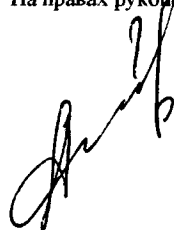


На правах рукописи

СИДОРОВА АЛЛА АНАТОЛЬЕВНА



**ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *OFF-LINE* И *ON-LINE* КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ**

Специальность 02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург

2006

Работа выполнена на кафедре органической химии химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета и в ЦКП «Аналитическая спектроскопия» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

Научный руководитель:	доктор химических наук, профессор Карцова Людмила Алексеевна
Официальные оппоненты:	доктор технических наук, профессор Воронцов Александр Михайлович доктор химических наук, профессор Дмитриенко Станислава Григорьевна
Ведущая организация:	Российская Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова

Защита состоится 16 марта 2006 г. в 15.00 ч.

на заседании диссертационного совета Д 212.232.37 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 1990034 Санкт-Петербург, Средний проспект В.О., д. 41/43.
Большая химическая аудитория

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан 11 февраля 2006 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

Папуева - /А.Г. Папуева/

2006 А
3528

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность проблемы. Нейротрансмиттеры (катехоламины и их метаболиты, нейротрансмиттерные гидрокси- и аминокислоты) играют важную роль в регуляции деятельности сердечно-сосудистой и эндокринной систем, процессах обучения и памяти. Измерение их содержания в биологических образцах является актуальной задачей и имеет важное практическое значение для клинической диагностики различных заболеваний (болезнь Паркинсона, Альцгеймера, феохромоцитомы, нейробластома и др.)

Поскольку концентрации биогенных аминов и аминокислот в биологических жидкостях находятся на уровне нанограммовых количеств, требуются высокочувствительные и селективные методы их определения.

Традиционно используют иммунологические методы и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) с УФ-, флуоресцентным и электрохимическим детектированием. Помимо явных достоинств, они имеют и некоторые ограничения. Иммунологические методы позволяют с высокой специфичностью определять только один компонент в ходе анализа, а для ВЭЖХ часто требуется проводить дериватизацию.

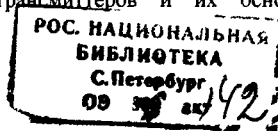
Основными методами анализа нейротрансмиттеров без перевода в производные являются обращенно-фазовая ВЭЖХ с амперометрическим детектированием и различные варианты капиллярного электрофореза, характеризующиеся высокой эффективностью и обеспечивающие разделение ионных и нейтральных аналитов.

Актуальность проблемы подтверждается поддержкой исследований в этом направлении со стороны центра фундаментального естествознания (гранты АСП-303375 и АСП-305104).

Цель работы. Разработка стратегии электрофоретического разделения и определения биогенных аминов (адреналин (А), норадреналин (НА), дофамин (ДА), серотонин (Сер)), их предшественников (3,4-дигидроксифенилаланин, триптофан) и метаболитов (метанефрин (МН), норметанефрин (NMN), ванилилминдальная кислота (VMA), гомованилиновая кислота (HVA), кинуренин (Куп), 3-гидроксикинуренин (ЗОНК)) в биологических объектах с использованием *off-line* и *on-line* концентрирования.

В связи с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи

1. Установить закономерности и выявить доминирующие факторы, определяющие электрофоретическое разделение нейротрансмиттеров и их основных и



кислотных метаболитов методами капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) и мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ)

2. Разработать метод пробоподготовки реальных биологических объектов для электрофоретического определения аналитов, выяснить возможности различных вариантов *off-line* и *on-line* концентрирования с целью снижения предела обнаружения аналитов.
3. Предложить схемы анализа реальных биологических объектов (моча, плазма и сыворотка крови, структуры мозга) при определении нейротрансмиттеров.

Научная новизна

Выявлены факторы (состав, pH и концентрация рабочего буфера, условия ввода пробы), определяющие закономерности электрофоретического разделения нейротрансмиттеров различной природы и позволяющие прогнозировать пути оптимизации анализа сложных смесей органических соединений в режимах КЗЭ и МЭКХ.

Обнаружен эффект влияния макроциклов (18-краун-6, 4,13-диаза-18-краун-6, β-циклодекстрина) и ион-парного реагента (додецилсульфата натрия) при электрофоретическом разделении нейротрансмиттеров и в ходе пробоподготовки при жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции.

Определены возможности *off-line* и *on-line* концентрирования (стэкинга) нейротрансмиттеров из биологических объектов для снижения предела обнаружения аналитов в режиме КЭ.

Практическая значимость работы

Разработан метод электрофоретического определения (КЗЭ и МЭКХ) нейротрансмиттеров в плазме крови, моче, структурах мозга, слезной жидкости с УФ-детектированием.

Предложены пути снижения пределов обнаружения при электрофоретическом определении катехоламинов, их предшественников и метаболитов в 10 – 1000 раз с использованием твердофазной экстракции (оксид алюминия и C18, модифицированный додецилсульфатом натрия) и *on-line* концентрирования.

Показана возможность выявления и контроля различных патологий, связанных с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями, посредством электрофоретического анализа биологических жидкостей (моча, плазма и сыворотка крови).

Разработан вариант капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) и мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) для количественного анализа смесей триптофана и его метаболитов (кинуренин, 3-гидроксикинуренин, кинуреновая кислота) в реальных объектах. Результаты данной работы используются Санкт-

Петербуржским Государственным Институтом физиологии им Павлова для изучения кинуренинового пути метаболизма триптофана.

Положения, выносимые на защиту

- 1 Результаты исследования влияния концентрации и pH буферного электролита, органических модификаторов (диэтиламин, триэтанолламин, ацетонитрил) и комплексообразователей (18-краун-6, 4,13-диаза-18-краун-6; β -циклодекстрин; додецилсульфат натрия) в составе рабочего буфера на электрофоретическое разделение нейротрансмиттеров в режиме капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) и мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ).
- 2 Влияние макроциклов как компонентов буферных систем (18-краун-6, 4,13-диаза-18-краун-6, β -циклодекстрина) на эффективность и селективность электрофоретического разделения катехоламинов и их метаболитов и количественная оценка комплексообразования в системе «макроцикл-субстрат».
3. Оптимизированный регламент пробоподготовки биологических жидкостей (сыворотки, плазмы крови и мочи) при определении нейротрансмиттеров методами КЗЭ и МЭКХ с использованием твердофазной и жидкостной экстракции.
- 4 Способы *on-line* концентрирования (электростэкинг; стэкинг с большим вводом пробы; стэкинг с усилением поля) для увеличения УФ-чувствительности электрофоретического определения катехоламинов и их метаболитов методами капиллярного электрофореза (МЭКХ, КЗЭ).
- 5 Обоснование возможности и преимуществ электрофоретического определения биогенных аминов, нейротрансмиттерных гидрокси- и аминокислот в биологических объектах.
6. Практические приложения выявленных закономерностей:
 - определение катехоламинов и их метаболитов методом КЗЭ в сыворотке крови и моче;
 - определение триптофана и его метаболитов методом КЗЭ и МЭКХ в структурах мозга.

Публикации и апробация работы. Материалы диссертации опубликованы в 3 статьях и 10 тезисах докладов. Результаты исследований докладывались на Всероссийском симпозиуме «Хроматография и хроматографические приборы» (2004, Клязьма); III Научной сессии УНЦХ СПбГУ (2004, Санкт-Петербург); V Международной конференции по реабилитологии (2004, Москва); The 8-th Multidisciplinary International Conference of Biological Psychiatry “Stress and Behavior” (2004, St-Petersburg, Russia); The XXIXth Symposium “Chromatographic methods of investigating the organic compounds” (2005, Katowice – Szczyrk, Poland);

International conference "Analytical chemistry and chemical analysis" (2005, Kiev, Ukraine); II Международном симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической и радиохимии» (2005, Краснодар, Россия).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, трех глав с обсуждением полученных результатов, экспериментальной части, практического применения, приложения, списка принятых сокращений, выводов и списка цитируемой литературы (162 наименования). Работа изложена на 184 страницах машинописного текста, содержит 4 схемы, 23 таблицы и 76 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении дано обоснование актуальности темы и сформулированы цели исследования. Отмечена перспективность использования метода капиллярного электрофореза при определении важнейших нейротрансмиттеров (биогенных аминов, гидрокси- и аминокислот) в биологических объектах.

1-я глава (Обзор литературных данных) состоит из 4 разделов, в которых обсуждаются общие сведения о нейротрансмиттерах; пути их биосинтеза и функции в организме; физико-химические методы исследования (иммунологические, хроматографические и электрофоретические), варианты дериватизации, пробоподготовка биологических жидкостей при хроматографическом и электрофоретическом определении биогенных аминов и аминокислот.

Во **2-й главе** рассматриваются **общие характеристики объектов и методов исследования.**

В **3-й главе** предметом обсуждения является **изучение электрофоретического поведения нейротрансмиттеров** при определении их методами КЗЭ и МЭКХ с УФ- и МС-детектированием.

Показана возможность определения алифатических нейротрансмиттерных аминокислот (*глицин, γ -аминомасляная кислота, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота*) в режиме КЭ на приборе «КАПЕЛЬ 105» с переводом в фенилтиокарбамойльные производные (при $\lambda = 254$ нм) и без предварительной дериватизации (при $\lambda = 190$ нм).

Изучение закономерностей электрофоретического поведения анализов проводили на 3-х сериях модельных систем: биогенные амины, нейротрансмиттерные ароматические гидрокси- и аминокислоты:

- 1 *дофамин (DA), серотонин (Ser), норадреналин (NA), норметанефрин (NMN), адреналин (A), метанефрин (MN),*
- 2 *ванилилиндровая кислота (VMA), гомованилиновая кислота (HVA), 3,4-дигидроксифенилаланин (DOPA), 5-гидроксииндолуксусная кислота (HIA),*

3 *триптофан (Trp), 3-гидроксикинуренин (ЗОНК), кинуренин (Куп), кинуреновая кислота (Куп acid).*

Химическая структура этих соединений в значительной степени диктовала выбор рабочего электролита с определенным значением pH. После серии предварительных экспериментов определение и разделение биогенных аминов осуществляли в кислой среде в виде катионов за счет протонирования аминогруппы молекул аналитов. Варьировались концентрации буферных электролитов на основе ацетата аммония (pH 4.0) (15 – 50 мМ) и уксусной кислоты (pH 3.0). В качестве добавок, модифицирующих стенки кварцевого капилляра, использовали гидрохлорид диэтиламина, *n*-бутиламин и триэтаноламин.

Оптимальные результаты были получены с участием следующих рабочих электролитов: 25 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор, 20 мМ диэтиламин и 0,175 М уксусная кислота, 30 мМ триэтаноламин (Рис. 1).

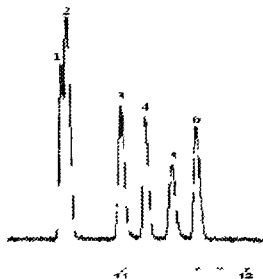


Рис. 1. Электрофореграмма модельной смеси (дофамин (1), серотонин (2), нордревалин (3), норметанефрин (4), адреналин (5), метанефрин (6)) 10 мг/л в 1 М растворе уксусной кислоты
Прибор: «Agilent 1100», $\lambda = 200$ нм, $L_{\text{общ}} = 60$ см, $L_{\text{эф}} = 50$ см, $d = 50$ мкм; ввод пробы: 50 мбар, 20 с; рабочий электролит 1 %-ный раствор уксусной кислоты и 30 мМ триэтанолamina; pH 3.0.

При этом оставалась нерешенной проблема разделения дофамина и серотонина.

На электрофоретические характеристики аналита (подвижность, разрешение, эффективность и селективность разделения) помимо природы, концентрации и pH рабочего электролита влияют органические растворители и комплексообразователи в составе рабочего буфера, что было детально изучено на примере пары дофамин/серотонин. Дофамин – маркер таких заболеваний как шизофрения, болезни Паркинсона и Альцгеймера, для диагностики которых необходимо контролировать как содержание самого дофамина, так и его соотношение с серотонином.

Введение 18-краун-6 (18-К-6) в состав буферного электролита с pH < 7 должно было бы повлиять на электрофоретические характеристики протонированных аминокислотных соединений за счет комплексообразования последних с макроциклом.

Для исключения конкурентного комплексообразования с ионами аммония ацетатно-аммонийного буфера был выбран рабочий электролит на основе 1%-ного раствора уксусной кислоты и раствора триэтанолamina (ТЭА), pH 3.0.

Введение 18-К-6 в состав электролита позволило разделить эту пару соединений (Рис 2). Влияние краун-эфира значительно сказывается лишь на электрофоретических характеристиках аналитов с первичной аминогруппой (дофамин, норадреналин, серотонин) и практически не влияет на вторичные амины (например, адреналин) (Рис. 3) Именно поэтому в данных условиях адреналин (вторичный амин) и норметанефрин (первичный амин) элюируются одним пиком (Рис.2), что подтверждено и результатами расчета констант комплексообразования в системе «макроцикл-аналит» (дофамин 10 ± 2 л/моль, серотонин 14 ± 3 л/моль, норадреналин 13 ± 3 л/моль) Для вторичных аминов соответствующие значения оказались крайне малы, и количественная оценка их методом КЭ невозможна

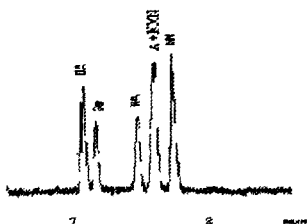


Рис. 2. Электрофореграмма модельной смеси биогенных аминов «Agilent 1100 CE», $\lambda = 200$ нм. Рабочий электролит: 1%-ный р-р CH_3COOH , 10мМ ТЭА, 10мМ 18-К-6

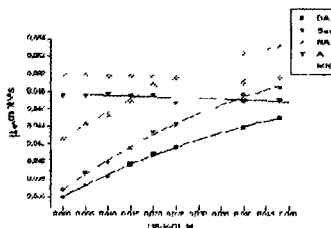


Рис. 3. Графические зависимости эффективных электрофоретических подвижностей биогенных аминов от концентрации 18-К-6

Наряду с увеличением коэффициента разрешения (R_s) пары дофамин/серотонин (от 0,5 до 4,9) наблюдается и заметный рост эффективности (N) (для дофамина от 4×10^5 т.т. до 8×10^5 т.т.).

В отличие от макроциклов ион-парный агент, каким является додецилсульфат натрия (ДДСН), изменяет электрофоретические подвижности как первичных, так и вторичных аминов, что позволило полностью разделить смесь катехоламинов и их метаболитов. Однако в этом случае рост селективности разделения сопровождался значительным снижением эффективности (Рис. 4, 5).

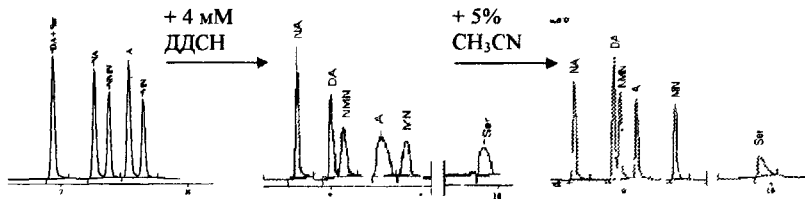


Рис. 4. Электрофореграмма модельной смеси катехоламинов (дофамин (DA), норадреналин (NA), адреналин (A), метанефрин (MN), норметанефрин (NMN), серотонин (Ser))

Прибор: «Капель 105», $\lambda_{\text{макс}} = 210$ нм

Изучено влияние ДДСН и ацетонитрила на эффективность и селективность разделения аналитов в режиме КЭЭ (Рис 4, 5) Введение ацетонитрила, изменяющего сольватную оболочку аналитов, в состав электролита, содержащего 4 мМ ДДСН, позволило резко увеличить эффективность при сохранении селективности разделения (Рис 4, 5).

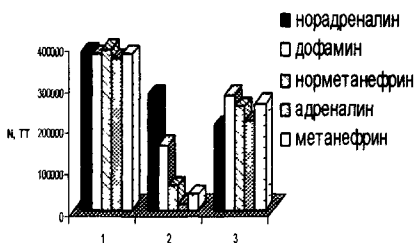


Рис. 5. Влияние ДДСН и ацетонитрила на эффективность определения катехоламинов и их метаболитов в режиме КЭЭ

1 – 1%-ный р-р CH_3COOH , 30 мМ ТЭА
 2 – 1%-ный р-р CH_3COOH , 30 мМ ТЭА, 4 мМ ДДСН
 3 – 1%-ный р-р CH_3COOH , 30 мМ ТЭА, 4 мМ ДДСН, 5% CH_3CN

В режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии (10 мМ ДДСН) удалось достичь требуемого разрешения с высокой эффективностью лишь с участием 4,13-диаза-18-краун-6 (4мМ) (Табл. 1, Рис 6, 7)

Таблица 1. Зависимость коэффициента разрешения и эффективности от концентрации 4,13-диаза-18-К-6 в буферном электролите (25 мМ фосфатного буфера, pH 7.0, 10 мМ ДДСН)

Концентрация 4,13-диаза-18-К-6, мМ	Rs NA/A	Rs A/DA	Эффективность N, $\times 10^3$ т.т.		
			NA	A	DA
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

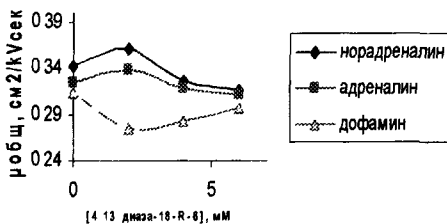


Рис. 6. Зависимость электрофоретической подвижности компонентов смеси от концентрации 4,13-диаза-18-К-6 в буферном электролите (фосфатный буфер pH 7.0, 10 мМ ДДСН)

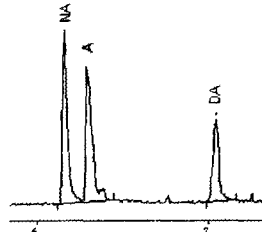


Рис. 7. Электрофореграмма модельной смеси катехоламинов буферный электролит: 25 мМ фосфатный буфер pH 7.0, 10 мМ ДДСН, 4 мМ 4,13-диаза-18-К-6.

Конкурирующее взаимодействие макроцикла и мицелл «за аналит» с участием водородных связей в наибольшей степени сказалось на дофамине, что может быть независимо использовано при его индивидуальном определении.

Задача электрофоретического разделения кислотных метаболитов катехоламинов, гомованилиновой (HVA), ванили миндальной (VMA),

5-гидроксииндол-3-уксусной (HIA), 3,4-дигидроксифенилаланина (DOPA) – маркеров опухолевых процессов – была решена с участием макроцикла с гидрофобной полостью (β -циклодекстрина (β -ЦД)). Использовали рабочий электролит с $pH > 7$, и нейротрансмиттерные аминокислоты разделялись в виде анионов (Рис 8)

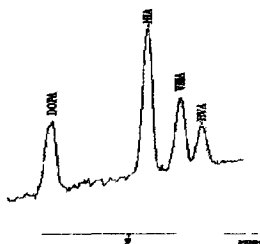


Рис. 8. Электрофореграмма модельной смеси биогенных аминов и нейротрансмиттерных кислот «КАПЕЛЬ 103Р» $\lambda=254$ нм; Рабочий электролит: 20 мМ боратный буфер (pH 8 1), 30 мМ β -ЦД

Для расширения диапазона растворимости β -ЦД в состав рабочего электролита вводили органические модификаторы (диметилсульфоксид (ДМСО), ацетонитрил). Снижение подвижностей кислот происходило в разной степени в зависимости от их структуры и природы органического растворителя, а в случае ацетонитрила порядок элюирования компонентов даже обращался (Рис. 9. а, б), что обусловлено различной сольватацией ионов и устойчивостью образующихся комплексов (Табл. 2)

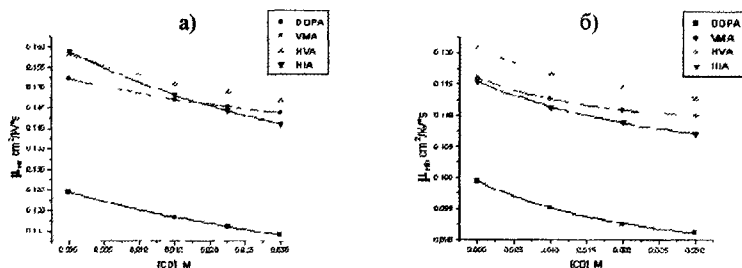


Рис. 9. Графические зависимости эффективных электрофоретических подвижностей ароматических кислот от концентрации макроцикла в буфере а) боратный буфер +10% CH_3CN ; б) боратный буфер +15% ДМСО

Таблица 2. Значения констант устойчивости [л/моль] комплексов ароматических кислот с -ЦД в различных буферных системах

Буфер \ Аналит	DOPA	VMA	HVA	HIA
боратный буфер	6 \pm 1	27 \pm 2	56 \pm 6	31 \pm 2
боратный буфер +15% ДМСО	30 \pm 6	54 \pm 2	26 \pm 2	33 \pm 5
боратный буфер +10% CH_3CN	13 \pm 2	17 \pm 1	22 \pm 1	18 \pm 1

В режиме КЗЭ выявлены факторы, определяющие закономерности электрофоретического поведения триптофана и его метаболитов, содержание которых резко возрастает при катаракте, глаукоме, урологических патологиях.

состав, pH и концентрации буферного электролита время ввода пробы и напряжение, что позволило подобрать оптимальный режим их разделения (Рис. 10)

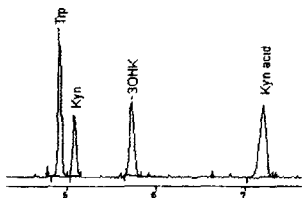


Рис. 10. Электрофореграмма модельной смеси аминокислот (триптофан, кинуренин, 3-гидроксикинуренин, кинуреновая кислота) «КАПЕЛЬ 105», 227 нм; рабочий электролит: 5 мМ тетрабората натрия, pH 9.0
Ввод пробы: 30 мбар, 20 с.

Пределы обнаружения ароматических гидроксикислот составили 250 мкг/л, что является достаточным для их определения в реальных объектах. Более высокие значения пределов обнаружения биогенных аминов не позволили проводить количественное определение их в биологических жидкостях.

В связи с этим был использован вариант *on-line* концентрирования, т.н. *стэкинг*. Основной принцип его заключается в различии электропроводностей раствора пробы и буфера, электропроводность последнего больше. Компоненты пробы ускоряются в более высоком поле матрицы образца и концентрируются на границе с буферным электролитом (Рис. 11). Испытано несколько вариантов: *стэкинг с усилением поля, использование "водной пробки", большой объем вводимого раствора пробы и электростэкинг*

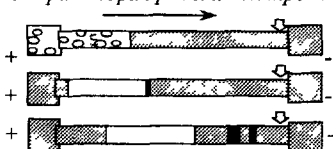


Рис. 11. Схематическое изображение *стэкинга*

□ - область низкопроводящей матрицы
■ - область высокопроводящей матрицы

Наилучшие результаты получили, используя *электростэкинг* и *стэкинг* с большим объемом образца.

В первом случае образец вводится электрокинетически под действием высокого напряжения (15 кВ, 90 с). Этот способ позволил снизить предел

обнаружения биогенных аминов до 2.5 мкг/л. При *стэкинге* с большим объемом образца вводится «длинная» зона пробы (30 мбар, 90 с) из раствора с меньшей электропроводностью, чем у рабочего буфера. Концентрирование происходит за счет низкой проводимости матрицы образца на границе раздела между зонами пробы и буфера. Предел обнаружения биогенных аминов составил 50 мкг/л. Свой выбор мы остановили на последнем варианте, поскольку воспроизводимость *электростэкинга* недостаточна.

Оценку степени концентрирования проводили по значениям факторов концентрирования (SEF_n) (Табл. 3).

$$SEF_n = \frac{\text{высота пика, полученного при концентрировании}}{\text{высота пика, полученного при обычных условиях ввода пробы (2с)}} \cdot \Delta, \text{ где } \Delta - \text{доля разбавления}$$

Таблица 3. Факторы концентрирования биогенных аминов в режиме КЗЭ

Варианты <i>on-line</i> концентрирования		DA	NA	NMN	A	MN	
		SEF_н					
стэкинг с усилением потока	30 мбар, 20с. C = 10 мг/л	15 ± 1	13 ± 1	12 ± 2	12 ± 1	13 ± 1	
	Предел обнаружения 500 мкг/л						
стэкинг с большим вводом пробы	30 мбар, 20с C = 10 мг/л	16 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	
	Предел обнаружения 900 мкг/л						
	30 мбар, 90с C = 100 мкг/л	36 ± 2	35 ± 2	34 ± 1	36 ± 1	39 ± 1	
		Предел обнаружения 50 мкг/л					
электростэкинг с большим вводом пробы	10 кВ, 12с C = 10 мг/л	5 ± 2	4 ± 2	4 ± 2	4 ± 1	4 ± 2	
	Предел обнаружения 1000 мкг/л						
	15 кВ 90 с	C = 100 мкг/л	194±45	180±60	170±52	182±52	170±28
		C = 25 мкг/л	500±80	405±42	360±36	404±30	390±37
		C = 10 мкг/л	720±85	580±54	560±40	670±93	585±86
		Предел обнаружения 2,5 мкг/л					
"водная пробка" 30 мбар, 5с	ввод пробы 30 мбар, 20 с C = 10 мг/л	14 ± 1	15 ± 1	13 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	
		Предел обнаружения 500 мкг/л					

Установленные закономерности электрофоретического разделения аналитов и выяснение возможностей *on-line* концентрирования позволили перейти к анализу реальных объектов (плазма и сыворотка крови, моча, структуры мозга)

В процессе пробоподготовки биологических образцов изучены возможности жидкостно-жидкостной (ЖЖЭ) и твердофазной экстракций (ТФЭ)

Для оптимизации условий ЖЖЭ варьировали матрицу образца, использовали процессы комплексообразования с участием 18-К-6 и формирования ионных пар с ДДСН; последний вариант оказался наиболее интересен

Биогенные амины в условиях анализа практически не переходят в органические растворители. Для повышения их гидрофобности в раствор пробы был введен ион-парный реагент (20 мМ ДДСН). Отмечено, что более гидрофобные аналиты (метабоиты катехоламинов) экстрагируются в большей степени (Табл. 4).

Таблица 4. Степени экстракции биогенных аминов после проведения ЖЖЭ с этилацетатом с использованием ДДСН в составе пробы

DA	46% ± 2
NA	44% ± 1
NMN	63% ± 2
A	44% ± 2
MN	64% ± 2

Обнаруженное влияние макроциклов и ион-парных добавок оказалось полезным и при разработке стратегии твердофазной экстракции. Испытаны оксид алюминия с рН поверхности < 7, силикагель, обращенно-фазовый сорбент С18

Основная схема твердофазной экстракции с использованием Al₂O₃ для выделения катехоламинов из биообъектов представлена на Рис. 12. На Al₂O₃ селективно сорбируются только катехоламины

Другой самостоятельной задачей являлась *одновременная* экстракция катехоламинов и их метаболитов (Табл. 5)

Для повышения селективности экстракции на силикагеле проводят предварительную модификацию сорбента раствором 18-К-6. Аналиты элюировали, используя конкурентное комплексобразование, раствором KNO_3 . При этом вторичные амины (адреналин, метанефрин) элюировались в большей степени (Табл. 5) за счет меньшей стабильности комплекса аналита с макроциклом.

Обнаруженный факт находится в хорошем соответствии с проведенными нами расчетами констант комплексобразования в режиме КЭ

На гидрофобном обращенно-фазовом сорбенте С18 биогенные амины не удерживаются, поэтому по аналогии с жидкостно-жидкостной экстракцией в пробу добавляли раствор 18-краун-6 либо ион-парную добавку ДДСН, и на С18 сорбировались комплексы аминов с макроциклом либо ионные пары (Табл. 5).

Таблица 5. Степени ТФЭ катехоламинов и их метаболитов

Аналит	Степень твердофазной экстракции, %				
	Al_2O_3	Силикагель, модифицированный 18-К-6		С18, модифицированный ДДСН	
	Э л ю е н т :				
	1М CH_3COOH	20мМ KNO_3	1М CH_3COOH	95% CH_3CN	95% CH_3OH
DA	84 ± 3	28 ± 1	65 ± 1	68 ± 6	96 ± 4
NA	89 ± 4	43 ± 3	58 ± 3	67 ± 8	70 ± 6
NMN	0	27 ± 2	70 ± 2	62 ± 9	96 ± 1
A	87 ± 8	84 ± 1	61 ± 2	75 ± 7	88 ± 2
MN	0	77 ± 2	69 ± 1	64 ± 4	94 ± 2

Проведенное *off-line* концентрирование привело к дополнительному снижению предела обнаружения биогенных аминов в 10-20 раз, что обеспечило возможность их электрофоретического определения в биологических объектах.

Проведена серия экспериментов по определению катехоламинов методом КЭ с масс-спектрометрическим детектированием на приборе Agilent 1100 CE-ESI-MS и показано, что предел обнаружения биогенных аминов в этом случае (в *SIM* режиме), составляет 17 мкг/л, что сопоставимо со значениями, полученными при использовании *on-line* концентрирования в режиме КЭ с УФ-детектированием

В качестве референтного метода для подтверждения правильности по ту чаемых нами количественных данных по содержанию катехоламинов был использован



Рис. 12. Процесс ТФЭ биогенных аминов из реального образца.

метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрическим детектированием (ОФ ВЭЖХ-АД) (Табл. 6)

Таблица 6. Результаты межлабораторного количественного контроля модельной смеси катехоламинов

Аналит	Введено (мкг/л)	Найдено (мкг/л)	
		КЭ-УФ «КАПЕЛЬ 105» НПО ЛЮМЭС, Санкт-Петербург	ОФ ВЭЖХ-АД «Цвет-Яуз» НПО Химвтоматика, Москва
адреналин	500	504 ± 10	500 ± 3
норадреналин	500	495 ± 8	504 ± 2
дофамин	500	495 ± 10	499 ± 2

При этом следует отметить, что определенный предел обнаружения катехоламинов в режиме ВЭЖХ с амперометрическим детектированием составил 46 нг/л для норадреналина, 28 нг/л для адреналина и 288 нг/л для дофамина. Это на порядок больше, чем в режиме капиллярного электрофореза с УФ- и МС-детектированием. Однако электрохимическое детектирование возможно лишь для соединений, содержащих электрофорные функциональные группы, т.е. весь набор важнейших нейротрансмиттеров в таком варианте определить невозможно.

Таким образом, показаны возможности капиллярного электрофореза с УФ-детектором для количественного определения и селективного разделения сложных смесей органических соединений с амино-, гидроксид- и карбоксигруппами независимо от природы биологического объекта (Схема 1)

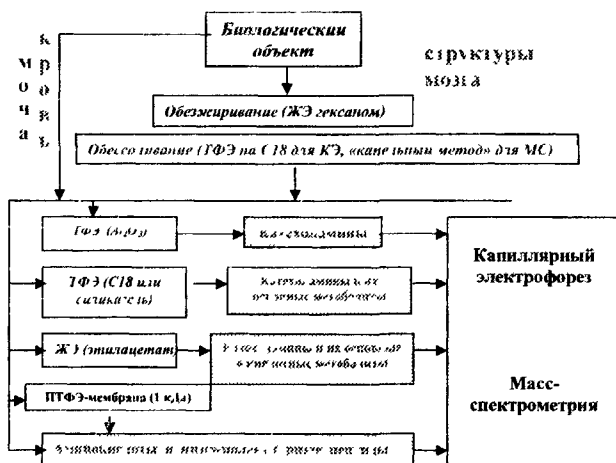


Схема 1. Основные этапы пробоподготовки биологического объекта к анализу

Была поставлена серия специальных экспериментов на модельной системе нейротрансмиттеров (триптофана и его метаболитов (кинурина, 3-

гидроксикину ренин, кинуреновая кислота)) для выяснения возможности высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) в целях медицинской диагностики. Использовались пластины на основе силикагеля, а также модифицированные β -циклодекстрином и 18-краун-6. Разделения удалось достичь только на модифицированных пластинах. Показано, что применение ВЭТСХ возможно лишь при достаточно высоких содержаниях аналитов в биологических объектах (> 500 мкг/л).

В 4-ой главе представлены возможности практического применения разработанных вариантов электрофоретического разделения и определения нейромедиаторов.

Обнаруженные на модельных смесях закономерности позволили предложить схему определения дофамина и норадреналина в моче (Рис 13) и плазме крови для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний.

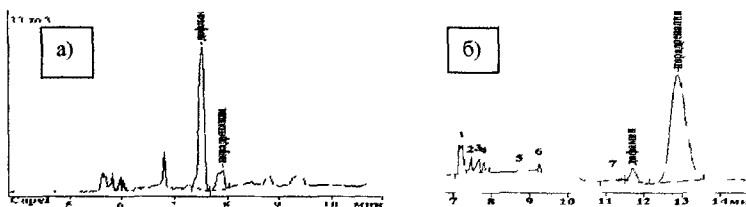


Рис. 13. Электрофореграмма реального объекта (мочи (а) и плазмы крови (б)) после ТФЭ с использованием Al_2O_3 ; исходный объем мочи 10 мл, плазмы 2 мл. Прибор: «КАПЕЛЬ 105»; 1%-ный раствор уксусной кислоты (0,17M), 30 мМ триэтанолamina; ввод пробы: 30 мбар, 90 сек.

Результаты количественного анализа методом абсолютной градуировки следующие:

в моче 200 мкг/сутки (DA), 30 мкг/сутки (NA);

плазме крови 350 мкг/л (DA), 1600 мкг/л (NA).

Самостоятельной задачей явилось изучение кинуренинового пути метаболизма триптофана (КПМТ), с которым связывают различные нейродегенеративные, урологические и глазные заболевания; болезни Паркинсона и Альцгеймера. КПМТ возможен как в человеческом организме, так и у насекомых и грызунов.

Наиболее интересный биологический объект, на котором можно исследовать модельные мутации КПМТ, это – *Дрозофилы*, относительно короткая жизнь которых (50 дней) позволяет изучать различные биохимические изменения, происходящие с возрастом.

Были протестированы мутанты *Drosophila canton S*, а также *cardinal* (избыток 3-гидроксикинуренина), *cinnabar* (избыток кинуреновой кислоты), *vermilion* (избыток триптофана) предоставленные институтом физиологии им Павлова

Реальный объект представлял собой гомогенизат голов *Drosophila* в фосфатном буферном растворе pH 8.0 (Рис 14)

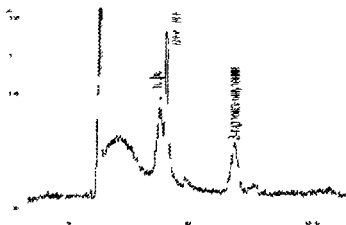


Рис.14. Электрофореграмма реального образца (гомогенизат голов *Drosophila*).

Прибор. «Agilent 1100 CE», $\lambda = 227$ нм.
Рабочий электролит: 7 мМ боратный буферный раствор pH 8,14

Содержание 3-гидроксикинуренина составило от 40 до 500 нг/мг ткани, в зависимости от мутации и половой принадлежности мух.

ВЫВОДЫ

1. Установлены закономерности электрофоретического разделения катехоламинов и их метаболитов и выявлены доминирующие факторы: модификатор поверхности кварцевого капилляра (диэтиламин, триэтианоламин), комплексообразователи (18-К-6, 4,13-диаза-18-К-6, β -циклодекстрина, додецилсульфата натрия (ДДСН)) и органические растворители (ацетонитрил, диметилсульфоксид) в составе рабочего электролита.
2. Обнаружено влияние макроциклов (18-К-6, 4,13-диаза-18-К-6, β -циклодекстрина) и ион-парного реагента (ДДСН) на эффективность и селективность электрофоретического разделения катехоламинов и их кислотных и основных метаболитов в режиме капиллярного зонного электрофореза и мицелярной электрокинетической хроматографии. Проведена количественная оценка комплексообразования в системе «макроцикл-аналит».
3. Разработан унифицированный регламент пробоподготовки биологических объектов (моча, плазма и сыворотка крови, структуры мозга) для электрофоретического анализа, основанный на различных вариантах жидкостной (экстрагент - этилацетат) и твердофазной экстракции (Al_2O_3 ; силикагель, модифицированный 18-К-6; С18 с использованием додецилсульфата натрия в составе анализируемой пробы).
4. Выявлены возможности различных вариантов *on-line* концентрирования (электростэкинг, стэкинг с большим вводом пробы, стэкинг с усилением поля) и

показано, что *stacking* с большим объемом пробы снижает предел обнаружения биогенных аминов до 50 мкг/л и позволяет проводить анализ биологических жидкостей методом капиллярного электрофореза

5. Предложена схема электрофоретического анализа реальных объектов: (плазма и сыворотка крови, моча и структуры мозга)
 - определение норадреналина и дофамина в плазме крови и моче методом КЗЭ,
 - определение триптофана и его метаболитов в структурах мозга и слезной жидкости методом КЗЭ и МЭКХ.

Основные материалы диссертации опубликованы в следующих работах:

1. *Л.А. Карцова, А.А. Сидорова, В.А. Казаков, Е.А. Бессонова, А.Я. Яшин* Определение катехоламинов методами капиллярного электрофореза и обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журнал Аналит. Химии 2004 Т.59. №8 С.826 – 831.
2. *Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова, А.А. Сидорова, И.А. Тверьянович, В.А. Казаков, Л.И. Великанова.* Определение адреналина, норадреналина, дофамина методом капиллярного электрофореза // Журнал прикл. Химии. 2004. Т.77 С.1164 – 1169.
3. *В.А. Казаков, М.Н. Сляднев, А.А. Сидорова, Л.А. Карцова, А.А. Ганеев, Л.Н. Москвин.* Оптимизация условий определения катехоламинов методом капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием // Научное приборостроение 2004. Т. 14. №1. С. 33-44.
4. *Л.А. Карцова, А.А. Сидорова, О.В. Ганжа.* Оптимизация процедуры пробоподготовки при определении нейротрансмиттеров в структурах мозга методами масс-спектрометрии и капиллярного электрофореза // Тезисы Всероссийский симпозиум "Хроматография и хроматографические приборы" Москва. Клязьма. 2004. С. 199.
5. *D.S. Orlov, A.A. Sidorova, I.A. Tveryanovich, V.A. Popova, P.D. Shabanov.* Modern methods for detection of biologically active compounds // Тезисы. Психофармакология и биологическая наркологи (Psychopharmacology & Biological narcology). 2004. Т. 4. № 2-3 С. 705.
6. *L.A. Kartsova, A.A. Sidorova, O.V. Ganzha, S.V. Nikolaev, P.D. Shabanov* The determination of neurotransmitters in rat brain structures by capillary electrophoresis and mass spectrometry // Тезисы Psychopharmacology & Biological narcology 2004. Т. 4. № 2-3. С. 710.
7. *Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова, А.А. Сидорова, О.В. Ганжа.* Использование возможностей капиллярного электрофореза для диагностики эндокринных и

- онкологических заболеваний // Тезисы V Международная конференция по реабилитологии 2004. С. 116
- 8 *Л.А. Карцова, А.А. Сидорова, В.А. Казаков, Е.А. Беслонова, А.Я. Яшин.* Определение катехоламинов методами КЭ и ОФ ВЭЖХ // Тезисы. Всероссийский симпозиум "Хроматография и хроматографические приборы" Москва. Клязьма. 2004. С. 169.
 - 9 *А.А. Sidorova, L.A. Kartsova* The application of macrocyclic reagents for electrophoresis separation of organic compounds with amino-, hydroxyl-, and carboxyl groups // The XXIXth Symposium "Chromatographic methods of investigating the organic compounds" Thesis. Katowice. Poland. 2005 P. 72.
 - 10 *А.А. Sidorova, L.A. Kartsova, A. Alekseeva.* The study of kynurenine pathway by capillary electrophoresis // International conference "Analytical chemistry and chemical analysis". Thesis. Kiev. Ukrainc. 2005. P. 150.
 - 11 *А.А. Сидорова, Л.А. Карцова, О.В. Ганжа, А.С. Иванова.* Разработка алгоритма пробоподготовки биологических объектов (*сыворотка и плазма крови, моча, ткани мозга*) при электрофоретическом определении нейротрансмиттерных аминокислот и биогенных аминов // II Международный симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической и радиохимии» Тезисы. Краснодар. 2005. С. 259.
 - 12 *А.А. Сидорова, Л.А. Карцова.* Метод капиллярного электрофореза при изучении кинуренинового пути метаболизма триптофана // II Международный симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической и радиохимии» Тезисы Краснодар 2005. С. 258.
 13. *О.И. Маркова, Л.А. Карцова, А.А. Сидорова.* Определение гомованилиновой и ванилинминдальной кислот методом зонного капиллярного электрофореза с β-циклодекстрином в составе буферного электролита // II Международный симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической и радиохимии». Тезисы. Краснодар. 2005. С. 371-372.

Подписано в печать 06.02.2006. Формат бумаги 60x84 1/16
Бумага офсетная. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,0
Тираж 100 экз. Заказ 3731

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ.
198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр 26

.

.

f

.

2006A

3528

" - 3528