

---

УДК 543.54+64

## Различные способы электрофоретического определения биологически активных соединений в форме их комплексов с ионами $\text{Cu}^{2+}$

Карцова Л.А.

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург*

Маркова О.И.

*ООО ЦКП «Аналитическая спектроскопия» Санкт-Петербург*

Поступила в редакцию 3.11.2010 г.

---

### Аннотация

Изучены возможности определения биологически активных органических соединений в форме их комплексов с ионами металлов методами капиллярного электрофореза (КЭ): электроинжекционный (ЭИА) и электрофоретически опосредованный микроанализ (ЭОМА); капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) с введением в кварцевый капилляр предварительно подготовленного комплекса и с добавлением в состав рабочего буфера одного из участников комплексообразования – катиона металла или биологически активного органического соединения (биогенных аминов и нейротрансмиттерных аминокислот, ароматических гидроксикислот, катехинов и др.).

**Ключевые слова:** капиллярный электрофорез, биологически активные органические соединения, комплексы металлов с органическими лигандами

Possibility of determination of bioactive organic substances in the form of their complexes with metal ions by the methods of capillary electrophoresis (CE): electroinjection (EIA) and electrophoretic microanalysis (EMA); capillary zone electrophoresis (CZE) with injection of preliminary prepared complex and with addition of one participant of complexation to the back ground electrolyte (BGE) – metal cation or bioactive organic substances (biogenic amines, neurotransmitter amino acids, aromatic hydroxyacids, catechins and others) were investigated.

**Keywords:** capillary electrophoresis, bioactive organic substances, complexes of organic ligands with metal ions

---

### Введение

Определение биогенных металлов и биологически активных веществ в природных объектах – одна из актуальных задач аналитической химии. В организме они преимущественно находятся в виде координационных соединений, выполняющих транспортные и аккумуляторные функции. Эффективность многих противомикробных и противовирусных препаратов усиливается в присутствии ионов металлов [1]. В субклеточных фракциях тканей мозга и нервов, характеризующихся высоким содержанием катехоламинов, обнаружены и значительные концентрации ионов металлов [2, 3]. Влияние ионов металлов на функционирование катехоламинов (КА) при условии их совместного присутствия со значительными количествами АТФ и белков позволило предположить важную роль эндогенного комплексообразования в проявлении активности КА и объяснить

---

некоторые аспекты молекулярного механизма выделения и транспорта нейротрансмиттеров [4, 5]. Возможность электрофоретического контроля за подобными процессами может оказаться весьма полезной в практике клинической медицины как для определения катионов металлов, так и соответствующих биологически активных веществ эндо- и экзогенного происхождения [6 – 8].

В данной работе изучены возможности определения биологически активных органических соединений (биогенных аминов и нейротрансмиттерных аминокислот, катехинов, циклама и др.) в форме их комплексов с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  различными вариантами капиллярного электрофореза (КЭ): электроинжекционный (ЭИА) и электрофоретически опосредованный микроанализ (ЭОМА); капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) с введением в кварцевый капилляр предварительно подготовленного комплекса и с добавлением в состав рабочего буфера одного из участников комплексообразования.

## Эксперимент

**Аппаратура.** Использовали систему капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ 105Р» (ООО «Люмэкс», г. Санкт-Петербург) с дейтериевой лампой в качестве источника света (область длин волн от 190 до 400 нм): общая длина капилляра – 60 см, длина капилляра от анода до детектора – 50 см, внутренний диаметр капилляра – 75 и 50 мкм, максимально возможное напряжение – 25 кВ; ввод пробы электрокинетический и гидродинамический.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре СФ-46 и Pharma Spec UV-1700 (Япония, Shimadzu) с дуолучевой схемой и шириной спектральной щели 1 нм. При приготовлении растворов использовали рН-метр (рН-121) и электронные аналитические весы «Explorer» (E) модификации E00640 («Ohaus», США).

**Реагенты, рабочие растворы.** Стандартные растворы норадrenalина, 3,4-дигидроксифенилаланина («Sigma», США) (1 г/л) готовили растворением точных навесок каждого соединения (1 мг) в 1 мл 0,01 М раствора соляной кислоты в пробирках Эппендорфа и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Все остальные стандартные растворы (органических кислот, циклама) концентрацией 1 г/л готовили растворением точных навесок каждого (1 мг) в 1 мл дистиллированной воды и хранили при той же температуре.

Рабочие растворы нейротрансмиттеров, органических кислот, циклама готовили разбавлением их концентрированных растворов дистиллированной водой. Для приготовления стандартных растворов катионов металлов использовали соответствующие нитраты, марки х.ч. Для приготовления 10 мл боратного буферного раствора (0,033 М, рН 8,5) к 6,6 мл тетрабората натрия ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) с концентрацией 50 мМ добавляли 3,4 мл 0,1 М раствора соляной кислоты и тщательно перемешивали.

Изучены возможности электроинжекционного (ЭИА) и электрофоретически опосредованного микроанализа (ЭОМА) (рис. 1.).

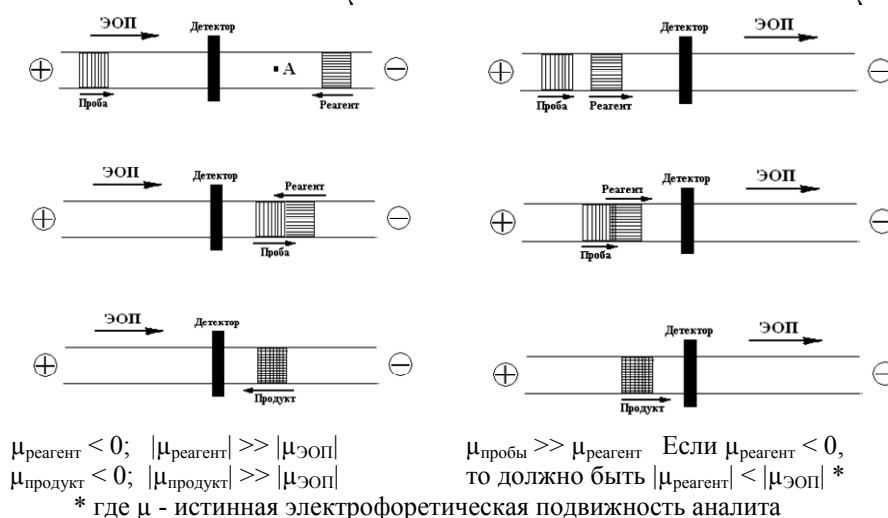


Рис. 1. Схемы (а) электроинжекционного анализа (ЭИА) и (б) электрофоретически опосредованного микроанализа (ЭОМА)

В 90-х гг. Андреевым предложен метод электроинжекционного анализа (ЭИА), позволяющий осуществить фотометрическую реакцию в кварцевом капилляре [9] (рис. 1а).

Суть метода в следующем: проба и реагент электрокинетически вводятся с противоположных концов кварцевого капилляра и движутся навстречу друг другу. Смешение этих зон осуществляется за счет различия в их электрофоретических подвижностях. Образующийся продукт химической реакции детектируется непосредственно в капилляре. При этом подвижность реагента и соответствующего комплекса должна быть по знаку противоположна электроосмотическому потоку, а по абсолютному значению его превосходить [10].

Если требуемые условия не выполняются, возможна реализация другого варианта – так называемый *электрофоретически опосредованный микроанализ* (ЭОМА) (*Electrophoretically Mediated Microanalysis* [11, 12]) (рис. 1б). Вслед за медленно движущимся реагентом в кварцевый капилляр со стороны анода вводится аналит, имеющий большую подвижность (в данном случае катионы  $\text{Cu}^{2+}$ ), который проходит сквозь зону реагента и образует комплекс с другой электрофоретической подвижностью.

## Результаты и их обсуждение

Для работы был выбран 35 мМ боратный буфер с рН 8,6. В этих условиях лиганды (биогенные амины и нейротрансмиттерные аминокислоты; ароматические гидроксикислоты и полифенолы) и образующиеся комплексы находятся в форме анионов и элюируются после электроосмотического потока (ЭОП). При использовании рабочих буферов с рН < 7 практически не наблюдается взаимодействия между ионами металлов и обсуждаемыми органическими соединениями: диссоциация карбоксильных групп и фенольных гидроксильных групп подавлена, а аминогруппы – протонированы.

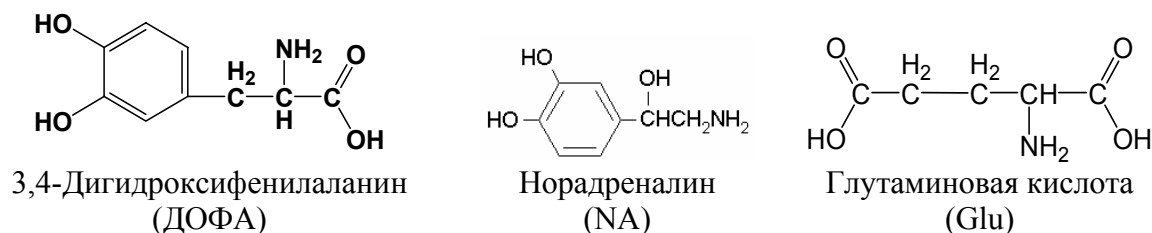
Измеренные значения электрофоретических подвижностей органических лигандов и соответствующих комплексов с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  оказались по абсолютной

величине меньше, чем скорость ЭОП, что не позволило реализовать схему электроинжекционного анализа. В табл. 1 представлены данные для норадреналина (NA), 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и глутаминовой кислоты (Glu).

При этом возможность проведения электрофоретически опосредованного микроанализа (ЭОМА), когда реагент и анализируемая проба вводятся с анодного конца капилляра «вдогонку» друг за другом, остается.

Нами был исследован такой тип комплексообразования в потоке.

В качестве «медленно движущегося» реактанта выступал органический лиганд (норадреналин (NA), 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), глутаминовая кислота (Glu)) (рис. 2), вводимый в кварцевый капилляр первым.



Быстрым («догоняющим») был образец раствора нитрата меди (II). Между зонами реактантов вводили буферный электролит, время ввода которого варьировалось (0, 10, 30, 60 с), что, в случае сложных многокомпонентных систем, могло бы привести к росту селективности разделения с одновременным увеличением общего времени анализа.

При большом времени ввода буферного электролита (60 с) комплекс *органический лиганд – металл* практически не успевал образовываться. Снижение времени от 30 с до 10 с привело к увеличению степени конверсии в ~ 5 раз. Если же пробу, содержащую ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , вводить в кварцевый капилляр непосредственно после раствора органического лиганда, то получаемые результаты сопоставимы с электрофоретическим анализом системы «*органический лиганд +  $\text{Cu}^{2+}$* », подготовленной предварительно.

Независимо реализован режим КЗЭ с введением в кварцевый капилляр как предварительно подготовленного комплекса, так и добавление в состав буфера одного из участников комплексообразования: катиона металла или биологически активного органического соединения (рис. 2.)

При наличии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в составе буферного электролита чувствительность определения 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) возрастает ~ в 2 раза, и на электрофореграмме фиксируется только пик соответствующего комплекса (рис. 2б.)

На примерах непоглощающих или слабопоглощающих в ближней УФ-области аминокислот (глутаминовой, аланина, валина) и азотистого макроцикла – циклама, показано, что пределы их обнаружения снижаются в 10 – 20 раз при использовании ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в составе рабочего буфера (рис. 3.).

А дополнительное использование *on-line* концентрирования – стэкинга с усилением поля или с большим вводом пробы [13] позволяет еще снизить пределы обнаружения органических лигандов в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в несколько раз (для глутаминовой кислоты в 5 и 15 раз, соответственно) до значений, требуемых при анализе реальных объектов.

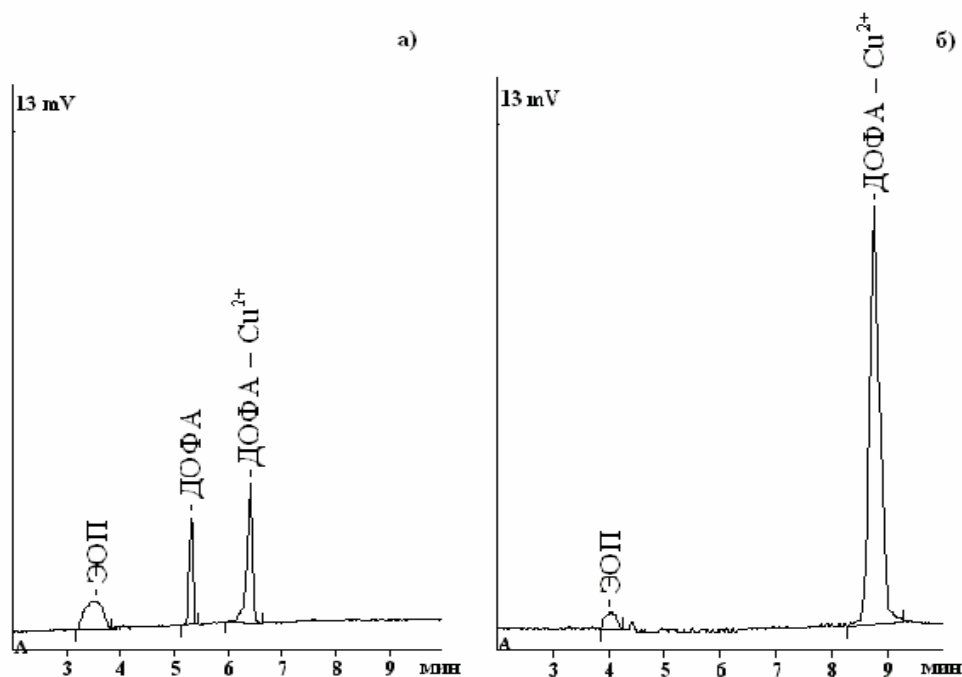


Рис. 2. Различные варианты комплексообразования ДОФА+Cu<sup>2+</sup>  
 (а) ввод готового комплекса; 30 мМ боратный буфер рН 8,5 ; (б) 0.1 мМ ионов Cu<sup>2+</sup> (мМ) в составе рабочего электролита: 30 мМ боратный буфер, рН 8,5; 10 % ацетонитрила

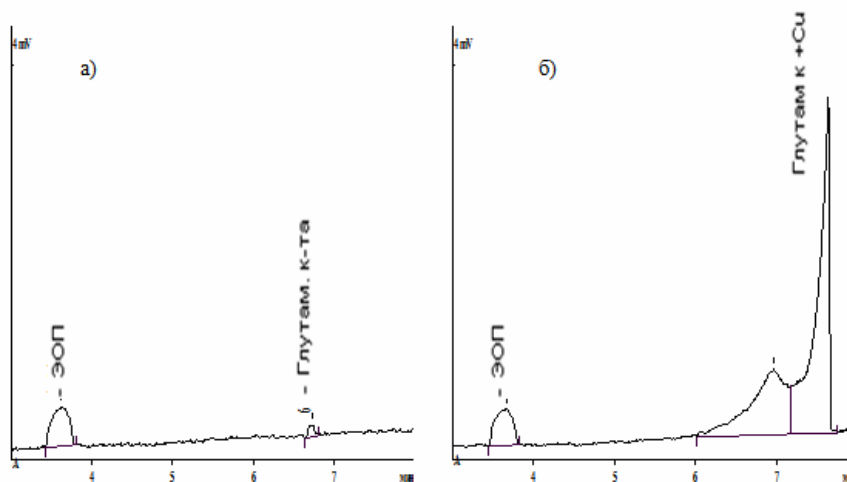


Рис. 3. Электрофореграмма глутаминовой кислоты (а) и ее комплекса с медью (б). Условия: рабочий электролит – 35мМ боратный буфер, рН 8,5. «Капель 103 РЕ»,  $\lambda = 254$  нм,  $L_{\text{общ}}/L_{\text{эфф}} = 60/30$  см,  $d = 75$  мкм, ввод пробы: 30 мбар, 20 с.

Для установления оптимальной длины волны детектирования и независимого подтверждения процесса комплексообразования перед выполнением электрофоретических анализов были получены спектры поглощения исходных органических соединений и смесей каждого из них с ионами меди (в мольном соотношении L/Cu<sup>2+</sup> 2:1) (рис. 4.). В отличие от самой глутаминовой кислоты, не поглощающей в УФ-свете, ее комплекс с ионами Cu<sup>2+</sup> имеет интенсивное поглощение в ближней УФ-области. А интенсивность аналитических сигналов 3,4-дигидроксифенилаланина и норадреналина, хорошо поглощающих в УФ-свете, при добавлении к их растворам ионов Cu<sup>2+</sup> заметно возрастает.

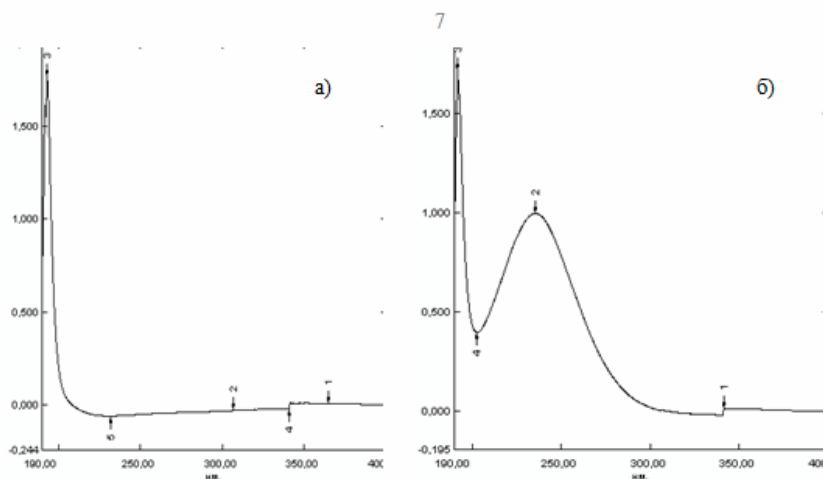


Рис. 4. Спектры поглощения глутаминовой кислоты ( $3 \times 10^{-4}$  М) (а) и комплекса глутаминовая кислота+ $\text{Cu}^{2+}$  ( $3 \times 10^{-4}$  М +  $1,5 \times 10^{-4}$  М) 10 мМ боратный буфер (рН 8,5). Спектрофотометр Shimadzy UV-1700, толщина поглощающего слоя  $l = 1$  см

Изучено влияние отношения концентраций *металл – лиганд* и времени ввода пробы на интенсивность аналитического сигнала при различных вариантах электрофоретического анализа (рис. 5).

Максимальной степени конверсии соответствует соотношение концентраций  $\text{Cu}^{2+}/L \sim 3$  (рис. 5а) и время ввода 60 с (рис. 5б).

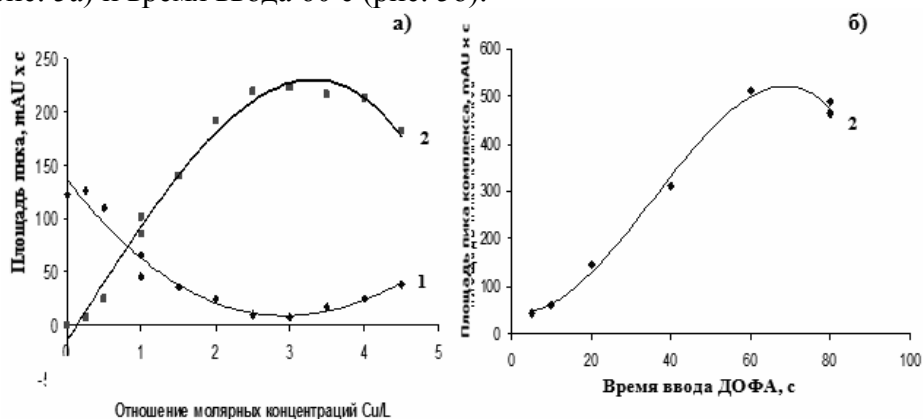


Рис. 5. Зависимость площадей пиков (а) от молярного отношения концентраций  $\text{Cu}^{2+}$ : ДОФА (б) от времени ввода пробы ДОФА ( $2 \times 10^{-4}$  М) (35 мМ боратный буфер с добавкой  $2 \times 10^{-4}$  М  $\text{Cu}^{2+}$ ); 1 - 3,4 дигидроксифенилаланин (ДОФА); 2 – комплекс 3,4 дигидроксифенилаланина с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  (ДОФА+ $\text{Cu}^{2+}$ ). «Капель 105 Р». Капилляр –  $L_{\text{эфф}}=50$  см,  $d_{\text{внутр}}=75$  мкм; УФ-детектор,  $\lambda_{\text{макс}}=220$  нм; ввод – гидродинамический 30 мбар x 20 с, + 20 кВ

Появление интенсивного сигнала комплекса непоглощающей глутаминовой кислоты с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  при КЭ-определении дало основание провести подобные эксперименты и с участием других, непоглощающих в ближней УФ-области (валин, аланин) и поглощающих кислот (тирозин, триптофан). Большинство из них ответственны за процессы комплексообразования белков, нейропептидов, лекарственных препаратов с биогенными металлами. Предел обнаружения с использованием стэкинга для непоглощающих в ближнем УФ-диапазоне кислот составил  $\sim 1 \cdot 10^{-7}$  М. Хорошо поглощающие в УФ- аминокислоты – тирозин и

триптофан – при добавлении к анализируемой пробе  $\text{Cu}^{2+}$  увеличивают интенсивность сигнала в 1,5-2 раза, а разрешение ( $R_s$ ) ~ в 5 раз.

Получение подобной информации могло бы представить как практическую ценность, так и теоретическую новизну в связи с установлением новых возможностей электрофоретического метода и решением задач клинической диагностики.

*Исследования проводились в рамках реализации ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009 - 2013 годы.*

### Список литературы

- 1.Крисс Е.Е., Волченкова И.И., Григорьева А.С. и др. Координационные соединения металлов в медицине / Киев: Наук. Думка, 1986. 216 с.
- 2.Эндокринология / под ред. Лавина Н. 1999. 1128 с.
- 3.Руководство по лабораторной клинической диагностике / под ред. Меньшикова В.В. М., Медицина. 1982. 576 с.
- 4.Sorenson J.R.I., Hangarter W. Treatment of rheumatoid and degenerative diseases with copper complexes: A review with emphasis on copper-salicylate// Inflammation. 1997. V. 2. № 3. P. 217-238.
- 5.Sorenson J.R.I. Copper chelates as possible active forms of the anti-arthritis agents // J. Med. Chem. 1976. V. 19. № 1. P. 135-148.
- 6.Liang X., Sadler P.J. Cyclam complexes and their applications in medicine // Chem. Soc. Rev. 2004. V. 33. P. 246-266.
- 7.Руководство по капиллярному электрофорезу / под ред. А.М. Волощука. М. 1996. 112 с.
- 8.Britz-McKibbin P., Terabe S. On-line preconcentration strategies for trace analysis of metabolites by capillary electrophoresis// J. Chrom. A. 2003. V. 1000. P. 917-934.
- 9.Андреев В.П. // Журн. Аналит. Химии. 1999. Т.54. № 7. С.769-776.
10. Andreev V.P., Ilyina N.B., Lebedeva E.V., Kamenev A.G., Popov N.S. Electroinjection analysis - Concept, mathematical model and applications// J. Chromatogr. A. 1997. V. 772. № 1. P. 115-127.
11. Harmon B.J., Patterson D.H., Regnier F.E. Electroforetically mediated microanalysis of ethanol// J. Chromatogr A. 1993. V 657 № 1. P 429 – 434.
12. Harmon B.J., Patterson D.H., Regnier F.E. Mathematical treatment of electrophoretically mediated microanalysis// Anal. Chem. 1993. V 65. № 19. P. 2655-2662.
13. Osbourn D.M., Weiss D.J., Lunte C.E. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis// Electrophoresis. 2000. V. 21. P. 2768-2779
14. Даванков В.А., Навратил Дж., Уолтон Х. Лигандообменная хроматография. / Пер. с англ. М.: Мир. 1990. 294 с.

**Карцова Людмила Алексеевна** – д.х.н., профессор кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, тел. (812) 428-40-44

**Маркова Ольга Игоревна** – к.х.н., инженер ЦКП «Аналитическая спектроскопия» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета, 66

**Kartsova Ludmila A.** – Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, e-mail: [kartsova@gmail.com](mailto:kartsova@gmail.com)

**Markova Olga I.** – Ph.D. Chem., engineer of CCA “Analytical spectrometry” St. Petersburg state polytechnic university, e-mail: [mari@mail.ru](mailto:mari@mail.ru)