

# Количественное определение моноаминовых нейротрансмиттеров в гомогенатах головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС

Попов Н. С.<sup>1</sup>, Гавриленко Д. А.<sup>1</sup>, Балабаньян В. Ю.<sup>2</sup>, Петрова М. Б.<sup>1</sup>, Донсков С. А.<sup>1</sup>,  
Атаджанов И. Б.<sup>1</sup>, Шатохина Н. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России), Тверь, Российская Федерация

<sup>2</sup> – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

**Аннотация.** *Актуальность.* Оценка влияния лекарственных средств на нейромедиаторные процессы является важной составляющей фармакодинамических исследований. Количественное определение моноаминовых нейротрансмиттеров в структурах головного мозга лабораторных животных является актуальной задачей фармакологии и физиологии. *Цель* — разработка методики количественного определения серотонина, дофамина, норэпинефрина, гистамина и эpineфрина в гомогенатах головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС. *Методы.* Выделение нейромедиаторов из мозга крыс осуществляли путём гомогенизации биоматериала с ацетонитрилом и хлористоводородной кислотой. Очистку извлечения проводили с помощью жидкость-жидкостной экстракции с хлороформом и изопропанолом. Детектирование моноаминов осуществляли с помощью масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200MD, хроматографирование проводили с использованием ВЭЖХ Agilent Technologies 1260 Infinity II. В качестве элюента использовали метанол и деионизированную воду. *Результаты.* Пробоподготовка представляла собой центрифугирование полученного гомогената, высушивание супернатанта в токе азота, растворение осадка в подвижной фазе, очистку раствора с помощью смеси хлороформа и изопропанола. Для хроматографического разделения моноаминовых нейромедиаторов использовали аналитическую колонку Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм. Общее время хроматографического анализа составило 12 минут, время удерживания норэпинефрина, эpineфрина, дофамина, серотонина, гистамина составило 2,8; 3,2; 5,4; 7,9; и 2,2 минут, соответственно. Аналитический диапазон методики составил 25,0–5000,0 нг/г для эpineфрина, гистамина и дофамина; 5,0–5000,0 нг/г для серотонина и 50,0–5000,0 для норэпинефрина. Для апробации методики был проведён анализ моноаминовых нейромедиаторов в стриатуме intactных крыс Wistar. *Заключение.* Разработанная биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения моноаминовых нейромедиаторов в головном мозге крыс полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить содержание норэпинефрина, эpineфрина, дофамина, серотонина и гистамина в структурах головного мозга крыс.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ-МС/МС; хроматография; масс-спектрометрия; дофамин; норэпинефрин; эpineфрин; серотонин; гистамин

## Для цитирования:

Попов Н. С., Гавриленко Д. А., Балабаньян В. Ю., Петрова М. Б., Донсков С. А., Атаджанов И. Б., Шатохина Н. А. Количественное определение моноаминовых нейротрансмиттеров в гомогенатах головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(4):33–42. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-33-42>

**Поступила:** 21 октября 2022 г. **Принята:** 17 ноября 2022 г. **Опубликована:** 24 декабря 2022 г.

## Quantitative determination of monoamine neurotransmitters in rat brain homogenates using HPLC-MS/MS

Popov NS<sup>1</sup>, Gavrilenko DA<sup>1</sup>, Balabanyan VYu<sup>2</sup>, Petrova MB<sup>1</sup>, Donskov SA<sup>1</sup>, Atadzhanov IB<sup>1</sup>, Shatokhina NA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

<sup>2</sup> – FSEI HPE Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** *Relevance.* Evaluation of the effect of drugs on neurotransmitter processes is an important component of pharmacodynamic studies. The quantitative determination of monoamine neurotransmitters in the brain structures of laboratory animals is an urgent task of pharmacology and physiology. *Purpose of the study.* Development of a method for the quantitative determination of serotonin, dopamine, norepinephrine, histamine and epinephrine in rat brain homogenates using HPLC-MS/MS. *Methods.* The isolation of neurotransmitters from the brain of rats was carried out by homogenizing the biomaterial with acetonitrile and hydrochloric acid. The extraction was purified by liquid-liquid extraction with chloroform and isopropanol. Monoamines were detected using an AB Sciex QTrap 3200MD mass spectrometer, chromatography was performed using an Agilent Technologies 1260 Infinity II HPLC. Methanol and deionized water were used as eluent. *Results.* Sample preparation consisted of centrifugation of the resulting homogenate, drying of the supernatant in a stream of nitrogen, dissolution of the precipitate in the mobile phase, and purification of the solution using a mixture of chloroform and isopropanol. An Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6×100 mm, 2.7 μm analytical column was used to separate monoamine neurotransmitters. The total time of the chromatographic analysis was 12 minutes, the retention time of norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin, histamine was 2.8; 3.2; 5.4; 7.9; and 2.2 minutes, respectively. The analytical range of the technique was 25.0–5000.0 ng/g for epinephrine, histamine, and dopamine; 5.0–5000.0 ng/g for serotonin and 50.0–5000.0 for norepinephrine. To test the technique, we analyzed monoamine neurotransmitters in the striatum of intact Wistar rats. *Conclusion.* The developed bioanalytical HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of monoamine neurotransmitters in the rat brain fully complies with the validation requirements. The metrological characteristics of the technique make it possible to estimate the content of norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin, and histamine in the brain structures of rats with high accuracy.

**Keywords:** HPLC-MS/MS; chromatography; mass spectrometry; dopamine; norepinephrine; epinephrine; serotonin; histamine

## For citations:

Popov NS, Gavrilenko DA, Balabanyan VYu, Petrova MB, Donskov SA, Atadzhanov IB, Shatokhina NA. Quantitative determination of monoamine neurotransmitters in rat brain homogenates using HPLC-MS/MS. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(4):33–42. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-4-33-42>

**Received:** October 21, 2022. **Accepted:** November 17, 2022. **Published:** December 24, 2022

## Введение / Introduction

Нейротрансмиттерами (НТ) называют биологически активные вещества, участвующие в синаптической передаче нервного импульса. Среди основных НТ выделяют ацетилхолин, аминокислоты (ГАМК, глицин, глутамат, аспарагинат) и моноамины (дофамин, норэпинефрин, эпинефрин, серотонин, гистамин) [1]. Нарушения обмена НТ могут приводить к широкому спектру неврологических и психических расстройств, фармакотерапия которых требует применения эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС). Оценка влияния ЛС на нейромедиаторные процессы является важной составляющей фармакодинамических исследований [2, 3]. Способность изменять содержание моноаминовых НТ в нервной ткани характерна для ЛС, обладающих противопаркинсонической, нейролептической, анальгетической, анксиолитической, снотворной активностью. Наличие нейропротекторных и прокогнитивных свойств у некоторых ЛС также связывают с их влиянием на нейромедиаторные процессы. Кроме того, важным элементом оценки безопасности новых фармакотерапевтических средств является анализ возможного аддитивного потенциала. Известно, что формирование патологического пристрастия многих ЛС связано с их влиянием на систему «вознаграждения мозга», функционирование которой непосредственно связано с обменом дофамина [3, 4].

Таким образом, определение уровня моноаминовых НТ в структурах головного мозга лабораторных животных является актуальной задачей фармакологии и физиологии. Сочетание точных и воспроизводимых аналитических методик и биологических моделей является важным инструментом для изучения патогенеза различных заболеваний, а также фармакодинамики, эффективности и безопасности новых ЛС на этапе доклинических испытаний.

Определение моноаминовых НТ в биологических образцах является сложной задачей. Так, катехоламины обладают высокой чувствительностью к свету [5], тяжёлым металлам [6], высоким значениям pH [7] и могут легко подвергаться спонтанному окислению [8]. Кроме того, некоторые НТ существуют в свободной форме в очень низких концентрациях, что требует разработки и внедрения специфичных и чувствительных методик количественного определения. Среди методов количественного анализа веществ в биологических объектах ключевое место занимает высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией, использование которой в большинстве случаев упрощает процедуру пробоподготовки и позволяет с высокой чувствительностью и скоростью проводить количественное определение нескольких аналитов одновременно. На основании данных литературы об использовании ВЭЖХ-МС/МС для определения содержания моноаминовых НТ в головном мозге можно выделить основные недостатки

предложенных методик: ограниченное число аналитов [9–11], длительное время анализа [12, 13] и сложная пробоподготовка, включающая дериватизацию или сублимационное высушивание [10, 14].

Цель исследования – разработка методики одновременного количественного определения серотонина, дофамина, норэпинефрина, гистамина и эпинефрина в гомогенатах головного мозга крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

## Материалы и методы / Materials and methods

Индивидуальные исходные растворы (stock solution, 1 мг/мл) моноаминовых НТ готовили на метаноле (J.T. Bacter, Польша) путём растворения в мерных колбах объёмом 50 мл 50 мг субстанции каждого аналита в пересчёте на основание [15]. Использовали аналитические стандарты Sigma Aldrich: серотонина гидрохлорид (CAS: 153-98-0), норэпинефрина гидрохлорид (CAS: 55-27-6), эпинефрина гидрохлорид (CAS: 329-63-5), дофамина гидрохлорид (CAS: 62-31-7), гистамин (CAS: 51-45-6), в качестве внутреннего стандарта (IS) применяли салбутамол (CAS: 18559-94-9). Отвешивание компонентов осуществляли на аналитических весах ВЛ-124В (Госметр, Россия), для ускорения растворения использовали орбитальный шейкер OS-20 (Biosan, Латвия). Для приготовления исходного комбинированного раствора НТ (100 мкг/мл) в мерную колбу объёмом 25 мл вносили по 2,5 мл каждого индивидуального раствора, после чего доводили объём до метки метанолом. Полученный комбинированный раствор использовали для приготовления серии рабочих растворов (work solution) на метаноле.

На этапе разработки методики пробоподготовки подбирали условия выделения моноаминовых НТ из биоматериала и последующей очистки полученного экстракта. Извлечение нейромедиаторов из тканей головного мозга крыс осуществляли путём гомогенизации с экстрагентом. С этой целью точную навеску биоматериала вносили в пробирку типа Эппендорф объёмом 1,5 мл, добавляли экстрагент из расчёта 400 мкл на 100 мг ткани, помещали бусину диаметром 4 мм из кварцевого стекла и гомогенизировали на вибрационной мельнице с частотой 50 Гц и амплитудой колебательных движений 30 мм в течение 10 минут. Полученный гомогенат центрифугировали при температуре 4 °С и частоте 15 000 об/мин в течение 15 минут с помощью лабораторной центрифуги SIGMA 1-14K (Финляндия). Супернатант переносили в отдельные пробирки Эппендорф и использовали для последующего анализа. Проводили сравнительный анализ использования в качестве экстрагента различных жидкостей: вода, метанол, ацетонитрил, водные растворы кислот (хлористоводородной, хлорной, муравьиной, трихлоруксусной, сульфосалициловой) различных концентраций, в том числе в комбинации. Кроме того,

оценивали влияние различных добавок к экстрагенту (натрия метабисульфит, ЭДТА, аскорбиновая кислота) на стабильность и степень извлечения аналитов. Так как ткани мозга содержат большое количество фосфолипидов, которые часто становятся причиной высоких значений матричного эффекта, на этапе разработки методики пробоподготовки подбирали условия очистки полученных извлечений от мешающих компонентов. Данную процедуру осуществляли с помощью жидкость-жидкостной экстракции, оценивали использование в качестве экстрагента различных растворителей (гексан, хлороформ, изопропанол). Для снижения нижнего предела количественного определения аналитов проводили концентрирование полученных экстрактов. С этой целью полученные экстракты моноаминовых НТ высушивали в токе азота с последующим растворением сухого остатка в малом количестве растворителя. Полученные готовые растворы после очистки переносили в полиэтиленовые вставки в хроматографические вials из тёмного стекла и использовали для последующего анализа.

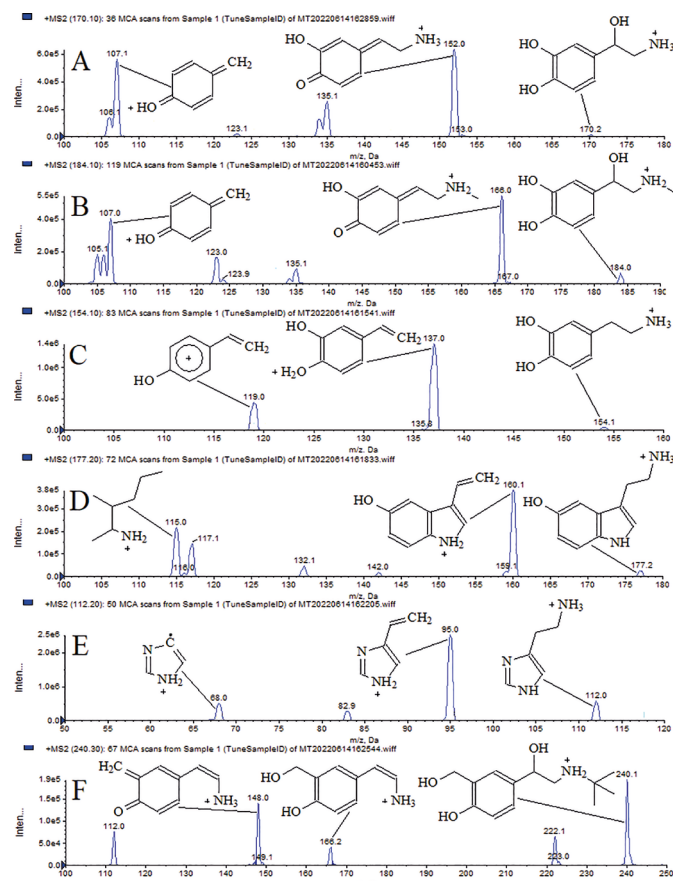
Хроматографическое разделение моноаминовых НТ осуществляли на обращённо-фазовой аналитической колонке InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм (Agilent Technologies, США) с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа 1260 Infinity II (Agilent Technologies, ФРГ), в качестве компонентов подвижной фазы использовали метанол и деионизированную воду с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты. В качестве детектора при проведении хроматографического анализа использовали тандемный квадрупольный масс-спектрометр AB Sciex QTrap 3200 MD (Sciex, Сингапур). Оптимизацию детектирования осуществляли с помощью шприцевого ввода в масс-спектрометр индивидуальных растворов (50,0 нг/мл) моноаминовых НТ и IS в метаноле с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты. Вначале для каждого аналита определяли  $m/z$  протонированных молекул при положительной ионизации, подбирали оптимальные значения потенциала декластеризации (DP) и напряжения на входе в ячейку соударений (CEP). Затем для установленных ионов-предшественников определяли масс-спектры второго порядка, выбирали 2 характеристических фрагментарных иона, для которых устанавливали наилучшие значения энергии соударений (CE) и напряжения на выходе из ячейки соударений (CXP). Полученные значения обеспечивали наилучшую селективность и чувствительность при регистрации моноаминовых НТ в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Для обработки первичных данных масс-спектрометрического и хроматографического анализа использовали программное обеспечение (ПО) Sciex Analyst 1.3.6, расчёт значений валидационных параметров проводили с использованием ПО Microsoft Office Excel 365.

В процессе валидации оценивали следующие параметры биоаналитической методики: селективность, матричный эффект, перенос пробы, линейность аналитического диапазона, нижний предел количественного определения (НПКО), внутри- и межсерийную точность и прецизионность, фактор разбавления. Кроме этого, определяли стабильность определяемых веществ на этапах анализа.

## Результаты / Results

Для моноаминовых НТ и внутреннего стандарта были проанализированы масс-спектры первого и второго (рис. 1) порядка, результаты определения которых сравнивали с данными литературы [12, 18]. Для каждого вещества были определены два характеристических иона-продукта, для которых были подобраны параметры детектирования, обеспечивающие максимальную чувствительность (табл. 1).



**Рис. 1.** Масс-спектры ионов-продуктов моноаминовых НТ (А – норэпинефрин, В – эпинефрин, С – дофамин, D – серотонин, Е – гистамин) и внутреннего стандарта (F – салбутамол) при положительной ионизации  
**Fig. 1.** Mass spectra of monoamine NT product ions (A – norepinephrine, B – epinephrine, C – dopamine, D – serotonin, E – histamine) and internal standard (F – salbutamol) with positive ionization

Таблица 1

Параметры масс-спектрометрического детектирования моноаминовых НТ в режиме MRM

Table 1

Parameters of mass spectrometric detection of monoamine NT in MRM mode

Тип источника ионов			TurboIonSpray				
Режим ионизации			Положительный				
Температура источника ионов, °С			450,0				
Напряжение источника ионов, В			5500,0				
Давление газа завесы, psi			10,0				
Давление газа-распылителя, psi			40,0				
Давление газа-нагревателя, psi			50,0				
НТ	MRM, m/z	Dwell, мсек	DP, В	EP, В	CEP, В	CE, эВ	CXP, В
Норэпинефрин	170,2/152,0 170,2/107,1	100	34	10,0	9,5	13 23	2,3 2,5
Эпинефрин	184,2/166,0 184,2/107,0		30		9,7	15 23	2,9 3,7
Дофамин	154,2/137,0 154,2/119,0		29		7,0	11 20	2,7 4,0
Серотонин	177,2/160,1 177,2/115,0		27		9,6	14 14	2,5 3,9
Гистамин	112,0/95,0 112,0/68,0		49		14,0	15 16	3,0 2,5
Сальбутамол (IS)	240,1/148,0 240,1/166,2		51		13,0	24 21	2,5 2,8

Хроматографическое разделение моноаминовых НТ осуществляли в обращённо-фазовом режиме. В качестве компонента подвижной фазы, обладающего большей элюирующей силой, использовали метанол. Применение альтернативного элюента – ацетонитрила при любой программе градиента не приводило к полному разделению пиков норэпинефрина и мешающих компонентов матрицы. Таким образом, в качестве

компонентов подвижной фазы использовали деионизированную воду (А) и метанол (В) с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты в градиентном режиме (табл. 2), общее время анализа составило 12 минут. По результатам анализа хроматограмм установлено, что время удерживания норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина, гистамина составило 2,8; 3,2; 5,4; 7,9; и 2,2 минут, соответственно (рис. 2).

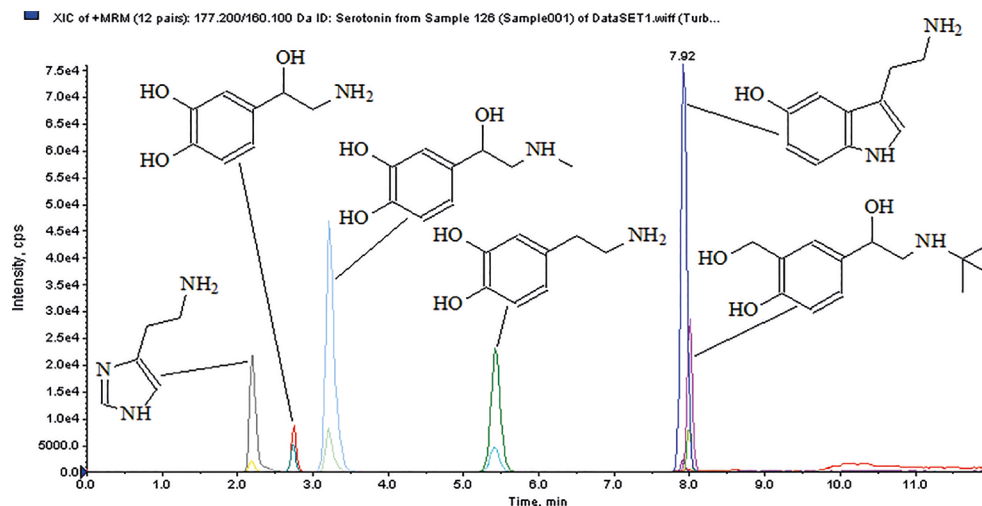
Таблица 2

Хроматографические параметры определения моноаминовых НТ

Table 2

Chromatographic parameters for the determination of monoamine NT

Колонка	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм			
Элюент А	Деионизированная вода + 0,1 % муравьиной кислоты			
Элюент В	Метанол + 0,1 % муравьиной кислоты			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% А	% В
	0,0	0,4	98	2
	2,5		98	2
	4,0		5	95
	8,0		5	95
	8,01		98	2
12,0	98		2	
Температура колонки, °С	30			
Аликвота, мкл	5			
Общее время анализа, мин	12			
Промывка инжектора	3 секунды, 50 % водный раствор метанола			



**Рис. 2.** Хроматограмма стандартного образца с индивидуальной концентрацией каждого моноаминового НТ в пересчёте на мозговую ткань 500 нг/г (подвижная фаза – метанол и деионизированная вода с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты; режим элюирования – градиентный; хроматографическая колонка – InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм; температура колонки – 30 °С; аликвота – 5 мкл)

**Fig. 2.** Chromatogram of a standard sample with an individual concentration of each monoamine NT in terms of brain tissue 500 ng/g (mobile phase – methanol and deionized water with the addition of 0.1% formic acid; elution mode – gradient; chromatographic column – InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 microns; temperature columns – 30 °C; aliquot – 5 µl)

Сравнительный анализ результатов пробоподготовки показал, что оптимальные значения степени извлечения и величины матричного эффекта для каждого аналита могут быть достигнуты при гомогенизации образцов мозговой ткани со смесью ацетонитрила и 0,1 н водного раствора хлористоводородной кислоты в соотношении 3:1. При этом происходит эффективное удаление белковых компонентов. Анализ использования ЭДТА с целью связывания тяжёлых металлов, способствующих ускоренному окислению катехоламинов [6], показал значительное снижение чувствительности определения гистамина и норэпинефрина. Добавление с этой же целью натрия метабисульфита или аскорбиновой кислоты привело к появлению на хроматограммах множества дополнительных мешающих пиков. Таким образом, методика пробоподготовки включала в себя гомогенизацию тканей головного мозга с извлекателем (ацетонитрил : 0,1н хлористоводородная кислота, 3:1) в соотношении 400 мкл на 100 мг биоматериала, последующее центрифугирование при температуре 4 °С и частоте 15000 об/мин в течение 15 минут. Затем 200 мкл супернатанта переносили в чистые пробирки типа Эппендорф объёмом 1,5 мл, добавляли 10 мкл метанольного раствора IS с концентрацией 100 нг/мл и высушивали в токе азота при температуре 40 °С с помощью испарительного концентратора NDK200-1N (Miulab, КНР), полученный сухой остаток растворяли в 50 мкл подвижной фазы (2 % водный раствор метанола + 0,1 % муравьиной кислоты). С целью очистки к полученному раствору добавляли 100 мкл смеси хлороформа и изопропанола (3:1) [16], перемешивали

на центрифуге-вортексе FVL-2400N (Biosan, Латвия) в течение 1 минуты, после чего отделяли водный слой центрифугированием при комнатной температуре и частоте 3000 об/мин в течение 5 минут. Верхний слой переносили в полиэтиленовые вставки в вials и использовали для хроматографического анализа.

Метрологические параметры методики определяли по результатам анализа серии стандартных образцов с содержанием каждого моноаминового НТ 5,0; 25,0; 50,0; 250,0; 500,0; 2500,0 и 5000,0 нг в пересчёте на 1 г мозговой ткани, а также контрольных и холостых образцов с добавлением внутреннего стандарта и без него. Так как в природе отсутствует свободная от моноаминовых НТ биологическая матрица, требуется доказательство возможности использования в качестве её заменителя чистого растворителя (100 мкл воды, 300 мкл ацетонитрила и 100 мкл 0,1 н раствора хлористоводородной кислоты). С этой целью был проведён эксперимент с добавлением рабочих метанольных растворов аналитов к аликвотам гомогената головного мозга крыс с последующим проведением процедуры пробоподготовки [17, 19]. Содержание моноаминовых НТ в образцах гомогената мозга крыс с добавками рассчитывали с использованием калибровочной зависимости, установленной по результатам анализа стандартных образцов на чистом растворителе. Разность между установленной концентрацией и концентраций стандартных растворов с добавкой определяли для каждого нейромедиатора.

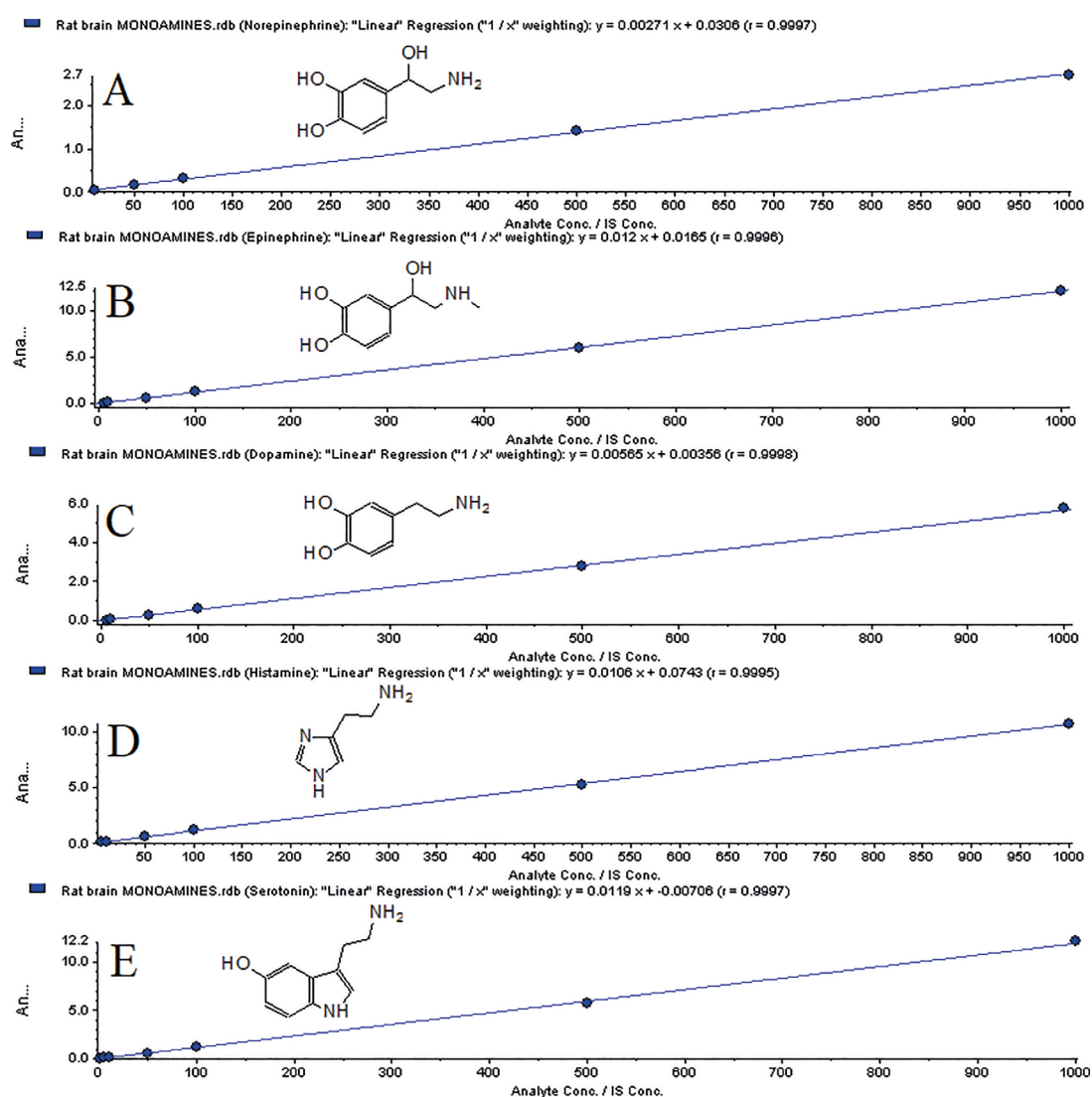
Результаты экспериментов со стандартным добавлением показали, что для серотонина, гистамина, дофамина и эпинефрина на протяжении всего анали-

тического диапазона отклонения прироста концентраций не превышали 10 % от среднего значения, лишь для норэпинефрина эта величина была близка к 15 %. Кроме того, выявлено близкое к 1 значение отношения тангенсов угла наклона калибровочной прямой, построенной по результатам анализа гомогенатов мозга крыс с добавлением аналитов и стандартных растворов на чистом растворителе. Таким образом, установлено, что для построения калибровочной зависимости использование стандартных растворов моноаминовых НТ, приготовленных на чистом растворителе, не будет отражаться на правильности результатов анализа биологических образцов.

Для оценки селективности методики проводили сравнительный анализ отношения площадей хроматографических пиков двух характеристических

ионов-продуктов каждого моноаминового НТ в чистом растворителе и с добавлением гомогената мозга. Было установлено, что для всех уровней концентраций каждого аналита этот показатель не превышал 10 %, что подтверждает селективность разработанной методики количественного определения.

По результатам хроматографического анализа серии стандартных образцов для всех моноаминовых НТ были построены калибровочные кривые, отражающие зависимость отношения площади пика аналита к площади пика IS от концентрации аналита в стандартном образце (рис. 3). Калибровочные зависимости были установлены в виде уравнений линейной регрессии, при этом считали приемлемыми значения коэффициента корреляции не ниже 0,99 (табл. 3).



**Рис. 3.** Калибровочные прямые для количественного определения норэпинефрина (А), эпинефрина (В), дофамина (С), серотонина (D) и гистамина (Е) (по горизонтальной оси представлена концентрация моноаминового НТ в гомогенате мозговой ткани (нг/мл), по вертикальной оси – отношение площади хроматографического пика НТ к площади пика IS – салбутамола)

**Fig. 3.** Calibration lines for the quantitative determination of norepinephrine (A), epinephrine (B), dopamine (C), serotonin (D) and histamine (E) (the horizontal axis shows the concentration of monoamine HT in brain tissue homogenate (ng/ml), the vertical axis shows the ratio of the area of the chromatographic peak of HT to areas of the peak of IS – salbutamol)

Таблица 3

Валидационные характеристики методики определения моноаминовых нейротрансмиттеров в головном мозге крыс

Table 3

Validation characteristics of the method for determining monoamine neurotransmitters in the rat brain

Аналит	Норэпинефрин	Эпинефрин	Дофамин	Гистамин	Серотонин
Аналитический диапазон, нг/г	50,0 – 5000,0	25,0 – 5000,0	25,0 – 5000,0	25,0 – 5000,0	5,0 – 5000,0
НПКО, нг/г	50,0	25,0	25,0	25,0	5,0
Уравнение регрессии	$y = 0,0027x + 0,0306$	$y = 0,012x + 0,0165$	$y = 0,00565x + 0,00356$	$y = 0,0106x + 0,0743$	$y = 0,0119x - 0,00706$
$r^2$	0,9997	0,9996	0,9998	0,9995	0,9997
Межсерийная точность и прецизионность					
Нижний предел количественного определения					
Измеренная концентрация, нг/г, mean±SD	56,0±2,2	23,1±2,1	22,7±1,5	26,4±1,9	5,4±0,4
Точность, %	112,0	92,4	90,8	105,6	107,4
CV, %	4,34	8,35	6,00	7,66	7,74
Низкая концентрация					
Измеренная концентрация, нг/г, mean±SD	106,3±8,2	42,9±1,5	42,7±0,8	45,7±2,0	46,8±1,8
Точность, %	106,3	95,4	94,8	101,5	104,0
CV, %	8,18	3,24	1,77	4,41	4,09
Средняя концентрация					
Измеренная концентрация, нг/г, mean±SD	2287,5±27,2	2195,7±52,7	2172,2±63,4	2239,1±48,6	2242,1±59,3
Точность, %	101,7	97,6	96,5	99,5	99,6
CV, %	1,21	2,34	2,81	2,15	2,63
Высокая концентрация					
Измеренная концентрация, нг/г, mean±SD	4561,5±25,2	4470,2±59,7	4548,8±37,8	4508,9±20,1	4470,5±52,4
Точность, %	101,4	99,3	101,1	100,2	99,3
CV, %	0,56	1,32	0,84	0,45	1,16

В связи с отсутствием доступной холостой биологической матрицы нижний предел количественного определения (НПКО) моноаминовых НТ оценивали по результатам хроматографического анализа стандартов, приготовленных на чистом растворителе. За НПКО принимали условное содержание моноаминового НТ в 1 мг мозговой ткани, которая может быть определена со значениями относительного стандартного отклонения и относительной погрешности не более 20 %, при этом отношение «сигнал—шум» на хроматограмме должно быть не менее 10:1. Результаты определения НПКО представлены в табл. 3.

Перенос веществ во время хроматографического анализа оценивали путём сравнения хроматограмм холостых проб, анализируемых после шестикратного ввода пробы с высокой концентрацией каждого моноаминового НТ и проб с концентрацией аналитов на уровне НПКО. Было установлено, что отношение площадей хроматографических пиков всех моноаминовых НТ в холостых пробах к площади пиков в образцах НПКО был ниже максимально допустимого уровня (20 % для аналитов и 5 % для внутреннего стандарта), что

свидетельствует о незначительном переносе веществ при переходе от большей концентрации к меньшей.

Точность и прецизионность методики оценивали в трёх сериях путём анализа 5 контрольных образцов для четырёх уровней концентраций: нижний предел количественного определения (НПКО), низкая концентрация (НК), средняя концентрация (СК), высокая концентрация (ВК). Точность была выражена в процентах, как отношение измеренной концентрации в контрольных образцах к номинальному содержанию аналита. Прецизионность определяли по коэффициенту вариации (CV) результатов пятикратного определения концентрации каждого аналита. Результаты межсерийной точности и прецизионности представлены в табл. 3.

Стабильность норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина и гистамина в готовых гомогенатах тканей мозга крыс была подтверждена для высоких (900,0 нг/мл) и низких (45,0 нг/мл) концентраций. Оценивали стабильность аналитов после 3 циклов заморозки/разморозки, краткосрочную стабильность, стабильность стандартных растворов моноаминовых

Таблица 4

Содержание моноаминовых НТ в стриатуме интактных крыс Wistar

Table 4

The content of monoamine NT in the striatum of intact rats Wistar

Нейромедиатор	Норэпинефрин	Эпинефрин	Дофамин	Серотонин	Гистамин
Содержание, нг на 1 г ткани (M±S.E.M.)	312,8 ±39,7	Ниже НПКО	7971,6 ±893,1	456,6 ±24,9	312,8 ±35,0

НТ в метаноле, пост-препаративную стабильность и долгосрочную стабильность. По результатам анализа было установлено, что разница в площади пика каждого аналита во всех исследованных пробах и свежеприготовленных образцах не отличалась более чем на 15 %.

Так как содержание моноаминовых НТ в тканях головного мозга крыс может значительно превышать верхний предел количественного определения, была проведена оценка возможности десятикратного разбавления полученных гомогенатов смесью воды (1 часть), ацетонитрила (3 части), 0,1 н раствор хлористоводородной кислоты (1 часть). По результатам анализа было установлено, что разбавление образца не снижает точность и прецизионность количественного определения всех НТ.

**Обсуждение / Discussion**

Апробация разработанной методики была произведена путём анализа содержания моноаминовых НТ в стриатуме 5 интактных крыс Wistar, содержащихся в виварии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России. Результаты определения норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина и гистамина сопоставимы с данными, полученными другими авторами [20–23] и представлены в таблице 4.

**Ограничения исследования / Limitations of the study**

По мнению авторов разработанная методика определения моноаминовых нейромедиаторов в гомогенатах тканей мозга крыс имеет ряд особенностей, ограничивающих её использование. К ним можно отнести отсутствие широкого распространения тандемных масс-спектрометров, используемых в качестве детектора для ВЭЖХ, а также невозможность оценивать изменение уровня определяемых метаболитов в динамике у одних и тех же лабораторных животных.

**Заключение / Conclusion**

Разработанная биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения моноаминовых нейромедиаторов в головном мозге крыс полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить содержание норэпинефрина, эпинефрина, дофамина, серотонина и гистамина в структурах мозга крыс, что несомненно является актуальным и востребованным в исследовании патологических процессов и механизма действия фармакологических средств.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION**

**Конфликт интересов.** У авторов отсутствует какой-либо конфликт интересов.

**Conflict of interest.** The authors do not have any conflict of interest.

**Участие авторов.** *Попов Н. С., Гавриленко Д. А.* – осуществляли разработку и валидацию биоаналитической методики; *Балабаньян В. Ю.* – отвечал за организационную часть исследования; *Петрова М. Б., Донсков С. А., Атаджанов И. Б.* – осуществляли забор биологического материала и выделение структур головного мозга крыс; *Шатохина Н. А.* – выполняла статистическую обработку полученных результатов; все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов.

**Participation of authors.** *Popov NS, Gavrilenko DA* – carried out the development and validation of the bioanalytical methodology; *Balabanyan VYu* – was responsible for the organizational part of the study; *Petrova MB, Donskov SA, Atajanov IB* – carried out the collection of biological material and isolation of rat brain structures; *Shatokhina NA* – performed statistical processing of the results; all the authors participated in the discussion of the results obtained.



СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

**Попов Никита Сергеевич**

*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: ns.popov@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>

SPIN-код: 1974-7300

к. фарм. н., зав. научно-исследовательской лабораторией, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Popov Nikita S.**

*Corresponding author*

e-mail: ns.popov@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>

SPIN code: 1974-7300

PhD, Cand. Pharm Sci., Head of Research Laboratory, Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Гавриленко Дмитрий Антонович**

e-mail: niruef@yandex.ru

SPIN-код: 5573-2662

асс. кафедры химии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Gavrilenko Dmitry A.**

e-mail: niruef@yandex.ru

SPIN code: 5573-2662

Assistant of the Department of Chemistry, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Балабаньян Вадим Юрьевич**

e-mail: bal.pharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

SPIN-код: 7351-7328

д. фарм. н., доцент, в. н. с., лаборатория трансляционной медицины, факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

**Balabanyan Vadim Yu.**

e-mail: bal.pharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

SPIN code: 7351-7328

Dr. Sci. (Pharm), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Translational Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov MSU, Moscow, Russian Federation

**Петрова Маргарита Борисовна**

e-mail: education@tvghmu.ru

SPIN-код: 4310-3839

д. б. н., профессор, зав. кафедрой биологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Petrova Margarita B.**

e-mail: education@tvghmu.ru

SPIN code: 4310-3839

Dr. Sc. (Biol.), Professor, Head of Department of Biology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Донсков Сергей Александрович**

e-mail: donskov\_s@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>

SPIN-код: 1026-7460

к. с.-х. н., доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Donskov Sergey A.**

e-mail: donskov\_s@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>

SPIN code: 1026-7460

PhD, Cand. Agricult Sci., Associate Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Атаджанов Ильяс Борисович**

e-mail: atadzanov.ilyas@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1995-2661>

препаратор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Atadzhanov Ilyas B.**

e-mail: atadzanov.ilyas@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1995-2661>

preparator of the Department of Histology, Embryology and Cytology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Шатохина Наталья Александровна**

e-mail: chatokhina@mail.ru

SPIN-код: 8171-5540

к. м. н., доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Shatokhina Natalya A.**

e-mail: chatokhina@mail.ru

SPIN code: 8171-5540

PhD, Cand. Med Sci., Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE TVER SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

## Список литературы / References

1. Barandouzi ZA, Lee J, del Carmen Rosas M, et al. Associations of neurotransmitters and the gut microbiome with emotional distress in mixed type of irritable bowel syndrome. *Sci Rep.* 2022;12(1):1648. DOI: 10.1038/s41598-022-05756-0.
2. Федеральный закон Российской Федерации № 61 от 12 апреля 2010 г. «Об обращении лекарственных средств». [Federal Law of Russian Federation №61 of 12 April 2010 «Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv». (In Russ).]. URL: <https://base.garant.ru/12174909/> Ссылка активна на: 17.10.2022
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 17–24 с. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv Part 1. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).].
4. Fei YY, Johnson PA, Omran NAL, et al. Maladaptive or misunderstood? Dopamine fasting as a potential intervention for behavioral addiction. *Lifestyle Med.* 2021;3(1):e54. DOI: 10.1002/lim2.54.
5. Jung-Klawitter S, Kuseyri Hübschmann O. Analysis of catecholamines and Pterins in inborn errors of monoamine neurotransmitter metabolism— from past to future. *Cells.* 2019;8(8):867. DOI: 10.3390/cells8080867.
6. Kontur PJ, Fechter LD. Brain regional manganese levels and monoamine metabolism in manganese-treated neonatal rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1988;10(4):295–303. DOI: 10.1016/0892-0362(88)90031-1
7. Seyfried CA, Adam G, Greve T. An automated direct-injection HPLC-method for the electrochemical/fluorimetric quantitation of monoamines and related compounds optimized for the screening of large numbers of animals. *Biomed Chromatogr.* 1986;1(2):78–88. DOI: 10.1002/bmc.1130010206.
8. Wang W, Wu X, Yang CS, et al. An unrecognized fundamental relationship between neurotransmitters: Glutamate protects against catecholamine oxidation. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(10):1564. DOI: 10.3390/antiox10101564.
9. Cannazza G, Carrozzo MM, Cazzato AS, et al. Simultaneous measurement of adenosine, dopamine, acetylcholine and 5-hydroxytryptamine in cerebral mice microdialysis samples by LC–ESI-MS/MS. *J Pharm Biome Anal.* 2012;71:183–186. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.08.004.
10. Greco S, Danysz W, Zivkovic A, et al. 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.
11. Uutela P, Reinilä R, Piepponen P, et al. Analysis of acetylcholine and choline in microdialysis samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19(20):2950–2956. DOI: 10.1002/rcm.2160.
12. Xu N, Qiu C, Wang W, et al. HPLC/MS/MS for quantification of two types of neurotransmitters in rat brain and application: Myocardial

ischemia and protection of Sheng-Mai-san. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(1):101–108. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.12.015.

13. Kovac A, Somikova Z, Zilka N, et al. 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.

14. Syslová K, Rambousek L, Kuzma M, 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.

15. Chen D, Zhang J-X, Cui W-Q, et al. A simultaneous extraction/derivatization strategy coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of free catecholamines in biological fluids. *J Chromatogr A.* 2021;1654:462474. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462474.

16. 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.

17. Ma S-R, Yu J-B, Fu J, et al. Determination and application of nineteen monoamines in the gut microbiota targeting phenylalanine, tryptophan, and glutamic acid metabolic pathways. *Molecules.* 2021;26(5):1377. DOI: 10.3390/molecules26051377.

18. Xie Z, Lorkiewicz P, Riggs DW, et al. 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.

19. Minkler P, Stoll M, Ingalls S et al. Quantification of Carnitine and Acylcarnitines in Biological Matrices by HPLC Electro Spray Ionization–Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 2008;54(9):1451–1462. DOI: 10.1373/clinchem.2007.099226.

20. González-Pardo H, Arias J, Gómez-Lázaro E, et al. Sex-Specific Effects of Early Life Stress on Brain Mitochondrial Function, Monoamine Levels and Neuroinflammation. *Brain Sci.* 2020;10(7):447. DOI: 10.3390/brainsci10070447.

21. Doroshenko Y, Lelevich V. Biogenic Monoamines, Their Precursors, and Metabolites in the Brain of Rats under Experimental Circulatory Failure. *Neurochemical Journal.* 2020;14(3):295–302. DOI: 10.1134/S1819712420030034.

22. Mahmood D, Akhtar M, Jahan K, et al. Histamine H3 receptor antagonists display antischizophrenic activities in rats treated with MK-801. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2016;27(5):463–471. DOI: 10.1515/jbcpp-2015-0045.

23. Krupina N, Khlebnikova N, Narkevich V, et al. 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.