013	2	2.66	S-пиридилэтилирование
237	F.PTIPLSR.L	782.4650	392.2406	2	3.46	
238	FPTIPLSRLFDNAM(+15.99)LRAH.R	2114.1094	705.7131	3	4.42	Окисление (M)
239	K.NYGLLYCFRKDMDKVE.T	1992.9437	665.3224	3	3.97	
240	R.LHQLAFDTY(+162.05)QEFEEAYIPKEQK.Y	2888.3755	963.8002	3	3.82	Гексоза (NSY)
241	R.SVFANSLVYGASD(+21.98)SNVYDLLK.D	2283.1035	1142.5605	2	4.43	Аддукт с натрием
242	R.SVFANSLVYGASDSNVYDLLKD.L	2376.1484	1189.0870	2	4.38	
243	K.YSFLQNPQTSLC(+105.06)FSE(+21.98)SIPTPSNREETQQK.S	3485.6174	872.4102	4	3.69	S-пиридилэтилирование; аддукт с натрием
244	FPTIPLSRLFDNAM(+15.99)LRAHRLHQLAF.D	2979.6018	745.9086	4	4.38	Окисление (M)
245	K.YSFLQNT(sub P)QTSLC(+105.06)FSESIPTPSNREETQQK.S	3467.6304	867.9103	4	3.72	S-пиридилэтилирование; неопределенные модификации
246	F.DTNSHNDDALLKN(+162.05)YGLLY.C	2471.1340	824.7261	3	4.35	Гексоза

Таблица П8 – Результаты идентификации пептидов основного пика препарата «Тимозин бета»

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
1	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPLPSKETIEQEKQAGES	4960.4863	993.1022	5	4.24	Ацетилирование (N-конец)
2	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPLPSKETIEQEKQ S(sub A).G	4703.3848	784.9052	6	4.29	Ацетилирование (N-конец); неопределенные модификации
3	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLK.K	2150.0928	538.5290	4	4.69	Ацетилирование (N-конец)
4	S(+42.01)DKPDMAEIEKF.D	1450.6649	726.3400	2	5.69	Ацетилирование (N-конец)
5	SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPLPSKETIEQEKQAGES	4918.4756	1230.6239	4	2.47	
6	K.KTETQEKNPLPSKETIEQEK.Q	2356.2122	590.0590	4	0.85	
7	K.TETQEKNPLPSKETIEQEK.Q	2228.1172	558.0349	4	0.98	
8	K.K(+42.01)TETQEKNPLPSKETIEQEK.Q	2398.2227	600.5610	4	1.08	Ацетилирование (N-конец)
9	K.TETQEKNPLPSKETIEQEKQAGES	2700.3088	901.1102	3	1.30	
10	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLKKT.E	2379.2356	476.8541	5	4.28	Ацетилирование (N-конец)
11	K.NPLPSKETIEQEKQAGES	1983.9749	992.9917	2	0.97	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
12	S(+42.01)DKPDM(+15.99)AEIEKFDKSKLKKKTETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES	4976.4810	996.3038	5	2.31	Ацетилирование (N-конец); окисление (M)
13	SDKPDMAEIEKFDKS.K	1738.8083	580.6069	3	4.47	
14	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLKKKTETQEKN(-18.01).P	3090.5542	619.1174	5	2.43	Ацетилирование (N-конец); дегидрирование
15	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLK(+42.01)KTETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES	5002.4966	1001.5035	5	2.71	Ацетилирование (N-конец); ацетилирование (K)
16	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLKKKTETQEKN.P	3108.5647	622.7181	5	2.44	Ацетилирование (N-конец)
17	K.L(+42.01)KKTETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES	3111.5935	778.9012	4	1.04	Ацетилирование (N-конец)
18	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKS.K	1780.8188	594.6124	3	4.98	Ацетилирование (N-конец)
19	S.D(+42.01)K(+114.04)PDMAEIEKFDK.S	1720.7977	574.6037	3	3.00	Ацетилирование (N-конец); убиквитинирование
20	K.K(+42.01)TETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES	2870.4146	718.6108	4	1.05	Ацетилирование (N-конец)
21	K.KTETQEKNPLPSK.E	1498.7991	750.4086	2	0.71	
22	SDKPDMAEIEKFDK.S	1651.7762	551.5978	3	4.41	
23	K.NPLPSKETIEQEK.Q	1511.7831	504.9328	3	1.00	
24	S(+42.01)DKPDMAEIEK.F	1303.5966	652.8054	2	1.56	Ацетилирование (N-конец)
25	S.D(+42.01)K(+71.04)PDMAEIEKFDK.S	1677.7920	560.2712	3	2.95	Ацетилирование (N-конец); пропионамид (K, N-конец)
26	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLKKKTETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES(-18.01)	4942.4756	824.7482	6	4.40	Ацетилирование (N-конец); дегидрирование
27	SDKPDMAEIEKF.D	1408.6544	470.5580	3	5.19	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
28	S.D(+42.01)K(+87.07)PDMAEIEKFDK.S	1693.8232	565.6077	3	3.05	Ацетилирование (N-конец); гипузин
29	S(+42.01)DK(+27.99)PDMAEIEKFDK.S	1721.7817	574.9305	3	5.13	Ацетилирование (N-конец); формилирование
30	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDK.S	1693.7869	565.6016	3	5.00	Ацетилирование (N-конец)
31	D.K(+42.01)PDMAEIEKFDK.S	1491.7279	746.8682	2	3.08	Ацетилирование (N-конец)
32	K.ETIEQEKQAGES	1347.6154	674.8145	2	0.73	
33	S.D(+42.01)K(+87.03)PDMAEIEKFDK.S	1693.7869	847.9003	2	2.97	Ацетилирование (N-конец); аддукт с глицидамидом
34	SDKPDMAEIEK.F	1261.5859	631.7985	2	1.06	
35	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLKK.T	2278.1877	570.5545	4	2.65	Ацетилирование (N-конец)
36	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSK.L	1908.9138	955.4590	2	4.54	Ацетилирование (N-конец)
37	K.TETQEKNPLPSK.E	1370.7041	686.3591	2	0.77	
38	E.TIEQEKQAGES	1218.5728	610.2946	2	0.73	
39	K.LKKTETQEKNPLPSKETIEQEKQAGES	3069.5830	768.4014	4	1.04	
40	K.LKKTETQEKNPLPSK.E	1739.9781	580.9995	3	0.63	
41	S(+42.01)DKPD(+14.02)MAEIEKFDK.S	1707.8025	570.2686	3	5.13	Ацетилирование (N-конец); метилвый эфир
42	SDKPDMAEIEKFDKSK.L	1866.9033	467.7330	4	2.47	
43	S(+42.01)DKPDMAEIEK(+42.01)FDKSKLK.K	2192.1035	549.0314	4	5.23	Ацетилирование (N-конец); ацетилирование (K)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
44	S(+42.01)(+42.01)DKPDMAEIEKFDK.S	1735.7974	579.6047	3	3.15	Ацетилирование (N-конец); Ацетилирование (TSCYH)
45	K.LKKTETQEKNPLPSKETIEQEK.Q	2597.3911	520.4854	5	0.86	
46	S(+42.01)DK(+42.01)PDMAEIEKFDK.S	1735.7974	579.6038	3	5.23	Ацетилирование (N-конец); Ацетилирование (K)
47	K.N(+.98)PLPSKETIEQEK.Q	1512.7671	505.2658	3	1.57	Деамидирование (NQ)
48	S(+43.01)DKPDMAEIEKF.D	1451.6602	726.8392	2	5.68	Карбомоилирование
49	S(+43.01)DKPDMAEIEKFDKSKLK.K	2151.0881	538.7786	4	4.76	Карбомоилирование
50	E.T(+42.01)QEKNPLPSKETIEQEKQAGES	2828.4331	943.8083	3	0.81	Ацетилирование (N-конец)
51	N.PLPSKETIEQEK.Q	1397.7401	466.9189	3	1.03	
52	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKN(sub S)K.L	1935.9247	484.9862	4	4.49	Ацетилирование (N-конец); неопределенные модификации
53	SDKPDMAEIEKFDK(+42.01)SK.L	1908.9138	478.2340	4	4.64	Ацетилирование (K)
54	S(+42.01)DKPDMAEIEK(+42.01)FDK.S	1735.7974	868.9026	2	5.55	Ацетилирование (N-конец); ацетилирование (K)
55	D.KPDMAEIEKFDK.S	1449.7173	484.2458	3	2.56	
56	P.LPSKETIEQEK.Q	1300.6874	651.3478	2	1.20	
57	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKL(sub S)K.L	1934.9658	484.7472	4	5.36	Ацетилирование (N-конец); неопределенные модификации
58	K.NPLPSK(+42.01)ETIEQEK.Q	1553.7937	777.9010	2	4.37	Ацетилирование (K)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
59	S(+42.01)DKPDMAEIEKFD(-18.01)K.S	1675.7762	559.5989	3	5.20	Ацетилирование (N-конец); дегидрирование
60	K.NPLPSKETIEQ(+.98)EKQAGES	1984.9589	662.6591	3	1.56	Деамидирование (NQ)
61	K.T(+42.01)ET(-15.99)QEK NPLPSKETIEQEKQAGES	2726.3245	909.7782	3	1.57	Ацетилирование (N-конец); отщепление кислорода
62	E.IEKFDKSKLKKTE.T	1592.9137	797.4625	2	0.63	
63	S(+42.01)DK(+27.99)PDMAEIEKFDKSK.L	1936.9087	485.2318	4	4.74	Ацетилирование (N-конец); формилирование
64	SDKPDMAEIEKL(sub F).D	1374.6700	459.2299	3	4.99	Неопределенные модификации
65	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKS(+154.14)K.L	2063.0496	516.7720	4	2.93	Ацетилирование (N-конец); деканоилирование
66	N.PLPSKETIEQEKQAGES	1869.9319	935.9713	2	1.00	
67	E.IEKFDKSKLKKTTETQE.K	1951.0625	651.3636	3	0.65	
68	S(+42.01)DKPDMAEIEK(+42.01)FDKSK.L	1950.9244	976.4656	2	3.08	Ацетилирование (N-конец); ацетилирование (K)
69	S(+42.01)D(-15.99)KPDMAEIEKFDK.S	1677.7919	560.2689	3	4.84	Ацетилирование (N-конец); отщепление кислорода
70	D.MAEIEKFDK.S	1109.5426	555.7774	2	1.77	
71	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKN(sub S)KLK.K	2177.1038	545.2803	4	4.66	Ацетилирование (N-конец); неопределенные модификации
72	E.IEKFDKSKLK(+42.01)KTE.T	1634.9243	818.4678	2	0.85	Ацетилирование (K)
73	K.PDMAEIEKFDK.S	1321.6223	441.5470	3	4.80	

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
74	S(+42.01)DKPDMAEIEKFD(-18.01)KSKLK.K	2132.0823	534.0254	4	5.08	Ацетилирование (N-конец); дегидрирование
75	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDK(+42.01)SK.L	1950.9244	488.7365	4	4.85	Ацетилирование (N-конец); ацетилирование (K)
76	D.K(+43.01)PDMAEIEKFDK.S	1492.7231	498.5833	3	5.04	Карбомилирование
77	S(+42.01)DKPDMAE(+21.98)IEKF.D	1472.6469	737.3295	2	3.44	Ацетилирование (N-конец); аддукт с натрием
78	E.TQEKNPLPSKE.T	1269.6565	635.8360	2	0.77	
79	S(+42.01)DKPDM(+15.99)AEIEKFDK.S	1709.7817	570.9323	3	4.87	Ацетилирование (N-конец); окисление (M)
80	SDKPDM(+15.99)AEIEKFDK.S	1667.7712	556.9305	3	1.36	Окисление (M)
81	E.KFDKSKLKKKTETQE.K	1708.9359	855.4737	2	0.60	
82	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKS(-18.01)K.L	1890.9033	631.3066	3	3.07	Ацетилирование (N-конец); дегидрирование
83	E.KFDKSKLKKTE.T	1350.7870	676.4002	2	0.59	
84	S(+42.01)DKPDMAEIEKFD.K	1565.6919	783.8538	2	3.28	Ацетилирование (N-конец)
85	E.K(+42.01)NPLPSKE.T	953.5182	477.7650	2	0.88	Ацетилирование (N-конец)
86	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLKKKTET(-18.01)QEKN.P	3090.5542	773.6472	4	2.44	Ацетилирование (N-конец); дегидрирование
87	S(+42.01)DKPDMAEIEK(+15.99)FDKSK.L	1924.9087	482.2315	4	2.79	Ацетилирование (N-конец); гидроксилирование
88	K.TETQEK(+42.01)NPLPSKETIEQEKQAGES	2742.3196	915.1102	3	2.55	Ацетилирование (K)
89	S(+27.99)DKPDMAEIEKFDK.S	1679.7712	560.9302	3	4.82	Формилирование (N-конец)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
90	K.TETQEK(+42.01)NPLPSKETIEQEK.Q	2270.1277	757.7139	3	2.28	Ацетилирование (K)
91	K.TETQEKNPLPSKETIEQEK(+42.01)QAGES	2742.3196	915.1143	3	2.53	Ацетилирование (K)
92	S(+42.01)DKPDMAEIEK(+225.09)F.D	1675.7585	559.5985	3	5.20	Ацетилирование (N-конец); иминобиотинилирование
93	S(+42.01)DKPD(+53.92)MAEIEKFDK.S	1747.7062	583.5727	3	4.98	Ацетилирование (N-конец); замена 2 протонов на железо
94	K.SKLLK(+42.01)KTETQEK.N	1360.7561	454.5917	3	0.91	Ацетилирование (K)
95	S(+42.01)DKPDMAEIEK(+15.99)FDK.S	1709.7817	570.9323	3	3.08	Ацетилирование (N-конец); гидроксилирование
96	E.KNPLPSKE.T	911.5076	456.7614	2	0.76	
97	S(+42.01)DKPDMAE(+21.98)IE.K	1197.4835	599.7483	2	2.54	Ацетилирование (N-конец); аддукт с натрием
98	S(+42.01)DKPDMAE(+21.98)IEKFDK.S	1715.7688	858.8903	2	2.98	Ацетилирование (N-конец); аддукт с натрием
99	E.KFDKSKLLK(+42.01)KTE.T	1392.7976	697.4032	2	1.05	Ацетилирование (K)
100	S(+42.01)DKPDMAEIE(+21.98)KFDK.S	1715.7688	858.8900	2	2.98	Ацетилирование (N-конец); аддукт с натрием
101	K.T(+42.01)ETQEKNPLPSKETIEQEKQAGES	2742.3196	915.1108	3	2.55	Ацетилирование (N-конец)
102	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKSKLLKT(sub K)TE.T	2481.2307	1241.6268	2	2.52	Ацетилирование (N-конец); неопределенные модификации
103	S(+42.01)DKPDM(+15.99)AEIEKFDK(+42.01)SK.L	1966.9193	656.6489	3	2.54	Ацетилирование (N-конец); окисление (M); ацетилирование (K)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
104	E.K(+42.01)FDKSKLKKTE.T	1392.7976	465.2705	3	1.06	Ацетилирование (N-конец)
105	E.TQEKNPLPSKETIE.Q	1612.8308	807.4236	2	1.27	
106	K.L(+42.01)KKTETQEKNPLPSKETIEQEK.Q	2639.4016	528.8862	5	1.12	Ацетилирование (N-конец)
107	K.LKKTETQEK.N	1103.6187	552.8168	2	0.61	
108	S(+42.01)DKPDMAEIE.K	1175.5016	588.7576	2	4.10	Ацетилирование (N-конец)
109	K.LK(+42.01)KTETQEK.N	1145.6292	382.8848	3	0.98	Ацетилирование (K)
110	S(+43.01)DKPDMAEIEKFDK.S	1694.7821	565.9348	3	3.04	Карбомоилирование
111	K.KTETQEK.N	862.4396	432.2267	2	0.62	
112	E.K(+42.01)(+27.99)NPLPSKE.T	981.5131	491.7639	2	0.86	Ацетилирование (n-конец); формилирование
113	S(+42.01)DKPDM(+15.99)AEIEKFDKSK.L	1924.9087	482.2312	4	4.55	Ацетилирование (N-конец); окисление (M)
114	S(+42.01)DKPDMAEIEKFDKE(sub S)KLK.K	2192.1035	549.0311	4	5.25	Ацетилирование (N-конец); неопределенные модификации
115	S(+42.01)DKPD(+21.98)MAEIEKF.D	1472.6469	737.3283	2	5.72	Ацетилирование (N-конец); аддукт с натрием
116	K.TETQEKNPLPSK(+42.01)ETIEQEKQAGES	2742.3196	686.5848	4	1.57	Ацетилирование (K)
117	S(+42.01)DKPDMAEIEK(+114.04).F	1417.6395	709.8221	2	3.33	Ацетилирование (N-конец); убиквитинирование
118	E.TQEKNPLPSK(+42.01)E.T	1311.6670	656.8383	2	1.70	Ацетилирование (K)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
119	S.D(+42.01)K(+87.03)PDMAEIEKFDK.K	1565.6919	783.8531	2	3.26	Ацетилирование (N-конец); аддукт с глицидамидом
120	S.D(+42.01)(+57.02)KPDM(+15.99)AEIEKFDK.S	1679.7712	560.9313	3	4.84	Ацетилирование (N-конец); карбамидометилирование (DHKE, N-term); окисление (M)
121	S(+42.01)DKPDM(+31.99)AEIEKFDK.S	1725.7766	576.2647	3	3.90	Ацетилирование (N-конец); сульфонирование
122	L.PSKETIEQEK.Q	1187.6034	594.8100	2	1.05	
123	S(+42.01)DKPDMAE(+21.98)IEK.F	1325.5785	663.7952	2	1.64	Ацетилирование (N-конец); аддукт с натрием
124	S.D(+42.01)K(+72.02)PDMAEIEKFDK.S	1678.7759	560.6000	3	3.00	Ацетилирование (N-конец); карбоксиэтилирование
125	K.TETQEKNPLPSKETIEQEKQS(sub A).G	2443.2078	815.4065	3	1.03	Неопределенные модификации
126	E.KNPLPSKETIEQE.K	1511.7831	756.8953	2	1.03	
127	S(+42.01)DKPDMAE(+37.95)IEKFDK.S	1731.7338	433.9397	4	4.99	Ацетилирование (N-конец); Замена 2 протонов на кальций
128	E.IEKFDK.S	778.4225	390.2171	2	1.12	
129	K.NPLPSK.E	654.3701	328.1912	2	1.21	
130	S(+42.01)DKPDMAE.I	933.3749	467.6949	2	1.05	Ацетилирование (N-конец)
131	E.KNPLPSKETIE.Q	1254.6819	628.3454	2	1.42	
132	E.IEKFDK(+42.01)SKLKKTETQE.K	1993.0731	665.3646	3	0.87	Ацетилирование (K)

№ п/п	Пептид	Масса	m/z	z	RT	Модификации
133	S(+42.01)DKPDMAE(+53.92)IEKFDK.S	1747.7062	874.8571	2	2.99	Ацетилирование (N-конец); замена 2 протонов на железо
134	E.IEKFDKSK.L	993.5494	497.7802	2	1.07	
135	S(-18.01)DKPDMAEIEKFDK.S	1633.7657	545.5942	3	4.69	Дегидрирование
136	K.FDK(+42.01)SKLK.K	906.5175	454.2657	2	1.55	Ацетилирование (K)
137	S.D(+42.01)KPDMAEIEKFDK.S	1606.7548	536.5864	3	3.10	Ацетилирование (N-конец)
138	S(+42.01)DL(sub K)PDMAEIEKFDK.S	1678.7760	560.5961	3	4.97	Ацетилирование (N-конец); неопределенные модификации
139	K.FDKSK.L	623.3278	312.6712	2	0.67	



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ**

Joint Stock Company
The federal research and technical
center of ecological control systems
metrology "Inversiya"

Открытое акционерное общество
Федеральный научно-технический
центр метрологии систем
экологического контроля
"Инверсия"

The federal scientific
metrology center

Федеральный научный
метрологический центр

Moscow, 107031 Razhdatsynska str., 27 Russia	Fax (495) 608-45-56 Phone (495) 608-35-31 608-46-85 E-mail: inversiyaDIR@yandex.ru inversiya@yandex.ru inversiyaMVI@yandex.ru	107031, г. Москва ул. Раздатовская, 27	Факс (495) 608-45-56 Телефон (495) 608-35-31 608-46-85
--	--	---	--

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
об аттестации методики идентификации**

Выдано 30 сентября 2015г.
Действительно до 30 сентября 2020 г.

№ И6/8-18-2015

**Методика идентификации рекомбинатного инсулина
человека в лекарственных средствах методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии
с масс-селективным детектированием,**

наименование методики идентификации

разработанная **Федеральным государственным унитарным
предприятием «Научный центр «Сигнал» (ФГУП «НЦ» Сигнал»)**,
115487 г. Москва, ул. Нагатинская, д. 16А
*наименование и юридический адрес организации (предприятия),
разработавшей методику идентификации*

и регламентированная в методике идентификации
№ И6/8-18-2015 «Методика идентификации рекомбинатного
инсулина человека в лекарственных средствах методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным
детектированием», год утверждения – 2015 г., 29 стр.

Методика идентификации аттестована в соответствии с ГОСТ Р
8.795–2012. Аттестация осуществлена по результатам
метрологической экспертизы материалов, представленных
разработчиком.

Рис. П1. Свидетельство об аттестации методики идентификации рекомбинантного
инсулина человека в лекарственных средствах методом высокоэффективной
жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием.



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ**

Joint Stock Company
The federal research and technical
center of ecological control systems
metrology "Inversiya"

Открытое акционерное общество
Федеральный научно-технический
центр метрологии систем
экологического контроля
"Инверсия"

The federal scientific
metrology center

Федеральный научный
метрологический центр

Moscow, 107031 Razhdatsivnaya str., 27 Russia	Fax (495) 608-45-56 Phone (495) 608-35-31 608-46-85 E-mail: inversiyaDIR@yandex.ru inversiya@yandex.ru inversiyaMVI@yandex.ru	107031, г. Москва ул. Раздатовская, 27	Факс (495) 608-45-56 Телефон (495) 608-35-31 608-46-85
---	---	---	--

С В И Д Е Т Е Л Ь С Т В О
об аттестации методики идентификации

Выдано 30 сентября 2015г.
Действительно до 30 сентября 2020 г.

№ И6/8-19-2015

Методика идентификации инсулина лизпро
в лекарственных средствах методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии
с масс-селективным детектированием,

наименование методики идентификации

разработанная **Федеральным государственным унитарным**
предприятием «Научный центр «Сигнал» (ФГУП «НЦ» Сигнал),
115487 г. Москва, ул. Нагатинская, д. 16А
*наименование и юридический адрес организации (предприятия),
разработавшей методику идентификации*

и регламентированная в методике идентификации № И6/8-19-2015 «Методика идентификации инсулина лизпро в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием», год утверждения – 2015 г., 29 стр.

Методика идентификации аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.795–2012. Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов, представленных разработчиком.

Рис. П2. Свидетельство об аттестации методики идентификации инсулина лизпро в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием.



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ**

Joint Stock Company
The federal research and technical
center of ecological control systems
metrology "Inversiya"

Открытое акционерное общество
Федеральный научно-технический
центр метрологии систем
экологического контроля
"Инверсия"

The federal scientific
metrology center

Федеральный научный
метрологический центр

Moscow, 107031 Rozhdestvenska str., 27 Russia	Fax (495) 608-45-56 Phone (495) 608-35-31 608-46-85 E-mail: inversiyaDIR@yandex.ru inversiya@yandex.ru inversiyaMVI@yandex.ru	107031, г. Москва ул. Рождественская, 27	Факс (495) 608-45-56 Телефон (495) 608-35-31 608-46-85
---	---	---	--

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
об аттестации методики идентификации**

Выдано 30 сентября 2015г.
Действительно до 30 сентября 2020 г.

№ И6/8-20-2015

**Методика идентификации инсулина аспарт
в лекарственных средствах методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии
с масс-селективным детектированием,**
наименование методики идентификации

разработанная **Федеральным государственным унитарным
предприятием «Научный центр «Сигнал» (ФГУП «НЦ» Сигнал),**
115487 г. Москва, ул. Нагатинская, д. 16А
*наименование и юридический адрес организации (предприятия),
разработавшей методику идентификации*

и регламентированная в методике идентификации
№ И6/8-20-2015 «Методика идентификации инсулина аспарт в
лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной
хроматографии с масс-селективным детектированием», год
утверждения – 2015 г., 29 стр.

Методика идентификации аттестована в соответствии с ГОСТ Р
8.795–2012. Аттестация осуществлена по результатам
метрологической экспертизы материалов, представленных
разработчиком.

Рис. ПЗ. Свидетельство об аттестации методики идентификации инсулина аспарт
в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
с масс-селективным детектированием.



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ**

Joint Stock Company
The federal research and technical
center of ecological control systems
metrology "Inversiya"

Открытое акционерное общество
Федеральный научно-технический
центр метрологии систем
экологического контроля
"Инверсия"

The federal scientific
metrology center

Федеральный научный
метрологический центр

Moscow, 107031 Rozhdestvenska str., 27 Russia	Fax (495) 608-46-66 Phone (495) 608-35-31 608-46-85 E-mail: inversiyaDIR@yandex.ru inversiya@yandex.ru inversiyaMVI@yandex.ru	107031, г. Москва ул. Рождественская, 27	Факс (495) 608-46-66 Телефон (495) 608-35-31 608-46-85
---	--	---	--

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
об аттестации методики идентификации**

Выдано 30 сентября 2015г.
Действительно до 30 сентября 2020 г.

№ И6/8-21-2015

**Методика идентификации инсулина гларгин
в лекарственных средствах методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии
с масс-селективным детектированием,**
наименование методики идентификации

разработанная **Федеральным государственным унитарным
предприятием «Научный центр «Сигнал» (ФГУП «НЦ» Сигнал»),**
115487 г. Москва, ул. Нагатинская, д. 16А
*наименование и юридический адрес организации (предприятия),
разработавшей методику идентификации*

и регламентированная в методике идентификации
№ И6/8-21-2015 «Методика идентификации инсулина гларгин в
лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной
хроматографии с масс-селективным детектированием», год
утверждения – 2015 г., 29 стр.

Методика идентификации аттестована в соответствии с ГОСТ Р
8.795–2012. Аттестация осуществлена по результатам
метрологической экспертизы материалов, представленных
разработчиком.

Рис. П4. Свидетельство об аттестации методики идентификации инсулина гларгин в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием.



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ**

Joint Stock Company
The federal research and technical
center of ecological control systems
metrology "Inversiya"

Открытое акционерное общество
Федеральный научно-технический
центр метрологии систем
экологического контроля
"Инверсия"

The federal scientific
metrology center

Федеральный научный
метрологический центр

Moscow, 107031 Rozhdestvenska str., 27 Russia	Fax (495) 608-45-56 Phone (495) 608-35-31 608-46-85 E-mail: inversiyaDIR@yandex.ru inversiya@yandex.ru inversiyaMVI@yandex.ru	107031, г. Москва ул. Рождественская, 27	Факс (495) 608-45-56 Телефон (495) 608-35-31 608-46-85
---	---	---	--

С В И Д Е Т Е Л Ь С Т В О
об аттестации методики идентификации

Выдано 30 сентября 2015г.
Действительно до 30 сентября 2020 г.

№ И6/9-22-2015

**Методика идентификации рекомбинантного
соматотропного гормона человека
в лекарственных средствах методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии
с масс-селективным детектированием,**
наименование методики идентификации

разработанная **Федеральным государственным унитарным
предприятием «Научный центр «Сигнал» (ФГУП «НЦ» Сигнал)**,
115487 г. Москва, ул. Нагатинская, д. 16А
*наименование и юридический адрес организации (предприятия),
разработавшей методику идентификации*

и регламентированная в методике идентификации
№ И6/9-22-2015 «Методика идентификации рекомбинантного
соматотропного гормона в лекарственных средствах методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным
детектированием», год утверждения – 2015 г., 30 стр.

Методика идентификации аттестована в соответствии с ГОСТ Р
8.795–2012. Аттестация осуществлена по результатам
метрологической экспертизы материалов, представленных
разработчиком.

Рис. П5. Свидетельство об аттестации методики идентификации рекомбинантного соматотропного гормона человека в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием.

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГУП «НЦ «Сигнал»



[Handwritten signature]

А.А. Жиров

« 21 » 09 2015 г.

А К Т

о практическом применении результатов диссертационного исследования Беризовской Е.И. на тему «Разработка унифицированного способа оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы методом масс-спектрометрии высокого разрешения»

Настоящим актом удостоверяется, что в Федеральном государственном унитарном предприятии «Научный центр «Сигнал» используется способ оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, предложенный в диссертационном исследовании Беризовской Е.И. при подтверждении заявленных изготовителем показателей качества. Разработанные в рамках данного диссертационного исследования методики идентификации рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин и рекомбинантного соматотропного гормона человека в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием аттестованы и внесены в область аккредитации ФГУП «НЦ «Сигнал» органом по аккредитации ОАО ФНТЦ «Инверсия».

Начальник Испытательной химико-аналитической
лаборатории ФГУП «НЦ «Сигнал»

[Handwritten signature]

В.Ф. Таранченко

Рис. П6. Акт внедрения унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы методом масс-спектрометрии высокого разрешения в ФГУП «НЦ «Сигнал».