

ФАРМАКОЛОГИЯ И ФАРМАЦИЯ PHARMACOLOGY AND PHARMACY

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОНОАМИНОВЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В ТКАНЯХ МОЗГА КРЫС С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ-МС/МС

РЕЗЮМЕ

Хохлов А.Л.^{1,2},
Яичков И.И.^{1,2},
Корсаков М.К.¹,
Каграманян И.Н.³,
Вольхин Н.Н.¹,
Петухов С.С.^{1,2},
Зайкова В.Е.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского» (150010, г. Ярославль, ул. Технопарковая, 11/2, Россия)

² ФГБОУ ВО «Ярославский государственные медицинский университет» Минздрава России (150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5, Россия)

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, г. Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, Россия)

Автор, ответственный за переписку:

Яичков Илья Игоревич,
e-mail: ilya_1993_08@mail.ru

Обоснование. Определение изменения содержания моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в структурах головного мозга является необходимой частью изучения фармакодинамики противопаркинсонических лекарственных средств. Методика совместного определения норадреналина, адреналина, допамина, серотонина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, гомованилиновой кислоты, ванилилминдальной кислоты в тканях мозга крыс ранее не была разработана. Цель исследования. Разработка и валидация методики количественного определения норадреналина, адреналина, допамина, серотонина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, гомованилиновой кислоты, ванилилминдальной кислоты в тканях мозга крыс с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Методы. Методика определения моноаминовых медиаторов и их метаболитов разработана с применением метода ВЭЖХ-МС/МС. Гомогенаты тканей мозга готовились с помощью механического ручного гомогенизатора. Изучено влияние различных антиоксидантов на стабильность норадреналина, адреналина, допамина и 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты в испытуемых образцах.

Результаты. Хроматографическое разделение компонентов пробы осуществлялось с помощью двух хроматографических колонок Synergi Max RP (20 × 2,0 мм, 2,5 мкм) и Synergi Fusion RP 80Å (250 × 4,6 мм, 4 мкм). Элюирование проводили в градиентном режиме с применением подвижной фазы на основе метанола и 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в воде. Для подготовки проб гомогенатов использовалось разведение образцов раствором внутренних стандартов в метаноле. В качестве стабилизатора-антиоксиданта был выбран 5%-й водный раствор аскорбиновой кислоты.

Заключение. Разработанная методика прошла полную валидацию и соответствует требованиям российских и международных руководств. Выбранный способ стабилизации позволяет хранить образцы гомогенатов мозга в течение 30 дней после отбора.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС, моноаминовые нейромедиаторы, ткани мозга, стабилизация образцов

Для цитирования: Хохлов А.Л., Яичков И.И., Корсаков М.К., Каграманян И.Н., Вольхин Н.Н., Петухов С.С., Зайкова В.Е. Разработка и валидация методики количественного определения моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов в тканях мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(1): 177-191. doi: 10.29413/ABS.2024-9.1.18

Статья поступила: 24.07.2023

Статья принята: 19.01.2024

Статья опубликована: 26.03.2024

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF MONOAMINE NEUROTRANSMITTERS AND THEIR METABOLITES IN RAT BRAIN TISSUE USING HPLC-MS/MS

Khokhlov A.L.^{1,2},
Yaichkov I.I.^{1,2},
Korsakov M.K.¹,
Kagramanyan I.N.³,
Volkhin N.N.¹,
Petukhov S.S.^{1,2},
Zaikova V.E.^{1,2}

¹ Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky (Tekhnoparkovaya str. 11/2, Yaroslavl 150010, Russian Federation)

² Yaroslavl State Medical University (Revolutsionnaya str. 5, Yaroslavl 150000, Russian Federation)

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (Bolshaya Pirogovskaya str. 2, build. 4, Moscow 119991 Russian Federation)

Corresponding author:
Ilya I. Yaichkov,
e-mail: ilya_1993_08@mail.ru

ABSTRACT

Background. Determining changes in the content of monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain structures is a necessary part of studying the pharmacodynamics of antiparkinsonian drugs. A method for the joint determination of norepinephrine, adrenaline, dopamine, serotonin, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, vanillylmandelic acid in rat brain tissue has not previously been developed.

The aim of the study. To develop and to validate a method for the quantitative determination of norepinephrine, adrenaline, dopamine, serotonin, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, vanillylmandelic acid in rat brain tissue using high-performance liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

Materials and methods. A method for determining monoamine mediators and their metabolites was developed using the HPLC-MS/MS method. Brain tissue homogenates were prepared using a mechanical hand-operated homogenizer. The effect of various antioxidants on the stability of norepinephrine, adrenaline, dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in the test samples was studied.

Results. Chromatographic separation of sample components was carried out using two Synergi Max RP (20 × 2.0 mm, 2.5 μm) and Synergi Fusion RP 80 Å (250 × 4.6 mm, 4 μm) chromatographic columns. Elution was carried out in a gradient mode using a mobile phase based on methanol and a 0.1% solution of formic acid in water. To prepare homogenate batches, the samples were diluted with a solution of internal standards in methanol. A 5% aqueous solution of ascorbic acid was chosen as an antioxidant stabilizer.

Conclusion. The developed methodology has been fully validated and meets the requirements of Russian and international guidelines. The chosen stabilization method allows samples of brain homogenates to be stored for 30 days after collection.

Key words: HPLC-MS/MS, monoamine neurotransmitters, brain tissue, sample stabilization

Received: 24.07.2023
Accepted: 19.01.2024
Published: 26.03.2024

For citation: Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Korsakov M.K., Kagramanyan I.N., Volkhin N.N., Petukhov S.S., Zaikova V.E. Development and validation of a method for the quantitative determination of monoamine neurotransmitters and their metabolites in rat brain tissue using HPLC-MS/MS. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(1): 177-191. doi: 10.29413/ABS.2024-9.1.18

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона является нейродегенеративным заболеванием, при котором происходит снижение численности дофаминергических нейронов в чёрной субстанции, что приводит к уменьшению концентрации допамина (Dop) в стриатуме. Это вызывает классические двигательные симптомы – ригидность, нарушения осанки, акинезию, тремор, брадикинезию. Большинство существующих моделей данного заболевания предполагают использование крыс в качестве подопытных животных [1]. При изучении фармакодинамики новых противопаркинсонических лекарственных средств (ЛС) требуется количественное определение допамина и его основных метаболитов – 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid) и гомованилиновой кислоты (3-метокси-4-гидроксифенилуксусной кислоты; HVA, homovanillic acid) в стриатуме. Одной из перспективных групп ЛС, применяемых при лечении болезни Паркинсона, являются ингибиторы фермента MAO-B, который селективно катализирует окисление допамина. С целью исследования влияния данных ЛС на активность MAO-A необходимо измерять концентрацию норадреналина (NA, noradrenaline), серотонина (5HT, 5-hydroxytryptamine) и его метаболита (5-гидроксииндол-3-ил)-уксусной кислоты (5HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid) [1, 2]. Для контроля правильности отбора проб мозга и стриатума и отсутствия контаминации частицами крови и других тканей необходимо контролировать содержание в пробах адреналина (Adr) и ванилилминдальной кислоты (2-гидрокси-2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-уксусной кислоты; VMA, vanillylmandelic acid), которые в норме не должны быть обнаружены в данных образцах [3–7].

Для количественного определения перечисленных выше аналитов в биологических объектах применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию со спектрофотометрическим (ВЭЖХ-УФ) [8], электрохимическим (ВЭЖХ-ЭД) [9–12] и tandemным масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС) [2, 5–7, 13–20]. Однако методика совместного анализа всех восьми изучаемых веществ в структурах головного мозга ранее не была опубликована. Процесс разработки данной методики осложнён тем, что норадреналин, адреналин, допамин и DOPAC содержат в своей структуре пирокатехиновый фрагмент, что способствует их быстрому окислению в образцах за счёт взаимодействия с эндогенными веществами и кислородом воздуха [4, 21]. Для предотвращения деградации этих соединений требуется добавление к пробам растворов антиоксидантов. На необходимость применения стабилизатора указано только в работах J. Lu и соавт. [2], J. Thomas и соавт. [8], G. Cannazza и соавт. [12], C. Ji и соавт. [15], A. Kovacs и соавт. [17]. Поэтому выбор оптимальных условий стабилизации и хранения отобранных тканей головного мозга крыс также является актуальным для обеспечения достоверности результатов доклинических исследований.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка и валидация методики совместного количественного определения норадреналина, адреналина, допамина, серотонина, 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, гомованилиновой кислоты, ванилилминдальной кислоты в тканях мозга крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

На первом этапе исследования осуществлялся выбор оптимальных условий подготовки проб гомогената, а также параметров хромато-масс-спектрометрического определения. Затем производился подбор стабилизатора-антиоксиданта для предотвращения деградации норадреналина, адреналина, допамина и DOPAC. Далее оценивались матричные эффекты методики. На основании полученных результатов была выполнена коррекция объёмного соотношения растворителя и ткани при приготовлении гомогенатов. На следующем этапе проводилась полная валидация биоаналитической методики. Затем осуществлялась её апробация путём анализа проб стриатума шести интактных линейных крыс-самцов породы Wistar массой 362 ± 25 г (среднее значение \pm стандартное отклонение (SD, standard deviation)). Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 2 от 23.03.2023).

Оборудование

Разработка и валидация методики проводилась на ВЭЖХ-МС/МС-системе, включающей в себя гибридный tandemный масс-спектрометр QTRAP5500 (SCIEX, Канада) и хроматограф 1260 Infinity (Agilent, США) (насос G1312B, автосемплер G1329B с термостатом G1330B, термостат колонок G1316A).

Реактивы

Метанол (кат. № 1060352500; Merck KGaA, Германия) и муравьиная кислота (кат. № A117-50; Thermo Fisher Scientific, США) качества «HPLC-MS-Grade» применяли для приготовления подвижной фазы. Субстанции аскорбиновой кислоты (х. ч.; кат. № 160003; АО «Ленреактив», Россия), натрия сульфита (ч. д. а.; кат. № 130231; АО «Ленреактив», Россия), натрия тиосульфата пентагидрата (кат. № SO07270500; Scharlau, Испания), натрия пиросульфита (ч.; кат. № 8.06.00804; АО «Химреактивснаб», США) были апробированы в качестве антиоксидантов. В качестве стандартных образцов определяемых веществ использовались вторичные стандартные образцы производства Sigma Aldrich (США): норадреналин (кат. № A7257-1G), адреналина гидрохлорид (кат. № E4642-5G), серотонин (кат. № 14927-25MG), допамина гидрохлорид (кат. № H8502-5G), (5-гидроксииндол-3-ил)-уксусная кислота (кат. № H8876-1G), 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота (кат. № 850217-1G), гомованилиновая кислота (кат. № H1252-1G), ванилилминдальная кислота (кат. № H0131-1G). Для пригото-

ния раствора внутренних стандартов (ВС) применяли субстанцию 3,4-дигидроксибензиламина гидробромида (3,4-

DHBA) (кат. № 858781-1G) и фармакопейный стандартный образец соталола (USP; кат. № 1617408) (рис. 1).

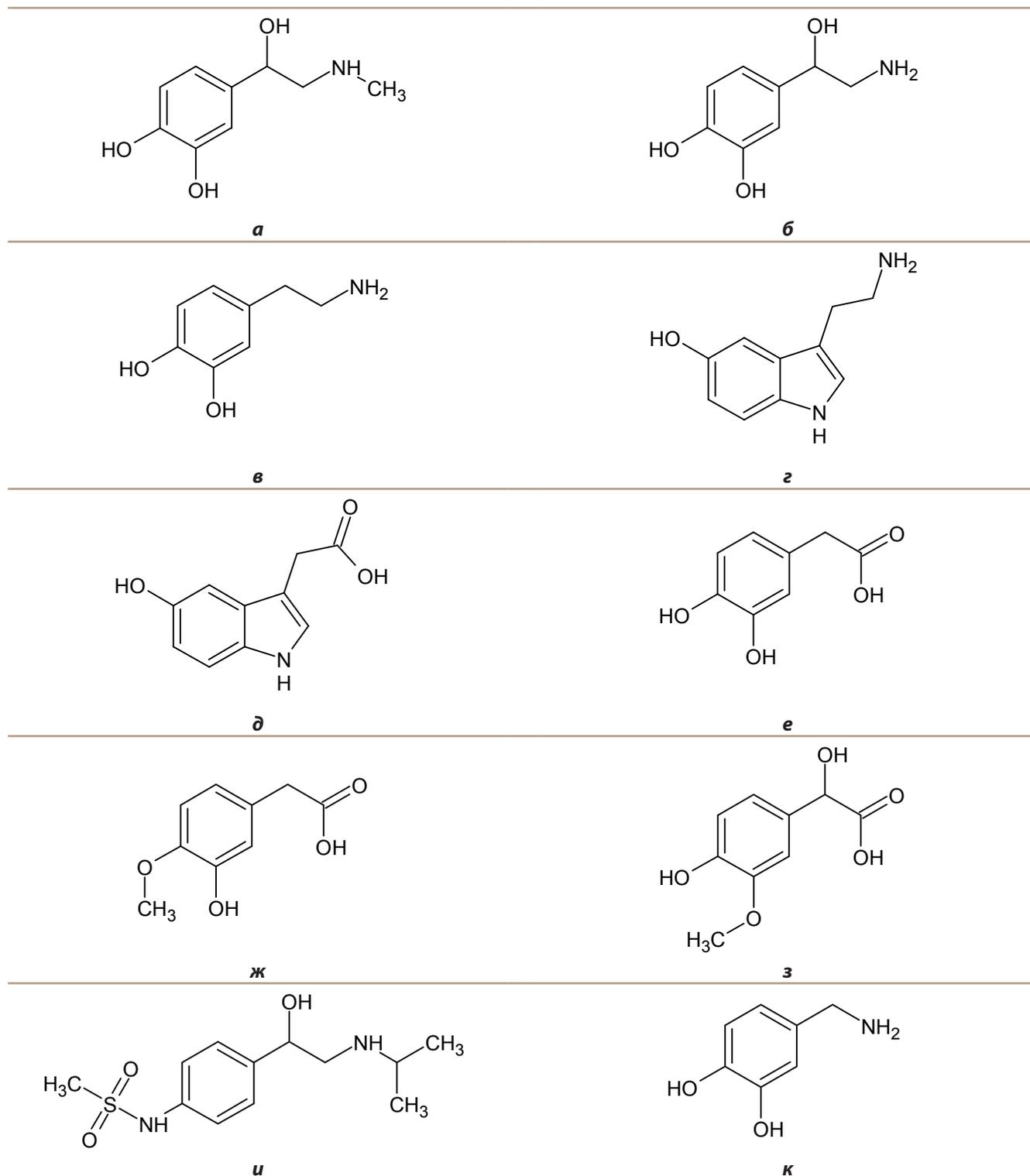


РИС. 1.

Структурные формулы адреналина (а), норадреналина (б), допамина (в), серотонина (г), (5-гидроксииндол-3-ил)-уксусной кислоты (д), 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (е), гомованилиновой кислоты (ж), ванилминдальной кислоты (з) и внутренних стандартов соталола (и) и 3,4-дигидроксибензиламина (к)

FIG. 1.

Chemical structure of adrenaline (a), noradrenaline (б), dopamine (в), serotonin (г), (5-hydroxyindol-3-yl)-acetic acid (д), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (е), homovanillic acid (ж), vanillylmandelic acid (з) and internal standards of sotalol (и) and 3,4-dihydroxybenzylamine (к)

Методика хромато-масс-спектрометрического определения

Хроматографическое разделение проводили при градиентном режиме на двух колонках Synergi Max RP (20 × 2,0 мм, 2,5 мкм) и Synergi Fusion RP 80Å (250 × 4,6 мм, 4 мкм), используя в качестве компонентов подвижной фазы 0,1%-й водный раствор муравьиной кислоты и метанол (табл. 1). Данные обращённо-фазовые колонки имели дополнительные гидрофильные функциональные группы, необходимые для удерживания полярных катехоламинов. Температура термостата колонок составляла 40 °С.

**ТАБЛИЦА 1
ПАРАМЕТРЫ ГРАДИЕНТНОГО ЭЛЮИРОВАНИЯ
TABLE 1
THE PARAMETERS OF GRADIENT ELUTION**

Время, мин	Скорость потока, мкл/мин	A, %	B, %
0,0	650	98	2
2,0	650	98	2
9,0	650	20	80
14,1	650	20	80
14,5	1000	20	80
15,0	1000	20	80
15,1	1000	98	2
19,0	1000	98	2
19,2	650	98	2
21,0	650	98	2

Примечание. Подвижная фаза: А – 0,1%-й водный раствор муравьиной кислоты; В – метанол.

Детектирование проводилось в режиме MRM (multiple reaction monitoring) (табл. 2) с применением электрораспылительной ионизации (ESI, electrospray ionization). Определение NA, Adr, Dop, 5HT, 5HTAA, а также 3,4-DHBA осуществлялось в положительной полярности; DOPAC, HVA, VMA – в отрицательной полярности. Соталол детектировался в обоих полярностях: в положительной – для расчёта концентрации 5HT и 5HTAA; в отрицательной – для расчёта концентрации DOPAC, HVA и VMA. Данное соединение было использовано из-за структурного сходства с катехоламинами и близости его времени удерживания (10,4 мин) к временам удерживания 5HT (10,1 мин), 5HTAA (12,4 мин), DOPAC (11,9 мин), HVA (12,9 мин) и VMA (10,8 мин). В качестве внутреннего стандарта для определения норадrenalина, адреналина и допамина применялся 3,4-DHBA. Его выбор основан на ранее опубликованных методиках количественного определения данных аналитов [9–12].

Параметры валидации методики

Полная валидация методики проводилась согласно требованиям руководства по валидации биоаналитических методов (M10) Международного совета по гармонизации (ICH, International Council on Harmonisation) [22], руководства Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA, Food and Drug Administration) [23], руководства (том 1) ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (НЦЭСМП) [24] и Решения Совета Евразийской экономической комиссии (ЕАК) № 85 (приложение 5) [25] к хроматографическим методикам. Модельные смеси гомогенатов готовились из образцов цельного мозга и образцов стриатума крыс породы Wistar. Данные объекты помещались в пред-

**ТАБЛИЦА 2
ПАРАМЕТРЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ**

№	Аналит	Полярность	Напряжение ESI, В	MRM-переход		DP	EP	CE	CXP
				Q1	Q3				
1	Adr	+	4500	184,0	77,0	60	10	45	25
2	NA	+	4500	170,0	77,0	60	10	40	25
3	Dop	+	4500	154,0	119,0	60	10	35	25
4	5HT	+	4500	177,0	160,0	60	10	30	25
5	5HTAA	+	4500	192,0	146,0	60	10	20	13
6	DOPAC	-	-4500	167,0	123,0	-60	-10	-10	-30
7	HVA	-	-4500	181,0	122,0	-60	-10	-20	-25
8	VMA	-	-4500	197,0	137,0	-60	-10	-25	-30
9	3,4-DHBA	+	4500	140,0	77,0	60	10	25	25
10	Sot	+	4500	273,0	133,0	60	10	80	13
		-	-4500	271,0	174,0	-60	-10	-40	-16

Примечание. Sot – соталол; DP – потенциал декластеризации (decluster potential); EP – входной потенциал (entrance potential); CE – энергия соударения (collision energy); CXP – потенциал на выходе из ячейки соударения (collision cell exit potential).

**TABLE 2
THE PARAMETERS OF MASS SPECTROMETRY DETECTION**

ТАБЛИЦА 3
КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛИБРОВочНЫХ ОБРАЗЦОВ
И ОБРАЗЦОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Обозначение	Концентрация, нг/г							
	NA	Adr	Dop	5HT	DOPAC	5HTAA	HVA	VMA
K1 (LLOQ)	50	50	1250	75	200,0	150	80	67,50
K2	100	100	2500	150	400,0	300	160	135,00
K3	200	200	5000	300	800,0	600	320	270,00
K4	300	300	7500	450	1200,0	900	480	405,00
K5	400	400	10000	600	1600,0	1200	640	540,00
K6	600	600	15000	900	2400,0	1800	960	810,00
K7	900	900	22500	1350	3600,0	2700	1440	1215,00
K8	1200	1200	30000	1800,0	4800	3600	1920	1620,00
LQC	150	150	3750	225,0	600	450	240	202,50
MQC	500	500	12500	750,0	2000	1500	800	675,00
HQC	975	975	24375	1462,5	3900	2925	1560	1316,25
Dil	1800	1800	45000	2700,0	7200	5400	2880	2430

Примечание. Dil – концентрация для оценки эффекта разведения; K – калибровочная концентрация.

варительно тарированную пробирку ручного гомогенизатора и после добавления растворителя в нужном объёме гомогенизировались. После центрифугирования к надосадочной жидкости добавляли стандартный раствор смеси аналитов из расчёта 10 мкл стандартного раствора на 190 мкл супернатанта. Для изучения селективности методики (см. серию 1 в таблице 6), а также эффекта разведения проб использовались образцы мозга, хранившиеся в течение 2 лет при температуре не выше -20°C , в которых аналитический сигнал аналитов отсутствовал. Оценка линейности проводилась на 8 уровнях концентраций (K1–K8), правильности и прецизионности – на 4 уровнях концентрации (на нижнем пределе количественного определения (LLOQ, lower limit of quantitation), нижнем (LQC, lower quality control), среднем (MQC, middle quality control) и верхнем (HQC, higher quality control) уровнях контроля качества), эффекта разведения – на одном уровне (Dil) (табл. 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальном этапе разработки в качестве растворителя для приготовления гомогенатов был выбран метанол, т. к. при использовании воды на хроматограммах отсутствовал пик NA (время удерживания $t_R = 4,7$ мин), а при использовании ацетонитрила его соотношение «сигнал/шум» (S/N, signal/noise) было в 10 раз ниже (106/1). Образцы готовились с помощью ручного гомогенизатора путём добавления растворите-

TABLE 3
CONCENTRATION OF CALIBRATION AND QUALITY
CONTROL SAMPLES

ля из расчёта 3 мкл растворителя на 1 мг тканей мозга¹. Затем гомогенаты центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об./мин и к 190 мкл супернатанта добавляли 10 мкл метанольного стандартного раствора с концентрацией K4 (табл. 3). К 50 мкл полученной пробы добавляли 120 мкл метанольного раствора смеси внутренних стандартов соталола и 3,4-DHBA. Смесь перемешивали на шейкере в течение 30 с, а затем центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об./мин.

На следующем этапе осуществлялся подбор раствора антиоксиданта (АО) путём изучения краткосрочной стабильности (STS, short-term stability) NA, Adr, Dop и DOPAC в образцах гомогенатов мозга, а также стабильности данных аналитов в приготовленных образцах в автосемплере (ASS, autosampler stability). В качестве стабилизатора применяли водные растворы аскорбиновой кислоты, натрия сульфита, натрия метабисульфита, натрия тиосульфата в концентрациях 5 и 10 % [21]. Раствор антиоксиданта добавлялся из расчёта 10 мкл раствора на 50 мкл гомогената. Результаты испытания приведены в таблице 4.

При добавлении растворов натрия сульфита и натрия тиосульфата не удалось предотвратить окисление всех аналитов (табл. 4). Так, при применении растворов Na_2SO_3 только концентрация DOPAC укладывалась в требуемый диапазон 85–115 % от исходного значения. Использование раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в концентрации 5 %

¹ Пробу ткани взвешивали в предварительно тарированной пробирке гомогенизатора, а затем добавляли к ней метанол в нужном количестве: например, при массе ткани 100 мг к ней добавляли 300 мкл метанола.

ТАБЛИЦА 4
РЕЗУЛЬТАТЫ ПОДБОРА
СТАБИЛИЗАТОРА-АНТИОКСИДАНТА

TABLE 4
THE RESULTS OF THE ANTIOXIDANT STABILIZER
SELECTION

		Антиоксидант							
		Без АО (n = 2)	Аскорбиновая кислота		Na ₂ S ₂ O ₃		Na ₂ SO ₃		
			5 % (n = 2)	10 % (n = 2)	5 % (n = 2)	10 % (n = 2)	5 % (n = 2)	10 % (n = 2)	
Гомогенат в метаноле 1:3 (масса/об.)	NA	ASS (+4 °C, 24 ч)	56,24	109,55	100,12	87,24	96,82	74,82	71,43
		STS (комнатная температура, 24 ч)	49,02	91,02	114,71	100,48	103,19	78,18	77,61
	Adr	ASS (+4 °C, 24 ч)	62,01	97,66	101,95	74,99	79,85	71,44	48,92
		STS (комнатная температура, 24 ч)	59,52	102,19	112,68	34,19	62,90	22,20	38,45
	Dop	ASS (+4 °C, 24 ч)	39,28	105,03	96,62	92,53	N/A	83,01	N/A
		STS (комнатная температура, 24 ч)	35,21	101,39	95,96	54,65	N/A	48,12	N/A
DOPAC	ASS (+4 °C, 24 ч)	78,26	107,21	97,88	93,37	87,44	94,24	90,94	
	STS (комнатная температура, 24 ч)	72,42	107,52	100,55	78,27	87,18	92,37	94,51	
Гомогенат в метаноле 1:7 (масса/об.)	NA	ASS (+4 °C, 24 ч)	90,00	90,15	–	–	–	–	–
		STS (комнатная температура, 24 ч)	75,45	97,35	–	–	–	–	–
	Adr	ASS (+4 °C, 24 ч)	70,73	95,98	–	–	–	–	–
		STS (комнатная температура, 24 ч)	23,17	100,57	–	–	–	–	–
	Dop	ASS (+4 °C, 24 ч)	88,31	103,93	–	–	–	–	–
		STS (комнатная температура, 24 ч)	49,93	98,61	–	–	–	–	–
DOPAC	ASS (+4 °C, 24 ч)	95,55	97,28	–	–	–	–	–	
	STS (комнатная температура, 24 ч)	90,24	95,10	–	–	–	–	–	

Примечание. N/A – отсутствие хроматографического пика аналита.

позволило предупредить окисление норадреналина, а также дофамина и DOPAC в приготовленных образцах в автосемплере. В образцах с добавкой 10%-х растворов Na₂S₂O₃ и Na₂SO₃ хроматографический пик Dop не был обнаружен. При добавлении растворов натрия метабисульфита к метанольным гомогенатам данная соль выпадала в осадок, поэтому эти образцы не анализировались. Только при применении аскорбиновой кислоты концентрация всех аналитов при испытаниях краткосрочной стабильности и стабильности в автосемплере соответствовала установленным требованиям. Для дальнейших испытаний был выбран водный раствор аскорбиновой кислоты наименьшей концентрации 5 %, чтобы минимизировать риск загрязнения хроматографической колонки, источника ионов и ионной оптики масс-спектрометра избыточным количеством данного вещества.

На следующем этапе исследования проводилось изучение матричных эффектов. Для приготовления модельных смесей использовали гомогенаты свежееотобранного мозга крысы, гомогенаты свежееотобранного стриатума и гомогенаты мозга, хранившиеся в течение 2 лет при температуре не выше –20 °C, полученные от 6 разных животных. Согласно требованиям российских и зарубежных руководств по валидации биоаналитических методик [23–25], анализировалась по 6 образцов на уровне концентраций LQC и HQC (см. табл. 3), а также проба каждого гомогената без добавки стандарта для вычитания сигнала эндогенных веществ (табл. 5).

При первоначальных условиях подготовки проб величина коэффициент вариации (CV, coefficient of variation) нормализованного фактора матрицы (NMF, normal matrix factorization) при определении 5HT

ТАБЛИЦА 5
ОЦЕНКА ЭФФЕКТА МАТРИЦЫ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ
АНАЛИТОВ В ГОМОГЕНАТАХ МОЗГА

TABLE 5
ASSESSING THE MATRIX EFFECT WHEN DETERMINING
THE ANALYTES IN BRAIN HOMOGENATES

	Аналиты		Гомогенат в соотношении 1:3	Гомогенат в соотношении 1:7
CV (NMF), %	NA	LQC	13,48	11,39
		HQC	14,09	4,80
	Adr	LQC	13,94	7,46
		HQC	12,76	10,56
	Dop	LQC	8,95	6,07
		HQC	5,15	7,29
	5HT	LQC	13,98	5,93
		HQC	17,69	4,37
	5HIAA	LQC	11,14	9,77
		HQC	6,25	5,23
	DOPAC	LQC	26,82	7,89
		HQC	21,38	7,49
	HVA	LQC	11,10	5,37
		HQC	11,95	8,65
	VMA	LQC	10,90	8,37
		HQC	10,31	5,07
Соотношение площадей пиков «аналит/ внутренний стандарт» (среднее значение)	5HT (гомогенат мозга) (n = 4)	LQC	0,183	0,135
		HQC	1,464	0,956
	5HT (гомогенат стриатума) (n = 2)	LQC	0,142	0,132
		HQC	1,021	0,940
	DOPAC (гомогенат мозга) (n = 4)	LQC	4,635	2,223
		HQC	33,255	15,538
	DOPAC (гомогенат стриатума) (n = 2)	LQC	2,701	2,115
		HQC	22,502	15,327

Примечание. CV (NMF) – коэффициент вариации нормализованного фактора матрицы (coefficient of variation for normal matrix factorization).

и DOPAC превышала допустимый предел в 15 % (табл. 5). Для снижения матричных эффектов было изменено соотношение метанола и тканей мозга при приготовлении гомогенатов: проба готовилась из расчёта 7 мкл растворителя на 1 мг ткани. При данных условиях подготовки проб результат CV (NMF) отвечал установленным требованиям для всех аналитов. Далее была повторно проверена стабильность NA, Adr, Dop и DOPAC в образцах метанольного гомогената, приготовленного в соотношении 1:7, с применением выбранного ранее 5%-го водного раствора аскорбиновой кислоты (см. табл. 4). Концентрации всех аналитов при испытаниях ASS и STS укладывались в допустимый диапазон 85,0–115,0% от исходного значения.

Таким образом, для количественного определения концентрации изучаемых веществ в тканях мозга гомогенат готовился вручную в соотношении 1:7 (масса ткани/ объём метанола). Далее пробу центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об./мин. И стабилизировали водным раствором аскорбиновой кислоты в концентрации 5 % из расчёта 10 мкл раствора на 50 мкл супернатанта. Затем к 60 мкл смеси добавляли 120 мкл метанольного раствора внутренних стандартов, перемешивали в течение 30 с и центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об./мин. Надосадочную жидкость переносили в микровставку и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

После выбора окончательных условий подготовки проб и хромато-масс-спектрометрического определе-

ния проводилась полная валидация методики. Аналитический диапазон для Adr и NA составил 50–1200 нг/г, для Dop – 1,25–30,00 мкг/г, для 5HT – 75–1800 нг/г, для DOPAC – 200–4800 нг/г, для 5HIAA – 150–3600 нг/г, для HVA – 80–1920 нг/г, для VMA – 67,5–1620 нг/г. Зависимость соотношения площадей пиков «аналит/внутренний стандарт» от концентрации каждого соединения носила линейный характер. При оценке селективности методики на образцах гомогенатов мозга, хранившихся при температуре не выше –20 °С в течение 2 лет, пло-

щадь хроматографических пиков в холостых образцах у аналитов не превышала 20 % от площади пиков в образцах LLOQ, для внутренних стандартов соталолола, для внутренних стандартов 3,4-DHBA площадь хроматографических пиков не превышала 5 % от площади пиков в образцах LLOQ (рис. 2, 3).

Средние значения, рассчитанных концентраций определения всех изучаемых соединений находились в пределах 85–115 % от номинального значения для уровней концентраций LQC, MQC и HQC, в пределах

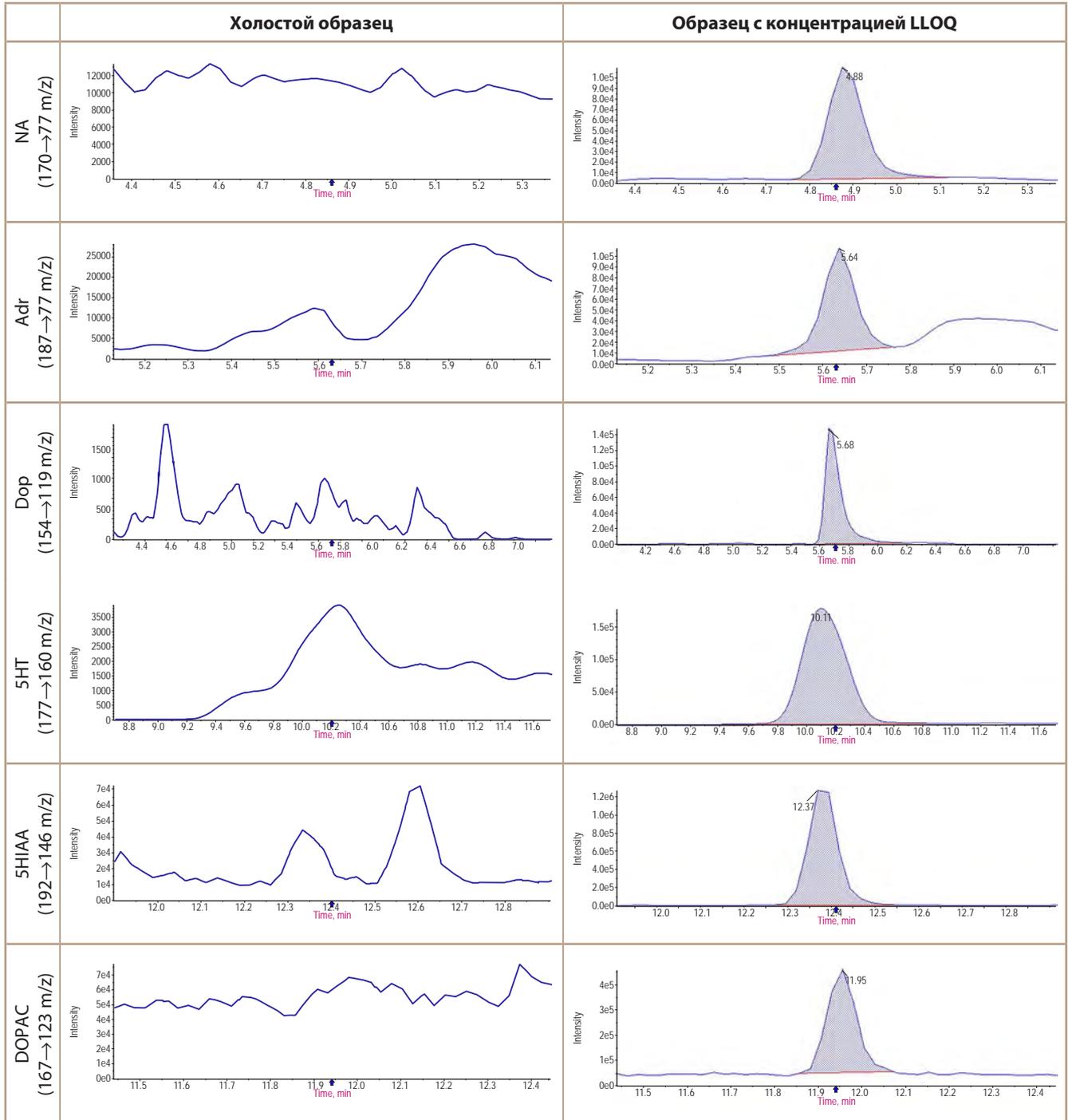


РИС. 2.
Примеры MRM-хроматограмм холостого образца и образца с добавкой стандарта на уровне LLOQ (аналиты – NA, Adr, Dop, 5HT, 5HIAA, DOPAC)

FIG. 2.
The examples of MRM chromatograms of a blank sample and a spiked LLOQ sample (analytes – NA, Adr, Dop, 5HT, 5HIAA, DOPAC)

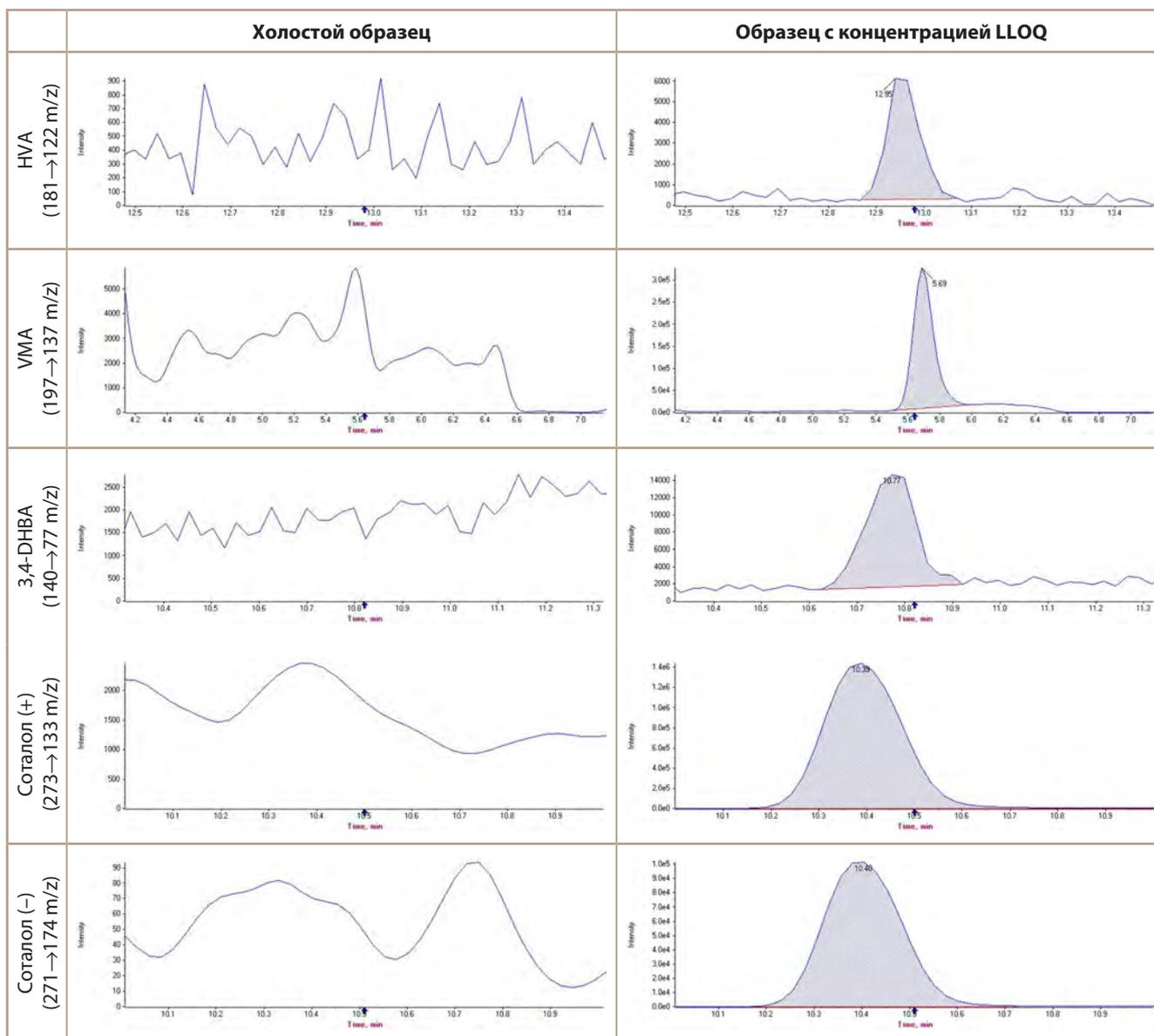


РИС. 3.

Примеры MRM-хроматограмм холостого образца и образца с добавкой стандарта на уровне LLOQ (аналиты – HVA, VMA, 3,4-DHBA (BC), соталол (BC))

FIG. 3.

The examples of MRM chromatograms of a blank sample and a spiked LLOQ sample (analytes – HVA, VMA, 3,4-DHBA (IS), Sotalol (IS))

80–120 % – для уровня концентраций LLOQ, в том числе при оценке селективности методики (табл. 6, серия 1). Величина коэффициента вариации рассчитанных концентраций при этом не превышала 15 %. При этом результат аналитических серий 2 и 3 (табл. 6), выполненных на образцах гомогенатов свежееотобранного мозга, рассчитывался с учётом эндогенного содержания аналитов в пробах без добавки стандарта. Двукратное разведение проб с содержанием изучаемых веществ, превышающим аналитический диапазон (DiI; см. табл. 3), холостой матрицей не влияло на метрологические характеристики методики: значение рассчитанных концентраций аналитов лежало в интервале 89,76–94,99 % от номинального значения, значение CV – в интервале 2,77–5,88 % (табл. 6). Перенос аналитов и внутренних стандартов из предыдущей пробы отсутствовал.

Выбранный раствор антиоксиданта обеспечивает стабильность аналитов в образцах гомогената в течение 24 ч хранения при комнатной температуре, 3 циклов заморозки/разморозки (FTS, freezing/thawing stability), 30 дней хранения в морозильной камере при температуре не выше –20 °C (LTS, long-term stability), а также стабильность в приготовленных пробах в автосемплере в течение 48 ч при температуре +4 °C (табл. 7).

Разработанная методика апробирована путём анализа образцов стриатума, полученного от 6 интактных линейных крыс-самцов породы Wistar. Пробы мозга сразу после забора охлаждали жидким азотом, извлекали стриатум. Гомогенизацию и добавление раствора стабилизатора проводили не позднее 20 мин после отбора. Результаты определения NA, Adr, Dop, 5HT, DOPAC, 5HIAA, VMA, HVA представлены в таблице 8.

ТАБЛИЦА 6
РЕЗУЛЬТАТЫ ВАЛИДАЦИИ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ
RESULTS OF THE VALIDATION OF DEVELOPED METHOD

Параметры	Adr	NA	Dop	5HT	5HTAA	DOPAC	HVA	VMA								
Интерференция в области времён удерживания аналитов в холостых образцах не превышала 20 % от уровня LLOQ, в области времён удерживания внутренних – не превышала 5 % от площади пика*																
LLOQ	50 нг/г	50 нг/г	1,25 мкг/г	75 нг/г	150 нг/г	200 нг/г	80 нг/г	67,5 нг/г								
Калибровочный диапазон (линейная зависимость)	50–1200 нг/г	50–1200 нг/г	1,25–30,00 мкг/г	75–1800 нг/г	150–3600 нг/г	200–4800 нг/г	80–1920 нг/г	67,5–1620 нг/г								
Правильность и прецизионность	Асс., %	CV, %	Асс., %	CV, %	Асс., %	CV, %	Асс., %	CV, %								
LLOQ	112,73	8,34	109,61	12,06	104,46	13,48	82,64	6,28	103,52	9,49	115,69	7,62	86,68	9,39	100,42	7,97
LQC	92,25	8,66	96,79	8,94	95,74	7,96	88,31	5,01	98,19	8,97	97,73	9,49	98,98	9,11	102,87	3,34
MQC	97,49	8,59	90,04	7,47	97,45	6,48	86,98	2,30	111,27	5,75	98,66	6,60	104,73	5,71	109,07	2,72
HQC	104,51	3,78	91,97	4,04	100,89	5,95	89,17	2,95	114,60	3,25	105,36	3,78	108,76	7,68	110,87	3,96
LLQC	85,44	8,06	94,21	12,11	90,42	6,40	110,94	7,00	108,36	6,91	114,02	5,72	101,01	6,36	111,76	3,39
LQC	99,82	9,09	92,70	9,06	95,90	10,04	93,18	3,59	106,26	3,19	106,73	5,69	110,72	1,40	102,01	3,73
MQC	96,97	9,16	91,98	8,04	92,33	8,77	87,29	3,36	113,84	4,22	97,66	5,03	104,49	6,52	96,82	2,55
HQC	104,38	9,21	101,75	6,78	96,28	6,17	93,33	2,72	111,91	2,13	99,15	3,12	112,17	5,00	102,51	3,01
LLQC	101,48	13,05	98,56	12,01	106,51	5,59	92,11	3,81	116,19	4,06	112,96	4,18	100,72	11,90	117,89	2,41
LQC	93,43	9,26	93,27	7,95	92,70	4,95	91,44	3,09	110,03	6,76	108,07	3,10	100,96	8,29	109,49	3,73
MQC	89,70	3,36	96,11	5,02	91,00	2,70	93,15	3,48	95,31	10,62	98,65	3,44	99,25	1,80	105,30	2,93
HQC	87,67	5,39	99,14	5,51	93,76	7,27	96,03	3,22	86,07	2,35	97,61	3,20	105,11	3,46	106,65	2,61
LLQC	99,89	15,58	100,79	14,08	100,46	12,13	92,11	3,81	109,36	8,70	114,22	6,29	102,55	12,13	109,99	8,42
LQC	95,17	9,95	94,26	9,14	94,78	8,37	91,44	3,09	104,82	8,36	104,17	8,01	110,45	8,75	104,80	4,95
MQC	94,72	8,78	92,71	7,65	93,59	7,37	93,15	3,48	106,81	10,67	98,32	5,36	102,82	5,91	103,73	5,82
HQC	98,85	10,72	97,62	7,26	96,98	7,35	96,03	3,22	103,31	13,00	100,70	4,90	108,68	6,49	106,68	4,71
Эффект разведения (n = 6)	Асс., %	93,77	90,73	94,99	94,71	89,76	93,58	91,17	93,36	4,24						
CV, %	4,63	4,05	3,60	5,88	2,77	3,97	4,68									

Примечание. * – оценка селективности проводилась в рамках серии 1; ** – количество проб на каждом уровне концентрации; Асс. (assigasy) – отклонение среднего значения рассчитанных концентраций от номинального значения.

ТАБЛИЦА 7
РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ СТАБИЛЬНОСТИ АНАЛИТОВ
В ГОМОГЕНАТАХ МОЗГА

TABLE 7
RESULTS OF ASSESSING STABILITY OF ANALYTES
IN BRAIN HOMOGENATES

Параметры		Adr	NA	Dop	5HT	5HIAA	DOPAC	HVA	VMA	
% от исходной концентрации	STS (24 ч при комнатной температуре) (n = 6*)	LQC	100,88	96,58	99,85	91,80	96,93	97,80	99,01	101,79
		HQC	100,47	94,03	97,51	90,64	105,85	102,21	103,88	107,47
	FTS (n = 6*) (3 цикла)	LQC	100,60	101,04	101,40	95,56	97,26	100,69	102,62	105,00
		HQC	103,22	96,78	103,04	97,63	101,48	101,13	102,01	107,44
	ASS (48 ч при +4 °C) (n = 6*)	LQC	102,81	98,42	98,76	96,21	99,61	100,65	101,47	100,41
		HQC	102,48	95,96	96,22	93,82	100,83	97,95	100,79	104,58
	LTS (30 дней при температуре не выше -20 °C) (n = 6*)	LQC	103,11	100,12	104,84	95,50	98,41	102,41	102,43	96,99
		HQC	102,25	99,08	100,74	98,70	98,75	97,84	98,65	98,85

Примечание. * – количество проб на каждом уровне концентрации; FTS – стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки (freezing/thawing stability); LTS – долгосрочная стабильность (long-term stability).

ТАБЛИЦА 8
РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
НОРАДРЕНАЛИНА, АДРЕНАЛИНА, ДОПАМИНА,
СЕРОТОНИНА, DOPAC, 5HIAA, VMA, HVA В ОБРАЗЦАХ
СТРИАТУМА КРЫС

TABLE 8
RESULTS OF QUANTIFICATION OF NORADRENALINE,
ADRENALINE, DOPAMINE, SEROTONIN, DOPAC, 5HIAA,
VMA, HVA IN RAT STRIATUM SAMPLES

	Концентрация, нг/г							
	Adr	NA	Dop	5HT	5HIAA	DOPAC	HVA	VMA
Средние значения (n = 6)	менее LLOQ	354,85	9181,30	595,86	1180,49	1851,35	896,26	менее LLOQ
SD	–	33,43	1497,84	137,25	244,61	283,25	266,38	–
CV, %	–	9,42	16,31	23,03	20,72	15,30	29,72	–

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате подбора оптимальных условий анализа для приготовления проб тканей мозга после их механической гомогенизации было выбрано разведение образца метанольным раствором внутренних стандартов. Это значительно ускоряет производительность пробоподготовки по сравнению с работами, в которых использовались жидкостно-жидкостная экстракция [18], диализ [13, 17, 19], а также дериватизация аналитов [13, 14]. Применение ВЭЖХ-МС/МС даёт преимущество в селективности и чувствительности методики по сравнению с ВЭЖХ-УФ [8] и ВЭЖХ-ЭД [9–12] при проведении фармакодинамических исследований ЛС. Так, при использовании данных методик молекулы изучаемых ЛС могут экстрагироваться и коэлюироваться вместе с аналитами, давая тем самым завышенные результаты количественного определения [3]. Время хроматографического анализа составляет 21 мин, что дольше, чем в методиках E. Grouzmann и соавт. [5], N. Hwang и соавт. [6], L. Fang и соавт. [7], S. Greco и соавт. [14], C. Ji и соавт. [15]. Однако в данных работах анализируется меньшее количество моноаминовых нейромедиаторов и их метаболитов.

При подборе стабилизатора был использован подход, заключающийся в предварительной оценке краткосрочной стабильности аналитов в гомогенатах и стабильности проб в автосемплере без добавления и с добавлением антиоксидантов. Аналогичный подход был использован для образцов плазмы крови в работе [21], но он не предусматривал испытаний ASS. Приемлемые результаты при выборе антиоксиданта были достигнуты только при добавлении к супернатанту гомогената водных растворов аскорбиновой кислоты в объёмном соотношении 1:5 (см. табл. 5, 7). Это связано с тем, что в метанольных пробах солевые восстановители (Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) растворяются значительно хуже, чем выбранный стабилизатор. При изучении долгосрочной стабильности показано (табл. 7), что для хранения образцов достаточно температуры не выше $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Полученные в ходе апробации методики значения концентраций Dop, NA, 5HT, 5HIAA, DOPAC, HVA в образцах стриатума крыс совпадают с данными, опубликованными в работах J. Lu и соавт. [2] и N.N. Khlebnikova и соавт. [10]. Хроматографические пики Adr и VMA на хроматограммах испытуемых проб обнаружены не были, что свидетельствует о правильности забора образцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика количественного определения норадреналина, адреналина, дофамина, серотонина, ДОРАС, 5Н1АА, VMA, HVA в образцах мозга крысы соответствует требованиям руководств НЦЭСМП, ЕАК, ICH, FDA по показателям селективности, калибровочной зависимости, правильности и прецизионности внутри цикла и между циклами, эффекта разведения, эффекта переноса из предыдущей пробы, эффекта матрицы, стабильности. Применение выбранного способа стабилизации позволяет предотвратить окисление аналитов во время подготовки и анализа проб, а также их хранения в течение как минимум 30 дней. Это значительно снижает риски недостоверных результатов при проведении доклинических испытаний фармакодинамики и исключения из эксперимента фармакологически эффективных соединений из-за ложно заниженных концентраций нейромедиаторов и их метаболитов в пробах.

Ограничения исследования

Данная методика прошла валидацию и показала свою пригодность для определения аналитов в образцах тканей мозга крыс. Использование методики для количественного определения изучаемых веществ у другого вида животных потребует её частичной валидации путём оценки эффекта матрицы, калибровочной зависимости и селективности.

Финансирование

Исследование выполнено за счёт средств гранта Российского научного фонда «Разработка новых фармакологических агентов для терапии нейродегенеративных заболеваний» № 22-13-20085.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. М.: Гриф и К; 2012. [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ.)].
2. Lu J, Sun F, Ma H, Qing H, Deng Y. Quantitative detection of dopamine, serotonin and their metabolites in rat model of Parkinson's disease using HPLC-MS/MS. *2015 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation*. 2015: 1460-1465. doi: 10.1109/ICMA.2015.7237700
3. Яичков И.И., Джурко Ю.А., Шитов Л.Н. Основные ошибки в аналитической части исследований биоэквивалентности и фармакокинетики. *Медицинская этика*. 2018; 6(1): 33-38. [Yaichkov II, Dzhurko YA, Shitov LN. The main error in the analytical part of bioequivalence studies and pharmacokinetics. *Medical Ethics*. 2018; 6(1): 33-38. (In Russ.)].
4. Хохлов А.Л., Рыска М., Кукес В.Г., Писачкова М., Печена М., Яворский А.Н., и др. *Современные подходы к проведению биоаналитических исследований при создании лекарственных препаратов*. М.: Российская академия наук; 2018. [Khokhlov AL, Ryska M, Kukes VG, Pisachkova M, Pechena M, Yavorsky AN, et al. *Modern approaches to conducting bioanalytical studies in the creation of drugs*. Moscow: Russian Academy of Sciences; 2018. (In Russ.)].
5. Grouzmann E, Centeno C, Eugster PJ. Quantification of vanillylmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in urine using a dilute-and-shoot and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Clin Chem Lab Med*. 2018; 56(9): 1533-1541. doi: 10.1515/cclm-2017-1120
6. Hwang N, Chong E, Oh H, Cho HW, Lee JW, Sung KW, et al. Application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of homovanillic acid and vanillylmandelic acid for the diagnosis and follow-up of neuroblastoma in 357 patients. *Molecules*. 2021; 26(11): 3470. doi: 10.3390/molecules26113470
7. Fang L, Lv Y, Sheng X, Yao S. Sensitive, rapid and easy analysis of three catecholamine metabolites in human urine and serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr Sci*. 2012; 50(5): 450-456. doi: 10.1093/chromsci/bms068
8. Thomas J, Khanam R, Vohora D. A validated HPLC-UV method and optimization of sample preparation technique for norepinephrine and serotonin in mouse brain. *Pharm Biol*. 2015; 53(10): 1539-1544. doi: 10.3109/13880209.2014.991837
9. Brenes JC, Fornaguera J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav Brain Res*. 2009; 198(1): 199-205. doi: 10.1016/j.bbr.2008.10.036
10. Khlebnikova NN, Orshanskaya EV, Narkevich VB, Kudrin VS, Krupina NA. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors diprotin A and sitagliptin administered on weeks 2-3 of postnatal development modulate monoamine metabolism in the striatum of adult rats. *Bull Exp Biol Med*. 2017; 163(2): 190-194. doi: 10.1007/s10517-017-3763-5
11. Krupina NA, Khlebnikova NN, Narkevich VB, Naplekova PL, Kudrin VS. The levels of monoamines and their metabolites in the brain structures of rats subjected to two- and three-month-long social isolation. *Bull Exp Biol Med*. 2020; 168(5): 605-609. doi: 10.1007/s10517-020-04761-5
12. Cannazza G, Carrozzo MM, Cazzato AS, Bretis IM, Troisi L, Parenti C, et al. Simultaneous measurement of adenosine, dopamine, acetylcholine and 5-hydroxytryptamine in cerebral mice microdialysis samples by LC-ESI-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2012; 71: 183-186. doi: 10.1016/j.jpba.2012.08.004
13. Jampolska M, Andrzejewski K, Zaremba M, Joniec-Maciejak I, Kaczynska K. Deficiency of biogenic amines modulates the activity of hypoglossal nerve in the reserpine model of Parkinson's disease. *Cells*. 2021; 10: 531. doi: 10.3390/cells10030531
14. Greco S, Danysz W, Zivkovic A, Gross R, Stark H. Microdialysate analysis of monoamine neurotransmitters – A versatile and sensitive LC-MS/MS method. *Anal Chim Acta*. 2013; 771: 65-72. doi: 10.1016/j.aca.2013.02.004
15. Ji C, Walton J, Su Y, Tella M. Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC-MS/MS. *Anal Chim Acta*. 2010; 670: 84-91. doi: 10.1016/j.aca.2010.04.051
16. Kim S, Jang EY, Song S-H, Kim JS, Ryu IS, Jeong C-H, et al. Brain microdialysis coupled to LC-MS/MS revealed that CVT-10216, a selective inhibitor of aldehyde dehydrogenase 2,

alters the neurochemical and behavioral effects of methamphetamine. *ACS Chem Neurosci*. 2021; 12(9): 1552-1562. doi: 10.1021/acscchemneuro.1c00039

17. Kovac A, Somikova Z, Zilka N, Novak M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of panel of neurotransmitters in cerebrospinal fluid from the rat model for tauopathy. *Talanta*. 2014; 119: 284-290. doi: 10.1016/j.talanta.2013.10.027

18. Попов Н.С., Гавриленко Д.А., Балабаньян В.Ю., Петрова М.Б., Донсков С.А., Атаджанов И.Б., и др. Количественное определение моноаминовых нейротрансмиттеров в гомогенатах головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2022; (4): 33-42. [Popov NS, Gavrilenko DA, Balabanyan VYu, Petrova MB, Donskov SA, Atadzhanov IB, et al. Quantitative determination of monoamine neurotransmitters in rat brain homogenates using HPLC-MS/MS. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2022; (4): 33-42. (In Russ.)]. doi: 10.37489/2587-7836-2022-4-33-42

19. Syslova K, Rambousek L, Kuzma M, Najmanova V, Bubenikova-Valesova V, Slamberova R, et al. Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: Method combining freeze-drying with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011; 1218(21): 3382-3391. doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.006

20. Xie Z, Lorkiewicz P, Riggs DW, Bhatnagar A, Srivastava S. Comprehensive, robust, and sensitive UPLC-MS/MS analysis of free biogenic monoamines and their metabolites in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2018; 1099: 83-91. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.09.012

21. Хохлов А.Л., Яичков И.И., Джурко Ю.А., Рыска М., Кубеш В., Шитов Л.Н. Подходы к разработке биоаналитических методик для определения нестабильных соединений в биологических жидкостях. *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3(5): 106-115. [Khokhlov AL, Yaichkov II, Dzhurko YuA, Ryska M, Kubeš V, Shitov LN. Approaches to the development of bioanalytical methods for determination of unstable substances in biological fluids. *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3(5): 106-115. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2018-3.5.16

22. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf [date of access: 15.05.2023].

23. Food and Drug Administration. *Guidance for industry. bioanalytical method validation*. 2018. URL: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> [date of access: 15.05.2023].

24. *Руководство по экспертизе лекарственных средств*. М.: Полиграф-Плюс; 2014; (1). [Guide to the expert analysis of drugs. Moscow: Polygraph-Plus; 2014; (1). (In Russ.)].

25. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза: Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85. 2016. [On approval of the Rules for conducting bioequivalence studies of medicinal products within the framework of the Eurasian Economic Union. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016 No. 85. 2016. (In Russ.)]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/456026107> [дата доступа: 15.05.2023].

Сведения об авторах

Хохлов Александр Леонидович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заместитель директора по научной работе Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»; заведующий кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ректор, ФГБОУ ВО «Ярославский государственные медицинский университет» Минздрава России, e-mail: al460935@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>

Яичков Илья Игоревич – кандидат фармацевтических наук, научный сотрудник Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»; научный сотрудник Института фармации, ФГБОУ ВО «Ярославский государственные медицинский университет» Минздрава России, e-mail: ilya_1993_08@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>

Корсаков Михаил Константинович – доктор химических наук, профессор кафедры химии, теории и методики преподавания химии, директор Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», e-mail: m.korsakov@yspu.org, <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>

Каграманян Игорь Николаевич – доктор медицинских наук, профессор Института лидерства и управления здравоохранением, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: info@hsha.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2139-6847>

Вольхин Никита Николаевич – младший научный сотрудник Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», e-mail: nnvolkhin@ysmu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>

Петухов Сергей Станиславович – инженер Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»; младший научный сотрудник Института фармации, ФГБОУ ВО «Ярославский государственные медицинский университет» Минздрава России, e-mail: sspp465@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>

Зайкова Валерия Евгеньевна – лаборант Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»; специалист Института фармации, ФГБОУ ВО «Ярославский государственные медицинский университет» Минздрава России, e-mail: valeria.zaykova@bk.ru, <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>

Information about the authors

Alexander L. Khokhlov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Member of RAS, Deputy Director for Science of the Center of Pharmaceutical Technologies Transfer named after M.V. Dorogov, Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky; Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Rector, Yaroslavl State Medical University, e-mail: al460935@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>

Ilya I. Yaichkov – Cand. Sc. (Med.), Research Officer at the Center of Pharmaceutical Technologies Transfer named after M.V. Dorogov, Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky; Research Officer at the Institute of Pharmacy, Yaroslavl State Medical University, e-mail: ilya_1993_08@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>

Mikhail K. Korsakov – Dr. Sc. (Chem.), Professor at the Department of Chemistry, Theory and Methods for Teaching of Chemistry, Director of the Center of Pharmaceutical Technologies Transfer named after M.V. Dorogov, Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky, e-mail: m.korsakov@yspu.org, <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>

Igor N. Kagramanyan – Dr. Sc. (Med.), Professor at the Institute of Leadership and Management of Healthcare, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: info@hsha.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2139-6847>

Nikita N. Volkhin – Junior Research Officer at the Center of Pharmaceutical Technologies Transfer named after M.V. Dorogov, Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky, e-mail: nnavolkhin@ysmu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>

Sergey S. Petukhov – Engineer at the Center of Pharmaceutical Technologies Transfer named after M.V. Dorogov, Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky; Junior Research Officer at the Institute of Pharmacy, Yaroslavl State Medical University, e-mail: sspp465@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>

Valeria E. Zaykova – Clinical Research Assistant at the Center of Pharmaceutical Technologies Transfer named after M.V. Dorogov, Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky; Specialist at the Institute of Pharmacy, Yaroslavl State Medical University, e-mail: valeria.zaykova@bk.ru, <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>