

УВЭЖХ-МСВР определение дансильных производных адреналина и дофамина в слюне человека

***А.А. Азарян, Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев**

*Кубанский государственный университет,
Российская Федерация, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149*

**Адрес для переписки: Азарян Алиса Андреевна, E-mail: alisa_azaryan@mail.ru*

Поступила в редакцию 23 июля 2020 г., после исправлений – 9 октября 2020 г.

В последнее десятилетие большой интерес вызывает определение катехоламинов в биологических жидкостях человека. Изменение эндогенных уровней таких катехоламинов, как адреналин и дофамин, в организме приводит к неврологическим нарушениям, а также ряду заболеваний, а именно болезни Альцгеймера и Паркинсона, нейроэндокринным катехоламинпродуцирующим опухолям – феохромоцитоме, параганглиоме, карциноидные опухоли и нейробластома. Кроме того, комбинации различных препаратов, могут приводить к искажениям в биологическом паспорте человека, включающего в себя не только сведения об эритропоезе и стероидном профиле, но и содержании ряда катехоламинов, определение которых также сопряжено с рядом трудностей как в части подготовки проб, так и их анализе. Предложена методика определения дансильных производных адреналина и дофамина в слюне человека, включающая дериватизацию и определение аналитов методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения. Проведение процедуры дериватизации позволило получить менее полярные производные катехоламинов, что особенно важно для их количественного анализа в режиме обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии, поскольку обеспечивает их лучшее удерживание на сорбенте. Оценена чувствительность определения этих веществ предложенным методом, установлено, что наибольшей чувствительности можно добиться с использованием подвижной фазы, состоящей из 0.1 % водного раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила. Нижняя граница определяемых концентраций составила 5 нг/мл для дансиладреналина, 10 нг/мл для дансилдофамина. Предложенная методика апробирована на реальных образцах слюны, полученных от добровольцев с целью установления содержания дансильных производных катехоламинов в режиме обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения. Высокая чувствительность методики позволяет применять ее для определения адреналина и дофамина при клинической диагностике.

Ключевые слова: адреналин, дофамин, катехоламины, УВЭЖХ-МСВР, слюна, биологические жидкости, дериватизация.

For citation: Analitika i kontrol' [Analytics and Control], 2020, vol. 24, no. 4, pp. 298-304

DOI: 10.15826/analitika.2020.24.4.004

UHPLC-HRMS determination of adrenaline and dopamine dansyl derivatives in human saliva

***А.А. Азарян, Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев**

*Kuban State University, Stavropolskaya st., 149, Krasnodar, 350040,
Russian Federation*

**Corresponding author: Alisa A. Azaryan, e-mail: alisa_azaryan@mail.ru*

Submitted 23 July 2020, received in revised form 09 October 2020

In the last decade, the quantification of catecholamines in human biological fluids has been of great interest. Changes in catecholamine levels, such as adrenaline and dopamine, in the body lead to neurological disorders as well as several diseases, namely Alzheimer's and Parkinson's diseases, neuroendocrine catecholamine - producing tumors - pheochromocytoma, paraganglioma, carcinoid tumors and neuroblastoma.

Moreover, different drug combinations can lead to the distortions in the human biological passport, containing the information not only about the erythropoiesis and steroid profile, but also about catecholamine levels, which are difficult to quantify in terms of sample preparation and analysis. A method has been proposed for the determination of adrenaline and dopamine dansyl derivatives in human saliva, including the derivatization and determination of analytes by ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) with high resolution mass spectrometric detection. The derivatization procedure allowed obtaining less polar catecholamine derivatives, which is especially important for their quantification by reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography since it ensures their better retention on the sorbent. The sensitivity of these substances quantification by the proposed method was estimated; the highest sensitivity was achieved using the mobile phase consisting of the 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile. The lower limit of quantification was 5 ng/mL for dansyldrenaline and 10 ng/mL for dansyldopamine respectively. The proposed technique was tested on real saliva samples obtained from volunteers to quantify catecholamine dansyl derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometric detection. High sensitivity of the technique allows using it for adrenaline and dopamine determination in clinical diagnosis.

Key words: adrenaline, dopamine, catecholamines, UHPLC-HRMS, saliva, biological fluids, derivatization.

ВВЕДЕНИЕ

Катехоламины (норадреналин, адреналин, дофамин) – группа гормонов, ответственных за механизмы физиологического обеспечения организма, такие как реакция на стресс (физиологический или психологический), повышение содержания глюкозы в крови, расширение сосудов, учащенное сердцебиение и др. [1-3]. Кроме того, некоторые эндогенные факторы, а также средства, действующие на адренергические синапсы, могут привести к изменению концентрации катехоламинов [4, 5]. Увеличение или уменьшение уровней катехоламинов в организме прежде всего связано с развитием различных патологий [2, 6].

Также стоит отметить, что адреналин включен в список стимуляторов, относящихся к особым субстанциям, запрещенным в соревновательный период Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) [7, 8]. Известно, что подкожное введение малых доз адреналина позволяет добиться анаболического эффекта. Подобные явления, а также комбинации употребляемых препаратов, могут приводить к искажениям в биологическом паспорте человека, включающего в себя не только сведения

о стероидном профиле, но и содержании ряда катехоламинов, определение которых также сопряжено с рядом трудностей как в части подготовки проб, так и их анализе.

На сегодняшний день для определения адреналина, норадреналина, дофамина, их предшественников и метаболитов разработано большое количество методик, сочетающих в себе различные способы подготовки проб, хроматографического разделения, а также детектирования (табл. 1). Ввиду предварительного разделения катехоламинов хроматографические методы обладают достаточной селективностью и низкими пределами обнаружения – на уровне 1 нМ. Наиболее распространенными биологическими матрицами, используемыми для определения катехоламинов, являются кровь и моча. Также существуют методики, позволяющие определить катехоламины в слюне [9].

Отбор слюны является неинвазивной процедурой, и с этой точки зрения анализ данного объекта является предпочтительным. Также к основным преимуществам слюны можно отнести следующее: безопасность и простота отбора проб, возможность транспортировки и хранения образцов без их пред-

Таблица 1

Определение катехоламинов в биологических жидкостях

Table 1

Quantification of catecholamines in biological fluids

Образец	Пробоподготовка	Детектор	Предел обнаружения, нг/мл	Литература
Спинальная жидкость	Дериватизация	ВЭЖХ–МС/МС	–	10
	ТФЭ	ВЭЖХ–ЭД	1	11
Моча	ТФЭ	ВЭЖХ–МС/МС	0.76 – 1.83	12
	Дериватизация	ВЭЖХ–ФД	0.09 – 1.13	13
	Дериватизация на патроне для ТФЭ	ВЭЖХ–МС/МС	2.5 – 25	14
	ЖЖЭ Дериватизация	ВЭЖХ–ФД	–	15
	«Разбавил и вколол»	ВЭЖХ–МС/МС	25 – 75	16
Плазма	ЖЖЭ Дериватизация	ВЭЖХ–ЭД	12	17
	Дериватизация	ВЭЖХ–МС/МС	0.0873 – 0.297	18
Слюна	Разбавление, фильтрация	ВЭЖХ–ФД	0.018 – 0.076	9

Примечания: ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция, ТФЭ – твердофазная экстракция, ЭД – электрохимический детектор, ФД – флуориметрический детектор, ХД – хемилюминесцентный детектор.

варительной обработки. Эти преимущества позволяют определять различные биомаркеры прежде всего у младенцев и детей. Важно отметить прямую зависимость между основными биохимическими показателями в крови и слюне, а, следовательно, возможность использования слюны в качестве дополнительного источника информации в клинической диагностике [21, 22]. Наиболее сильная корреляция между содержанием в слюне и плазме наблюдается при определении стероидов [23], ряда лекарственных препаратов [24, 25], некоторых катехоламинов и их метаболитов [26, 27].

Для повышения чувствительности при определении катехоламинов в биологических жидкостях успешно используют методы химической дериватизации. Дансильирование является наиболее распространенной процедурой дериватизации при анализе эндогенных соединений методом ВЭЖХ-МС (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием). Дансилхлорид быстро и количественно реагирует со вторичными и первичными аминогруппами, а дансильные производные устойчивы в условиях хроматографического разделения.

Таким образом, целью данной работы являлась разработка методики определения дансильных производных адреналина и дофамина в слюне человека методом УВЭЖХ-МСВР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и реагенты

Для проведения исследований использовали ацетонитрил квалификации «gradient grade» (Sigma Aldrich, США), метанол квалификации «HPLC grade» (J.T. Baker, США), муравьиную кислоту (> 99 %) (Acros Organics, США), формиат аммония квалификации «х.ч.» (Вектон, Россия), воду 18 МΩ·см, полученную при помощи системы Milli-Q (Millipore, Франция), и стандартные образцы адреналина (≥ 99 %), дофамина (≥ 98%), дансилхлорида (≥ 99 %) (Sigma-Aldrich, США), габапентина (≥ 75 %) (Pfizer, США).

Стандартные растворы адреналина и дофамина с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением навески вещества в 0.1 % муравьиной кислоте и хранили при температуре 4 °С. Раствор дериватирующего агента (дансилхлорида) с концентрацией 1 мг/мл готовили путем растворения точной навески вещества в ацетонитриле. Для приготовления обратного буферного раствора с pH 9.5 использовали гидроксид натрия «ч.д.а.» (Реактив, Россия), тетраборат натрия «ч.д.а.» (Вектон, Россия). Рабочие растворы, полученные разбавлением стандартных растворов ацетонитрилом, хранили при температуре 4 °С. При построении градуировочных кривых использовали образцы слюны, полученные от добровольцев (мужчин и женщин в возрасте от 20 до 35 лет). Пробы хранили при температуре -20 °С.

Оборудование

Для проведения исследований использовали систему, состоящую из ультравысокоэффективного жидкостного хроматографа Elute UHPLC (Bruker Daltonik GmbH, Германия), оснащенного бинарным градиентным насосом, термостатируемым автосамплером и колоночным термостатом, и квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра maXis impact (Bruker Daltonik GmbH, Германия) с источником электрораспылительной ионизации под управлением ПО Bruker Compass HyStar 4.1. Последующую обработку данных проводили с использованием ПО Bruker Data Analysis 4.4. Разделение осуществляли в режиме обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с использованием аналитической колонки Phenomenex Kinetex C18 (100×2.1 мм, 1.7 мкм). Температура термостата колонки – 40 °С, объем вводимой пробы – 10 мкл.

Пробоподготовка

Образцы слюны собирали в пробирки Эппендорф у волонтеров (мужчин и женщин в возрасте от 20 до 35 лет). Для предотвращения загрязнения образцов пищевыми продуктами, отбор проб осуществлялся не ранее, чем через 30 минут после приема пищи. В целях предотвращения попадания в слюну крови, отбор проб проводили не ранее, чем через 1 час после чистки зубов. Образцы анализировали сразу после пробоотбора. Перед проведением процедуры дериватизации их центрифугировали в течение 10 минут при 10000 об/мин. Образцы хранили при температуре -20 °С до анализа.

Обсуждение результатов

Поскольку исследуемые катехоламины относятся к малым полярным соединениям, их прямое определение в биологических объектах может быть затруднено сильно выраженными матричными эффектами и практическим отсутствием удерживания в режиме обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, что обуславливает необходимость применения дериватизации. Получение производных исследуемых аналитов позволяет не проводить отдельные серии анализов в режиме гидрофильной хроматографии для контроля единичных показателей, что может значительно повысить экспрессность и эффективность использования научного оборудования. Также известно, что оптимальным методом их определения без дериватизации является применение электрохимического детектирования, обеспечивающего высокую чувствительность, но требующего контроля постоянного контроля стабильности получаемых результатов. Для метода ВЭЖХ-ЭД характерны высокие значения фонового шума по сравнению с полезным сигналом, загрязнение электрода. В случае получения производных катехоламинов, возникает

возможность варьировать методы детектирования – от ультрафиолетового и флуориметрического до масс-спектрометрического.

Известно, что полнота образования дансильных производных катехоламинов зависит от следующих факторов: температуры, времени проведения реакции и соотношения дериватирующего агента и аналитов, вследствие чего было исследовано их влияние на образование производных катехоламинов. Дериватизацию проводили в диапазоне температур от 35 до 60 °С. В результате проведенных исследований установлена зависимость времени дериватизации от температуры, при этом увеличение температуры приводит к сокращению времени дериватизации, к увеличению выхода основного продукта и, как следствие, к уменьшению выхода побочного продукта. Так, при дериватизации при 60 °С достаточно 30 минут для завершения реакции. Степень конверсии для адреналина, дофамина и габапентина в продукты дериватизации оценивали путем нахождения суммы площадей хроматографических пиков, образовавшихся целевых производных, с одной стороны, а также пиков, относящихся к побочным продуктам дериватизации и/или продуктов распада целевых производных, с другой стороны. Степень конверсии целевого продукта представлена в виде отношения площадей соответствующих пиков, выраженного в процентах. Установлены аналитические формы основных и побочных соединений, образующихся при дериватизации, их молекулярные массы и степень конверсии. При этом степень конверсии всех основных продуктов превышала 70 %.

В качестве внутреннего стандарта использовали габапентин. Данное вещество имеет близкую к катехоламинам структуру и не коэлюируется с эндогенными катехоламинами в реальных образцах слюны, что позволяет избежать существенных искажений полученных результатов. В качестве внутреннего стандарта также могут быть использованы и другие вещества, отвечающие следующим критериям: близкая структура, время удерживания внутреннего стандарта должно быть отличным от времени удерживания исследуемого вещества, внутренний стандарт может быть выбран из того же класса соединений, что и аналит.

В качестве подвижной фазы изучали системы ацетонитрил–0.1 % водный раствор муравьиной кислоты и метанол–0.1 % водный раствор муравьиной кислоты. Наибольшая эффективность разделения была достигнута при использовании системы ацетонитрил–0.1 % водный раствор муравьиной кислоты, обеспечивающей возможность реализации быстрого хроматографического разделения без потери в селективности, наблюдаемой при увеличении скорости потока подвижной фазы с использованием колонок подобного типа. Установлено, что наиболее воспроизводимые результаты и симметричные формы пиков достигаются при скорости потока

Таблица 2

Условия градиентного элюирования производных адреналина и дофамина

Table 2

Gradient elution conditions for adrenaline and dopamine derivatives

Время, минут	А (ацетонитрил), %	В (0.1 % муравьиная кислота в воде), %	Скорость потока, мл/мин
0	5	95	0.45
1.0	5	95	
1.7	60	40	
3.5	60	40	
6.5	90	10	
9.0	90	10	
9.0	5	95	
10.5	5	95	

подвижной фазы 0.45 мл/мин. Условия градиентного элюирования приведены в табл. 2.

Условия масс-спектрометрического детектирования в режиме регистрации положительных ионов приведены в табл. 3. Оптимизированные условия определения аналитов представлены в табл. 4.

Также были рассмотрены факторы преданалитического этапа, оказывающие влияние на результаты исследования проб слюны. К ним можно отнести возраст, предпочтения в еде, физические нагрузки, гигиена полости рта, прием лекарственных препаратов, курение. Установлено, что данные факторы оказывают незначительное влияние в случае соблюдения условий отбора проб.

Для оценки точности анализа готовили несколько растворов контроля качества (QC) с низкой, средней и высокой концентрациями; каждый раствор QC анализировали в течение одного дня по три раза. Правильность результатов в разные дни также контролировали путем анализа QC. Концентрации

Таблица 3

Условия масс-спектрометрического детектирования с источником нагреваемой электрораспылительной ионизации

Table 3

Mass spectrometric detection conditions with the heated electrospray ionization source

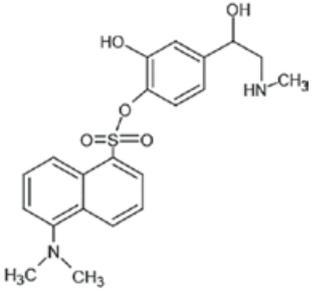
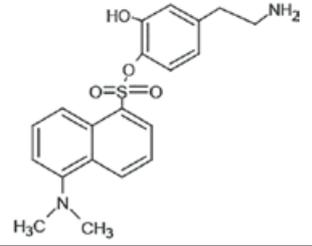
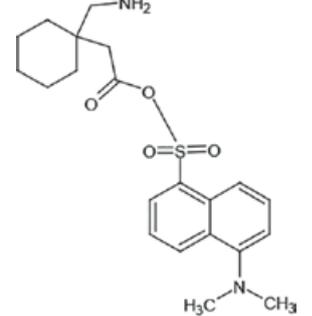
Параметры	Значения
Температура источника ионизации, °С	250
Напряжение на источнике ионизации, В	4000
Давление газа распылителя (азот), кПа	100
Расход газа-осушителя (азот), л/мин	5
Скорость сканирования, Гц	3
Диапазон масс, m/z	150-3000
Давление газа-мишени в ячейке соударений (азот), mTorr	1.5

Таблица 4

Параметры определения аналитов с помощью УВЭЖХ-МС/МС

Table 4

Parameters for the determination of analytes using UHPLC-MS/MS

Аналит	Структура	t_R , мин	$[M + H]^+$ теоретическая, Да	$[M + H]^+$ найденная, Да	Погрешность определения масс, ppm
Дансиладреналин		2.9	417.1479	417.1473	-1.4
Дансилдофамин		3.0	387.1373	387.1365	-2.0
Дансилгабапентин*		4.3	405.1843	405.1844	0.2

Примечание: * – внутренний стандарт.

растворов находили по градуировочным графикам, полученным в день анализа (табл. 5).

Предел обнаружения аналита устанавливали экспериментально путем снижения концентрации стандартных растворов до тех пор, пока соотношение сигнал/шум не составило 3 : 1. Для адrenalина и

дофамина предел обнаружения составил 1 и 2.5 нг/мл, соответственно. Нижнюю границу определяемых концентраций также устанавливали экспериментально, она составила 5 нг/мл для дансиладrenalина, 10 нг/мл для дансилдофамина.

Таблица 5

Валидационные характеристики определения аналитов в слюне

Table 5

Validation characteristics of analytes determination in saliva

Производные катехоламинов	Введено (нг/мл)	В один день		В разные дни	
		Правильность, %	Воспроизводимость, %	Правильность, %	Воспроизводимость, %
Дансиладrenalин	25	11.6	15.3	12.4	15.7
	50	8.8	6.9	6.4	10.7
	250	3.0	1.3	4.8	9.8
Дансилдофамин	25	13.3	14.1	14.3	19.5
	50	5.1	5.9	5.6	9.4
	250	2.1	4.1	-3.1	7.0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований нами были оптимизированы условия пробоподготовки и определения дансильных производных адреналина и дофамина, которые позволили достичь высокой чувствительности и селективности определения. Разработанный способ был апробирован на реальных образцах слюны, полученных от добровольцев с целью установления содержания дансильных производных катехоламинов в режиме обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения.

Определение производных адреналина и дофамина в слюне может быть использовано для оценки физиологического состояния человека, в частности, для контроля за эффективностью лечения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проводились при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-43-233001 р_мол_а, с использованием научного оборудования ЦКП "Эколого-аналитический центр" Кубанского госуниверситета, уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008.

ACKNOWLEDGEMENTS

Current studies were conducted with the financial support of the RFBR, project No. 19-43-233001 r_mol_a as well as with the use of the scientific equipment of the "Ecological and Analytical Center" of the Kuban State University, the unique identifier RFMEFI59317X0008.

ЛИТЕРАТУРА

1. Determination of catecholamines and their metabolites in rat urine by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the study of identifying potential markers for Alzheimer's disease / L. Chunxiao [et al.] // *J. Mass Spectrom.* V. 50. 2015. P. 354–363.
2. Fast determination of catecholamines in human plasma using carboxyl-functionalized magnetic-carbon nanotube molecularly imprinted polymer followed by liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry / J. Ma [et al.] // *J. Chromatogr. A.* V. 1429. 2016. P. 86–96.
3. Quantitative determination of adrenaline and noradrenaline in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / A. Thomas [et al.] // *Chromatographia.* V. 64. 2006. P. 587–591.
4. Davis, E. Loiacono R., Summers R.J. The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the b-adrenergic system // *Br. J. Pharmacol.* V. 154. 2008. P. 584–597.
5. A convenient method for extraction and analysis with high-pressure liquid chromatography of catecholamine neurotransmitters and their metabolites / Xie L. [et al.] // *J. Vis. Exp.* V. 133. 2018. P. 1–10.
6. Plasma free metanephrines for diagnosis of neuroblastoma patients / S. Barco [et al.] // *Clin. Biochem.* V. 66. 2019. P. 57–62.

7. Investigating the use of stimulants in out-of-competition sport samples / T. Boghosian [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* V. 35. 2011. P. 613–616.
8. WADA Prohibited list 2020. [Электронный ресурс]: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2020_english_prohibited_list.pdf [дата обращения 21.05.2020]
9. Study of salivary catecholamines using fully automated column-switching high-performance liquid chromatography / T. Okumura [et al.] // *J. Chromatogr. B.* V. 694. 1997. P. 305–316.
10. Norepinephrine and Its Metabolites in Cerebrospinal Fluid, Plasma, and Urine Relationship to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Depression / A. Roy [et al.] // *Arch Gen Psychiatry.* V. 45. 1988. P. 849–857.
11. Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection / K.E. Hubbard [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* V. 24. 2010. P. 626–631.
12. Whiting, M.J. Simultaneous measurement of urinary metanephrines and catecholamines by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection // *Ann. Clin. Biochem.* V. 46. 2009. P. 129–136.
13. Selective liquid-chromatographic determination of native fluorescent biogenic amines in human urine based on fluorous derivatization / Y. Sakaguchi [et al.] // *J. Chromatogr. A.* V. 1218. 2011. P. 5581–5586.
14. LC–MS/MS determination of catecholamines in urine using FMO-CI derivatization on solid-phase extraction cartridge / A. Azaryan [et al.] // *Chromatographia.* V. 81. 2018. P. 1487–1494.
15. Improved measurement of urinary catecholamines by liquid–liquid extraction, derivatization and high performance liquid chromatography with fluorometric detection // F.A.J. van der Hoorn [et al.] // *J. Chromatogr.* V. 563. 1991. P. 348–355.
16. Development and validation of a simple, rapid and sensitive LC-MS/MS method for the measurement of urinary neurotransmitters and their metabolites / J. Yan [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* V. 409. 2017. P. 7191–7199.
17. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / F.A.J. van der Hoorn [et al.] // *J. Chromatogr.* V. 487. 1989. P. 17–28.
18. Cai, H-L., Zhu R-H., Li H-D. Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Anal. Biochem.* V. 396. 2010. P. 103–111.
19. Vitali L., Favere V. T., Micke G. A. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva // *J. Chromatogr. A.* V. 1218. 2011. P. 2327–2333.
20. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review / S. Martí-Álamo [et al.] // *J Clin Exp Dent.* V. 4. 2012. P. 237–243.
21. Ferguson DB. Current diagnostic uses of saliva // *J. Den. Res.* V. 66. 1987. P. 420–424.
22. Drobitch R. K., Svensson C. K. Therapeutic drug monitoring in saliva. An Update // *Clin. Pharmacokinet.* V. 23. 1992. P. 365–379.
23. Determination of levetiracetam in human plasma/serum/saliva by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry / T. Guo [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* V. 375. 2007. P. 115–118.
24. Unconjugated methoxylated catecholamine metabolites in human saliva. Quantitation methodology and comparison with plasma levels / C.J. Drebing [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* V. 3. 1989. P. 217–220.

25. Relationship between 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and homovanillic acid in saliva and plasma of healthy volunteers / R-K. Yang [et al.] // *Biol. Psychiatry*. V. 42. 1997. P. 821–826.

REFERENCES

- Chunxiao L., Qing L., Xujia L., Bosai H., Zhenyu S., Huarong X., Yidi Y., Ran L., Kaishun B. Determination of catecholamines and their metabolites in rat urine by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the study of identifying potential markers for Alzheimer's disease. *J. Mass Spectrom.*, vol. 50, pp. 354–363. DOI: 10.1002/jms.3536.
- Ma J., Qiu H., Rui Q., Liao Y., Chen Y., Xu J., Zhan P., Zhao Y. Fast determination of catecholamines in human plasma using carboxyl-functionalized magnetic-carbon nanotube molecularly imprinted polymer followed by liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, vol. 1429, pp. 86–96. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.030.
- Thomas A., Geyer H., Mester H.J., Schänzer W., Zimmermann E., Thevis M. Quantitative determination of adrenaline and noradrenaline in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, vol. 64, pp. 587–591. DOI: 10.1365/s10337-006-0067-8.
- Davis, E. Loiacono R., Summers R.J. The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the b-adrenergic system. *Br. J. Pharmacol.*, vol. 154, pp. 584–597. DOI: 10.1038/bjp.2008.164.
- Xie L., Chen L., Gu P., Wei L., Kang X. A convenient method for extraction and analysis with high-pressure liquid chromatography of catecholamine neurotransmitters and their metabolites. *J. Vis. Exp.*, vol. 133, pp. 1–10. DOI: 10.3791/56445.
- Barco S., Verly I., Corrias M.V., Sorrentino S., Conte M., Tripodi G., Tytgat G., Kuilenburg A.V., Ham M.V., Velden M.S., Garaventa A., Cangemi, G. Plasma free metanephrines for diagnosis of neuroblastoma patients. *Clin. Biochem.*, vol. 66, pp. 57–62. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2019.02.012.
- Boghossian T., Mazzoni I., Barroso O., Rabin O. Investigating the use of stimulants in out-of-competition sport samples. *J. Anal. Toxicol.*, vol. 35, pp. 613–616. DOI: 10.1093/anatox/35.9.613.
- WADA Prohibited list 2020 (2020). Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2020_english_prohibited_list.pdf [accessed 21 May 2020]
- Okumura T., Nakajima Y., Matsuoka M., Takamatsu T. Study of salivary catecholamines using fully automated column-switching high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B*, vol. 694, pp. 305–316. DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00106-0.
- Roy A., Pickar D., De Jong J., Karoum F., Linnoila M. Norepinephrine and Its Metabolites in Cerebrospinal Fluid, Plasma, and Urine Relationship to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Depression. *Arch Gen Psychiatry*, vol. 45, pp. 849–857. DOI:10.1001/archpsyc.1988.01800330081010.
- Hubbard K. E., Wells A., Owens T. S., Tagen M., Fraga C. H., Stewart C. F. Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Biomed. Chromatogr.*, vol. 24, pp. 626–631. DOI: 10.1002/bmc.1338.
- Whiting, M.J. Simultaneous measurement of urinary metanephrines and catecholamines by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection // *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 46, pp. 129–136. DOI: 10.1258/acb.2008.008180.
- Sakaguchi Y., Yoshida H., Hayama T., Itoyama M., Todoroki K., Yamaguchi M., Nohta H. Selective liquid-chromatographic determination of native fluorescent biogenic amines in human urine based on fluoros derivatization. *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, pp. 5581–5586. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.05.076.
- LC–MS/MS determination of catecholamines in urine using FMOC–Cl derivatization on solid-phase extraction cartridge. *Chromatographia*, vol. 81, pp. 1487–1494. DOI: 10.1007/s10337-018-3610-5
- van der Hoorn F.A.J., Boomsma F., Man in't Veld A.J., Schalekamp M.A.D.H. Improved measurement of urinary catecholamines by liquid–liquid extraction, derivatization and highperformance liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Chromatogr.*, vol. 563, pp. 348–355. DOI: 10.1016/0378-4347(91)80041-a.
- Yan J., Kuzhiumparambil U., Bandodkar S., Solowij N., Fu S. Development and validation of a simple, rapid and sensitive LC–MS/MS method for the measurement of urinary neurotransmitters and their metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, pp. 7191–7199. DOI: 10.1007/s00216-017-0681-3.
- van der Hoorn F.A.J., Boomsma F., Man in't Veld A.J., Schalekamp M.A.D.H. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.*, vol. 487, pp. 17–28. DOI: 10.1016/s0378-4347(00)83003-0.
- Cai, H-L., Zhu R-H., Li H-D. Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Anal. Biochem.*, vol. 396, pp. 103–111. DOI: 10.1016/j.ab.2009.09.015.
- Vitali L., Favere V. T., Micke G. A. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, pp. 2327–2333. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.02.035.
- Martí-Álamo S., Mancheño-Franch A., Marzal-Gamarra C., Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *J Clin Exp Dent.*, vol. 4, pp. 237–243. DOI: 10.4317/jced.50865.
- Ferguson DB. Current diagnostic uses of saliva. *J. Den. Res.*, vol. 66., 1987, pp. 420–424. DOI: 10.1177/00220345870660020601.
- Drobitch R. K., Svensson C. K. Therapeutic drug monitoring in saliva. An Update. *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 23, pp. 365–379. DOI: 10.2165/00003088-199223050-00003.
- Guo T, Oswald LM, Mendu DR, Soldin S. Determination of levetiracetam in human plasma/serum/saliva by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, vol. 375, pp. 115–118 DOI: 10.1016/j.cca.2006.06.022.
- Drebing C.J., Freedman R., Waldo M., Gerhardt G.A. Unconjugated methoxylated catecholamine metabolites in human saliva. Quantitation methodology and comparison with plasma levels. *Biomed. Chromatogr.*, vol. 3, pp. 217–220. DOI: 10.1002/bmc.1130030509.
- Yang R-K., Yehuda R., Holland D.D., Knott P.J. Relationship between 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and homovanillic acid in saliva and plasma of healthy volunteers. *Biol. Psychiatry*, vol. 42, pp. 821–826. DOI: 10.1016/s0006-3223(97)00055-3.