

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ТОКСИКОЛОГИИ И АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ
RESEARCH METHODS IN TOXICOLOGY AND ANALYTICAL CHEMISTRY

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Градинарь М.М., Шулькин А.В., Черных И.В., Якушева Е.Н.

Разработка и валидация методики количественного определения ротенона в гомогенате коры головного мозга крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографииФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 390026, г. Рязань, Российская Федерация

Введение. Ротенон – нейротоксин, вызывающий повреждение дофаминергических нейронов чёрной субстанции и используемый в качестве средства для моделирования экспериментального паркинсонического синдрома. Разработка методики количественного определения ротенона в головном мозге позволит предложить и апробировать новые стратегии фармакотерапии паркинсонизма, связанные со снижением проникновения нейротоксических веществ в мозг.

Цель исследования заключалась в разработке и валидации ВЭЖХ-методики (высокоэффективная жидкостная хроматография) количественного определения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс.

Материал и методы. Количественное определение ротенона осуществляли с помощью хроматографической системы Stayer («Аквилон», Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104 при длине волны 296 нм в изократическом режиме. Применяли обращенно-фазную хроматографическую колонку Luna C18 100Å (250*4,6) с зернением 5 мкм при температуре 37°C. Состав подвижной фазы: вода деионизированная, ацетонитрил в соотношении 70:30. Определение концентрации ротенона проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков.

Пробоподготовка заключалась в гомогенизации 500 мг измельченной лобной доли коры головного мозга крыс в 500 мкл воды очищенной с последующим центрифугированием (1750 g), отбором надосадочной жидкости, осаждением белка ацетонитрилом (2,5 мл). Водный слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе. К сухому остатку добавляли 250 мкл подвижной фазы и 100 мкл инжестировали в хроматограф.

Результаты. Методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, пределы обнаружения и определения, перенос пробы, стабильность образцов. Аналитический диапазон составил 62,5–1000,0 нг/г мозга с коэффициентом корреляции более 0,99. Предел обнаружения и количественного определения ротенона составляли соответственно 25,0 и 62,5 нг/г. Расчет внутри- и межциклового точности и прецизионности показал, что данные параметры не превышают 20% для концентрации, соответствующей нижнему пределу количественного определения, и 15% – для более высоких концентраций. Стабильность методики продемонстрирована при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, трехкратном цикле заморозки-разморозки при минус 80°C, хранении при минус 80 °C в течение 60 сут. Перенос пробы отсутствовал.

Ограничения исследования. Разработанная хроматографическая методика позволяет анализировать содержание ротенона в коре головного мозга крыс в диапазоне концентраций 62,5–1000,0 нг/г.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс.

Ключевые слова: ротенон; ВЭЖХ; кора больших полушарий мозга; крысы

Соблюдение этических стандартов. Экспериментальное исследование было одобрено комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Для цитирования: Градинарь М.М., Шулькин А.В., Черных И.В., Якушева Е.Н. Разработка и валидация методики количественного определения ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Токсикологический вестник*. 2022; 31(2): 120-126. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-2-120-126> (in Russian)

Для корреспонденции: Черных Иван Владимирович, доктор биол. наук, доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Рязанский ГМУ имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ, 390026, г. Рязань. E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Участие авторов: Градинарь М.М. – выполнение хроматографических исследований, пробоподготовка; Шулькин А.В. – статистическая обработка результатов, написание текста; Черных И.В. – выполнение хроматографических исследований, расчёт валидационных параметров; Якушева Е.Н. – руководство исследованием, написание текста. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила в редакцию: 08 июня 2023 / Принята в печать: 02 февраля 2023 / Опубликовано: 30 апреля 2023

Gradinar M.M., Schulkin A.V., Chernykh I.V., Yakusheva E.N.

Development and validation of a method for the quantitative determination of rotenone in the homogenate of the cerebral cortex of rats by high-performance liquid chromatography (HPLC)

Ryazan State Medical University, 390026, Ryazan, Russian Federation

Introduction. Rotenone is a neurotoxin that causes damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra and is used as a model for experimental parkinsonian syndrome. The development of a technique for the quantitative determination of rotenone in the brain will allow testing new strategies for the pharmacotherapy of parkinsonism by reducing the penetration of toxic substances into the brain.

The aim of the study was to develop and validate an HPLC method for the quantitative determination of rotenone in the cerebral cortex of rats.

Material and methods. Quantitative determination of rotenone was carried out using a Stayer chromatographic system (Аквилон, Russia) with a UV spectrophotometric detector UVV 104 at a wavelength of 296 nm in isocratic mode. A reverse-phase chromatographic column Luna C18 100Å (250*4.6) with a grain size of 5 µm at a temperature of 37°C was used. The composition of the mobile phase was deionized water, acetonitrile in a ratio of 70:30. Determination of rotenone concentration was carried out by the method of absolute calibration by the area of the peaks.

Sample preparation consisted in homogenization of 500 mg of crushed frontal lobe of the rat cerebral cortex in 500 µl of purified water, followed by centrifugation (1750 g), collection of the supernatant and sedimentation of the proteins by acetonitrile. The liquid layer was evaporated on a rotary vacuum. 250 µl of the mobile phase was added to the dry residue, and 100 µl was injected into the chromatograph.

Results. The method was validated for the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision, limits of detection and determination, sample transfer, sample stability. The analytical range was 62.5–1000.0 ng/g brain with a correlation coefficient of more than 0.99. The limits of detection and quantification of rotenone were 25.0 and 62.5 ng/g, respectively. The calculation of intra- and inter-cycle accuracy and precision showed that these parameters do not exceed 20% for the concentration corresponding to the lower limit of quantitative determination, and 15% for higher concentrations. The stability of the technique was demonstrated during short-term storage at room temperature, three freeze-thaw cycles at –80°C, and storage at –80°C for 60 days. There was no sample transfer.

Limitations. The chromatographic technique makes it possible to analyze the content of rotenone in the cerebral cortex of rats in the concentration range of 62.5–1000.0 ng/g.

Conclusion. A method for the quantitative determination of rotenone in the homogenate of the cerebral cortex of rats has been developed and validated.

Keywords: rotenone; HPLC; cerebral cortex; rats

Compliance with ethical standards. The experimental study was approved by the commission for control over the maintenance and use of laboratory animals of the Ryazan State Medical University.

For citation: Gradinar M.M., Shchulkin A.V., Chernykh I.V., Yakusheva E.N. Development and validation of a method for the quantitative determination of rotenone in the homogenate of the cerebral cortex of rats by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Toksikologicheskiy vestnik (Toxicological Review)*. 2023; 31(2): 120-126. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2023-31-2-120-126> (In Russian)

For correspondence: Ivan V. Chernykh, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Ryazan State Medical University, Ministry of Health of Russia, 390026, Ryazan, Russian Federation. E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Information about the authors:

Gradinar M.M., <https://orcid.org/0000-0002-2246-4127>

Chernykh I.V., <https://orcid.org/0000-0002-5618-7607>

Schulkin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>

Yakusheva E.N., <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>

Author contribution: Gradinar M.M. – performance of chromatographic studies, sample preparation; Shchulkin A.V. – statistical processing of the obtained results, writing an article; Chernykh I.V. – performance of chromatographic studies, calculation of validation parameters; Yakusheva E.N. – writing an article, general management of the work. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was not sponsored.

Received: January 1, 2023 / Accepted: February 2, 2023 / Published: April 30, 2023

Введение

Ротенон – это цитотоксичное соединение из группы флавоноидов, получаемое из корней ряда растений семейства Бобовые (*f. Fabaceae*). Он применяется в сельском хозяйстве в качестве пестицида и инсектицида. Ротенон ингибирует цепь переноса электронов в митохондриях, что приводит к гибели клетки [1].

В эксперименте *in vitro* ротенон нарушал синтез и сборку белков цитоскелета, репликацию ДНК, везикулярный транспорт медиаторов [2], а при системном введении повреждал центральные и периферические дофаминэргические нейроны [3].

Ротенон-индуцированная модель – это одна из перспективных моделей токсического паркинсонизма, которая вызывает нигростриальную дегенерацию и является наиболее приближенной по патогенетическим механизмам и симптомам к болезни Паркинсона [4]. Ротенон обладает высокой липофильностью и, таким образом, легко проникает во все органы, включая головной мозг.

На сегодняшний день в научной литературе приведён ряд методик количественного определения ротенона в головном мозге, плазме крови и растительных экстрактах. Методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии (высокоэффективная жидкостная хроматография) определяли количество ротенона в головном мозге крыс [5], в плазме крови человека [6], в оливковом масле [7], фруктах и овощах [8], однако данный метод является

дорогостоящим и экономически малодоступным. Также при литературном поиске был найден метод определения ротенона в плазме крови ВЭЖХ-УФ, однако для растворения ротенона использовали метанол [9], при апробации данной методики происходила адсорбция ротенона на колонке и наблюдался эффект переноса пробы.

Разработка методики количественного определения ротенона позволила бы доказать проникновение нейротоксина в головной мозг при моделировании экспериментального паркинсонического синдрома, а также проводить посмертную диагностику интоксикации данным веществом. Кроме того, оценка содержания ротенона в мозге даст возможность апробировать новые стратегии фармакотерапии паркинсонизма, связанные со снижением проникновения токсических веществ в мозг [10].

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс методом ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Материал и методы

Животные. В исследовании использовались крысы-самцы породы Вистар массой тела 280–320 г в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (Приказ МЗ РФ № 199н от 1 апреля 2016 г.), с целью забора биоматериала для разработки и валидации методики количественного определения ротенона.

Животных выводили из эксперимента передозировкой зоветила («Зоветил 100», «Virbac С.А.», Франция) в дозе 30 мг/кг массы тела и извлекали образец лобной доли коры больших полушарий головного мозга. В качестве биологической матрицы использовался гомогенат данной ткани интактных крыс, полученный от 5 разных животных. Образцы мозга хранили в морозильной камере при -80°C [11].

Оборудование и реактивы. Количественное определение ротенона в гомогенате лобной доли коры больших полушарий головного мозга крыс осуществляли с использованием хроматографической системы Stayer («Аквилон», Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104, оснащенный петлевым краном-дозатором РЕЕК с петлей ввода на 100 мкл, при длине волны 296 нм. Применяли обращенно-фазную хроматографическую колонку Luna C18 100Å (250*4,6) с зернением 5 мкм при температуре 37°C . Ввод проб в петлю хроматографа осуществляли шприцом «Microsyringes» (Германия).

В работе использовали следующее вспомогательное оборудование: гомогенизатор Diax 9000 («Heidolph», Германия), центрифуга «Elmi CM 6M» (Elmi, Латвия), деионизатор «Водолей Д301» («Аквилон», Россия), роторно-вакуумный испаритель «VV – Micro» («Heidolph», Германия), шейкер «Shaker S 3.01» («Elmi», Латвия), встряхиватель лабораторный медицинский «Vortex» («Elmi», Латвия) [11].

Для приготовления подвижной фазы использовали реактивы: ацетонитрил «для ВЭЖХ» («Merck», Германия), вода деионизированная, полученная с помощью деионизатора «Водолей Д301» («Аквилон», Россия).

В исследовании использовали субстанцию ротенона («Sigma», США).

Пробоподготовка. Ткань мозга массой 500 мг гомогенизировали при 24 000 оборотах в 1 мин в 500 мкл деионизированной воды в течение 1 мин на гомогенизаторе DIAx 900. Осаждение белков осуществляли ацетонитрилом (2,5 мл) путём встряхивания на приборе Shaker при 500 оборотах в мин в течение 10 мин, после чего центрифугировали при 1750 g в течение 10 мин и отбрасывали надосадочную жидкость.

Подготовка калибровочных растворов осуществлялась следующим образом: 5,0 мг ротенона растворяли в 5 мл ацетонитрила для получения матричного раствора с концентрацией 1,0 мг/мл. Из него путем разведения в деионизированной воде готовили 5 рабочих растворов в объеме 5 мл с концентрацией 62,5, 125,0, 250,0, 500,0, 1000,0 нг/мл, которые добавляли в

объеме 500 мкл к 500 мг ткани мозга с последующей гомогенизацией. Матричный и рабочие растворы хранили при температуре минус 80°C .

Диапазон концентраций целевого вещества был выбран на основе ожидаемых значений при внутривенном введении раствора ротенона крысам породы Вистар при моделировании лекарственного паркинсонизма [10].

Органический слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе (Heidolph instruments, Германия). Сухой остаток растворяли в 250 мкл подвижной фазы и 100 мкл раствора вводили в хроматограф [11].

Условия хроматографирования. Температура разделения – 37°C . Скорость потока – 1 мл/мин. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды в объёмном отношении 30:70. Время удерживания ротенона в данных условиях составило 6,72 мин.

Валидация. Валидацию биоаналитической методики выполняли согласно Руководству по экспертизе лекарственных средств, том I, Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, 2016, Руководствам EMA Guideline on bioanalytical method validation 1 и 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. European Medicines Agency. Committee for medicines products for human use: London, 2011 по следующим параметрам:

- селективность;
- калибровочная кривая (линейность);
- нижний предел количественного определения;
- точность;
- прецизионность;
- перенос пробы;
- стабильность ротенона в гомогенате мозга [11].

Результаты и обсуждение

Селективность. Проводили анализ холостой пробы гомогената коры больших полушарий головного мозга крыс без добавления стандарта ротенона и образцов гомогената мозга с добавлением рабочих растворов ротенона до конечных концентраций 62,5–1000,0 нг/г. На хроматограммах образцов холостой пробы гомогената коры больших полушарий головного мозга крыс не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания ротенона (рис. 1, 2).

Предел обнаружения ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс составил 25,0 нг/г, при этом отношение сигнала к шуму (базовой линии) было не менее 3.

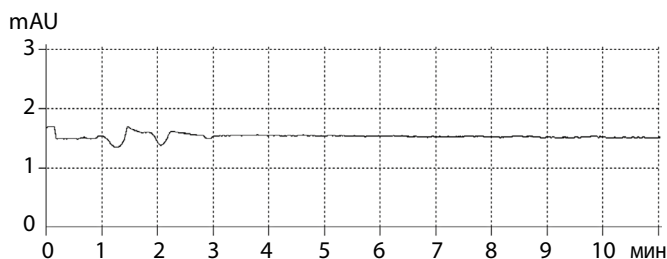


Рис. 1. Хроматограмма холостой матрицы.

Fig. 1. Intact matrix chromatogram.

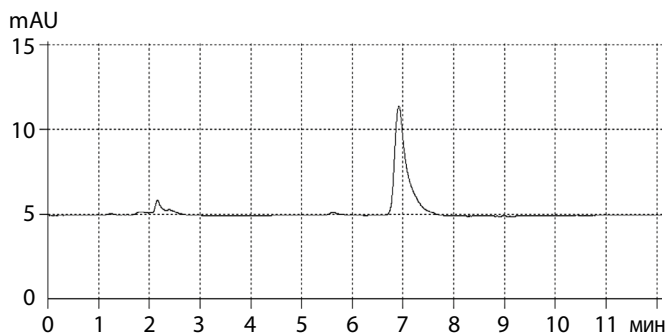


Рис. 2. Хроматограмма матрицы с добавлением рабочего раствора ротенона до конечной концентрации 125,0 нг/г.

Fig. 2. Chromatogram of the matrix with the addition of rotenone solution to concentration 125,0 нг/г.

Нижний предел количественного определения ротенона составил 62,5 нг/г. При этом соотношение сигнала к шуму было не ниже 10, а точность и прецизионность определения не превышали 20%.

Калибровочная кривая. Проводили анализ 5 образцов холостой пробы гомогената коры головного мозга крыс с добавлением равных объемов рабочих растворов ротенона до получения концентраций 62,5, 125,0, 250,0, 500,0, 1000,0 нг/г. Калибровочные растворы готовили трижды: перед началом проведения рутинного анализа и в процессе анализа при смене подвижной фазы. По полученным результатам были

построены 3 калибровочных графика в координатах зависимость площади пика ротенона от концентрации целевого вещества. Были получены следующие уравнения линейной регрессии: $y = 2,9854x - 40,106$; $R^2 = 0,9981$; $y = 3,0619x - 49,706$; $R^2 = 0,9987$; $y = 3,0783x - 46,99$; $R^2 = 0,9971$. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости от номинальных значений, не превышали допустимых пределов (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для более высоких концентраций калибровочных растворов), приведены в табл. 1.

Точность и прецизионность. Выполняли анализ образцов гомогената коры головного мозга крыс с добавлением рабочих растворов ротенона до получения концентраций 62,5, 200,0, 500,0, 800,0 нг/г в рамках трех циклов. На первом этапе оценивали точность и прецизионность внутри цикла, для этого анализировали по 5 образцов для каждой концентрации ротенона. Далее тестировали точность и прецизионность между циклами. Величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам, не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% для остальных точек (табл. 2, 3).

Стабильность. Для оценки стабильности ротенона в гомогенате коры головного мозга крыс при хранении в замороженном состоянии (при -80°C) в течении 60 дней, а также при 3-кратной заморозке-разморозке готовили образцы с концентрацией 62,5, 200,0, 500,0, 800,0 нг/г. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные – после хранения в замороженном состоянии или заморозки-разморозки. В обоих случаях исследовали по 3 независимых образца [11]. Рассчитанные концентра-

Таблица 1 / Table 1

Отклонения концентраций ротенона в калибровочных образцах от их номинальных значений
Deviations of rotenone concentrations in calibration samples from their nominal values

Концентрация номинальная, нг/г	График 1		График 2		График 3	
	концентрация рассчитанная, нг/г	точность	концентрация рассчитанная, нг/г	точность	концентрация рассчитанная, нг/г	точность
62,5	69,0	10,4	65,3	4,5	66,8	6,9
125,0	140,2	12,1	138,3	10,6	143,1	14,5
250,0	243,1	2,8	246,1	1,6	248,2	0,7
500,0	473,9	5,21	478,8	4,2	466,0	6,8
1000,0	1011,4	1,14	1009,0	0,9	1013,1	1,3

Таблица 2 / Table 2

Точность и прецизионность методики количественного определения ротенона в гомогенате коры головного мозга крыс внутри цикла
Accuracy and precision of the method for the quantitative determination of rotenone in the homogenate of the cerebral cortex of rats within the cycle

Концентрация номинальная, нг/г	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Среднее, нг/г	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
62,5	66,8	6,9	66,6	6,6	2,2	3,3
	64,6	3,4				
	70,3	12,5				
	65,2	4,3				
	66,4	6,2				
200,0	209,3	4,65	207,8	3,9	16,1	7,7
	210,8	5,4				
	221,4	10,7				
	180,3	9,9				
	217,0	8,5				
500,0	465,9	6,8	471,4	5,7	10,3	2,2
	473,1	5,4				
	488,4	2,3				
	461,3	7,7				
	469,5	6,1				
800,0	785,4	1,8	773,5	3,3	25,3	3,3
	766,4	4,2				
	805,3	0,7				
	774,1	3,2				
	726,5	7,9				

Таблица 3 / Table 3

Точность и прецизионность методики количественного определения ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс между циклами
Accuracy and precision of the method for quantitative determination of rotenone in the homogenate of the cerebral cortex of rats between cycles

Концентрация номинальная, нг/г	Концентрация рассчитанная, нг/г	Точность, %	Среднее, нг/г	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
62,5	66,6	6,6	68,0	8,9	2,0	2,9
	67,2	7,5				
	70,3	12,5				
200,0	207,8	3,8	193,2	3,4	13,1	6,7
	181,9	9,1				
	190,1	5,0				
500,0	471,6	5,6	483,7	3,3	14,1	2,9
	499,2	0,2				
	480,3	3,9				
800,0	773,2	3,3	774,0	3,3	11,0	1,4
	785,2	1,9				
	763,2	4,6				

ции ротенона до и после манипуляций статистически значимо не различались ($p > 0,05$, t -критерий Стьюдента).

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы гомогената мозга с концентрацией ротенона 1000,0 нг/г и образца чистой холостой пробы гомогената мозга на хроматограмме чистой транспортной среды отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам ротенона.

Заключение

Разработана и валидирована методика количественного определения ротенона в гомогенате лобной доли коры больших полушарий голов-

ного мозга крыс. Данная методика валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы и стабильность образцов. Подтвержденный аналитический диапазон составил 62,5–1000,0 нг/г. Разработанная методика позволяет оценить содержание ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс с целью изучения его проникновения через гематоэнцефалический барьер при экспериментальном паркинсоническом синдроме и апробации новой стратегии терапии токсического паркинсонизма, направленной на снижение концентрации нейротоксина в ткани мозга.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1–9 см. в References)

- Черных И.В., Шулькин А.В., Мылников П.Ю., Гацаного М.В., Есенина А.С., Градинарь М.М., Якушева Е.Н. Функциональная активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере на фоне экспериментального паркинсонического синдрома. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2019; 27(2): 150–9. <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2019272150-159>
- Мылников П.Ю., Черных И.В., Шулькин А.В., Попова Н.М., Якушева Е.Н. ВЭЖХ-методика количественного анализа фексофенадина в печени кроликов. *Фармация и фармакология*. 2020; 8(1): 40–7. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-1-40-47>
- Sherer T.B., Betarbet R., Testa C.M., Seo B.B., Richardson J.R., Kim J.H., et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*. 2003; 23(34): 10756–64. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-34-10756.2003>
- Watabe M., Nakaki T. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone inhibits and redistributes vesicular monoamine transporter 2 via nitration in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Molecular Pharmacology*. 2008; 74: 933–40. <https://doi.org/10.1124/mol.108.048546>
- Alam M., Schmidt W.J. L-DOPA reverses the hypokinetic behavior and rigidity in rotenone-treated rats. *Behavioural Brain Research*. 2004; 153: 439–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.12.021>
- Betarbet R., Sherer T.B., Greenamyre J.T. Animal models of Parkinson Disease. *Bioessays*. 2002; 24(4): 308–18. <https://doi.org/10.1002/bies.10067>
- De Miranda B.R., Fazzari M., Rocha E.M., Castro S., Greenamyre J.T. Sex differences in rotenone sensitivity reflect the male-to-female ratio in human Parkinson's disease incidence. *Toxicol Sci*. 2019; 170(1): 133–43. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz082>
- Caboni P., Sarais G., Vargiu S., Luca M.A., Garau V.L., Ibba A., Cabras P. LC-MS-MS Determination of Rotenone, Deguelin, and Rotenolone in Human Serum. *Chromatographia*. 2008; 68: 739–45. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0830-0>
- Di Donna L., Grassi G., Mazzotti F., Perri E., Sindona G. High-throughput assay of rotenone in olive oil using atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004; 39(12): 1437–40. <https://doi.org/10.1002/jms.694>
- Taylor M.J., Keenan G.A., Reid K.B., Fernandez D.U. The utility of ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry for multi-residue determination of pesticides in strawberry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2008; 22(17): 2731–46. <https://doi.org/10.1002/rcm.3671>
- Huang J., Liu H., Gu W., Yan Z., Xu Z., Yang Y., et al. A delivery strategy for rotenone microspheres in an animal model of Parkinson's disease. *Biomaterials*. 2006; 27: 937–46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.005>
- Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Mylnikov P.Y. Functional activity of p-glycoprotein in blood-brain barrier during experimental parkinson's syndrome. *Rossiiskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2019; 27(2): 150–9. <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2019272150-159> (in Russian)
- Mylnikov P.Yu., Chernykh I.V., Shchulkin A.V., Popova N.M., Yakusheva E.N. HPLC-methods of fexofenadine quantitative analysis in rabbits' liver. *Farmaciya i farmakologiya*. 2020; 8(1): 40–47. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-1-40-47> (in Russian)

REFERENCES

ОБ АВТОРАХ:

Градинарь Мария Михайловна (Gradinar Maria Mikhailovna) – ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБУ ВО «Рязанский ГМУ им. академика И.П. Павлова» МЗ РФ, 390026, Рязань, Россия. E-mail: masha.gradinar1995@mail.ru

Шулькин Алексей Владимирович (Shchulkin Alexey Vladimirovich) – доктор мед. наук, доцент, профессор кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО «Рязанский ГМУ им. академика И.П. Павлова» МЗ РФ, 390026, Рязань, Россия. E-mail: alekseishchulkin@rambler.ru

Черных Иван Владимирович (Chernykh Ivan Vladimirovich) – доктор биол. наук, доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Рязанский ГМУ им. академика И.П. Павлова» МЗ РФ, 390026, Рязань, Россия. E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Якушева Елена Николаевна (Yakusheva Elena Nikolaevna) – доктор мед. наук, профессор, заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО «Рязанский ГМУ им. академика И.П. Павлова» МЗ РФ, 390026, Рязань, Россия. E-mail: e.yakusheva@rzgtmu.ru

