



Разработка и валидация методики количественного определения сукцината в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС

Мыльников П. Ю., Есенина А. С., Черных И. В., Полупанов А. С., Шулькин А. В., Якушева Е. Н.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»,
Рязань, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Сукцинат (янтарная кислота) — центральный метаболит цикла Кребса, через специфический сукцинатный рецептор SUCNR1 регулирующий многочисленные процессы. В ряде фармакологических препаратов сукцинат является важным компонентом, но его фармакокинетика при их введении остаётся малоизученной. Для выполнения данных исследований необходима чувствительная аналитическая методика.

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения сукцината в плазме крови крыс.

Методы. Анализ выполняли на ВЭЖХ-МС/МС — Ultimate 3000 TSQ Fortis и колонке UCT Selectra C18 4,6 мм × 100 мм 3 мкм, 100 Å. Температура разделения — 35 °С, скорость потока — 0,5 мл/мин. Использовали градиентный режим элюирования смесью 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты и 0,1 % раствора муравьиной кислоты в метаноле. Объём пробы — 5 мкл. Для пробоподготовки использовали метанол с добавлением в качестве внутреннего стандарта хлорамфеникола в концентрации 10 нг/мл. При валидации использовалась модельная матрица. Для детектирования сукцината использовали следующие переходы масс в негативном режиме ионизации: 117 m/z → 98,7 m/z, 117 m/z → 73,1 m/z.

Результаты. Методика характеризовалась селективностью, чувствительностью, правильностью, прецизионностью и линейностью в диапазоне концентраций 200–20000 нг/мл (1,69–169 мкМ). Отсутствовал перенос пробы, матричный эффект. Степень извлечения превышала 96 %. Сукцинат был стабильным при использованных условиях хранения.

Закключение. Разработана и валидирована методика количественного определения сукцината в плазме крови крыс, которая может быть использована для анализа концентрации эндогенного сукцината и фармакокинетики сукцината после введения сукцинат-содержащих лекарственных препаратов.

Ключевые слова: сукцинат; янтарная кислота; ВЭЖХ-МС/МС

Для цитирования:

Мыльников П. Ю., Есенина А. С., Черных И. В., Полупанов А. С., Шулькин А. В., Якушева Е. Н. Разработка и валидация методики количественного определения сукцината в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2026;(3):95–105. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2026-3-95-105>. EDN: WTTCSR

Поступила: 09.06.2026. **В доработанном виде:** 09.07.2026. **Принята к печати:** 09.09.2026. **Опубликована:** 30.09.2026.

Development and validation of a method for the quantitative determination of succinate in rat blood plasma by HPLC-MS/MS

Pavel Yu. Mylnikov, Anna S. Esenina, Ivan V. Chernykh, Alexander S. Polupanov, Aleksey V. Shchulkin,
Elena N. Yakusheva

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation

Abstract

Relevance. Succinate is a central metabolite of the Krebs cycle and also a regulator of numerous processes via the specific succinate receptor SUCNR1. Succinate is an important component of several pharmacological preparations. However, its pharmacokinetics following the administration of these substances remain poorly understood. A sensitive analytical method is required to perform such studies.

Objective. To develop and validate a method for the quantitative determination of succinate in rat blood plasma.

Methods. The analysis was performed using HPLC-MS/MS — an Ultimate 3000 TSQ Fortis system and a UCT Selectra C18 column (4.6 mm × 100 mm, 3 μm, 100 Å). The separation temperature was 35 °C, and the flow rate was 0.5 mL/min. A gradient elution mode was used with a mixture of 0.1 % aqueous formic acid and 0.1 % formic acid in methanol. The injection volume was 5 μL. For sample preparation, methanol containing chloramphenicol at a concentration of 10 ng/mL as an internal standard was used. A model matrix was used during validation. For succinate detection, the following mass transitions were used in negative ionization mode: 117 m/z → 98.7 m/z, 117 m/z → 73.1 m/z.

Results. The method demonstrated selectivity, sensitivity, accuracy, precision, and linearity in the concentration range of 200–20,000 ng/mL. No carryover or matrix effect was observed. The recovery rate was over 96 %. Succinate was stable under the employed storage conditions.

Conclusion. A method for the quantitative determination of succinate in rat blood plasma has been developed and validated. This method can be used to analyze endogenous succinate concentrations and the pharmacokinetics of succinate following the administration of succinate-containing drugs.

Keywords: succinate; succinic acid; HPLC-MS/MS

For citations:

Mylnikov PYu, Esenina AS, Chernykh IV, Polupanov AS, Shchulkin AV, Yakusheva EN. Development and validation of a method for the quantitative determination of succinate in rat blood plasma by HPLC-MS/MS. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2026;(3):95–105. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2026-3-95-105>. EDN: WTTCSR

Received: 09.06.2026. **Revision received:** 09.07.2026. **Accepted:** 09.09.2026. **Published:** 30.09.2026.

Введение / Introduction

Сукцинат, или анион янтарной кислоты, является центральным компонентом цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса). Под действием сукцинатдегидрогеназы сукцинат окисляется до фумарата, в результате чего образуются два атома водорода, поступающие в дыхательную цепь [1].

Однако сукцинат — далеко не просто субстрат сукцинатдегидрогеназы. Он дополнительно участвует в метаболическом пути, генерирующем итаконат и специфичном для макрофагов. Метаболизм сукцината тесно связан с метаболизмом аминокислот с разветвлённой цепью и другими метаболитами, с синтезом гема, метаболизмом кетоновых тел и ГАМК-шунтом. Помимо этого, сукцинат является критическим медиатором гипоксического ответа, а также участвует в канцерогенезе и в сукцинировании белков, недавно обнаруженном виде посттрансляционной модификации [2, 3].

Наконец, было обнаружено, что сукцинат оказывает своё действие вне клеток пара- и эндокринным способом, влияя на свои специфические мембранные сукцинатные рецепторы (SUCNR1) [4].

Активация сукцинатного рецептора приводит к множеству физиологических и патофизиологических эффектов: усилению клеточного дыхания и мембранного транспорта, стабилизации белкового обмена, а также восстановлению энергетического баланса, особенно в условиях гипоксии и гипергликемии. Кроме того, наблюдаются: увеличение васкуляризации сетчатки, агрегация тромбоцитов, стимуляция роста гемопоэтических клеток-предшественников и повышение уровней гемоглобина, тромбоцитов и нейтрофилов на фоне химиотерапевтически-индуцированной миелосупрессии. Активация SUCNR1 также вызывает повышение артериального давления путём стимуляции ренин-ангиотензиновой системы [5].

Таким образом, сукцинатные рецепторы могут являться перспективной фармакологической мишенью. Сукцинат является важным компонентом ряда фармакологических препаратов, таких как Мексидол, Реамберин, Цитофлавин, а также входит в состав солей некоторых активных фармацевтических субстанций (например, суматриптана сукцинат, метопролола сукцинат) [6]. Однако его фармакокинетика при введении данных веществ остаётся малоизученной.

Для оптимизации терапии с помощью уже известных препаратов и для разработки новых лекарственных средств необходима аналитическая методика определения концентрации сукцината в биологических жидкостях.

В литературе описан ряд подобных методик. Так в исследовании *Lamy C, et al.* (2022 г.) концентрации сукцината в сыворотке, моче и культуральной среде клеток ACL-4 оценивались методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон составил 1,0–135,4 мкМ. Калибровочные образцы готовились на воде. В качестве

пробоподготовки использовали твёрдофазную экстракцию. Элюат упаривали досуха. Сухой остаток растворяли и вносили в хроматограф [7].

В другом исследовании была разработана методика для экстракции сукцината из парафиновых блоков и замороженных образцов тканей с последующим анализом его концентрации методом ВЭЖХ-МС/МС. Депарафинизацию осуществляли ксилолом. В дальнейшем ткань гомогенизировали и экстрагировали сукцинат метанолом и подвергали анализу. Аналитический диапазон составил 0,02–10 мкМ. Калибровочные образцы готовили на воде [8].

В работе *Jung Y, et al.* (2022 г.) анализировалась фармакокинетика сукцината C¹³ после его введения мышам. Концентрацию сукцината C¹³ определяли методом ВЭЖХ-МС/МС. Калибровочные образцы готовили на бланковой плазме или бланковых гомогенатах органов. Белки осаждали 80 % метанолом. Аналитический диапазон составил в плазме крови мышей 0,5–8000 нг/мл, а в органах — 2–500 нг/мл [9].

Наконец, *Xu L, et al.* (2024) был разработан метод количественного определения янтарной и молочной кислот в сыворотке крови, содержанием кишечника и мясе свиней с использованием сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. Разделение выполняли на колонке Kinetex XB-C18. Нижний предел количественного определения сукцината составил 0,75 нг/мл [10].

Однако в большинстве указанных методов применяли сложный способ пробоподготовки, использовали в качестве матрицы воду и труднодоступные (дейтерированные) внутренние стандарты.

Цель / Objective

Целью настоящего исследования явилась разработка и валидация методики количественного определения сукцината в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы / Materials and methods

Использованные реактивы / Reagents used

В исследовании использовали субстанцию сукцината ("Acros Organics", Бельгия). Структурная формула сукцината представлена на рис. 1.

Для выполнения ВЭЖХ использовали следующие реактивы: метанол для градиентной хроматографии («Химмед», Россия), кислота муравьиная 98 % для аналитики («Panreac», Испания), этилацетат («Химмед», Россия), вода Milli-Q (Система очистки воды Millipore Simplicity UV, Merck, Германия).

Животные / Animals

Для получения матрицы (холостой плазмы крови) использовали крыс самцов Wistar ($n = 20$) массой 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицин-

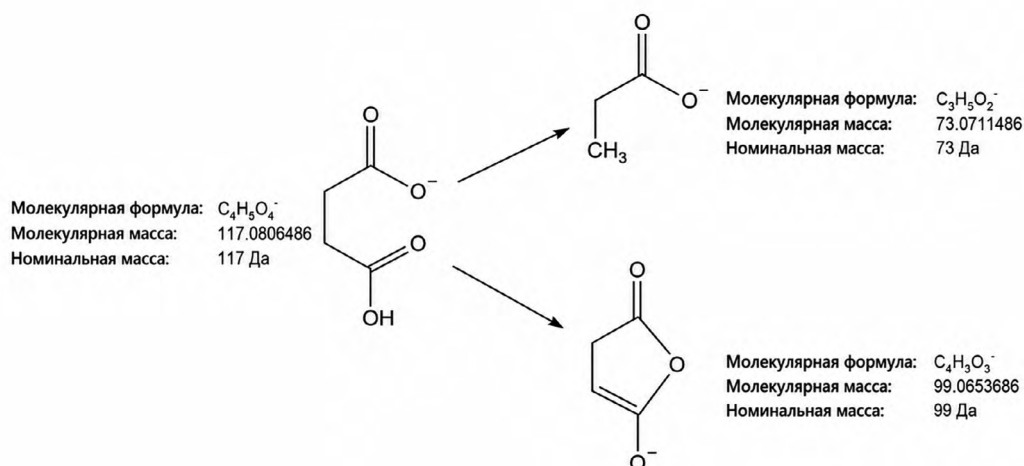


Рис. 1. Структурная формула сукцината и схема фрагментации его молекулы
Fig. 1. Structural formula of succinate and fragmentation of its molecule

ских технологий федерального медико-биологического агентства» филиал «Столбовая».

Организацию и проведение работ осуществляли в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», межгосударственным стандартам серии «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 (Приложение А к Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123)). План исследования был рассмотрен и одобрен «Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных» ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, выписка №33 от 30.10.20. Кровь животных забиралась прижизненно из хвостовой вены под золептиловым наркозом.

Условия хроматографирования и детектирования / Chromatography and detection conditions

Анализ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе Ultimate 3000 («ThermoFisher», США), оснащённом автосемплером, дегазатором, градиентным насосом и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Управление системой ВЭЖХ-МС/МС и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Для проведения хроматографического анализа использовали следующие условия: колонка UCT Selectra C18 4.6 mm × 100 mm, 3 μm, 100 Å, предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM.

Использовали градиентный режим элюирования следующими растворителями: 0,1 % водный раствор муравьиной кислоты (раствор А) и муравьиная кислота

0,1 % с метанолом (раствор Б). Соотношение раствора А и раствора Б было следующим: 0 мин — 90 / 10 %, 0,01 мин — 70 / 30 %, 3,5 мин — 50 / 50 %, 3,5 мин — 10 / 90 %, 5 мин — 10 / 90 %, 5 мин — 90 / 10 %, 7,5 мин — 90 / 10 %.

Скорость подвижной фазы составила 0,5 мл/мин при температуре 35 °С, объём вводимой пробы — 5 мкл.

В качестве матрицы первоначально использовали плазму крови, полученную от 6 интактных животных, однако так как янтарная кислота (сукцинат) является эндогенным веществом, в холостых образцах плазмы крови крыс детектировались пики со временем удерживания, соответствующим времени удерживания сукцината. Были предприняты попытки устранения эндогенного сукцината (в ходе биохимической реакции превращения сукцината в сукцинил-КоА (Succinate Assay Kit (Colorimetric), Abcam ab204718) и твердофазной экстракцией), однако они не привели к полному избавлению от сукцината. Поэтому в ходе валидации была использована модельная матрица.

Модельную матрицу готовили следующим образом. К 1,8 мл плазмы добавляли 8 мл этилацетата, перемешивали на вортексе и инкубировали на шейкере в течение 15 мин. Полученный экстракт центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Органическую фазу упаривали в токе азота при 40 °С. Полученный осадок растворяли в 1,8 мл 10 % бычьего альбумина («Sigma-Aldrich», Германия), разведённого на физиологическом растворе.

Приготовление калибровочных растворов осуществляли следующим образом. Из маточного метанольного раствора сукцината 1 мг/мл готовили водный раствор с концентрацией 100 мкг/мл. Из полученного раствора готовили следующие калибровочные стандарты сукцината в модельной плазме крови крыс: 20 000 нг/мл, 10 000 нг/мл, 6000 нг/мл, 2000 нг/мл, 1000 нг/мл, 600 нг/мл и 200 нг/мл. В качестве образцов контроля качества использовали следующие растворы сукцината: 16000 нг/мл,

10000 нг/мл, 600 нг/мл и 200 нг/мл. Полученные растворы хранили в холодильнике при температуре от +4 °C до +6 °C.

Ионизацию молекул сукцината проводили в режиме негативной (отрицательной) ионизации на электроспрее при атмосферном давлении и напряжении 2500 В. Режим детектирования: sheath gas (фокусирующий газ) 50 Arb (отн. ед.), aux gas (вспомогательный газ) 10 Arb (отн. ед.), sweep gas (экранирующий газ) 1 Arb (отн. ед.), температура трансферного капилляра 300 °C, температура испарителя 350 °C. Для детектирования сукцината использовали следующие переходы масс: 117 m/z → 98,7 m/z при энергии столкновения 10 эВ, 117 m/z → 73,1 m/z при энергии столкновения 10 эВ. Параметр напряжения фрагментации в источнике (Source CID) был установлен на уровне 5 В, давление аргона (диссоциирующий газ) — 1,5 мТорр. Переходы масс для внутреннего стандарта хлорамфеникола: 321,1 m/z → 152,1 m/z при энергии столкновения 17 эВ, 321,1 m/z → 176,1 m/z при энергии столкновения 21 эВ.

Общее время анализа составило 7,5 минут, скорость потока: 0,5 мл/мин, объём вводимой пробы 5 мкл. В данных условиях время удерживания сукцината — 3,8 мин.

Для пробоподготовки биообразцов или модельной матрицы использовали метанол с добавлением в качестве внутреннего стандарта хлорамфеникола (“Dr Ehrenstorfer”, Германия) в концентрации 10 нг/мл, добавляемый в количестве 600 мкл на 200 мкл образца. Полученную смесь встряхивали на шейкере в течение 1 минуты, затем центрифугировали при 13 000 g (Avanti JXN-3 “Beckman Coulter”, США) в течение 10 минут при 4 °C по Цельсию. 600 мкл надосадочной жидкости переливали пипеткой в промаркированные флаконы и помещали в автосемплер для последующего анализа.

Для расчёта метрологических характеристик и основных валидационных параметров разработанной методики применяли программу “Microsoft Excel”. Валидацию биоаналитической методики проводили на основе Руководства по экспертизе лекарственных средств, том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, 2016, а также Руководств FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018 и EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011 по следующим параметрам: селективность; нижний предел количественного определения; калибровочная кривая (линейность); правильность (на уровнях внутри цикла, между циклов); прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклов); стабильность образцов; перенос пробы; матричный эффект, извлечение, эффект разбавления.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Селективность. На хроматограммах образцов холостой плазмы крови крыс наблюдался пик со временем удерживания, соответствующим времени удерживания сукцината, что свидетельствовало о наличии эндогенного сукцината в плазме крови животных. Поэтому в дальнейшем для определения нижнего предела количественного определения, правильности и прецизионности использовалась модельная матрица.

Типовые хроматограммы представлены на рис. 2–3.

Нижний предел количественного определения (НПКО). Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация сукцината в модельной матрице в диапазоне линейной зависимости, для которой возможно количественное определение вещества со значениями правильности и прецизионности не более 20 %. НПКО методики составил 200 нг/мл для сукцината. Хроматограмма модельной матрицы с содержанием сукцината на уровне НПКО приведена на рис. 3. Отношение сигнал/шум по пикам сукцината на уровне НПКО, составляло не менее 10. Предел обнаружения (детектирования) сукцината для данной методики составил около 50 нг/мл. Соотношение сигнал/шум составило около 3.

Линейность. Проводили анализ 7 образцов модельной матрицы и холостой плазмы крови с прибавлением рабочих растворов сукцината до получения концентраций: 200 нг/мл, 600 нг/мл, 1000 нг/мл, 2000 нг/мл, 6000 нг/мл, 10 000 нг/мл, 20 000 нг/мл и рабочего раствора хлорамфеникола (внутреннего стандарта) до концентрации 10 нг/мл.

По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика сукцината к площади пика хлорамфеникола от концентрации сукцината в модельной матрице и в плазме крови. Полученные коэффициенты корреляции соответствовали нормам (не менее 0,99).

Были получены следующие уравнения регрессии — для модельной матрицы: $y = -0,00944909 + 0,183291 \times x$, $r^2 = 0,9977$; $y = -0,00437701 + 0,16042 \times x$, $r^2 = 0,9917$; $y = 0,00339529 + 0,156666 \times x$, $r^2 = 0,9922$; для плазмы крови: $y = 0,0780406 + 0,160863 \times x$, $r^2 = 0,9926$; $y = 0,0946422 + 0,147063 \times x$, $r^2 = 0,9938$; $y = 0,107646 + 0,153049 \times x$, $r^2 = 0,9962$.

Угол наклона калибровочных графиков на модельной матрице $0,1668 \pm 0,0144$, соответствовал углу наклона калибровочных графиков на плазме $0,1536 \pm 0,0069$ ($p = 0,226$), т. е. калибровочные кривые практически совпадали (рис. 4), что подтверждает возможность использовать модельную матрицу [11].

Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений (правильность) для калибровочных графиков на модельной матрице соответствовали

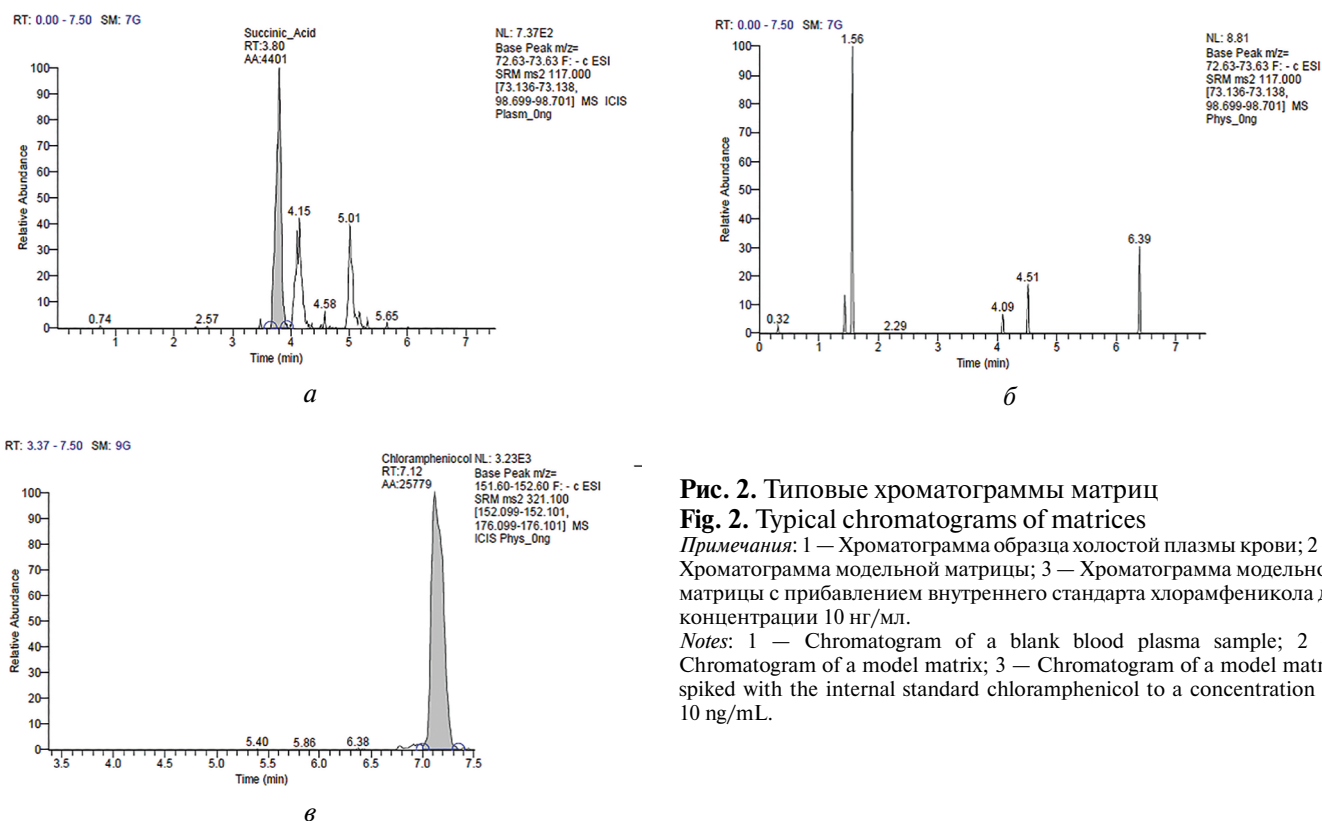


Рис. 2. Типовые хроматограммы матриц
Fig. 2. Typical chromatograms of matrices

Примечания: 1 — Хроматограмма образца холостой плазмы крови; 2 — Хроматограмма модельной матрицы; 3 — Хроматограмма модельной матрицы с прибавлением внутреннего стандарта хлорамфеникола до концентрации 10 нг/мл.

Notes: 1 — Chromatogram of a blank blood plasma sample; 2 — Chromatogram of a model matrix; 3 — Chromatogram of a model matrix spiked with the internal standard chloramphenicol to a concentration of 10 ng/mL.

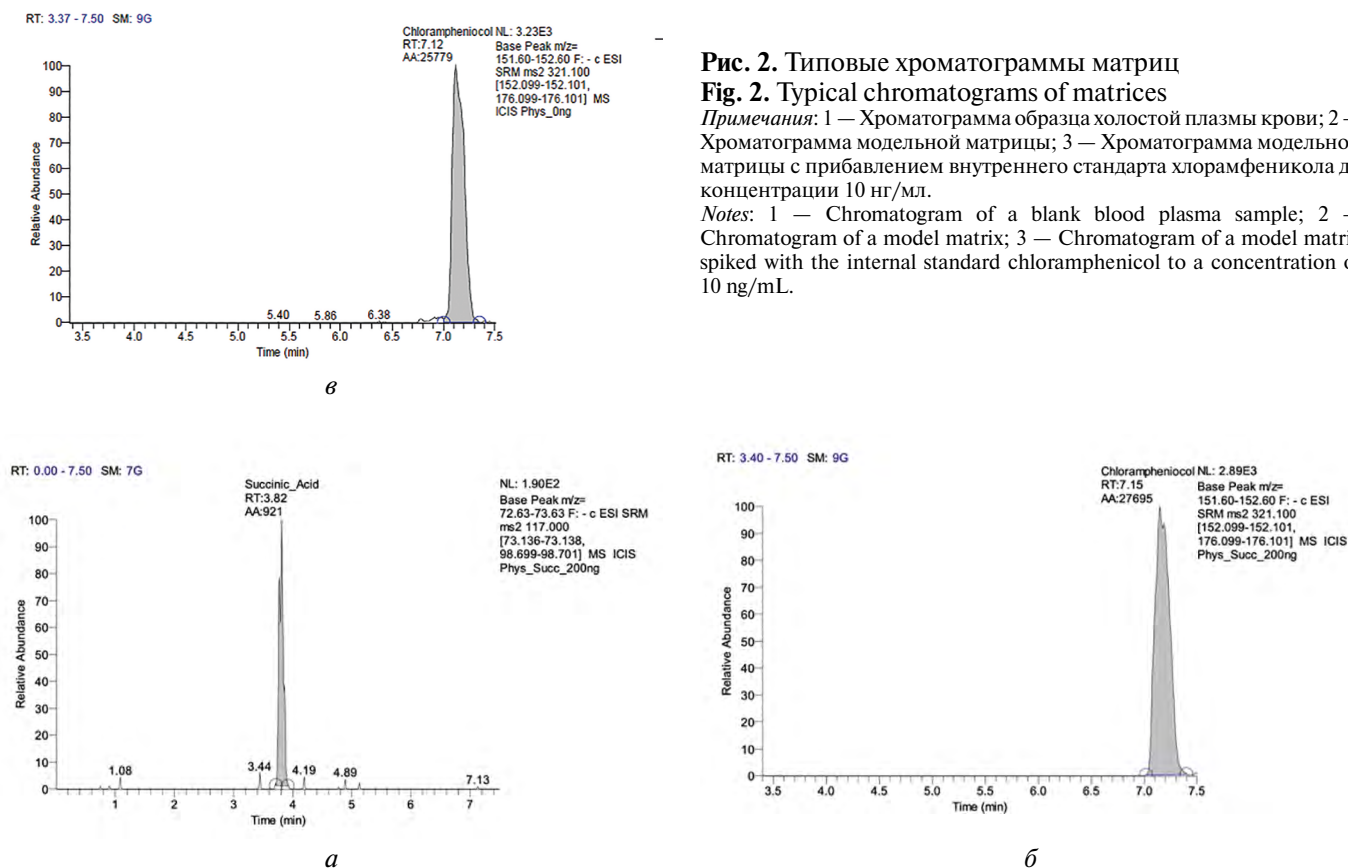


Рис. 3. Хроматограмма модельной матрицы с прибавлением сукцината до концентрации 200 нг/мл и внутреннего стандарта хлорамфеникола до концентрации 10 нг/мл

Fig. 3. Chromatogram of a model matrix spiked with succinate to a concentration of 200 ng/mL and the internal standard chloramphenicol to a concentration of 10 ng/mL

принятым нормам (не более 20 % для НПКО, не более 15 % для остальных точек) (табл. 1).

Правильность и прецизионность. Проводили анализ образцов модельной матрицы с прибавлением рабочих растворов до получения концентраций сукцината 200 нг/мл, 600 нг/мл, 10000 нг/мл, 16000 нг/мл и раствора хлорамфеникола до концентрации 10 нг/мл. Анализ проводили в рамках 3 последовательностей (циклов) по 5 образцов для каждой концентрации сукцината в каждом цикле ($n = 5$ для внутрицикловой, $n = 15$ для

межцикловой правильности и прецизионности). Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, CV, прецизионность) и относительной погрешности (E, правильность) соответствовали принятым нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % — для остальных точек) (табл. 2).

Стабильность. Оценивали стабильность сукцината и внутреннего стандарта — хлорамфеникола в составе рабочих растворов, сукцината в биологической матрице при хранении, трехкратном цикле заморозки-размороз-

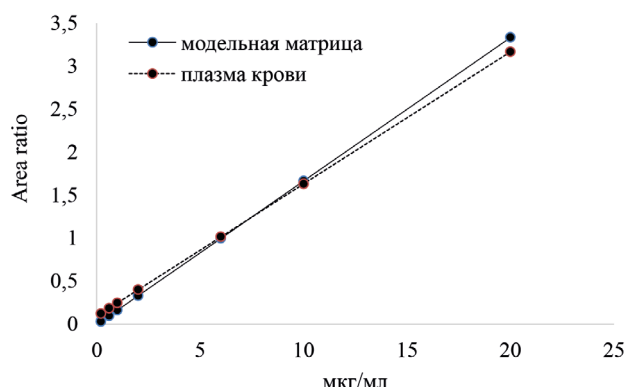


Рис. 4. Полученные усредненные уравнения регрессии для модельной матрицы и для плазмы крови
Fig. 4. Obtained averaged regression equations for the model matrix and for blood plasma.

ки, а также после пробоподготовки. Образцы считали стабильными при изменении концентрации после хранения не более чем на 15 % (табл. 3).

Стабильность рабочих растворов сукцината оценивали путём их хроматографического исследования после разведения в модельной матрице до концентрации 600 и 16 000 нг/мл, указанное разведение учитывали в дальнейшем при расчёте концентраций. Анализировали площадь пиков сукцината и хлорамфеникола сразу после приготовления и после хранения при -80°C в течение 123 дней. Полученные результаты, свидетельствуют о том, что рабочие растворы сукцината и хлорамфеникола устойчивы при хранении в течение 123 дней.

Для оценки стабильности сукцината в составе плазмы крови при хранении в замороженном состоянии (долгосрочной стабильности) готовили образцы, аналогичные по составу образцам нижнего и верхнего контроля ка-

чества. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные — после хранения в замороженном состоянии при -80°C в течение 97 дней. Полученные данные свидетельствуют о том, что сукцинат стабилен в составе плазмы крови при хранении в замороженном состоянии при -80°C в течение 97 дней.

Для оценки краткосрочной стабильности сукцината после пробоподготовки исследовали образцы нижнего и верхнего контроля качества. Половину образцов анализировали сразу после получения, а остальные — после хранения в лотке автосемплера при $+6^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов. Полученные данные свидетельствуют о том, что сукцинат стабилен после пробоподготовки в лотке автосемплера в течение 24 часов при $+6^{\circ}\text{C}$.

Для оценки стабильности сукцината в составе плазмы крови при трёхкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C готовили образцы, аналогичные по составу образцам нижнего и верхнего контроля качества. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные после трехкратного цикла заморозки-разморозки. Полученные данные свидетельствуют о том, что сукцинат стабилен в составе плазмы крови при трёхкратном цикле заморозки-разморозки при -80°C .

Таким образом, доказана стабильность аналита и внутреннего стандарта в течение времени, превышающего время хранения и анализа образцов.

Перенос пробы. При последовательном анализе образца с концентрацией сукцината 20 000 нг/мл и образца холостой модельной матрицы на хроматограмме образца холостой модельной матрицы отсутствовали пики или детектировались незначительные (отклик детектора при времени удерживания сукцината составлял менее 20 % отклика в образце НПКО) пики, соответствующие по времени удерживания пикам сукцината. Таким образом, доказано отсутствие переноса пробы.

Матричный эффект. В образцах холостой плазмы

Таблица 1

Отклонения концентраций сукцината в модельной матрице в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочные графики № 1, 2, 3

Table 1

Deviations of succinate concentrations in the model matrix in calibration samples from their nominal values, calibration curves № 1, 2, 3

Концентрация, номинальная, нг/мл	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация, рассчитанная, нг/мл	Правильность Е, %	Концентрация, рассчитанная, нг/мл	Правильность Е, %	Концентрация, рассчитанная, нг/мл	Правильность Е, %
200,0	191,9	4,03	212,2	6,1	190,6	4,69
600,0	661,5	10,3	578,7	3,5	588,7	1,88
1000,0	1011,9	1,20	869,2	13,1	1111,1	11,11
2000,0	1946,5	2,68	2134,7	6,7	1862,5	6,87
6000,0	5871,0	2,15	6824,1	13,7	6709,8	11,83
10000,0	9363,9	6,36	8832,9	11,7	8765,0	12,35
20000,0	20753,1	3,77	20348,2	1,7	20572,3	2,86

Таблица 2

Внутрицикловая и межцикловая правильность и прецизионность методики количественного определения сукцината в модельной матрице

Table 2

Intra-cycle and inter-cycle accuracy and precision of the method for the quantitative determination of succinate in the model matrix

Вид	Концентрация номинальная (нг/мл)	Среднее значение концентрации (нг/мл)	SD	RSD, %	E, %
Внутрицикловая	200	217,5	13,25	6,09	8,75
	600	605,9	41,06	6,78	0,98
	10000	8789,24	356,91	4,06	12,11
	16000	14423,4	612,66	4,25	9,85
Межцикловая	200	218,3	18,61	8,53	9,16
	600	619,26	57,23	9,24	3,21
	10000	9598,49	826,37	8,61	4,02
	16000	15498,1	1410,77	9,10	3,14

Таблица 3

Стабильность сукцината

Table 3

Succinate stability

Вид стабильности	600 нг/мл*			16000 нг/мл		
	До	После	% Изменения	До	После	% Изменения
Стабильность в замороженном состоянии при -80°C в течение 97 дней	1304,1 $\pm$ 8,52	1274,5 $\pm$ 33,41	-2,27	17145,9 $\pm$ 1264,9	16320,0 $\pm$ 686,5	-4,82
Краткосрочная стабильность в автосемплере	1218,4 $\pm$ 31,6	1299,5 $\pm$ 6,20	6,66	14998,9 $\pm$ 619,2	14528,5 $\pm$ 172,0	-3,14
Стабильность в плазме крови при заморозке-разморозке	1027,5 $\pm$ 86,91	1102,6 $\pm$ 13,79	7,31	17011,2 $\pm$ 298,54	15708,6 $\pm$ 404,36	-7,66
Примечание: * — фактическая концентрация сукцината равна сумме концентраций эндогенного и добавленного сукцината. Note: * — the actual concentration of succinate is equal to the sum of the concentrations of endogenous and added succinate.						

крови, полученных от 6 разных источников, определяли площадь пика эндогенного сукцината. Затем проводили экстракцию метанолом (в соотношении с плазмой 3:1), к полученным экстрактам добавлялись рабочие растворы сукцината для получения нижнего и верхнего контроля качества и внутреннего стандарта и анализировали их площади. Также анализировали площади пиков нижнего и верхнего контроля качества и внутреннего стандарта, приготовленных на физрастворе. Матричный эффект рассчитывали как отношение площади пика в присутствии плазмы за вычетом площади пика эндогенного сукцината к площади пика на физрастворе для каждого контроля качества и внутреннего стандарта.

Также рассчитывали нормализованный эффект матрицы по внутреннему стандарту (как частное от деления эффекта матрицы анализируемого вещества на эффект матрицы внутреннего стандарта). Относительное стандартное отклонение нормализованного эффекта матрицы, рассчитанное для 6 биологических образцов,

не должно превышать 15 %.

Рассчитанные относительное стандартное отклонение матричного эффекта сукцината, хлорамфеникола и нормализованного матричного эффекта сукцината находились в пределах нормы (табл. 4).

Извлечение. В холостую плазму из 6 различных источников после экстракции были добавлены рабочие растворы сукцината для получения нижнего и верхнего контроля качества и внутреннего стандарта. Растворы сукцината и внутреннего стандарта в плазме были приготовлены с такими же концентрациями.

Извлечение рассчитывали, как отношение площади пика после экстракции из плазмы к площади пика в присутствии матрицы для каждого контроля качества и внутреннего стандарта. Также рассчитывали нормализованное по внутреннему стандарту извлечение (как частное от деления извлечения анализируемого вещества на извлечение внутреннего стандарта). Рассчитанные относительное стандартное отклонение извлечения

Таблица 4

Эффект матрицы для сукцината в плазме крови

Table 4

Matrix effect for succinate in blood plasma

Концентрация		Холостая плазма крови	Сукцинат					Хлорамфеникол		
		S пика эндогенного сукцината	S пика на плазме	S пика экзогенного сукцината (дельта)	S пика на физрастворе	Матричный эффект	Нормализованный матричный эффект	S пика на плазме	S пика на физрастворе	Матричный эффект
600 нг/мл	M	6498,5	9102,1	2603,59	2477,1	1,05	0,88	29272,8	24469,5	1,20
	SD	674,4	559,6	357,42	165,9	0,14	0,13	640,3	2366,8	0,03
	RSD, %	10,38	6,15	13,73	6,70	13,73	14,80	2,19	9,67	2,19
16000 нг/мл	M	5318,5	71595,3	66276,8	66858,6	0,99	0,86	29033,7	25284,3	1,15
	SD	408,9	1939,8	1917,2	4386,7	0,03	0,01	801,32	859,2	0,03
	RSD, %	7,69	2,71	2,89	6,56	2,89	1,42	2,76	3,40	2,76

сукцината, хлорамфеникола и нормализованного извлечения сукцината находились в пределах нормы (не более 15 %) (табл. 5).

Эффект разбавления. Готовили образец холостой плазмы крови с добавлением сукцината до концентрации 2 000 000 и 200 000 нг/мл и разводили его той же холостой плазмой крови в 100 или 10 раз соответственно. Правильность при анализе образца с концентрацией 2 000 000 нг/мл составила 4,40 %, образца 200 000 нг/мл — 9,92 %. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии влияния разбавления на анализ количества сукцината.

Полученные результаты свидетельствуют об успешной валидации методики количественного определения сукцината в плазме крови крыс.

В ходе разработки методики количественного определения сукцината в плазме крови основной упор делался на экспрессность метода и упрощение методики

пробоподготовки, поскольку каждый дополнительный этап подготовки увеличивает время анализа и повышает риск допущения ошибок в данном случае. В результате для процесса пробоподготовки был использован только минимально необходимый процесс осаждения макромолекул органическим растворителем, в качестве которого был использован метанол, обеспечивающий, при этом, хорошую степень извлечения анализируемых соединений из образца без необходимости дополнительных мер и процедур.

При анализе хроматограмм во всех образцах плазмы наблюдалось наличие дополнительных пиков, не соответствующих по времени удерживания янтарной кислоте. Также при добавлении экзогенного сукцината к плазме крови не наблюдалось повышения интенсивности данных соединений, что свидетельствует об отличии в природе данных соединений. Поиск по масс-спектрометрическим базам данных и научным

Таблица 5

Степень извлечения для сукцината в плазме крови

Table 5

Extraction recovery for succinate in blood plasma

Концентрация		Сукцинат				Хлорамфеникол		
		S пика контроля качества	S пика в матрице	Извлечение	Нормализованный % извлечения	S пика контроля качества	S пика в матрице	Извлечение
600 нг/мл	Среднее	8775,67	9102,09	0,96	0,97	29099,50	29272,77	0,99
	SD	226,51	559,56	0,02	0,02	796,63	640,30	0,03
	RSD, %	2,58	6,15	2,58	1,87	2,74	2,19	2,74
16000 нг/мл	Среднее	71579,36	71595,30	1,00	1,03	28197,52	29033,72	0,97
	SD	1164,18	1939,81	0,02	0,03	651,58	801,32	0,02
	RSD, %	1,63	2,71	1,63	3,00	2,31	2,76	2,31

статьям позволяет предположить, что данное соединение является метилмалоновой кислотой — метаболитом, повышение уровня которого может указывать на дефицит цианокобаламина в организме [12].

Данный пик при этом отсутствовал на дополнительном масс-переходе сукцината, что являлось дополнительным критерием для признания данного пика принадлежащим другому соединению.

Отдельной проблемой стало также получение образцов матрицы, которые были бы свободны от сукцината, поскольку вещество является эндогенным метаболитом. Были предприняты попытки устранения эндогенного сукцината (в ходе биохимической реакции превращения сукцината в сукцинил-KoA (Succinate Assay Kit (Colorimetric), Abcam ab204718), однако ввиду обратимости биохимических процессов при отсутствии утилизации продуктов реакции наблюдалось повышение уровня сукцината в образце в отличие от ожидаемого результата. В итоге было принято решение использовать модельную матрицу, в которой применялся физиологический раствор для воспроизведения осмолярности крови, бычий сывороточный альбумин — в качестве белка крови, этилацетатный экстракт плазмы крови для добавления липофильных компонентов матрицы. При масс-спектрометрическом анализе всегда возможно коэлюирование соединений, влияющих на степень ионизации анализируемого соединения, по этой причине критерием приемлемости модельной матрицы считали близость коэффициента угла наклона калибровочной кривой (отличие не должно превышать 15 %) между модельной матрицей и плазмой крови.

В качестве внутреннего стандарта использовался хлорамфеникол, поскольку данное вещество давало стабильный отклик в негативном режиме ионизации электрораспылением, при котором анализируется исследуемое соединение, было доказано отсутствие взаимовлияния отклика (появление пиков, искажение площади) между аналитом и данным веществом, были получены адекватные значения нормализованного отклика (соотношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта) по параметрам правильности, прецизионности, стабильности, матричного эффекта, а также он является коммерчески доступным.

Концентрация эндогенного сукцината варьирует в

зависимости от типа ткани, особенностей метаболизма и наличия патологий. Кроме того, на этот показатель влияют демографические характеристики (возраст и пол), состояние здоровья исследуемого организма, а также технические аспекты — условия эксперимента, метод определения и пробоподготовка образцов. Например, концентрации сукцината в плазме у грызунов варьируют от 6 до 20 мкМ, тогда как у человека уровни сукцината были обнаружены от 2 до 3 мкМ в сыворотке [13] и от 2 до 20 мкМ в плазме крови [14]. Таким образом, выбранный аналитический диапазон 200–20 000 нг/мл, или 1,69–169 мкМ, подходит для анализа концентрации сукцината у грызунов.

Ограничения исследования / Study limitation

Исследование проводилось исключительно на плазме крови крыс, что ограничивает экстраполяцию полученных результатов на другие биологические матрицы (ткани, мочу, ликвор) и на другие виды, включая человека.

Аналитический диапазон методики (200–20 000 нг/мл) охватывает физиологические концентрации сукцината у грызунов, однако может быть недостаточным для анализа экстремально низких или высоких концентраций, возникающих при некоторых патологических состояниях или фармакологических воздействиях.

Наконец, методика не была апробирована в рамках полноценных фармакокинетических исследований *in vivo*, что требует дальнейшей верификации её применимости при анализе динамики концентраций сукцината после введения лекарственных препаратов.

Заключение / Conclusion

Разработана и валидирована методика количественного определения сукцината в плазме крови крыс с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Данная методика характеризуется необходимой чувствительностью, правильностью и прецизионностью и может быть использована для определения концентрации эндогенного сукцината в плазме крови крыс, а также для анализа фармакокинетики сукцината после введения сукцинат-содержащих лекарственных препаратов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare that they have no obvious or potential conflicts of interest to disclose in connection with the publication of this article.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией. *Есенина А. С.* — пробоподготовка, разработка методики ВЭЖХ-МС/МС; *Черных И. В.* — разработка методики ВЭЖХ-МС/МС, написание статьи; *Мыльников П. Ю.*, *Полупанов А. С.* — работа с хроматографом; *Шулькин А. В.* — анализ полученных результатов, редактирование статьи; *Якушева Е. Н.* — общее руководство работой, редактирование статьи; все авторы принимали участие в обсуждении полученных результатов.

Финансирование

Бюджет ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Рязань, Российская Федерация.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication. *Yesenina AS* — sample preparation, development of the HPLC-MS/MS method; *Chernykh IV* — development of the HPLC-MS/MS method, writing the article; *Mylnikov PYu*, *Polupanov AS* — operating the chromatograph; *Shchulkin AV* — analysis of the obtained results, editing the article; *Yakusheva EN* — general supervision of the work, editing the article; all authors took part in the discussion of the obtained results.

Funding

Budget of the Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Мыльников Павел Юрьевич — к. б. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Рязань, Российская Федерация
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-7829-2494
РИНЦ SPIN-код: 8503-3082

Pavel Yu. Mylnikov — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor of the Department of Pharmacology Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-7829-2494
RSCI SPIN code: 8503-3082

Есенина Анна Сергеевна — ассистент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Рязань, Российская Федерация
Автор, ответственный за переписку
e-mail: esenina.anna96@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-3984-8979
РИНЦ SPIN-код: 2351-2387

Anna S. Esenina — Assistant Professor of the Department of Pharmacology Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation
Corresponding author
e-mail: esenina.anna96@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-3984-8979
RSCI SPIN code: 2351-2387

Черных Иван Владимирович — д. б. н., доцент, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Рязань, Российская Федерация
e-mail: ivchernykh88@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-5618-7607
РИНЦ SPIN-код: 5238-6165

Ivan V. Chernykh — Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation
e-mail: ivchernykh88@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-5618-7607
RSCI SPIN code: 5238-6165

Полупанов Александр Сергеевич — к. м. н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Рязань, Российская Федерация
e-mail: alexpol81@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0003-4065-7544
РИНЦ SPIN-код: 8568-0766

Alexander S. Polupanov — PhD, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Pharmacology Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation
e-mail: alexpol81@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0003-4065-7544
RSCI SPIN code: 8568-0766

Шулькин Алексей Владимирович — д. м. н., доцент, профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Рязань, Российская Федерация
e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru
ORCID ID: 0000-0003-1688-0017
РИНЦ SPIN-код: 2754-1702

Aleksey V. Shchulkin — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor of the Department of Pharmacology, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation
e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru
ORCID ID: 0000-0003-1688-0017
RSCI SPIN code: 2754-1702

Якушева Елена Николаевна — д. м. н., профессор, зав. кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Рязань, Российская Федерация
e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru
ORCID ID: 0000-0001-6887-4888
РИНЦ SPIN-код: 2865-3080

Elena N. Yakusheva — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pharmacology, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ryazan, Russian Federation
e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru
ORCID ID: 0000-0001-6887-4888
RSCI SPIN code: 2865-3080

Список литературы / References

1. de Castro Fonseca M, Aguiar CJ, da Rocha Franco JA, et al. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Commun Signal*. 2016 Jan 12;14:3. doi: 10.1186/s12964-016-0126-1.
2. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1857(8):1086-1101. doi: 10.1016/j.bbabo.2016.03.012.
3. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Райцев С.Н. и др. Роль фактора, индуцируемого гипоксией, 1 α при адаптации к гипоксии в патогенезе новой коронавирусной болезни 2019. *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. 2024;32(1):133-144. [Kalinin RE, Suchkov IA, Raitsev SN, et al. Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 α in Adaptation to Hypoxia in Pathogenesis of Novel Coronavirus Disease 2019. *I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2024;32(1):133-144. (In Russ.)]. doi: 10.17816/PAVLOVJ165536.
4. He W, Miao FJ, Lin DC, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2004 May 13;429(6988):188-93. doi: 10.1038/nature02488.
5. Gilissen J, Jouret F, Pirotte B, Hanson J. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacol Ther*. 2016 Mar;159:56-65. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.008.
6. Оковитый С.В., Радько С.В., Шустов Е.Б. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015; 49(9):3-7. [Okovityi SV, Rad'ko SV, Shustov EB. Succinate receptors (SUCNR1) as a promising target for pharmacotherapy. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 2015;49(9):3-7. (In Russ.)]. doi: 10.30906/0023-1134-2015-49-9-3-7.
7. Lamy C, Mansard C, Blondel L, et al. Quantification of succinic acid levels, linked to succinate dehydrogenase (SDH) dysfunctions, by an automated and fully validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method suitable for multi-matrix applications. *J Chromatogr*

B AnalYT Technol Biomed Life Sci. 2022 Jan 15;1189:123085. doi: 10.1016/j.jchro.2021.123085.

8. Bao X, Wu J, Shuch B, et al. Quantitative Profiling of Oncometabolites in Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Specimens by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Sci Rep*. 2019 Aug 2;9(1):11238. doi: 10.1038/s41598-019-47669-5.

9. Jung Y, Song JS, Ahn S. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of 13C-Labeled Succinic Acid in Mice. *Nutrients*. 2022 Nov 10;14(22):4757. doi: 10.3390/nu14224757.

10. Xu L, Zha A, Xiong X, Sun D. Determination of succinic acid and lactic acid in pigs' serum, intestinal contents, and meat by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2024 Aug 15;38(15):e9769. doi: 10.1002/rcm.9769.

11. Shi Y, Tse S, Rago B, et al. Quantification of fumarate and investigation of endogenous and exogenous fumarate stability in rat plasma by LC-MS/MS. *Bioanalysis*. 2016 Apr;8(7):661-75. doi: 10.4155/bio-2015-0026.

12. Monostori P, Klinke G, Richter S, et al. Simultaneous determination of 3-hydroxypropionic acid, methylmalonic acid and methylcitric acid in dried blood spots: Second-tier LC-MS/MS assay for newborn screening of propionic acidemia, methylmalonic acidemias and combined remethylation disorders. *PLoS One*. 2017 Sep 15;12(9):e0184897. doi: 10.1371/journal.pone.0184897.

13. Sadagopan N, Li W, Roberds SL, et al. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am J Hypertens*. 2007 Nov;20(11):1209-15. doi: 10.1016/j.amjhyper.2007.05.010.

14. Kushnir MM, Komaromy-Hiller G, Shushan B, et al. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. *Clin Chem*. 2001 Nov;47(11):1993-2002.