

УДК 543, 544.5, 615.07

© А. В. Манойлов, И. Ю. Торопыгин, Ю. П. Козьмин,  
А. В. Новиков, Р. А. Бубляев, О. А. Миргородская

## КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ СТРЕПТОКИНАЗУ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Продемонстрирована возможность использования масс-спектрометрии для комплексного анализа лекарственных препаратов, содержащих стрептокиназу. Определен состав белков в препаратах и содержание целевого белка — стрептокиназы. Идентификация и количественная оценка содержания стрептокиназы проводились по продуктам исчерпывающего триптического гидролиза с использованием MALDI-MS. Для количественной оценки в анализируемые пробы в качестве внутреннего стандарта добавлялись  $^{18}\text{O}$ -изотопомеры триптических пептидов стрептокиназы с известной концентрацией. Концентрация анализируемого белка рассчитывалась по соотношениям интенсивностей изотопных распределений аналита и меченого  $^{18}\text{O}$  внутреннего стандарта. Биологическая активность стрептокиназы оценивалась по ее способности активировать плазминоген в сыворотке крови человека. Активация плазминогена сопровождается появлением эстеразной активности, которая определялась по скорости гидролиза синтетического субстрата TAME. Образование продукта гидролиза ТА определялось с помощью ESI-MS в присутствии изотопномеченного ТА в качестве внутреннего стандарта. Все изотопомеры, использованные в качестве внутренних стандартов, были получены путем изотопного обмена карбоксилсодержащих продуктов (пептидов и тозиларгинина) в среде  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в присутствии ТФУ.

Кл. сл.: анализ лекарств, стрептокиназа, масс-спектрометрия

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время масс-спектрометрия широко используется для идентификации индивидуальных белков, которая осуществляется главным образом по пептидному картированию их триптического гидролизатов. Измеренные величины молекулярных масс пептидов в гидролизате сопоставляются с теоретическими значениями, полученными исходя из генетических данных для всевозможных белков [1, 2].

В последнее время помимо идентификации масс-спектрометрия начинает находить применение и для количественного определения белков [3–5]. В этом случае достаточно определить лишь концентрацию одного или нескольких пептидов, полученных при исчерпывающем специфическом гидролизе белка, которая вследствие эквимоларности тождественна молярной концентрации исходного белка. Такой подход обеспечивает абсолютную специфичность при анализе и исключает возможность ошибок, связанных с наличием белковых примесей.

Для функциональных белков, каковой является стрептокиназа, важной характеристикой является их активность. Вместе с тем оказывается, что активность таких препаратов может значительно

отличаться от декларируемой [6]. Эти отличия могут быть обусловлены возможной инактивацией белка на всех стадиях процесса получения или хранения препарата. Помимо этого расхождения могут быть обусловлены и методическими сложностями оценки активности. В значительной степени это связано с тем, что оценка активности стрептокиназы производится опосредованно по фибринолитической активности эквимолекулярного комплекса этого белка с плазминогеном [7]. Измеряется способность лизировать в определенных условиях сгусток фибрина, образованный смесью растворов фибриногена и тромбина с комплексом стрептокиназы и плазминогена, зачастую присутствующего в виде примеси в фибриногене. Как сама методика, так и используемые компоненты (в частности, содержание плазминогена в фибрине не регламентировано) также могут приводить к несопоставимости значений этой величины, определяемой таким образом.

Представляется более целесообразным использовать для определения активности стрептокиназы способность активировать плазминоген *in vitro* в донорской сыворотке крови по скорости гидролиза низкомолекулярного субстрата TAME. Поскольку диапазон концентраций плазминогена в сыворотке крови известен [8], то при внесении

стрептокиназы в более низких концентрациях изменение эстеразной активности окажется прямо пропорционально количеству комплекса активной формы белка с плазминогеном. Скорость гидролиза может быть оценена по накоплению продукта гидролиза ТА в присутствии его  $^{18}\text{O}$ -изотомера с использованием ESI-MS [9].

Все изотопмеры, использованные в качестве внутренних стандартов в настоящей работе, могут быть получены путем изотопного обмена карбоксилсодержащих продуктов (пептидов и тозиларгинина) в  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в присутствии ТФУ аналогично процедуре, описанной в работе [10].

Для масс-спектрометрического анализа использованы препараты, содержащие стрептокиназу от разных производителей: "Стрептокиназа Белмед-препараты", Беларусь (Стр-Бел); "Кабикиназа 20В", Швеция (Стр-К); "Стрептокиназа Behring Werke", Германия (Стр-BW).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех выбранных образцах лекарственных препаратов, использованных в настоящей работе, декларировано наличие стрептокиназы во флаконе в условных единицах активности (см. раздел "Материалы и методы").

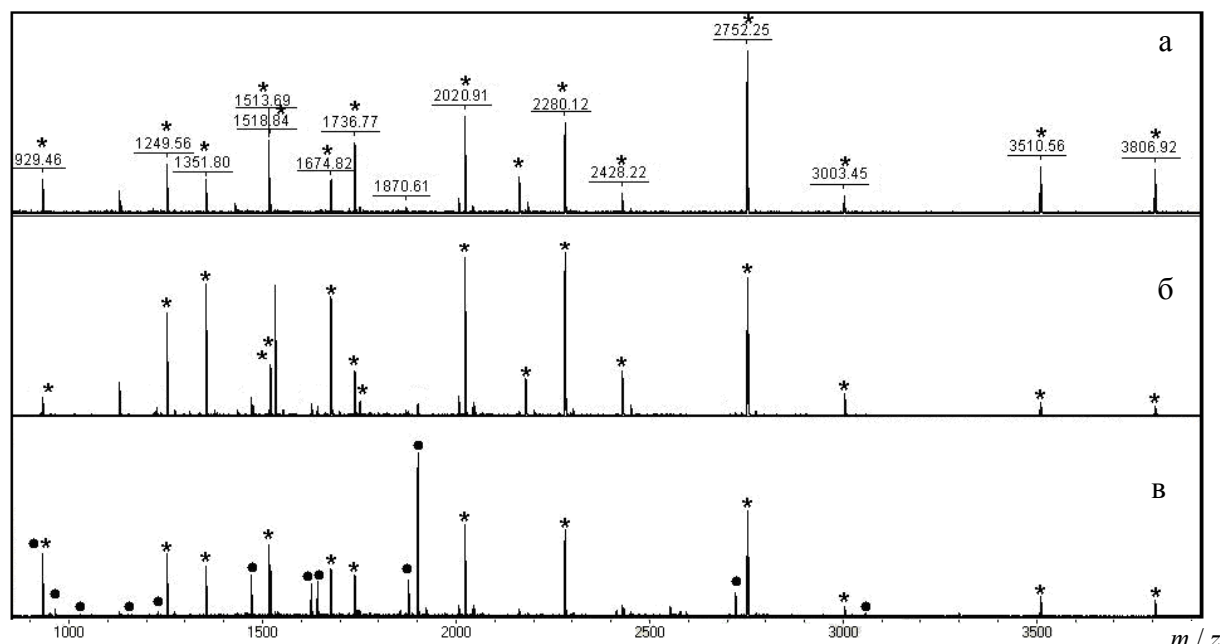
Для получения дополнительной характеристики этого белка и его свойств в настоящей работе

выбраны два масс-спектрометрических метода. С их помощью представлялось перспективным провести более полный сравнительный анализ выбранных препаратов: определить состав и сравнение аминокислотных последовательностей целевого белка, его содержание и относительную активность.

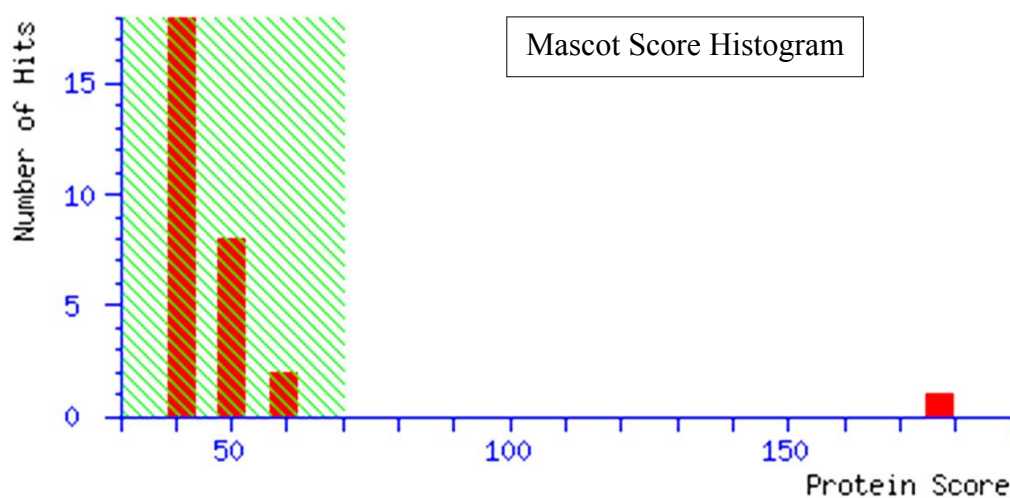
#### Пептидное картирование белков в препаратах с использованием MALDI-MS

Прежде всего образцы всех 3 препаратов были подвергнуты трипсинолизу и проанализированы с использованием MALDI-MS. Результаты масс-спектрометрического анализа гидролизатов представлены на рис. 1. Полученные масс-спектрометрические данные по всем образцам препаратов были использованы для идентификации в них белков методом пептидного картирования (peptide mass fingerprint, или "отпечатков пальцев").

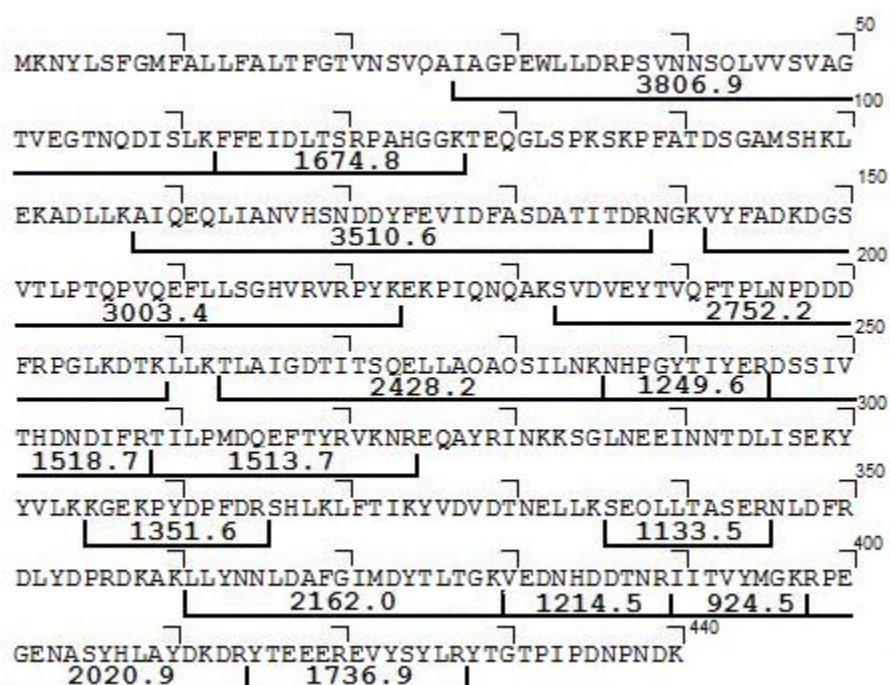
Идентификация масс-спектрометрических данных полученных гидролизатов проводилась в базе данных UniProtKB (SwissProt+TrEMBL). Поиск осуществлялся среди бактериальных белков (Bacteria) и белков Homo sapiens (Human) при помощи программы Mascot (matrixscience.com, США) с допущением окисления метионинов кислородом воздуха.



**Рис. 1.** MALDI масс-спектры триптических гидролизатов образцов лекарственных препаратов, содержащих стрептокиназу.  
а — Стр-Бел, б — Стр-BW, в — Стр-К



а



б

**Рис. 2.** Результаты обработки масс-спектрометрических данных пептидного картирования Стр-Бел. а — гистограмма и б — предложенная аминокислотная последовательность стрептокиназы. Для обнаруженных в масс-спектре пептидов отмечены моноизотопные массы ( $m/z$ ) и их положение в белке

В качестве примера на рис. 2 представлены результаты такого анализа для Стр-Бел по данным рис. 1, а, из которых следует, что в данном препарате с высоким score идентифицируется стрептокиназа с аминокислотной последовательностью рис. 2, б. Наличие других белковых компонентов в этом препарате не обнаружено. Вместе с тем из экспериментальных данных следует, что N-концевая последовательность начинается с 27-го аминокислотного остатка, что соответствует белку без

его предшественника. В спектре присутствует с высокой интенсивностью ион  $m/z = 3806.9$ , соответствующий аминокислотной последовательности 27–63.

Аналогичным образом проведен масс-спектрометрический анализ гидролизатов двух других образцов, который показал, что во всех образцах с хорошим score идентифицируется стрептокиназа с той же N-концевой последовательностью. Все пептиды этого белка, представленные в спектре

**Табл. 1.** Идентификация белков в препаратах стрептокиназы по данным MALDI-MS

№	Препарат	Белок	Score	Перекрытие, %	Количество идентифицированных пептидов
1	Стр-Бел	<i>Streptokinase C</i> C5WED5-1	177	67	19
2	Стр-BW	<i>Streptokinase C</i> C5WED5-1	100	70	19
3	Стр-К	<i>Streptokinase C</i> C5WED5-1	78	57	14
		<i>Serum albumin Homo sapiens</i>	71	34	17

**Табл. 2.** Характеристика препаратов, содержащих стрептокиназу

№	Препарат	D <sub>280</sub> *, о. е.		Содержание белка мг/(мг препарата)			Активность** стрептокиназы, у.е.
		Измерен.	Вычисл.	Белок	Стрептокиназа	Альбумин	
1	Стр-Бел	0.27	0.27	0.37	0.37	—	0.01
2	Стр-BW	0.14	0.14	0.21	0.21	—	0.11
3	Стр-К	0.22	0.22	0.425	0.095	0.33	0.15

\* — в растворе препарата с концентрацией 1 мг/мл

\*\* — превращение 1 мкмоль ТAME за 1 мин на 1 мг целевого белка — стрептокиназы

на рис. 1, отмечены знаком (\*) для каждого образца. Таким образом, из анализа данных по составу пептидных фрагментов следует, что стрептокиназа представлена белком если не идентичным, то белком с высокой гомологией. Отметим также, что обработка данных по пептидному картированию кабикиназы четко указала наличие в составе препарата альбумина человека, который, видимо, добавлен в качестве стабилизатора. Пептиды альбумина, представленные в спектре гидролизата кабикиназы на рис. 1, в, отмечены знаком (•). Результаты полной обработки масс-спектрометрических данных представлены в табл. 1.

#### Масс-спектрометрическое определение концентраций стрептокиназы

Для количественного определения стрептокиназы в препаратах использована масс-спектрометрия. Анализ основан на определении концентраций ряда индивидуальных пептидов, полученных при исчерпывающем триптическом гидролизе белков. В этом случае концентрация каждого из пептидов эквимолярна концентрации исходного белка.

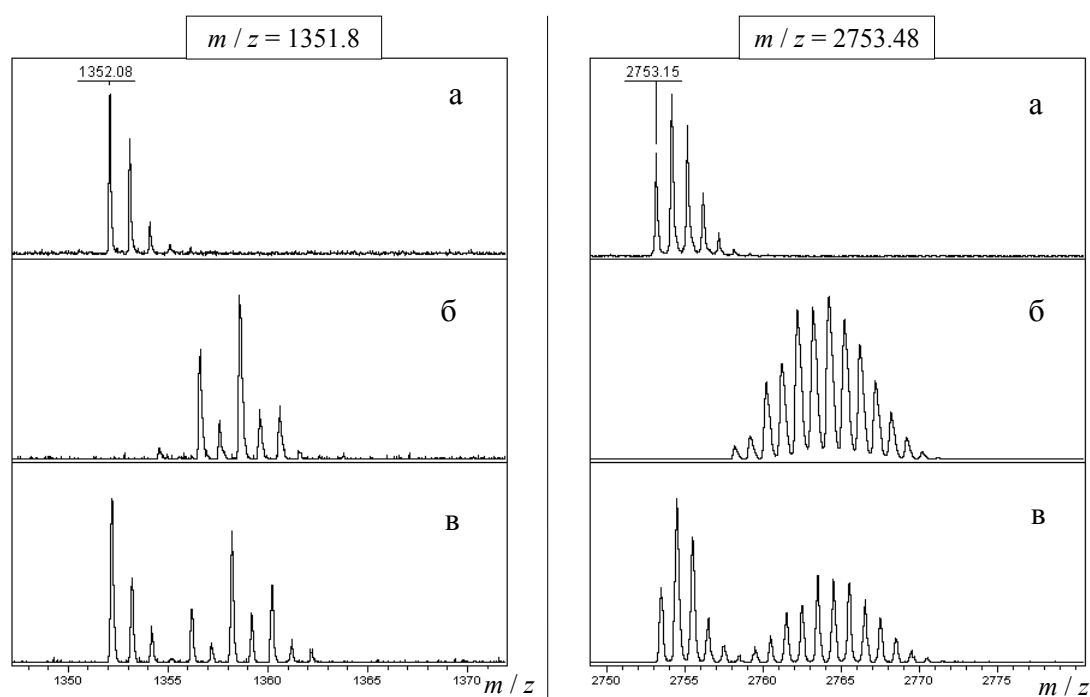
Концентрация каждого пептида может быть определена из соотношения интенсивностей анализируемого пептида и его изотопсодержащего

стандарта. Для этого из анализируемых белков с известной концентрацией были получены триптические гидролизаты, в которые путем изотопного обмена в кислой среде в присутствии H<sub>2</sub><sup>18</sup>O введены атомы <sup>18</sup>O. Полученные смеси изотопмеров пептидов были использованы в качестве внутренних стандартов. Отметим, что при таком подходе концентрация белка может быть вычислена сразу по нескольким пептидам, выбор которых определяется их достаточной интенсивностью, подходящим разделением в масс-спектрах выбранного пептида и его изотопомера и отсутствием наложения в спектре соседних пептидов.

Поскольку в гидролизатах всех препаратов набор наиболее интенсивных ионов пептидов для стрептокиназы примерно одинаков как по значению, так и по соотношению интенсивностей, то для их количественного определения возможно использование единого внутреннего стандарта. В качестве образца для получения стандарта стрептокиназы использован препарат Стр-Бел, который был предварительно гидролизован трипсином. Его исходная концентрация была оценена из спектрофотометрических данных отдельных тирозинсодержащих пептидов, по результатам хроматографического анализа и спектрофотометрическим данным исходного раствора белка.

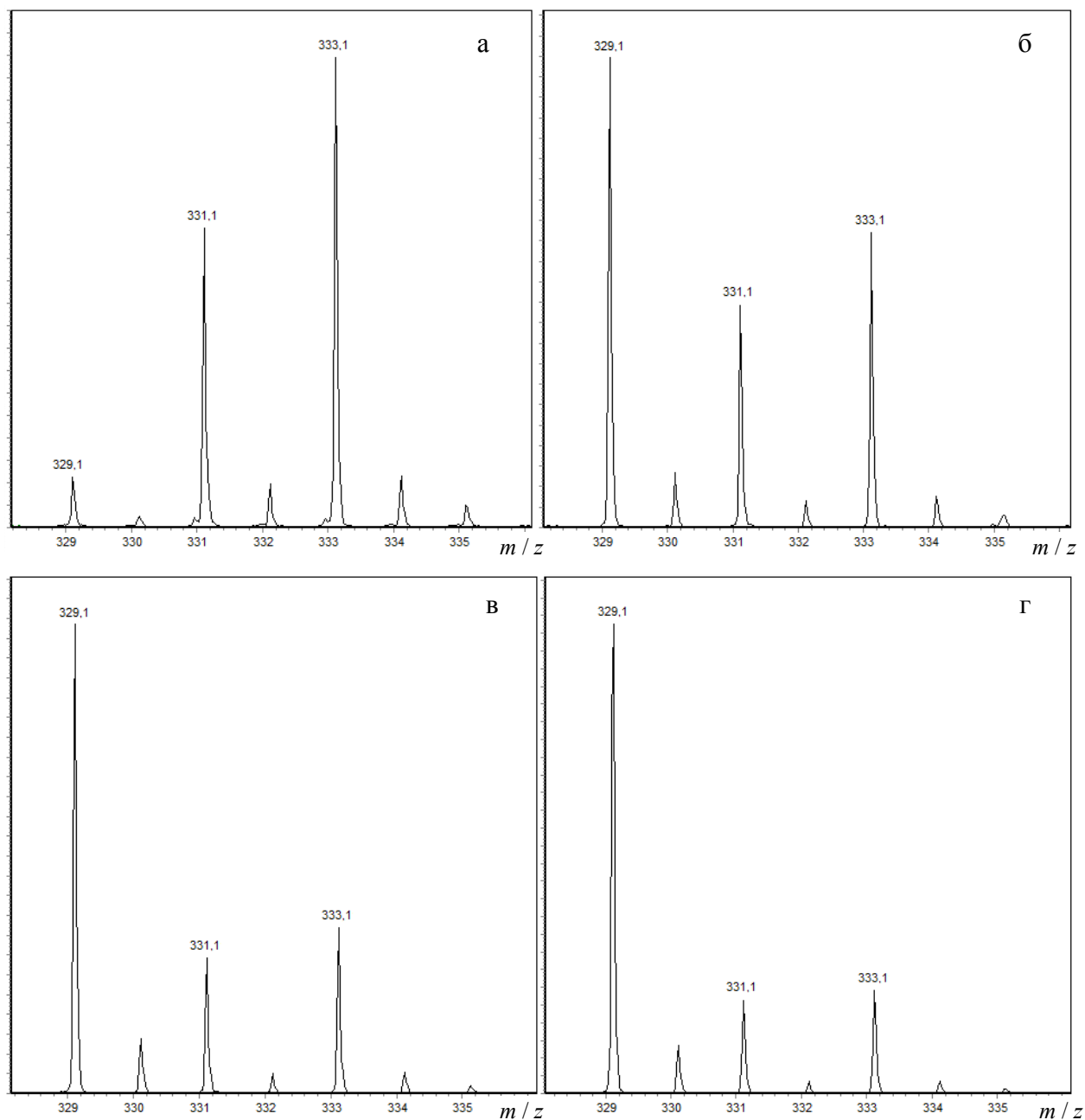
**Табл. 3.** Результаты масс-спектрометрической детекции стрептокиназы в смесях анализата и стандарта для препаратов

№	Пептид	$m/z$	$n_{\text{ср}}^{18\text{O}}$	Стрептокиназа, в % от стандарта		
				Стр-Бел	Стр-BW	Стр-К
1	<b>FFEIDLTSR</b>	1128	2.8	43	42	51
2	<b>KGEKPYDPFDR</b>	1352	2.8	44	45	51
3	<b>DGSVTLPTQPVQEFLLSGHVR</b>	2281	2.2	43	41	47
4	<b>SVDVEYTVQFTPLNPDDDFRPLK</b>	2753	4.5	45	42	55

**Рис. 3.** Фрагменты масс-спектров для двух пептидов с  $m/z = 1351.8$  и  $m/z = 2753.48$ . а, б — до и после (соответственно) введения изотопа  $^{18}\text{O}$ ; в — для смеси анализируемого образца и стандарта для Стр-Бел

Содержание белка по спектрофотометрическим данным, в том числе по тирозинсодержащему пептиду, рассчитывалось с использованием молекулярных коэффициентов экстинкции, представленных в программе GRMAW6:  $\epsilon_{280} = 33850 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$  и  $\epsilon_{280} = 1280 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$  соответственно. Было показано, что содержание белка в данном образце составляет с учетом его молекулярной массы 0.38 мг/(мг препарата). Результаты масс-спектрометрического определения концентрации стрептокиназы в различных препаратах представлены в табл. 2. Они основаны на серии масс-спектрометрических измерений изотопного распределения смесей анализируемых препаратов и их изотопомеров, используемых в качестве внутреннего стандарта. Соотношения весовых концентраций стандарта и анализатов Стр-Бел, Стр-BW и Стр-К

составляют соответственно 1 : 0.8, 1 : 1.3 и 1 : 4.1 в гидролизатах. Анализ проводился с использованием гидролизатов всех препаратов и единого для всех стандарта, концентрация которого была определена заранее по данным хроматографического и спектрофотометрического анализов Стр-Бел. Для анализа выбраны четыре пептида, изотопомеры которых максимальным образом отличаются от исходного изотопного распределения и не имеют наложений, обусловленных присутствием пептидов с перекрывающимися значениями  $m/z$  (см. табл. 3). В качестве примеров на рис. 3 представлены фрагменты масс-спектров для двух пептидов в гидролизате до (а), после введения изотопов, использованных в качестве стандартов (б), а также их смеси (в). Прежде всего отметим тот факт, что



**Рис. 4.** Масс-спектры продукта реакции ТА в смеси со стандартом. а — до реакции; б — 30 % превращения; в — 53 % превращения; г — 99 % превращения. Спектры были получены на приборе МХ-5310 с ионизацией типа электроспрей

полученные изомеры имеют достаточное количество атомов  $^{18}\text{O}$ , что практически приводит к разделению их по изотопному распределению с исходными пептидами. Рассчитанное среднее количество атомов  $^{18}\text{O}$  ( $n_{\text{cp}}$ ) для этих двух пептидов и двух других, использованных для анализа, представлено в табл. 3. Рассчитанные значения в процентах для трех смесей стандарта со всеми анализируемыми образцами препаратов стрепто-

киназы представлены в той же табл. 3. Отметим, что соотношения объемов анализируемого гидролизата и стандарта с известной концентрацией при получении смесей выбирались таким образом, чтобы соотношения максимальных интенсивностей изотопных ионов для аналита и стандарта в смеси были сопоставимы по величине.

Как показывают данные, представленные в табл. 3, для каждой смеси соотношения площадей

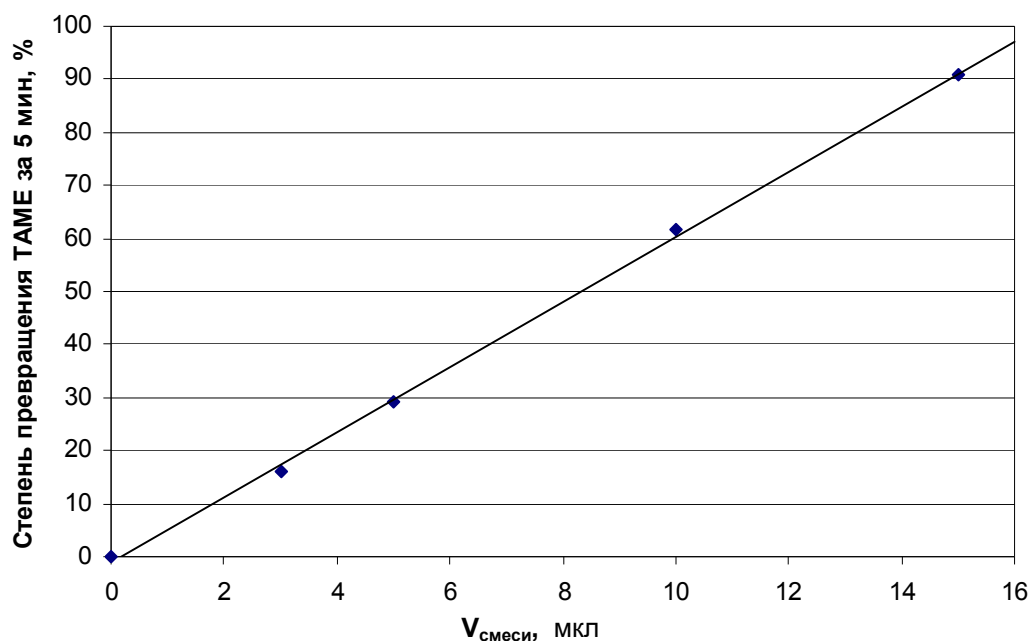


Рис. 5. Проверка пропорциональности степени превращения и добавляемой аликвоты (для Стр-К)

для аналита и стандарта близки по величине для всех 4 пептидов. Концентрация стрептокиназы, вычисленная для всех препаратов из среднего значения соотношения площадей, выбранных пептидов с учетом исходной концентрации стандарта и соотношения при смешивании представлена в табл. 2.

Для двух препаратов содержание стрептокиназы Бел. и BW, оцененное масс-спектрометрически, совпадает со спектрофотометрическими данными (см. табл. 2). Для кабикиназы, представляющей смесь белков, найденное масс-спектрометрически содержание целевого белка позволяет оценить количество альбумина в препарате по спектрофотометрическим данным, которые также представлены в табл. 2. Расчет проводился исходя из суммарной величины поглощения  $D_{280}$  за вычетом поглощения, которое соответствует определенной масс-спектрометрически концентрации стрептокиназы с использованием молекулярного коэффициента экстинкции для альбумина  $\epsilon_{280} = 30770 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  (программа GPMW6).

### Определение активности стрептокиназы

Как уже отмечалось во Введении, активность стрептокиназы в настоящей работе определяли по скорости гидролиза метилового эфира N-тозил-аргинина (ТАМЕ) в качестве субстрата. Скорость гидролиза ТАМЕ определялась масс-спектрометрически по накоплению продукта реакции — N-тозил-аргинина (ТА) с использованием изотомера ТА в качестве внутреннего стандарта (см.

рис. 4). Изотопмер ТА добавляли в количестве, составляющем 40 % от исходного количества субстрата. При анализе учитывалась скорость "спонтанного" гидролиза субстрата в сыворотке без добавления стрептокиназы. За 1 единицу активности (у.е.) принималось превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин на 1 мг целевого белка.

Экспериментально было показано (рис. 5), что в выбранном диапазоне концентраций скорость превращения прямо пропорциональна количеству вводимого препарата, причем эта скорость одинакова для обоих типов сывороток.

Измеренные таким образом значения удельной активности (в расчете на целевой белок) стрептокиназы для всех препаратов представлены в табл. 2. Из этих данных следует, что стрептокиназы, близкие по аминокислотной последовательности, существенным образом отличаются по активности. Наибольшей удельной активностью обладает Стр-К, а наименьшей Стр-Бел. Этот результат соответствует выводам работы [6], в которой отмечались значительные различия в активности препаратов от декларируемой.

### ВЫВОДЫ

Масс-спектрометрия позволяет выйти на новый уровень исследования белковых препаратов, который обеспечивает не только количественное определение состава многокомпонентных белковых смесей, но и функциональную активность индивидуальных компонентов. Для получения количественных



венных характеристик представляется перспективным использовать изотопомеры, которые могут быть получены для анализируемых соединений путем изотопного обмена с использованием  $H_2^{18}O$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали метиловый эфир *n*-(тозил)-аргинина (ТАМЕ) и *n*-(тозил)аргинин (ТА) фирмы "Sigma" (Германия); 90%  $H_2^{18}O$  производства "B.O.C. Limited" (Великобритания); трифторуксусную кислоту фирмы "Sigma" (Германия); 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Aldrich, США); трипсин Gold (Promega); препараты стрептокиназы: "Стрептокиназа" — Белмедпрепараты (Беларусь), "Кабикиназа" — Kabi Vitrum (Швеция), "Стрептокиназа" — Behring Werke (Германия).

**Триптический гидролиз белка** проводили следующим образом. К 10 мкл раствора каждого образца добавляли по 30 мкл 10% ТФУ для денатурации белков. Растворы термостатировали при 50°C 105 мин, затем высушивали на спидваке и перерастворяли в 10 мкл воды. К каждому образцу добавляли по 10 мкл трипсина с концентрацией 0.03 мг/мл в 0.1 М  $NH_4HCO_3$ . Гидролиз проводили в течение 20 ч при 37°C.

**Получение изотопомера N**-(тозил)-аргинина. Навеску 4.7 мг тозил-аргинина растворяли в смеси 50 мкл  $H_2^{18}O$  и 3 мкл ТФУ. Обмен проводили в течение 3 ч при 50°C. Раствор ТА высушивали на спидваке, перерастворяли в 50 мкл воды и использовали в качестве стандарта при определении активности стрептокиназы.

**Получение изотопомеров триптических пептидов стрептокиназы.** Для этого 10 мкл триптического гидролизата Стр-Бел высушивали и перерастворяли в 20 мкл 8% ТФУ в  $H_2^{18}O$ . Раствор термостатировали при 50°C 105 мин. Гидролизат после обмена высушивали на спидваке, перерастворяли в 40 мкл воды и использовали в качестве внутреннего стандарта для определения концентрации стрептокиназы.

**Подготовку образцов для масс-спектрометрии** проводили следующим образом: на мишени смешивали по 1 мкл раствора анализируемого образца и 0.3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (20 мг/мл в 20% ацетонитриле в воде с 0.5% ТФУ) и полученную смесь высушивали на воздухе.

**MALDI-масс-спектры** были получены на тандемном времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона.

**ESI-масс-спектры** были получены на времяпролетном масс-спектрометре MX-5310 с ортогональным вводом ионов, оборудованном электрораспылительным источником ионов (ESI-о-TOF) (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург). Все спектры получены в режиме съемки положительных ионов. Объем пробы 10–50 мкл, скорость подачи пробы 1–5 мкл/мин.

**Идентификацию белков** по "пептидному фингер-принту" осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков бактерий и человека с уче-

том возможного окисления метионинов кислородом воздуха.

**Спектрофотометрический анализ** проводили с использованием капельного спектрофотометра Cary 100 Scan.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Aebersold R., Mann M.* Mass spectrometry-based proteomics // *Nature*. 2003. V. 422. P. 198–207.
2. *Perkins D.N., Pappin D.J.C., Creasy D.M., Cottrell J.S.* Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data // *Electrophoresis*. 1999. V. 20, N 18. P. 3551–3567.
3. *Ong S.E., Mann M.* Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative // *Nature Chemical Biology*. 2005. N 1. P. 252–262.
4. *Yan W., Chen S.* Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling // *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. 2005. V. 4, N 1. P. 1–12.
5. *Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B.* Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 389, N 4. P. 1017–1031.
6. *Hermentin P., Cuesta-Linker T., Weisse J., et al.* Comparative analysis of the activity and content of different streptokinase preparations // *Eur. Heart J.* 2005. V. 26, N 9. P. 933–940.
7. *Jones A.J., Meunier A.M.* A precise and rapid microtitre plate clot lysis assay: methodology, kinetic modeling and measurement of catalytic constants for plasminogen activation during fibrinolysis // *Thromb. Haemost.* 1990. V. 64, N 3. P. 455–463.
8. *Leipnitz G., Miyashita C., Heiden M., et al.* Reference values and variability of plasminogen in healthy blood donors and its relation to parameters of the fibrinolytic system // *Haemostasis*. 1988. V. 18. P. 61–68.
9. *Манойлов А.В., Торопыгин И.Ю., Козьмин Ю.П. и др.* Клиническая протеомика: новые диагностические возможности масс-спектрометрии // *Научное приборостроение*. 2008. Т. 18, № 4. С. 16–23.
10. *Новиков А.В., Бубляев Р.А., Козьмин Ю.П. и др.* Способ получения изотопомодифицированных биоорганических соединений. Заявка на изобретение № 2008106883 с приоритетом от 13.02.2008.

*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Манойлов А.В., Новиков А.В., Бубляев Р.А., Миргородская О.А.)*

*Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва (Торопыгин И.Ю.)*

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва (Козьмин Ю.П.)*

*НИИ группа СЗО РАМН, Санкт-Петербург (Миргородская О.А.)*



Контакты: Бубляев Ростислав Анатольевич,  
Bub-slava@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 2.09.2010.

## COMPLEX ANALYSIS OF MEDICAL PRODUCTS CONTAINING STREPTOKINASE USING MASS-SPECTROMETRY

**A. V. Manoilov<sup>1</sup>, I. U. Toropigin<sup>2</sup>, U. P. Kozmin<sup>3</sup>, A. V. Novikov<sup>1</sup>,  
R. A. Boubliaev<sup>1</sup>, O. A. Mirgorodskaya<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

<sup>2</sup>*Institute of biomedical chemistry RAMS, Moscow*

<sup>3</sup>*Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow*

<sup>4</sup>*Institute of influenza RAMS, Saint-Petersburg*

The possibility of mass-spectrometry using for complex analysis of medical products containing streptokinase is showed. The protein composition and target protein – streptokinase - content are determined. The identification and quantitative estimation of streptokinase content were carrying out by MALDI-MS on exhaustive tryptic cleavage products. For the quantitative estimation, <sup>18</sup>O-isotopic tracers of streptokinase tryptic peptides with known concentration were added to the analysis samples as internal standard. The analyzable protein concentration was calculated on the intensities ratio of isotopic distribution of the analyzable protein and <sup>18</sup>O labeled internal standard. The streptokinase biological activity was estimated by its capability to activate plasminogen in human blood serum. The plasminogen activation is accompanied by the appearance of esterase activity which was determined by the cleavage rate of synthetic substrate TAME. The formation of hydrolytic cleavage product TA was determined with ESI-MS in the presence of radio labeled TA as an internal standard. All isotope tracers used as internal standards were obtained by isotopic exchange of products containing carboxyl (peptides and tozilarginin) in the medium H<sub>2</sub><sup>18</sup>O.

*Keywords:* analysis of medical products, streptokinase, mass-spectrometry