

# ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ГОМОГЕНАТАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ДЕРИВАТИЗАЦИИ С 9-ФЛУОРЕНИЛМЕТИЛХЛОРФОРМИАТОМ

## Н.С. Попов

к.фарм.н., зав. научно-исследовательской лабораторией,  
ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России» (г. Тверь, Россия)

## В.Ю. Балабаньян

д.фарм.н., доцент, вед. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной медицины,  
факультет фундаментальной медицины,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия)

## М.Б. Петрова

д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии,  
ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России» (г. Тверь, Россия)  
E-mail: education@tvgtmu.ru

## Н.Ю. Колгина

к.м.н., доцент, зав. кафедрой фармакологии и клинической фармакологии,  
ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России» (г. Тверь, Россия)

## Г.А. Петров

к.м.н., доцент, кафедра фармакологии и клинической фармакологии,  
ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России» (г. Тверь, Россия)

**Актуальность.** Важной составляющей механизма действия психотропных лекарственных средств является их влияние на обмен нейроактивных аминокислот. Изменение содержания аминокислот в структурах головного мозга крыс может выступать в роли фармакодинамического маркера, а также диагностического признака при изучении патогенеза заболеваний центральной нервной системы.

**Цель исследования** – разработка ВЭЖХ-МС/МС методики количественного определения нейроактивных аминокислот в гомогенатах головного мозга крыс после дериватизации с 9-флуоренилметилхлорформиатом.

**Материал и методы.** Исследовали гомогенат мозговой ткани крыс. Выделение аминокислот из мозга крыс осуществляли с помощью гомогенизатора Поттера-Эльвейема. Депротенинизацию и дериватизацию проводили путем добавления к образцам раствора 9-флуоренилметилхлорформиата в ацетонитриле. Детектирование производных аминокислот выполняли с помощью масс-спектрометра Sciex 3200, для хроматографического разделения использовали ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II. Элюирование осуществляли смесью ацетонитрила и воды в градиентном режиме.

**Результаты.** Пробоподготовка представляла собой смешивание 100 мкл гомогената мозговой ткани крыс, 100 мкл боратного буфера, 20 мкл 1 мМ раствора норвалина и 250 мкл 12 мМ раствора Fmoc-Cl в ацетонитриле с последующим центрифугированием в течение 10 мин. Для разделения Fmoc-производных аминокислот использовали хроматографическую колонку InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм. Общее время хроматографического анализа – 10 мин, время удерживания Fmoc-производных глицина, ГАМК, аспарагиновой и глутаминовой кислот, аспарагина и глутамина – 6,7; 6,8; 6,4; 6,4; 6,2 и 6,1 мин соответственно. Аналитический диапазон методики для каждой аминокислоты составил от 0,05 до 50 нмоль в 1 мл гомогената. Апробация методики была произведена путем анализа содержания аминокислот в головном мозге шести интактных крыс Wistar.

**Заключение.** Разработана хромато-масс-спектрометрическая методика количественного определения глутамина, аспарагина, глицина, ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислоты в гомогенатах головного мозга крыс. Для повышения чувствительности анализа была проведена предколонная дериватизация аминокислот с 9-флуоренилметилхлорформиатом.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ-МС/МС, хроматография, масс-спектрометрия, нейроактивные аминокислоты.

**Для цитирования:** Попов Н.С., Балабаньян В.Ю., Петрова М.Б., Колгина Н.Ю., Петров Г.А. Применение ВЭЖХ-масс-спектрометрии для количественного анализа нейроактивных аминокислот в гомогенатах головного мозга крыс после дериватизации с 9-флуоренилметилхлорформиатом. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(5):35–45. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-05-06>

Оценка механизма действия фармакологически активных веществ является важнейшим этапом разработки новых лекарственных средств [1, 2]. Известно, что важной составляющей фармакодинамики анксиолитиков, антидепрессантов, нейролептиков, антиконвульсантов, ноотропов, лекарственных средств для лечения паркинсонизма, нарушений мозгового кровообращения и мигрени является их влияние на обмен нейроактивных аминокислот в головном мозге. Изменение содержания возбуждающих и тормозных аминокислот в структурах головного мозга лабораторных животных может выступать в роли фармакодинамического маркера на этапе доклинических испытаний лекарственных средств, а также в качестве диагностического признака при изучении патогенеза различных заболеваний центральной нервной системы [2–9].

Универсальным методом качественного и количественного анализа биологически активных веществ является хромато-масс-спектрометрия. Несмотря на высокую селективность масс-спектрометрии, позволяющую проводить анализ веществ в биологических матрицах без применения сложных процедур пробоподготовки, этот метод детектирования имеет ряд недостатков.

*Во-первых*, применение электрораспылительной ионизации существенно ограничивает использование добавок к элюентам и высокие скорости потока подвижной фазы.

*Во-вторых*, существенной проблемой является минимизация матричного эффекта и повышение чувствительности анализа, решить которую помогает проведение процедуры дериватизации анализируемых компонентов.

Имеются литературные данные об использовании нингидрина, ортофталевого альдегида, фенилизотиоцианата, бутанола и других веществ в качестве дериватизирующих агентов при хроматографическом анализе аминокислот [10–13]. Одним из распространенных реагентов для осуществления дериватизации аминокислот является 9-флуоренилметилхлорформат (Fmoc-Cl). Из преимуществ Fmoc-Cl следует выделить: быстроту протекания реакции, взаимодействие как с первичными, так и со вторичными аминами, высокую стабильность растворов при хранении. Кроме того, при хроматографическом анализе Fmoc-производных аминокислот можно использовать как масс-спектрометрическое, так и флуориметрическое детектирование. Использование Fmoc-дериватизации нейроактивных аминокислот описано в работе Uutela et al. [11]. Однако в пред-

ставленной методике в качестве объекта исследования выступали микродиализаты головного мозга крыс. Аналогичный способ дериватизации при хроматографическом анализе аминокислот в различных тканях организма рассмотрен в публикации Ziegler et al. [12]. Описанная методика не предусматривает количественное определение нейроактивных аминокислот в структурах головного мозга и требует проведения процедуры твердофазной экстракции на этапе пробоподготовки образцов.

Цель исследования – разработка хромато-масс-спектрометрической методики количественного определения нейроактивных аминокислот в гомогенатах головного мозга крыс после дериватизации с 9-флуоренилметилхлорформатом.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Разработку методики количественного определения нейроактивных аминокислот начинали с приготовления индивидуальных исходных стандартных растворов аналитов с концентрацией 20 мМ. Для этого в отдельные мерные колбы вместимостью 25 мл на аналитических весах ВЛ-124В (Госметр, Россия) отвешивали 51,6 мг ГАМК (Sigma Aldrich, CAS: 56-12-2), 82,6 мг глутаминовой кислоты моногидрата (Sigma Aldrich, CAS: 19285-83-7), 66,6 мг аспарагиновой кислоты (Sigma Aldrich, CAS: 56-84-8), 73,1 мг глутамина (Agilent), 66,1 мг аспарагина (Agilent), 37,5 мг глицина (Sigma Aldrich, CAS: 56-40-6) и 58,6 мг норвалина (Agilent), добавляли небольшое количество 0,1 Н хлористоводородной кислоты (Экротхим, Россия), помещали на орбитальный шейкер OS-20 (Biosan, Латвия) и после полного растворения доводили растворителем до метки.

Полученные индивидуальные растворы аминокислот (кроме норвалина) использовали для приготовления исходного комбинированного раствора. С этой целью в мерную колбу вместимостью 25 мл вносили по 2,5 мл каждого индивидуального раствора, после чего доводили объем до метки 0,1 Н хлористоводородной кислотой. Таким образом, индивидуальная концентрация каждой аминокислоты составила 2 мМ. Исходный комбинированный раствор использовали для приготовления серии разведений (рабочих растворов), в качестве растворителя применяли деионизированную воду.

Для приготовления дериватизирующего агента в мерную колбу вместимостью 50 мл отвешивали 155,2 мг Fmoc-Cl (Sigma Aldrich, CAS: 28920-43-6)

и растворяли в ацетонитриле (Scharlau, Испания), при этом полученная концентрация раствора составила 12 мМ. Так как дериватизация аминокислот с использованием Fmoc-Cl происходит в щелочной среде, дополнительно был приготовлен 0,4 М боратный буферный раствор со значением pH=8,0. В мерную колбу вместимостью 100 мл отмеривали 50 мл деионизированной воды (Milli-Q), в которой

поочередно растворяли 2,98 г калия хлорида (PanReac Applichem, Испания) и 2,47 г борной кислоты (PanReac Applichem, Испания), затем порциями добавляли 0,8 М раствор натрия гидроксида (Merck, ФРГ) и деионизированную воду до достижения заданного значения pH. Дериватизация аминокислот с применением Fmoc-Cl происходит по общей реакции, приведенной на рис. 1.

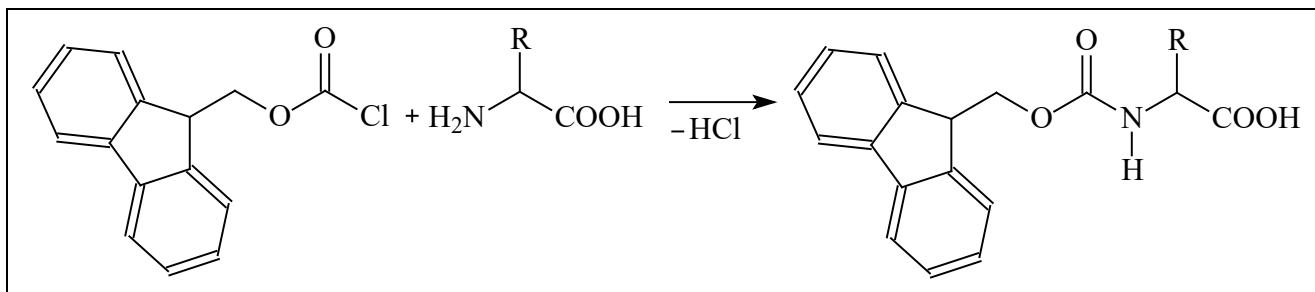


Рис. 1. Общая реакция дериватизации аминокислот с помощью 9-флуоренилметилхлорформата

Разработка методики пробоподготовки биологического материала включала в себя подбор условий выделения аминокислот и их последующей дериватизации, обеспечивающих необходимую чувствительность, точность, прецизионность и воспроизводимость анализа. Выделение аминокислот из головного мозга крыс осуществляли с помощью ручного пестикового гомогенизатора Поттера–Эльвейема вместимостью 2 мл. С этой целью образец ткани массой около 100 мг (точная навеска) помещали в гомогенизатор, добавляли деионизированную воду из расчета 900 мкл на 100 мг ткани, измельчали до однородного состояния, после чего центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин с помощью центрифуги LMC-4200R (Biosan, Латвия). Надосадочную жидкость переносили в чистые пробирки Эппендорфа, хранили при 4 °С и использовали по мере необходимости для последующего анализа. На следующем этапе пробоподготовки из полученных экстрактов удаляли белковые вещества. Сравнивали результаты депротенинизации образцов ацетонитрилом, метанолом, 3%-ным раствором сульфосалициловой кислоты, 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Выбор условий дериватизации аминокислот был основан на результатах хроматографического анализа, при этом оценивали зависимость величины отклика сигнала от объема и концентрации дериватирующего агента (Fmoc-Cl), буферного раствора, а также от времени протекания реакции. Для перемешивания образцов на этапе пробоподготовки использовали вортекс V-1 plus

(Biosan, Латвия), осажденные белки удаляли центрифугированием при 4 °С и 15000 g в течение 15 мин с помощью лабораторной центрифуги 5430R (Eppendorf, Германия), полученный супернатант переносили в хроматографические вials и использовали для анализа.

Для детектирования производных аминокислот при проведении хроматографического анализа применяли тандемный масс-спектрометр AB Sciex QTrap 3200 MD (AB Sciex, Сингапур). Подбор условий детектирования осуществляли путем прямого ввода в масс-спектрометр индивидуальных растворов Fmoc-производных аминокислот в ацетонитриле с концентрацией 500 пмоль/мл.

На первом этапе для каждого аналита определяли *m/z* депротонированных молекул при отрицательной ионизации, подбирали оптимальные значения декластеризующего потенциала (DP) и потенциала на входе в ячейку соударений (CEP).

На втором этапе для установленных ионов-предшественников определяли масс-спектр второго порядка, выбирали два характеристических иона-продукта, для которых подбирали оптимальные значения энергии соударений (SE) и потенциала на выходе из ячейки соударений (СХР). Полученные данные обеспечивали наилучшую селективность и чувствительность при детекции аналитов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Для хроматографического разделения производных аминокислот применяли ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Германия), в

качестве неподвижной фазы использовали колонку Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм. Выбор хроматографических параметров (состав, градиент и скорость подвижной фазы, объем вводимой пробы) был основан на данных о чувствительности, селективности и воспроизводимости анализа. На первом этапе в качестве компонентов подвижной фазы использовали ацетонитрил и деионизированную воду с добавлением 0,1% муравьиной кислоты. В качестве альтернативного элюента использовали метанол.

Первичные данные масс-спектрометрии и хроматографического анализа обрабатывали с помощью программного обеспечения Sciex Analyst 1.3.6, статистический анализ результатов проводили с использованием 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, выявляли стабильность определяемых веществ на этапах анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для Fmoc-производных аминокислот были получены масс-спектры первого и второго (рис. 2) порядка; для выбранных характеристических ионов были подобраны параметры детектирования, обеспечивающие максимальную чувствительность, результаты сведены в табл. 1.

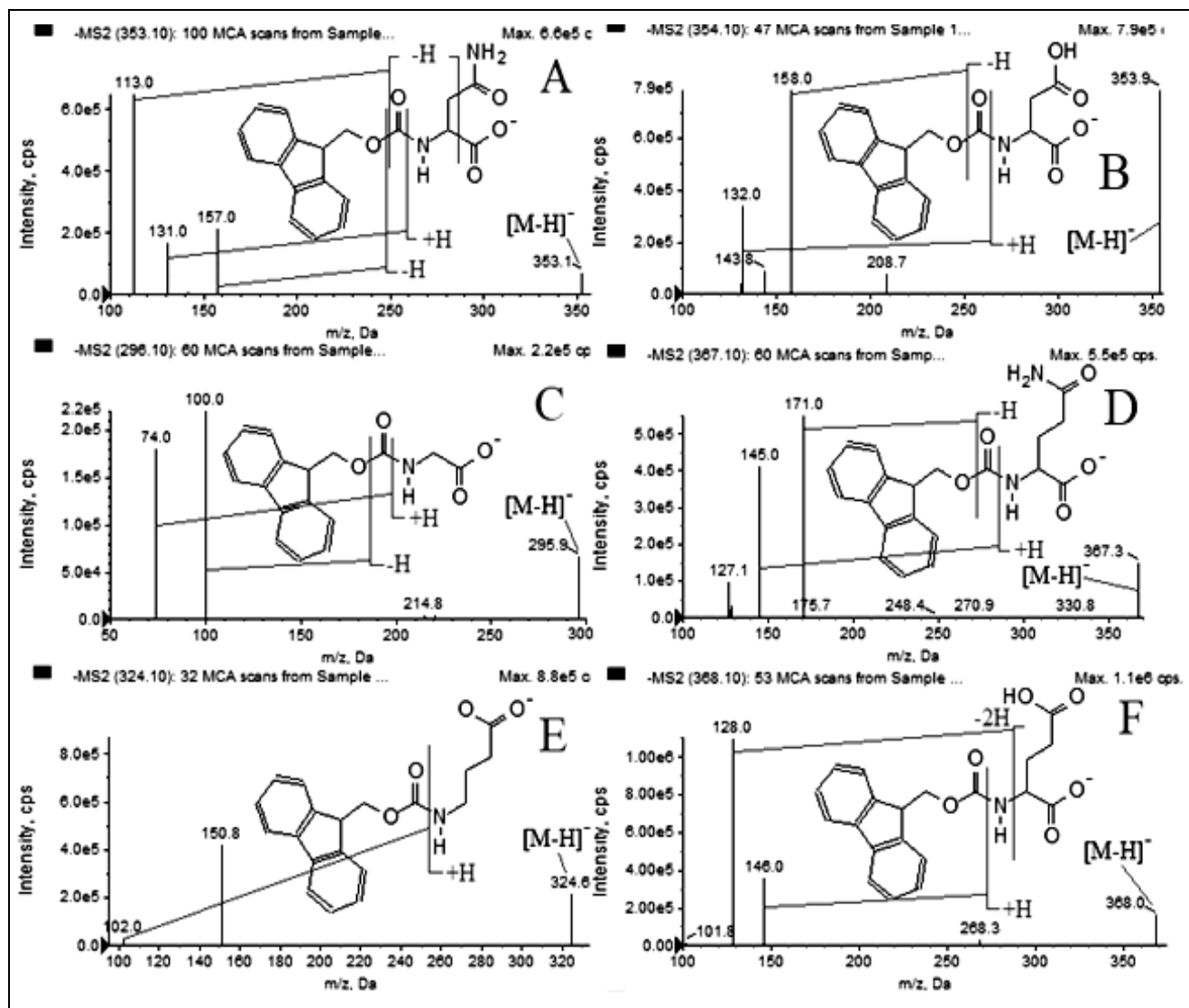


Рис. 2. Масс-спектры ионов-продуктов Fmoc-производных аминокислот в режиме регистрации отрицательных ионов (A – аспарагин, B – аспарагиновая кислота, C – глицин, D – глутамин, E – ГАМК, F – глутаминовая кислота)

**Таблица 1. Параметры масс-спектрометрического детектирования Fmoc-производных аминокислот в режиме мониторинга множественных реакций**

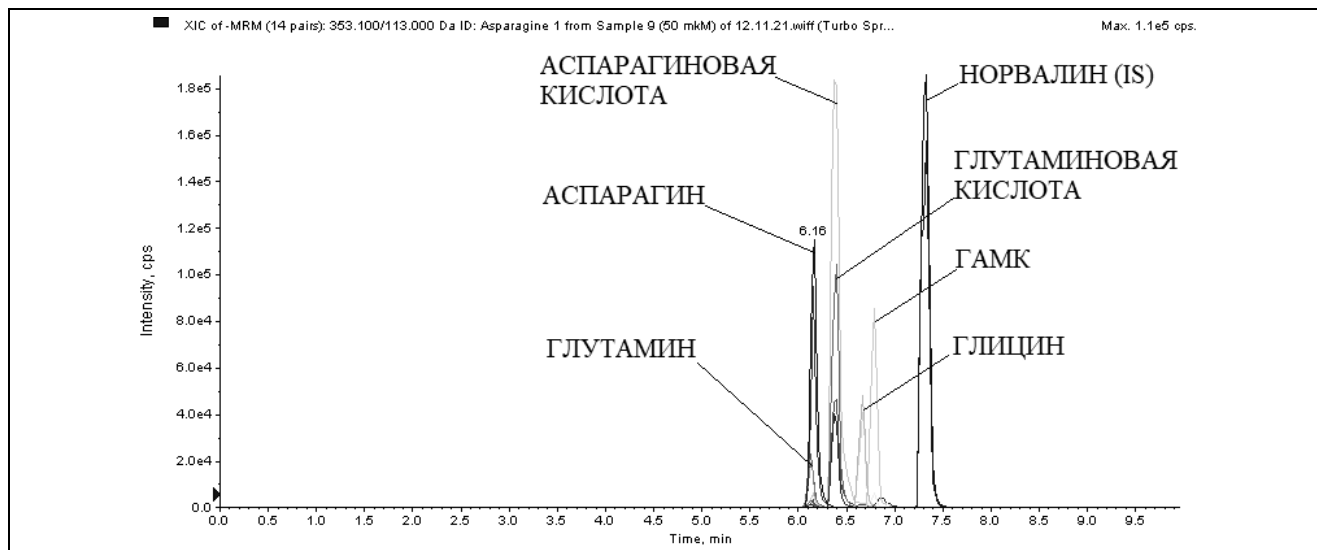
Параметр			Значение						
Тип источника ионов			TurboIonSpray						
Режим ионизации			Отрицательный						
Температура источника ионов, °C			450,0						
Напряжение источника ионов, В			-4500,0						
Давление газа завесы, psi			20,0						
Давление газа-небулайзера, psi			50,0						
Давление газа-нагревателя, psi			40,0						
Fmoc-АК	MRM, m/z	Dwell, мс	DP, В	EP, В	CEP, В	CE, эВ	CXP, В		
Глицин	296,1/74,0	100	-43	-10	-20	-18	-2,3		
	296,1/100,0					-20	-2,8		
ГАМК	324,1/102,0		-44				-16	-2,0	
	324,1/146,0								
Аспаргат	354,1/158,0		-40					-20	-1,1
	354,1/132,0							-18	-1,5
Аспарагин	353,1/113,0		-40					-27	-1,8
	353,1/131,0							-14	-3,0
Глутамат	368,1/128,1	-38			-28	-2,8			
	368,1/146,1				-18	-1,5			
Глутамин	367,1/171,0	-40			-16	-1,5			
	367,1/145,0				-15	-1,2			
Норвалин	338,1/116,0	-40			-12	-2,3			
	338,1/142,0				-20	-1,2			

Хроматографическое разделение Fmoc-производных аминокислот осуществляли на обращенно-фазовой колонке InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм при температуре 40 °C, аликвота пробы составила 10 мкл. Сравнительный анализ применения метанола и ацетонитрила в качестве компонента подвижной фазы показал, что использование метанола характеризуется высоким уровнем базовой линии аспарагина, а также приводит к формированию широких хроматографических пиков неправильной формы. Применение ацетонитрила при прочих равных условиях позволило достичь более высоких и узких хроматографических пиков всех аналитов при сохранении низкого уровня базовой линии на всем протяжении анализа.

Таким образом, в качестве компонентов подвижной фазы использовали деионизированную воду (А) и ацетонитрил (В) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты в градиентном режиме (табл. 2), общее время анализа составило 10 мин. Анализ полученных хроматограмм показал, что время

удерживания Fmoc-производных глицина, ГАМК, аспарагиновой и глутаминовой кислот, аспарагина и глутамината составило 6,7; 6,8; 6,4; 6,4; 6,2 и 6,1 мин соответственно (рис. 3).

Сравнительный анализ результатов определения степени извлечения и величины матричного эффекта показал, что оптимальным способом удаления белковых компонентов из пробы является осаждение при добавлении ацетонитрила. Учитывая этот факт, с целью уменьшения количества операций депротенинизацию и дериватизацию осуществляли одномоментно путем добавления к образцам раствора Fmoc-Cl в 100%-ном ацетонитриле. Таким образом, методика пробоподготовки включала в себя отмеривание в пробирку Эппендорфа 100 мкл гомогената мозговой ткани крыс (или соответствующего 10- или 20-кратного разведения), стандартного или контрольного образца аминокислот; 100 мкл боратного буферного раствора, 20 мкл водного 1 мМ водного раствора норвалина (IS) и 250 мкл 12 мМ раствора Fmoc-Cl в ацетонитриле, перемешивание на вихре в течение 1 мин.



**Рис. 3.** Хроматограмма стандартного образца с индивидуальной концентрацией каждой аминокислоты 50 нмоль/мл (подвижная фаза – ацетонитрил и деионизированная вода с добавлением 0,1% муравьиной кислоты; режим элюирования – градиентный; хроматографическая колонка – InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм; температура колонки – 40 °С; объем ввода – 10 мкл)

**Таблица 2.** Хроматографические параметры определения Fmoc-производных аминокислот

Параметр	Значение			
Колонка	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм			
Подвижная фаза А	Деионизированная вода + 0,1% HCOOH			
Подвижная фаза В	Ацетонитрил + 0,1% HCOOH			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% А	%В
	0,0	0,6	95	5
	0,5		95	5
	5,0		5	95
	7,5		5	95
	7,51		95	5
10,0	95		5	
Температура колонки, °С	40			
Объем ввода, мкл	10			
Общее время анализа, мин	10			
Промывка инжектора	5 с, 25% водный раствор ацетонитрила			

В ходе экспериментов было установлено, что необходимая полнота дериватизации может быть достигнута при молярном соотношении Fmoc-Cl и суммы аминокислот не менее чем 50:1, при этом продолжительность протекания химической реакции должна составлять не менее 45 мин при комнатной температуре. Принимая во внимание этот факт, после добавления дериватизирующего агента образцы инкубировали при 40 °С в течение 1 ч, после чего химическую реакцию останавливали путем добавления к образцам 30 мкл 80 мМ раствора адмантан-1-амин (Sigma Aldrich, CAS: 665-66-7) в

ацетонитриле с последующим дополнительным инкубированием в течение 15 мин. Для лучшего осаждения белков при пробоподготовке биологических образцов их выдерживали 15 мин при 4 °С, после чего центрифугировали при той же температуре и ускорении 20000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант переносили в одноразовые полиэтиленовые вставки в хроматографические вials.

Для определения метрологических параметров методики была приготовлена аналитическая серия, состоящая из стандартных образцов с индивидуальной концентрацией каждой аминокислоты:

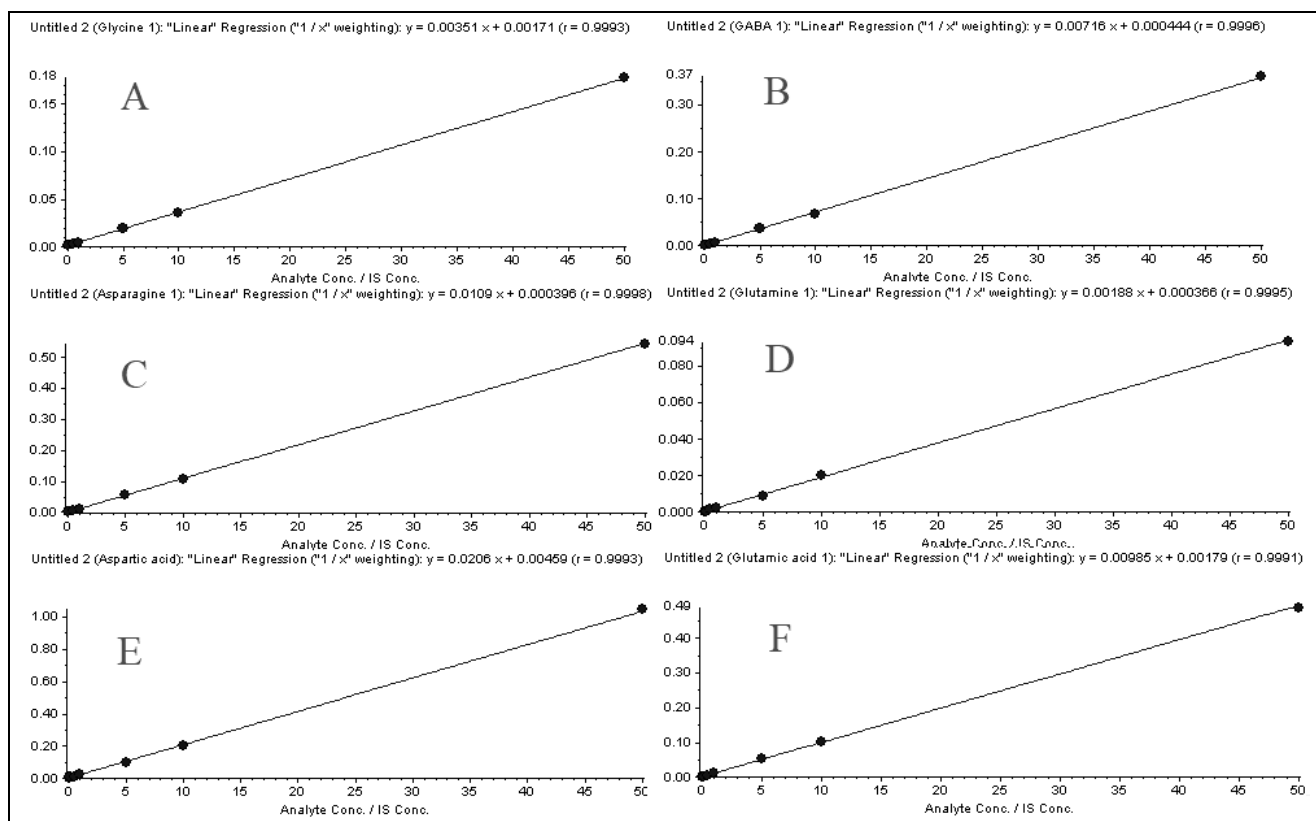
0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 и 50,0 нмоль/мл, образцов контроля качества и холостых образцов с добавлением внутреннего стандарта и без него. Для подтверждения возможности использования воды в качестве заменителя биологической матрицы был проведен эксперимент с добавлением рабочих водных растворов аминокислот к аликватам гомогената головного мозга крыс с последующим проведением стандартной процедуры пробоподготовки [14]. Концентрации аминокислот в образцах гомогената мозга крыс с добавками рассчитывали с использованием калибровочной зависимости, установленной по водным стандартным растворам. Разность между обнаруженной концентрацией и концентраций добавленных стандартных растворов определяли для каждой аминокислоты.

Результаты экспериментов со стандартным добавлением показали, что для каждой аминокислоты на протяжении всего аналитического диапазона относительные отклонения в разности концентраций не превышали 10%. Кроме того, обнаружено близкое к единице значение отношения тангенсов угла наклона калибровочной прямой, построенной по результатам анализа биологиче-

ских образцов с добавкой, и водных стандартных растворов. Таким образом, установлено, что использование водных стандартных растворов аминокислот для построения калибровочной зависимости не будет отражаться на правильности и воспроизводимости результатов анализа реальных биологических образцов.

Селективность методики оценивали путем сравнения отношения площадей хроматографических пиков двух характеристических ионов одного аналита в чистом растворителе и в присутствии компонентов биологической матрицы. Было установлено, что для всех уровней концентраций каждого аналита этот показатель не превышал 15%, что подтверждает селективность разработанной методики.

По результатам хроматографического анализа серии стандартных образцов для всех аминокислот были построены калибровочные кривые, отражающие зависимость отношения площади пика аналита к площади пика норвалина от концентрации аналита в стандартном образце (рис. 4). Для калибровочных зависимостей установлены уравнения линейной регрессии при значениях коэффициента корреляции не ниже 0,99 (табл. 3).



**Рис. 4.** Калибровочные прямые для количественного определения глицина (А), ГАМК (В), аспарагина (С), глутамина (D), аспарагиновой (Е) и глутаминовой (F) кислот (по оси X представлена концентрация аминокислоты в нмоль/мл, по оси Y – отношение площади хроматографического пика Fmoc-производного соответствующей аминокислоты к площади пика Fmoc-производного норвалина)

**Таблица 3. Валидационные характеристики методики определения нейроактивных аминокислот в гомогенатах головного мозга крыс**

Показатель	Аминокислота					
	Глицин	ГАМК	Аспарагин	Глутамин	Аспарат	Глутамат
Аналитический диапазон, нмоль/мл	0,05–50,0					
НПКО, нмоль/мл	0,05					
Уравнение регрессии	$y=0,00351x+0,00171$	$y=0,00716x+0,000444$	$y=0,0109x+0,000396$	$y=0,00188x+0,000366$	$y=0,0206x+0,00459$	$y=0,00985x+0,00179$
$r^2$	0,9993	0,9996	0,9998	0,9995	0,9993	0,9991
Межсерийная точность и прецизионность						
0,05 нмоль/мл (НПКО)						
Измеренная концентрация, нг/мл, mean±SD	0,057±0,003	0,056±0,002	0,056±0,002	0,056±0,003	0,056±0,002	0,055±0,003
Точность, %	113,8	111,8	113,1	112,1	111,5	111,1
CV, %	6,95	3,19	5,21	6,23	3,52	5,84
2,5 нмоль/мл (НК)						
Измеренная концентрация, нг/мл, mean±SD	2,52±0,13	2,57±0,11	2,49±0,12	2,53±0,09	2,54±0,08	2,54±0,13
Точность, %	101,0	103,2	98,87	101,3	101,8	101,7
CV, %	5,47	4,37	5,04	3,66	3,29	5,21
25,0 нмоль/мл (СК)						
Измеренная концентрация, нг/мл, mean±SD	25,46±0,072	25,19±0,74	25,25±0,83	25,40±0,69	25,30±0,67	25,53±0,71
Точность, %	101,8	100,8	101,0	101,6	101,2	102,1
CV, %	2,91	2,95	3,31	2,75	2,70	2,85
45,0 нмоль/мл (БК)						
Измеренная концентрация, нг/мл, mean±SD	45,25±0,76	45,07±0,89	44,92±0,65	44,88±0,57	44,90±0,64	44,94±0,67
Точность, %	100,6	100,2	99,82	99,74	99,78	99,87
CV, %	1,70	1,97	3,30	1,27	1,42	1,49

В связи с отсутствием доступной холостой биологической матрицы нижний предел количественного определения (НПКО) аминокислот оценивали путем хроматографического анализа водных стандартных растворов низкой концентрации аминокислот. За НПКО принимали концентрацию стандартного раствора аминокислоты, 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 путем сравнения хроматограмм холостых проб, анализируемых после ше-

стикратного ввода пробы с концентрацией аминокислот 50,0 нмоль/мл и проб с концентрацией аналитов на уровне НПКО. Было установлено, что отношение площадей хроматографических пиков всех Fмос-производных аминокислот в холостых пробах к площади пиков в образцах НПКО 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 трех сериях путем анализа 5 контрольных образцов для четырех 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 сведены в табл. 3.

Стабильность аминокислот в гомогенатах тканей мозга крыс была подтверждена для высоких (45,0 нмоль/мл) и низких (2,5 нмоль/мл) концентраций. Оценивали стабильность аналитов после трех циклов заморозки/разморозки, краткосрочную стабильность, стабильность стандартных растворов аминокислот в 0,1 н хлористоводородной кислоте и деионизированной воде, постпрепаративную стабильность и долгосрочную стабильность. По результатам анализа было установлено, что разница в площади пика каждого аналита во всех исследо-

ванных пробах и свежеприготовленных образцах не отличалась более чем на 15%.

Так как концентрация некоторых аминокислот в гомогенатах тканей головного мозга крыс может значительно превышать верхний предел количественного определения, была проведена оценка возможности десятикратного и двадцатикратного разбавления гомогенатов деионизированной водой. По результатам анализа было установлено, что разбавление образца не снижает точность и прецизионность количественного определения всех аминокислот.

Апробация разработанной методики была произведена путем анализа содержания аминокислот в головном мозге шести интактных крыс Wistar, содержащихся в виварии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России. Результаты определения нейроактивных аминокислот сопоставимы с данными других авторов и приведены в табл. 4.

**Таблица 4. Содержание (нмоль на 1 г ткани) нейроактивных аминокислот во фронтальной коре и гиппокампе мозга интактных крыс Wistar**

Ткань головного мозга	Аминокислота					
	Глицин	ГАМК	Аспарагин	Глутамин	Аспартат	Глутамат
Фронтальная кора	431,6±41,2	1971,6±127,5	53,4±3,2	2888,4±159,9	2075,4±92,3	7736,0±788,5
Гиппокамп	731,4±39,4	2546,4±173,7	51,6±3,2	1907,4±71,3	1705,8±51,5	6025,8±200,1

## ВЫВОДЫ

Разработанная хромато-масс-спектрометрическая методика количественного определения нейроактивных аминокислот в головном мозге крыс полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить содержание аспарагина, глутамина, ГАМК, глицина, аспарагиновой и глутаминовой кислоты в тканях мозга крыс, что является важным в исследовании патологических процессов, а также экспериментальной фармакодинамики лекарственных средств.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61 «Об обращении лекарственных средств». М. 56 с. В ред. от 11.06.2021.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
3. Chen X., Broeyer F., de Kam M., Baas J., Cohen A., van Gerven J. Pharmacodynamic response profiles of anxiolytic and sedative drugs. *British journal of clinical pharmacology*. 2017; 83(5): 1028–1038. doi.org/10.1111/bcp.13204
4. Sousa A., Dinis-Oliveira R.J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic of the cognitive enhancer modafinil: Relevant clinical and forensic aspects. *Substance abuse*. 2020; 41(2): 155–173. doi.org/10.1080/08897077.2019.1700584
5. Mankar S.S., Turan S.P., Mankar S.S., Shelke, P.A. Antidepressant in animal models of depression and study of cognitive property. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2019; 7(3): 64–76. doi.org/10.30574/gscbps.2019.7.3.0069
6. Bourin M. Mechanisms of Action of Anxiolytics. *Psychiatry and Neuroscience Update*. Springer, Cham. 2021: 195–211. doi.org/10.1007/978-3-030-61721-9\_18
7. Piras F., Vecchio D., Assogna F., Pellicano C., Ciullo V., Banaj N., Spalletta G. Cerebellar gaba levels and cognitive interference in parkinson's disease and healthy comparators. *Journal of Personalized Medicine*. 2021; 11(1): 16. doi.org/10.3390/jpm11010016
8. Li J., Chen L., Guo F., Han X. The Effects of GABAergic System under Cerebral Ischemia: Spotlight on Cognitive Function. *Neural Plasticity*. 2020. doi.org/10.1155/2020/8856722
9. Procter A. W., Bowen D. M. Cerebral Biopsy in the Neurochemical Study of Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease*. CRC Press. 2020: 279–294.
10. Srinivasa Rajagopalachari N.K., Shanmugasundaram P. Analytical method validation for the determination of Ninhydrin Positive Substances in amino acids by High Performance Liquid Chromatography. *Annals of the Romanian*

- Society for Cell Biology. 2021; 25 (6): 4323–4330.
11. *Uutela P., Ketola R. A., Piepponen P., Kostainen R.* Comparison of different amino acid derivatives and analysis of rat brain microdialysates by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta.* 2009; 633(2): 223–231. doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.055
  12. *Ziegler J., Hussain H., Neubert R. H. Abel S.* Sensitive and selective amino acid profiling of minute tissue amounts by HPLC/electrospray negative tandem mass spectrometry using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc-Cl) derivatization. *Amino Acid Analysis.* Humana, New York. 2019: 365–379. doi.org/10.1007/978-1-4939-9639-1\_27
  13. *Peng M. Z., Cai Y. N., Shao Y. X., Zhao L., Jiang M. Y., Lin Y. T., Liu L.* Simultaneous quantification of 48 plasma amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry to investigate urea cycle disorders. *Clinica Chimica Acta.* 2019; 495: 406–416. doi.org/10.1016/j.cca.2019.05.011
  14. *Minkler P., Stoll M., Ingalls S., Yang S., Kerner J., Hoppel C.* Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization-mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2008; 54: 1451–1462. doi.org/10.1373/clinchem.2007.099226

Поступила 17 декабря 2021 г.

## THE USE OF HPLC-MS/MS FOR THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF NEUROACTIVE AMINO ACIDS IN RAT BRAIN HOMOGENATES AFTER DERIVATIZATION WITH 9-FLUORENYLMETHYL CHLOROFORMATE

© Authors, 2022

### N.S. Popov

Ph.D. (Pharm.), Head of Research Laboratory, Tver State Medical University (Tver, Russia)

### V.Yu. Balabanyan

Dr.Sc. (Pharm.), Associate Professor, Leading Research Scientist, Laboratory of Translational Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia)

### M.B. Petrova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Head of Department of Biology, Tver State Medical University (Tver, Russia)

E-mail: education@tvgmu.ru

### N.Yu. Kolgina

Ph.D. (Med.), Associate Professor, Head of Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Tver State Medical University (Tver, Russia)

### G.A. Petrov

Ph.D. (Med.), Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Tver State Medical University (Tver, Russia)

**Relevance.** The effect on the metabolism of neuroactive amino acids is the most important component of the mechanism of action of psychotropic drugs. Variation of substance of amino acids in the structures of the rat brain can act as a pharmacodynamic marker diagnostic sign in the study of the pathogenesis of diseases of the central nervous system.

**Purpose of the study.** development of HPLC-MS / MS method for quantitative determination of neuroactive amino acids in rat brain homogenates after derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate.

**Material and methods.** For the detection of amino acids from the rat brain was used a Potter-Elvehjem homogenizer. Deproteinization and derivatization were performed by adding a solution of 9-fluorenylmethylchloroformate in acetonitrile to the samples. Amino acid derivatives were detected using a Sciex 3200 mass spectrometer. For chromatographic separation was used an Agilent 1260 Infinity II HPLC. Elution was carried out with a mixture of acetonitrile and water in a gradient mode.

**Results.** Sample preparation includes mixing 100 µl of rat brain tissue homogenate, 100 µl of borate buffer, 20 µl of 1 mM norvaline solution and 250 µl of 12 mM Fmoc-Cl solution in acetonitrile, followed by centrifugation for 10 minutes. For the separate Fmoc-derived amino acids was used chromatographic column InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6 × 100 mm, 2.7 µm. The total time of chromatographic analysis was 10 minutes, the retention time of Fmoc derivatives of glycine, GABA, aspartic and glutamic acids, asparagine and glutamine was 6.7; 6.8; 6.4; 6.4; 6.2 and 6.1 minutes, respectively. The analytical range of the method for each amino acid was from 0.05 to 50 nmol in 1 ml of homogenate. The method was tested by analyzing the amino acid content in the brain of 6 intact Wister rats.

**Conclusion.** A chromatography-mass spectrometric method for the quantitative determination of glutamine, asparagine, glycine, GABA, glutamic and aspartic acids in rat brain homogenates has been developed. Precolumn derivatization of amino acids with 9-fluorenylmethylchloroformate was carried out to increase the sensitivity of the analysis.

**Key words:** HPLC-MS/MS, chromatography, mass-spectrometry, neuroactive amino acids.

**For citation:** Popov N.S., Balabanyan V.Yu., Petrova M.B., Kolgina N.Yu., Petrov G.A. The use of HPLC-MS/MS for the quantitative analysis of neuroactive amino acids in rat brain homogenates after derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2022;25(5):35–45. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-05-06>

REFERENCES

1. Federal'nyj zakon ot 12 aprelja 2010 g. № 61 «Ob obrashhenii lekarstvennyh sredstv». M. 56 s. V red. ot 11.06.2021.
2. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. FGBU «NCJeSMP» Minzdravsocrazvitija Rossii. M.: Grif i K, 2012. 944 s.
3. Chen X., Broeyer F., de Kam M., Baas J., Cohen A., van Gerven J. Pharmacodynamic response profiles of anxiolytic and sedative drugs. *British journal of clinical pharmacology*. 2017; 83(5): 1028–1038. doi.org/10.1111/bcp.13204
4. Sousa A., Dinis-Oliveira R.J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic of the cognitive enhancer modafinil: Relevant clinical and forensic aspects. *Substance abuse*. 2020; 41(2): 155–173. doi.org/10.1080/08897077.2019.1700584
5. Mankar S.S., Turan S.P., Mankar S.S., Shelke, P.A. Antidepressant in animal models of depression and study of cognitive property. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2019; 7(3): 64–76. doi.org/10.30574/gscbps.2019.7.3.0069
6. Bourin M. Mechanisms of Action of Anxiolytics. *Psychiatry and Neuroscience Update*. Springer, Cham. 2021: 195–211. doi.org/ 10.1007/978-3-030-61721-9\_18
7. Piras F., Vecchio D., Assogna F., Pellicano C., Ciullo V., Banaj N., Spalletta G. Cerebellar gaba levels and cognitive interference in parkinson's disease and healthy comparators. *Journal of Personalized Medicine*. 2021; 11(1): 16. doi.org/10.3390/jpm11010016
8. Li J., Chen L., Guo F., Han X. The Effects of GABAergic System under Cerebral Ischemia: Spotlight on Cognitive Function. *Neural Plasticity*. 2020. doi.org/10.1155/2020/8856722
9. Procter A. W., Bowen D. M. Cerebral Biopsy in the Neurochemical Study of Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease*. CRC Press. 2020: 279–294.
10. Srinivasa Rajagopalachari N.K., Shanmugasundaram P. Analytical method validation for the determination of Ninhydrin Positive Substances in amino acids by High Performance Liquid Chromatography. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021; 25(6): 4323–4330.
11. Uutela P., Ketola R. A., Piepponen P., Kostiaainen R. Comparison of different amino acid derivatives and analysis of rat brain microdialysates by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2009; 633(2): 223–231. doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.055
12. Ziegler J., Hussain H., Neubert R. H. Abel S. Sensitive and selective amino acid profiling of minute tissue amounts by HPLC/electrospray negative tandem mass spectrometry using 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc-Cl) derivatization. *Amino Acid Analysis*. Humana, New York. 2019: 365–379. doi.org/10.1007/978-1-4939-9639-1\_27
13. Peng M. Z., Cai Y. N., Shao Y. X., Zhao L., Jiang M. Y., Lin Y. T., Liu L. Simultaneous quantification of 48 plasma amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry to investigate urea cycle disorders. *Clinica Chimica Acta*. 2019; 495: 406–416. doi.org/10.1016/j.cca.2019.05.011
14. Minkler P., Stoll M., Ingalls S., Yang S., Kerner J., Hoppel C. Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization-mass spectrometry. *Clin. Chem*. 2008; 54: 1451–1462. doi.org/10.1373/clin-chem.2007.099226



ИЗДАНИЯ ФГБНУ ВИЛАР

КОНЯЕВА Е.А., АЛЕНТЬЕВА О.Г., САЙБЕЛЬ О.Л., ДАРГАЕВА Т.Д., ПОТАНИНА О.Г., МИЗИНА П.Г.

МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ НЕКОТОРЫХ НОВЫХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

АТЛАС

Москва-2020

**МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ НЕКОТОРЫХ НОВЫХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. АТЛАС**  
**Авторы: Е.А. Коняева, О.Г. Алентьева, О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева, О.Г. Потанина, П.Г. Мизина**

В настоящем атласе представлено описание морфологических и анатомических признаков некоторых новых видов лекарственного растительного сырья различных морфологических групп. Данные признаки имеют диагностическое значение и позволяют устанавливать подлинность этих видов сырья. Изучение морфолого-анатомического строения сырья проведено в отделе фитохимии и стандартизации Центра химии и фармацевтической технологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР) при участии Центра коллективного пользования (Научно-образовательный центр) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» ЦКП (НОЦ) ФГАОУ ВО РУДН. В атласе приведено 519 оригинальных рисунков в виде фотографий анатомо-диагностических признаков сырья лекарственных растений. Атлас может служить справочным материалом для научных сотрудников, занимающихся изучением лекарственных растений, преподавателей, аспирантов и студентов фармацевтического и биологического профиля.

По вопросам приобретения книг и монографий обращаться в ФГБНУ ВИЛАР:  
 117216, г. Москва, ул. Грина, д. 7; +7 (495) 338-11-09; e-mail: vilarnii@mail.ru  
<http://vilarnii.ru/institute/our-publications/>