



## Определение катехоламинов и их метаболитов в различных режимах капиллярного электрофореза с использованием макроциклических и ион-парных реагентов

Карцова Л.А., Сидорова А.А.

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург*

Ганжа О.В.

*Санкт-Петербургский государственный политехнический университет ЦКП «Аналитическая спектроскопия», Санкт-Петербург*

---

### Аннотация

Рассмотрены возможности определения катехоламинов и их метаболитов (адреналин, норадреналин, дофамин, метанефрин, норметанефрин) в режимах капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) и мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) с нормальной и обращенной полярностью. Обсуждается влияние макроциклических (18-краун-6, 4,13-диаза-18-краун-6) и ион-парных реагентов (додецилсульфат натрия, октилсульфонат натрия), органических модификаторов (ацетонитрил, триэтаноламин, циклогексилламин) в составе буферного электролита на эффективность и селективность разделения аналитов

---

### Введение

Катехоламины и их метаболиты играют важную роль в регуляции деятельности сердечно-сосудистой, нервной и эндокринной систем [1, 2]. Измерение их содержания в биологических образцах является актуальной задачей в клинической диагностике различных заболеваний (болезнь Паркинсона, Альцгеймера, феохромоцитомы, нейроblastомы и др.) [2].

Основными методами определения катехоламинов и их метаболитов без перевода в производные являются обращенно-фазовая ВЭЖХ с амперометрическим детектированием и различные варианты капиллярного электрофореза, характеризующиеся высокой эффективностью [3 – 6].

Важным требованием при анализе биологических жидкостей (моча, плазма крови) помимо чувствительности является высокая селективность разделения близких по структуре компонентов пробы [4, 6].

В данной работе рассматриваются возможности определения катехоламинов и их метаболитов в различных режимах капиллярного электрофореза с использованием макроциклических и ион-парных реагентов. Исследованы возможности зонного капиллярного электрофореза и мицеллярной электрокинетической хроматографии с

---

нормальной (положительной) и обращенной (отрицательной) полярностью; последний – обычно реализуется в кислых мицеллярных системах с рН рабочего буфера ниже 2,5 при использовании немодифицированного кварцевого капилляра. При этом электроосмотический поток (ЭОП) полностью подавлен, и движение аналитов осуществляется за счет движения мицелл к аноду.

Улучшение параметров разрешения близких по химической структуре соединений можно добиться введением в рабочий буфер комплексообразующих добавок. Известно, что макроциклы (краун-эфиры, циклодекстрины, макроциклические антибиотики) при взаимодействии с субстратами различной природы (анионной, катионной и нейтральной), могут образовывать комплексы с аналитами по типу «гость-хозяин» [7 – 10], устойчивость которых определяется как природой аналита, так и макроцикла (размер полости, число и тип гетероатомов), это, в свою очередь, приводит к изменению хроматографических и электрофоретических характеристик определяемых соединений.

Наличие в молекулах катехоламинов аминогрупп, которые при  $\text{pH} < 7$  протонированы, обеспечивает дополнительный резерв в селективности разделения при добавлении в рабочий электролит 18-членных краун-эфиров (18-краун-6, бензо-18-краун-6 и 4,13-диаза-18-краун-6), размер полости которых (2,6 – 3,2 Å) практически совпадает с размером иона аммония (2,86 Å) и, соответственно, протонированной первичной аминогруппы [10]. Рассмотрено влияние 18-краун-6 на эффективность и селективность определения катехоламинов.

Еще один способ увеличения селективности разделения аналитов – использование поверхностно-активных веществ в составе буферного электролита или матрицы пробы, в качестве ион-парных и мицеллообразующих агентов [11 – 13].

## Эксперимент

**Аппаратура.** Использовали систему капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105» (ООО «Люмэкс», г. Санкт-Петербург), немодифицированный кварцевый капилляр со следующими параметрами: общая длина – 60 см, эффективная длина – 50 см, внутренний диаметр – 50 мкм. Обработка сигнала детектора осуществлялась с использованием программного обеспечения «МультиХром».

Для приготовления буферных электролитов использовались: ледяная уксусная кислота (х.ч., ЗАО «НПФ ЭКРОС»), триэтанолламин (ТЭА) (х.ч., Реахим), ацетат натрия (х.ч., Реахим), муравьиная кислота 85 % (имп, ОАО «Реактив»), лимонная кислота моногидрат (GR for analysis, Merk), соляная кислота, конц. (х.ч.), гидроксид натрия (х.ч.), додецилсульфат натрия (ДДСН) (Sigma), циклогексиламин (Fluka), ацетат аммония; 18-краун-6 (18-К-6) (Sigma), 4,13-диаза-18-краун-6 (ТОО «НПК Реактив-Сервис»), натриевая соль октансульфоновой кислоты (Sigma), дистиллированная вода; катехоламины и их метаболиты (адреналин (А), дофамин (ДА), норадреналин (НА), метанефрин (МН), норметанефрин (НМН)) (Sigma).

Стандартные растворы аминов (1 г/л) готовили растворением точных навесок каждого компонента (1 мг) в 1 мл 0,1 моль/л соляной кислоты в пробирках Эппендорфа и хранили при  $-12^{\circ}\text{C}$ .

## Результаты и их обсуждение

*Использование 18-краун-6 в составе рабочего электролита.*

В буферных системах с  $\text{pH} < 7$  первичная и вторичная аминогруппы катехоламинов и их метаболитов (Рис. 1) протонированы, и в этих условиях определяемые аналиты стабильны (при  $\text{pH} > 7$  возможны процессы окисления катехоламинов), поэтому использовался рабочий электролит на основе 1%-ного раствора уксусной кислоты и триэтанолламина (ТЭА) с  $\text{pH} 3.0$ . Триэтанолламин в концентрации от 5 до 40 ммоль/л

добавляли для снижения адсорбции положительно заряженных компонентов пробы на отрицательных стенках кварцевого капилляра, тем самым, улучшая эффективность разделения [14].

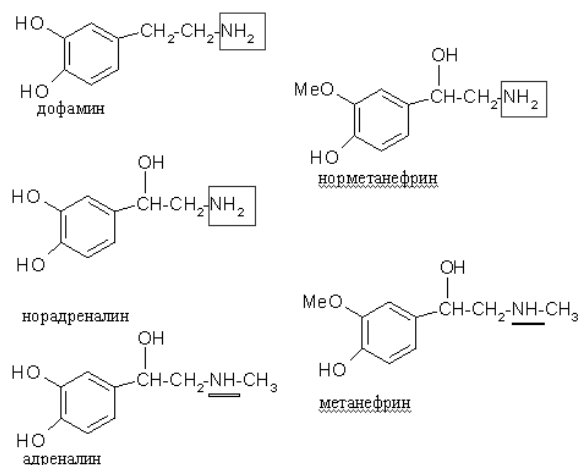


Рис. 1. Структурные формулы катехоламинов и их метаболитов

Введение в состав буферного электролита добавки 18-краун-6 (2 – 20 ммоль/л) привело к изменению электрофоретических характеристик за счет образования комплексов включения с протонированными аминогруппами аналитов и позволило достичь полного разделения исследуемой смеси с высокой эффективностью (~ 800 тыс т.т./м) (Рис. 2).

Оптимальная концентрация комплексообразователя в рабочем электролите составила 10 ммоль/л.

Расчитанные константы устойчивости образующихся комплексов (стехиометрия комплексообразования 1:1) составили  $10 \pm 2$  л/моль и  $13 \pm 3$  л/моль для дофамина и норадреналина, соответственно. Для вторичных аминов соответствующие значения крайне малы, и количественная оценка их методом КЭ невозможна [15 – 17].

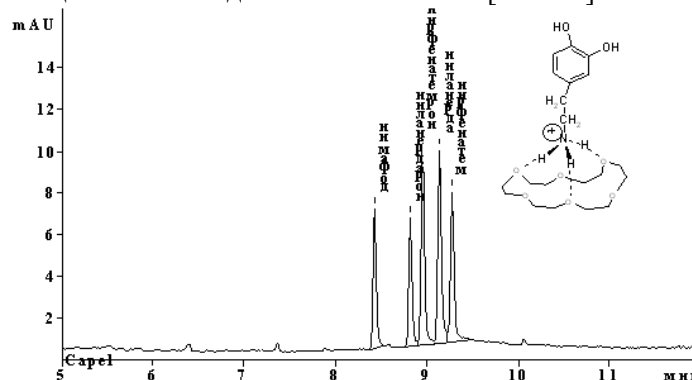


Рис. 2. Электрофореграмма модельной смеси (дофамин, норадреналин, адреналин, метанефрин, норметанефрин по 5 мг/л)

Прибор: «КАПЕЛЬ-105»,  $\lambda = 210$  нм,  $L_{\text{общ}} = 60$  см,  $L_{\text{эфф}} = 50$  см,  $d = 50$  мкм; ввод пробы: 30 мбар, 20 с;

Рабочий электролит: 0.17 моль/л  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 30 ммоль/л триэаноламин, 10 ммоль/л 18-краун-6, pH 3.0.

*Влияние додецилсульфата натрия (ДДСН) в качестве ион-парного реагента на эффективность и селективность разделения катехоламинов и их метаболитов оказалось иным, чем в случае краун-эфира.*

Катехоламины образуют ионные пары с отрицательно заряженными мономерами ДДСН. С увеличением концентрации додецилсульфата натрия от 0 до 8 ммоль/л наблюдается значительное увеличение селективности разделения катехоламинов и их метаболитов (Табл. 1), сопровождаемое заметным снижением эффективности.

**Таблица 1. Зависимость коэффициента разрешения ( $R_s$ ) от концентрации ДДСН в рабочем электролите (раствор уксусной кислоты, pH 3.0)**

Концентрация ДДСН, ммоль/л	$R_s$			
	ДА/НА	НА/НМН	НМН/А	А/МН
0	$2,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$
2	$-0,8 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$
4	$-2,5 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$
6	$-3,8 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,2$	$-0,5 \pm 0,3$
8	$-7,2 \pm 0,1$	$11,9 \pm 0,1$	$14,6 \pm 0,2$	$-5,2 \pm 0,3$

Эффективность удалось заметно увеличить введением в рабочий электролит органического модификатора – ацетонитрила (5 % по объему) при сохранении высокой селективности разделения (Рис. 3), что можно объяснить взаимодействием ацетонитрила с мономерами ДДСН и изменением их сольватационной оболочки.

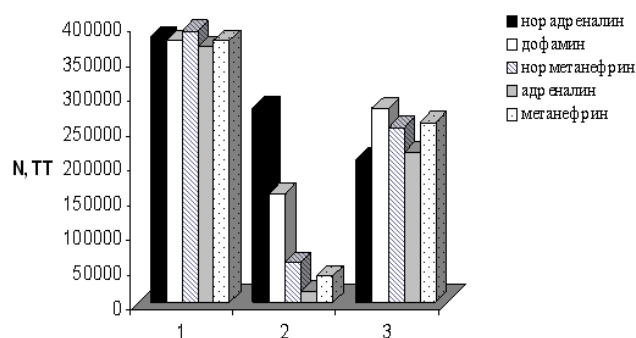


Рис. 3. Влияние додецилсульфата натрия и ацетонитрила, введенных в состав рабочего буфера, на эффективность при разделении катехоламинов и их метаболитов в режиме КЗЭ

1 – 1% уксусная кислота, 30 ммоль/л ТЭА; 2 – 1% уксусная кислота, 30 ммоль/л ТЭА, 4 ммоль/л ДДСН; 3 – 1% уксусная кислота, 30 ммоль/л ТЭА, 4 ммоль/л ДДСН, 5% ацетонитрил

Обсуждаемые результаты относятся к режиму зонного капиллярного электрофореза. Однако, сложная матрица реального биологического объекта (моча, плазма крови, спинномозговая жидкость) требует заведомо большей селективности разделения аналитов из-за значительного количества сопутствующих компонентов.

В связи с этим нами был изучен режим мицеллярной электрокинетической хроматографии для определения катехоламинов и их метаболитов с нормальной (МЭКХ) и обращенной полярностью (ОП МЭКХ).

В условиях мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ; нормальная полярность; ввод образца с анодного конца капилляра) на эффективность и селективность разделения влияет как взаимодействие аналитов с мицеллами, так и образование ионных пар с мономерами додецилсульфата натрия (ДДСН). Для создания условий мицеллярной электрокинетической хроматографии в буферный электролит (pH 7.0) вводили ДДСН в концентрации 10 ммоль/л (критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) додецилсульфата натрия составляет 8,5 ммоль/л).

В этих условиях полного разделения добиться не удалось. Было высказано предположение, что введение макроциклических агентов в состав рабочего электролита в режиме МЭКХ, подобно зонному варианту, могло бы привести к улучшению электрофоретических характеристик.

Зависимость влияния концентрации 4,13-диаза-18-краун-6 на эффективность и коэффициенты разрешения представлена в табл. 2. При концентрации макроцикла 4 ммоль/л

эффективность для норадреналина и дофамина достигает сотни тысяч теоретических тарелок.

Таблица 2. Зависимость коэффициента разрешения и эффективности от концентрации 4,13-диаза-18-краун-6 в буферном электролите (25 ммоль/л фосфатный буфер, рН 7.0, 10 ммоль/л ДДСН)

Концентрация 4,13-диаза-18-краун-6, ммоль/л	Rs НА/А	Rs А/ДА	Эффективность N, $\times 10^3$ т.т./м		
			НА	А	ДА
0	1,7 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	76	9	16
2	2,7 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 0,2	154	41	77
4	1,2 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,2	171	172	88
6	0,6 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	15	101	12

Для реализации мицеллярной электрокинетической хроматографии с обращенной полярностью (ОП МЭКХ) также использовали анионный детергент ДДСН в концентрации 25 – 120 ммоль/л и буферные системы со значением рН 2,0 – 2,5. При таких условиях диссоциация силанольных групп кварцевого капилляра подавлена и ЭОП отсутствует. Для полного подавления электроосмотического потока был выбран ацетатно-цитратный буферный раствор 10 ммоль/л рН 2,0.

Движущим и разделяющим фактором при подаче постоянного напряжения на капилляр являются отрицательно заряженные мицеллы поверхностно-активного вещества. В кислых буферных системах аминогруппы катехоламинов и их метаболитов могут образовывать ионные пары с молекулами анионных детергентов, которые в такой форме приобретают большое сродство к мицеллам.

Обнаружено, что при увеличении концентрации ДДСН времена миграции адреналина и норадреналина заметно снижаются, а дофамина, метанефрина и норметанефрина практически не меняются. Это приводит к заметному снижению селективности разделения пары адреналин/норадреналин в интервале концентрации ДДСН от 40 до 80 ммоль/л. При этом эффективность с повышением концентрации ДДСН возрастает (табл.3).

Таблица 3. Влияние концентрации ДДСН в рабочем электролите на эффективность разделения биогенных аминов (P=0.95, n=3)

Концентрация ДДСН, ммоль/л	N $10^3$ , т.т./м				
	ДА	МН	НМ	А	НА
40	173	216	174	166	160
120	217	264	259	264	295

Для повышения селективности разделения в раствор рабочего электролита одновременно с мицеллами вводились ион-парная добавка (октилсульфонат натрия, 0 – 20 ммоль/л) или комплексообразующие агенты – 18-краун-6 (0 – 6 ммоль/л) и его азотсодержащий аналог – 4,13-диаза-18-краун-6 (0 – 6 ммоль/л).

Октилсульфонат натрия – анионный ион-парный агент – образует с протонированной аминогруппой ионную пару, имеющую заметное сродство к гидрофобной мицелле. Введение в мицеллярную систему анионного ПАВ повысило эффективность и коэффициенты разделения (Rs) всех пар анализов (Рис. 4а), но полного разделения пары ДА/МН достичь не удалось.

18-Краун-6, образуя достаточно гидрофобный ассоциат с первичной протонированной аминогруппой анализа, способный к включению в гидрофобную мицеллу меняет характер разделения катехоламинов, что и наблюдалось нами в эксперименте.

Введение 18-К-6 позволило решить проблему разделения пары ДА/МН, однако снизилась селективность разделения других пар соединений (Рис. 4б).

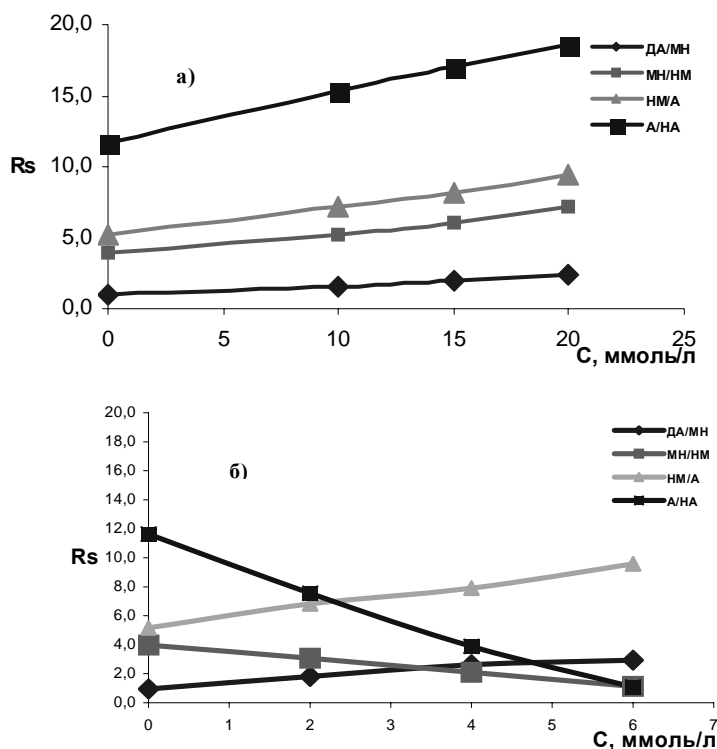


Рис. 4. Влияние различных добавок в составе рабочего электролита (10 ммоль/л ацетатно-цитратный буфер и 100 ммоль/л ДДСН) на коэффициенты разрешения компонентов смеси а) октилсульфонат натрия, б) 18-краун-6

Рассчитанные константы устойчивости комплексов катехоламинов с 18-краун-6 в режиме ОП МЭКХ составили  $11,8 \pm 0,6$ ;  $30,1 \pm 1,5$ ;  $58,6 \pm 2,9$ ;  $116,8 \pm 5,8$  для дофамина, норметанефрина, адреналина и норадреналина, соответственно.

В окончательном варианте в составе рабочего буфера был использован 18-краун-6 (2 ммоль/л) и циклогексиламин в качестве конкурирующего агента (от 2 до 10 ммоль/л), что привело к полному разделению смеси катехоламинов и их метаболитов (рис. 5).

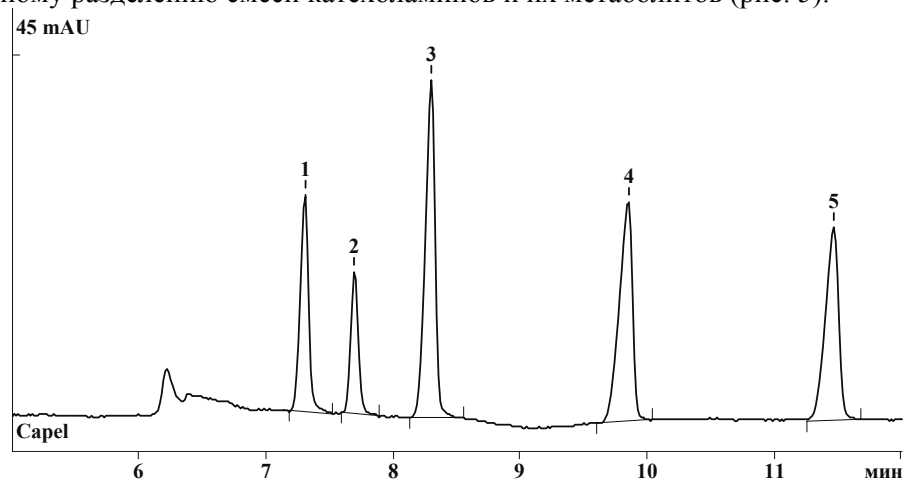


Рис. 5. Электрофореграмма модельной смеси катехоламинов в оптимизированных условиях (1- дофамин, 2 – метанефрин, 3 – норметанефрин, 4 – адреналин, 5 – норадреналин)

Прибор: «КАПЕЛЬ-105»,  $\lambda = 210$  нм,  $L_{\text{общ}} = 60$  см,  $L_{\text{эфф}} = 50$  см,  $d = 50$  мкм; ввод пробы: 30 мбар, 20 с;

Рабочий электролит: 10 ммоль/л ацетата аммония, 150 ммоль/л муравьиной кислоты, 80 ммоль/л ДДСН, 2 ммоль/л 18-К-6 и циклогексиламин (рН 2.0).

## Заключение

В режиме КЗЭ изучено влияние 18-краун-6 и додецилсульфата натрия в качестве ион-парного реагента, показано, что в обоих случаях увеличиваются эффективность и селективность разделения. При этом добавка краун-эфира приводит к большему росту эффективности, а ДДСН с органическим модификатором (ацетонитрилом) – к росту селективности разделения.

При сравнении вариантов МЭКХ с нормальной и обращенной полярностью последний – предпочтителен. В режиме ОП МЭКХ с добавкой 18-краун-6 и циклогексиламина были получены лучшие результаты по параметрам разделения.

Пределы обнаружения катехоламинов в зонном варианте составили 50 мкг/л, а в мицеллярном 20 мкг/л.

## Список литературы

1. Эндокринология / под ред. Н. Лавина. 1999. 1128 с.
2. Kagedal B. Catecholamines and their metabolites // J. Chrom. B. 1988. V. 429. P.177-233.
3. Volin P. Determination of free urinary catecholamines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // J. Chrom. B. 1994. V. 655. P. 121-126.
4. Карцова Л.А., Сидорова А.А., Казаков В.А., Бессонова Е.А., Яшин А.Я. Определение катехоламинов методами капиллярного электрофореза и обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журнал аналит. химии, 2004, т.59, №8, с.826 – 831.
5. Siren H., Mielonen M., Herlevi M. Capillary electrophoresis in the determination of anionic catecholamine metabolites from patients' urine // J. Chrom. A. 2004. V. 1032. P. 289-297
6. Siren H., Karjalainen U.. Study of catecholamines in patient urine samples by capillary electrophoresis // J. Chrom. A. 1999. V. 853. P. 527-533.
7. Хираока М. Краун-соединения. / М.: Мир. 1986. С. 356
8. Карцова Л. А., Краснова И. Н., Пименов А. И. Анализ нейротрансмиттерных аминокислот и биогенных аминов методом ВЭЖХ в присутствии краун эфиров в подвижной фазе // Журн. Аналит. Химии. 1996. Т. 51. № 10. С. 1068-1073
9. Карцова Л. А., Маркова О. В. Молекулярное распознавание в хроматографии / СПб.: СПбГУ. 2004. С. 140
10. Chiou C.-S., Shih J.-S. Application of crown ethers as modifiers for the separation of amines by capillary electrophoresis // Anal. Chim. Acta. 1998. V. 360. P.69-76
11. Liu Z., Zou H., Ye M., Ni J., Zhang Y. Effects of organic modifiers on retention mechanism and selectivity in micellar electrokinetic capillary chromatography studied by linear solvation energy relationships // J. Chrom. A. 1999. V. 863. P. 69–79
12. Su S.C., Chou S.S., Chang P.C., Hwang D.F. Determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning by micellar electrokinetic capillary chromatography // J.Chrom. B. 2000. V. 749. P. 163-169
13. Muijselaar P.G., Otsuka K., Terabe S. Micelles as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography // J. Chrom. A. 1997. V. 780. P. 41-61
14. Карцова Л.А., Сидорова А.А., Иванова А.С. Электрофоретическое определение биогенных аминов в биологических жидкостях // Журнал аналит. химии, 2007. т. 62, № 10. С. 1066-1072
15. Карцова Л.А., Попова А.М., Сидорова А.А., Маркова О.И. Оценка констант устойчивости органических веществ кислотного и основного характера с 18-краун-6 и β-

циклодекстрином методом капиллярного зонного электрофореза.// Журнал аналит. химии, 2007. т. 62. № 2. С. 198-203

16. Izatt R.M., Pawlak K., Bradshaw J.S., Bruening R.L. Thermodynamic and kinetic data for macrocycle interaction with cations and anions // Chem. Rev. 1991. V. 91. P. 1721-2085

17. Куликов О.В., Терехова И.В. Термодинамика комплексообразования аминокислот и пептидов, содержащих неполярные боковые группы, с 18-краун-6 в воде // Коорд. Хим. 1998. Том 24. С. 395-399.

*Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ 07-03-01001-а.*