

6. Предельно-допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве: ГН 2.1.7. 2041 – 06. Утв. Главным санитарным врачом РФ 19.01. 2006 – Изд. Офиц. – М.: ИИЦ Минздрава России. 2006. – 15 с.

7. Вредные вещества в промышленности (под редакцией Н.В. Лазарева и Э.Н. Левиной). М.: Химия. Т. 1. (органические вещества). 1976. 592 с.

8. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия. 1971. 252 с.

9. Несмеянов А.Н., Несмеянов Н.А. Начала органической химии. М.: Химия. 1969. Т. 2. 663 с.

Вигдорович Владимир Ильич - проф. кафедры «Химия» Тамбовского государственного технического университета, Тамбов

Цыганкова Людмила Евгеньевна – д.х.н., проф., зав. кафедрой аналитической и неорганической химии Тамбовского государственного университета им. Г.Р. Державина, Тамбов

Акулов А.И. – аспирант кафедры аналитической и неорганической химии Тамбовского государственного университета им. Г.Р. Державина, Тамбов

Vigdorovich Vladimir I. – doctor of chemical sciences, professor of department “Chemistry” in Tambov State Technical University, Tambov

Tsygankova Lyudmila E. - doctor of chemical sciences, professor, chief of analytic and inorganic chemistry department in Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Tambov

Akulov A.I. – post-graduate student in Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Tambov

УДК 543.54+635

Влияние добавок ионов металлов в рабочий электролит на электрофоретическое разделение ароматических гидрокси- и аминокислот

Карцова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Маркова О.И.

ООО ЦКП «Аналитическая спектрометрия» Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 3.11.2010 г.

Аннотация

Методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) изучено влияние добавок ионов металлов (Cu^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}) в состав рабочего электролита на увеличение селективности разделения ароматических гидрокси- и аминокислот за счет процессов комплексообразования.

Предложены схемы электрофоретического анализа реальных объектов с использованием ионов Cu^{2+} в составе рабочего буфера.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, ароматические гидрокси- и аминокислоты, комплексы с ионами металлов

The influence of addition of metal ions (Cu^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}) to the back ground electrolyte on the increase of selectivity separation of aromatic hydroxy- and aminoacides due to complexation processes was investigated by the method capillary zone electrophoresis (CZE).

Schemes of electrophoretic analysis of real objects with the use of Cu^{2+} ions in the composition of back ground electrolyte were suggested.

Keywords: capillary zone electrophoresis, aromatic hydroxy- and aminoacides, complexes with metal ions

Введение

Известно, что многие биологически активные вещества (аминокислоты, пептиды, углеводы и т.д.) образуют комплексы с ионами металлов [1, 2]. Подобные процессы комплексообразования при наличии катионов металлов в составе рабочего буфера приводят к существенным изменениям электрофоретических подвижностей аналитов. Важнейшим фактором при этом является величина pH буферного электролита, определяющая как аналитическую форму органического лиганда и катиона металла, так и величину электроосмотического потока (ЭОП) и т.д. [3, 4]. Одним из основных биогенных металлов, для которого имеется достаточное число публикаций, посвященных комплексообразованию с органическими соединениями является медь [5,6].

Имеются сообщения об успешном разделении металлохромных лигандов с использованием буферного раствора, содержащего ионы металлов [7]. Добавление ионов Cu^{2+} и Zn^{2+} использовано при электрофоретическом разделении кислот, олигонуклеотидов и пептидов [8 – 10].

При этом наличие ионов металлов в непокрытом капилляре может оказать и нежелательный эффект на разделение аналитов, что связано с их возможной сорбцией отрицательно заряженными стенками кварцевого капилляра [8, 11 - 13]. Использование буферов, содержащих анионные мицеллообразующие агенты, позволяет эту проблему решить: мицеллы обеспечивают конкурентноспособную стенкам капилляра поверхность для взаимодействия с ионами металлов [8]. Другой подход – экранирование силанольных групп добавлением к разделительной системе модификаторов ЭОП [6]. В данной работе изучено влияние ионов металлов (Cu^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}) в составе рабочего электролита на разделение компонентов модельной смеси, содержащей функционально замещенные гидроксид- и аминокислоты.

Эксперимент

Аппаратура. Электрофоретический анализ выполняли на системе 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 мкм, максимально возможное напряжение – 25 кВ; ввод пробы электрокинетический и гидродинамический.

При приготовлении растворов использовали pH-метр (pH-121) и электронные аналитические весы «Exploger» (E) модификации E00640 («Ohaus», США).

Реагенты, рабочие растворы. Стандартные растворы ванилинминдальной, гомованилиновой, салициловой, никотиновой, бензойной, 2,4-дигидроксибензойной,

антраниловой и *m*-аминобензойной кислот, («Sigma», США) с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением навесок по 1 мг каждой кислоты в 1 мл бидистиллированной воды во фторопластовых пробирках. Рабочие растворы готовили разбавлением стандартных растворов в необходимое число раз с помощью микрошприца и автоматического дозатора. Полученные растворы до анализа хранили в морозильной камере при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для приготовления стандартных растворов катионов металлов использовали соответствующие нитраты марки х.ч. По определенной навеске готовили соответствующие 0,1 М растворы. Стандартизацию полученных растворов проводили комплексометрически [14]. Рабочие растворы готовили соответствующим разбавлением исходного раствора бидистиллированной водой.

В качестве модельной системы выбрана смесь ароматических органических кислот (ванилинминдальная, гомованилиновая, 2,4-дигидроксибензойная, *m*-аминобензойная, салициловая, антраниловая, никотиновая, бензойная), в молекулах которых наряду с карбоксильной группой и ароматическим кольцом содержатся аминогруппы и фенольные гидроксильные группы (рис. 1). Среди них – нейротрансмиттеры, лекарственные препараты, консерванты.

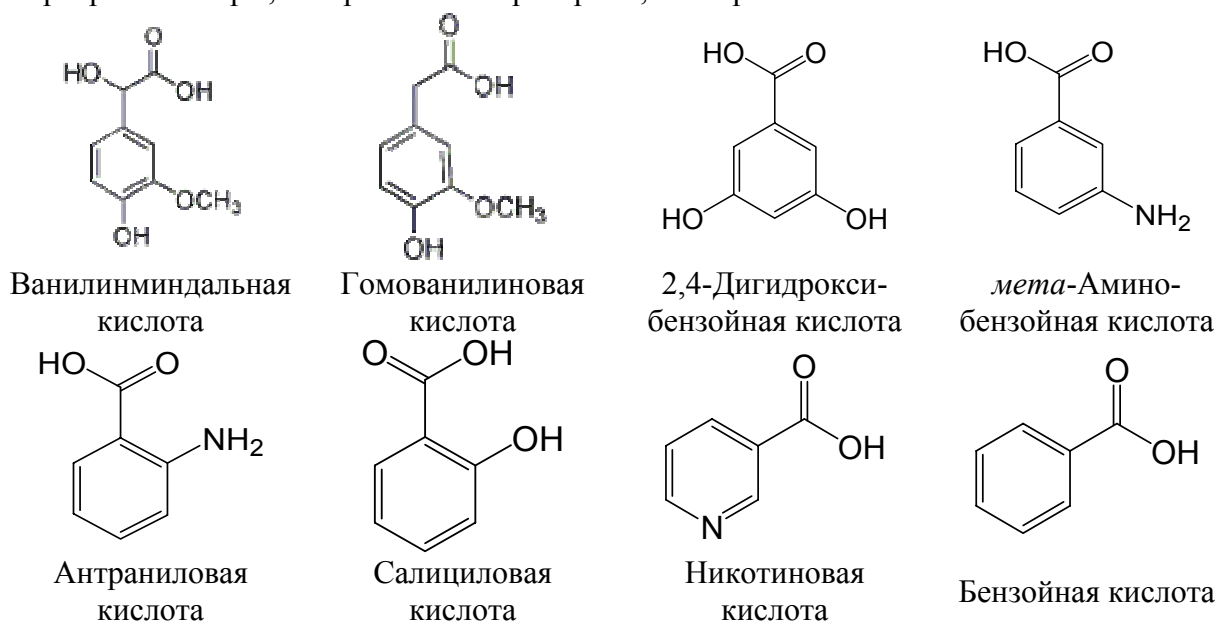


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых органических кислот

В качестве буферного электролита (БЭ) были испытаны: 35 мМ боратный буфер с pH 8,6; 10 мМ фосфатный буфер pH 6,0; ацетатно-аммонийный буфер с pH 4,0 и 1 %-ный раствор уксусной кислоты с добавкой триэаноламина (ТЭА). Во избежание возможной сорбции катионов металлов (Cu^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}) в рабочий буфер добавляли ацетонитрил (10%) и/или ион-парный агент додецилсульфат натрия (ДДСН, 2 мМ).

Результаты и их обсуждение

От использования буферных систем с pH < 7 (ацетатный и фосфатный буферы) пришлось отказаться из-за нестабильности ЭОПа при наличии ионов Cu^{2+} в составе буферного электролита. К тому же заметно возрастает и время анализа (> 40 мин).

Оптимальное разрешение было достигнуто при использовании боратного буфера (pH 8,6) с добавкой 1 мМ катионов металлов Cu^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} (нитраты соответствующих солей). Для предотвращения возможной сорбции ионов Me^{n+} на стенках немодифицированного капилляра в буферный электролит вводили ацетонитрил (10 объемн.%) и/или ион-парный агент – 2 мМ додецилсульфата натрия (ДДСН).

Общий вид полученных электрофореграмм представлен на рис. 2. На рис. 2б приведена электрофореграмма той же смеси кислот, при условии, что в буферном электролите содержится 1 мМ ионов Cu^{2+} . Наблюдается полное разделение бензойной и никотиновой кислот (что не достигалось ранее) и улучшение разрешения остальных компонентов. Исследована зависимость факторов разрешения (R_s) от концентрации ионов меди (II) в буферном электролите. Для пары никотиновая – бензойная кислоты значение R_s меняется от 0 до 2; для *m*-аминобензойной и салициловой кислот параметр R_s увеличивается в 2 раза, а для *m*-2,4-дигидроксибензойной и *m*-аминобензойной кислот более, чем в 2 раза, что связано с тенденцией ионов Cu^{2+} к образованию комплексов с молекулами никотиновой и *m*-аминобензойной кислот с участием атомов азота гетероцикла и аминогруппы ароматической кислоты.

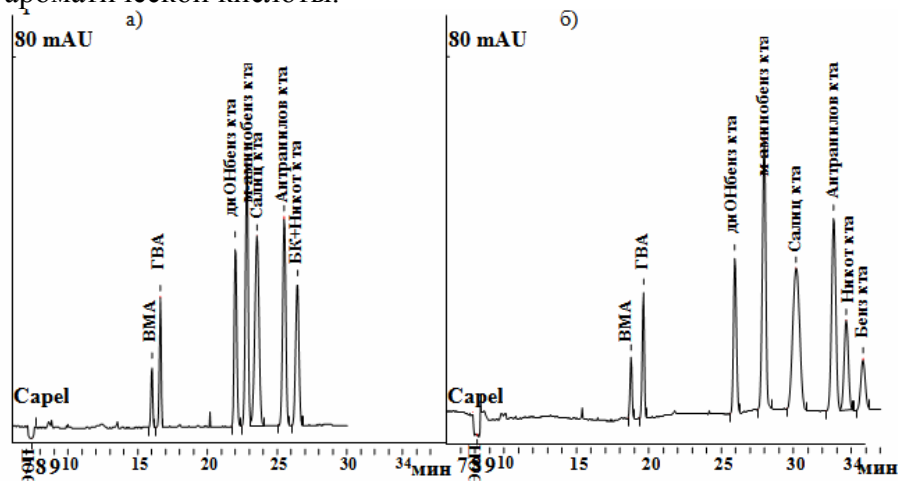


Рис. 2. Электрофореграмма модельной смеси ароматических кислот а) рабочий буфер: 35 мМ боратный буфер (pH 8,5), 10 % ацетонитрила (ЭОП 7,35 мин), б) рабочий буфер: 35 мМ боратный буфер (pH 8,5), 10 % ацетонитрила, 1 мМ меди (ЭОП 8,08 мин)

Прибор: «Капель 105 Р». Капилляр – $L_{\text{эфф}}=50$ см, $d_{\text{внутр}}=75$ мкм; УФ-детектор, $\lambda_{\text{макс}}=214$ нм; ввод – гидродинамический 30 мбар, время ввода 20 с, напряжение – 20 кВ.

В специальной серии электрофоретических экспериментов изучено влияние времени ввода пробы (10 – 60 с), приложенного напряжения (15 – 25 кВ), длины волны детектирования (190 – 254 нм), природы катиона металла в составе рабочего буфера на интенсивность аналитического сигнала, разрешение и эффективность.

С увеличением времени ввода пробы разрешение (R_s) снижается при использовании рабочего буфера с добавкой ионов Cu^{2+} , так и в их отсутствии. Однако, эти изменения не всегда одинаковы. Так, при разделении гомованилиновой и ванилинминдальной кислот (в отсутствии ионов Cu^{2+} в составе рабочего электролита) увеличение времени ввода от 10 с до 20 с привело к весьма заметному снижению разрешения ($\Delta R_s = 1,1$). При использовании того же рабочего буфера, содержащего ионы Cu^{2+} (1 мМ), значение ΔR_s значительно меньше и составляет

всего лишь 0.3, что оказалось весьма существенным обстоятельством при анализе реальных биологических объектов, поскольку увеличение времени ввода анализируемой пробы является одним из вариантов *on-line* концентрирования [15, 16], позволяющих снизить пределы обнаружения аналитов. При этом, важно «не проиграть» и в селективности разделения.

Чем меньше приложенное напряжение, тем медленнее скорость ЭОП и тем больше общее время анализа. Например, при увеличении напряжения (от 15 до 25 кВ) в случае буферных систем, содержащих ионы Cu^{2+} , заметно снижается общее время анализа (от 50 до 25 мин) при сохранении удовлетворительного разрешения.

Изучено влияние концентрации ионов Cu^{2+} в составе рабочего буферного электролита на электрофоретические характеристики кислот. В отсутствие ионов Cu^{2+} в составе рабочего буфера наблюдается неудовлетворительное разделение салициловой, антраниловой и никотиновой кислот. При добавлении 0,25 мМ ионов Cu^{2+} , а также при дальнейшем увеличении их концентрации в рабочем электролите наблюдается улучшение разрешения компонентов смеси.

Отмечено, что повышение концентрации ионов Cu^{2+} в рабочем буфере приводит к незначительному снижению электрофоретических подвижностей аналитов, что обусловлено процессами их комплексообразования с ионами Cu^{2+} , сопровождающимися увеличением размеров ионов.

Специальная серия экспериментов была поставлена по исследованию влияния добавок и других ионов металлов (Al^{3+} , Fe^{3+} , Co^{2+}) в составе буферного электролита на электрофоретические параметры определяемых аналитов.

На рис. 3 представлены электрофореграммы, иллюстрирующие изменение электрофоретического профиля смеси органических кислот в присутствии ионов алюминия в рабочем буфере. Видно, что для всех пар кислот разрешение заметно возрастает (~ в 2 раза), за исключением антраниловой/никотиновой и салициловой/антраниловой кислот. Наибольшее увеличение параметра R_s наблюдается для 2,4-дигидроксибензойной/*m*-аминобензойной и никотиновой/бензойной кислот. Аналогичная тенденция имеет место и для Fe^{3+} .

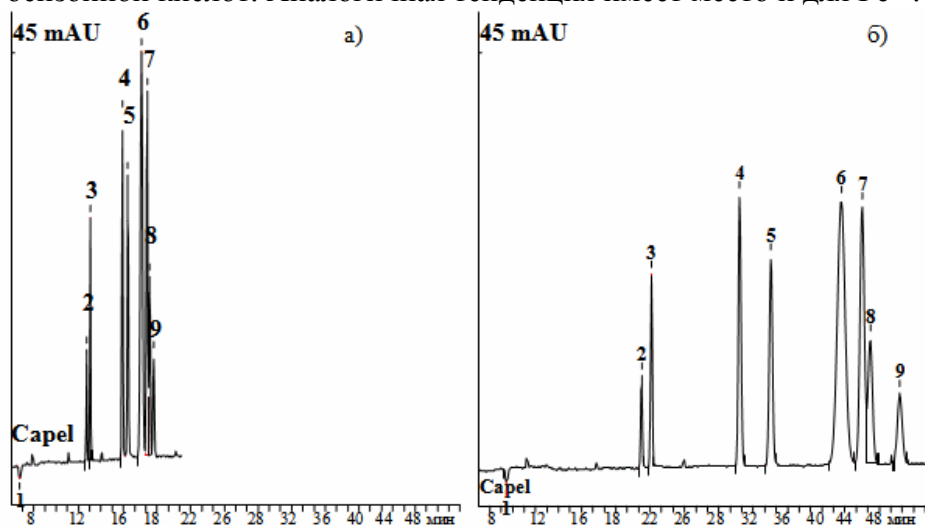


Рис. 3. Электрофореграмма модельной смеси органических кислот 1 (отрицательный) – ЭОП; 2 – ванилинминдальная кислота; 3 – гомованилиновая кислота; 4 – 2,4-дигидроксибензойная кислота; 5 – *m*-аминобензойная кислота; 6 – салициловая кислота; 7 – антраниловая кислота; 8 – никотиновая кислота; 9 – бензойная кислота.

а) рабочий электролит: 35 мМ боратный буфер, pH 8.5, 10% ацетонитрила, 2 мМ ДДСН; б) рабочий электролит: 35 мМ боратный буфер, pH 8.5, 10% ацетонитрила, 2 мМ ДДСН, 1 мМ Al^{3+} .

Система капиллярного электрофореза «Капель 105 Р». Капилляр – $L_{эфф}=50$ см, $d_{внутр}=75$ мкм; УФ-детектор, $\lambda_{макс}=214$ нм; ввод – гидродинамический 30 мбар, время ввода 10 с, напряжение – 20 кВ.

Введение ионов Al^{3+} и Fe^{3+} больше всего сказывается на электрофоретических подвижностях соединений, молекулы которых содержат фенольные гидроксильные группы (2,4-дигидроксибензойная, салициловая, ванилинминдальная, и гомованилиновая кислоты) (рис. 4).

При добавлении ионов Co^{2+} в буферный электролит также растет время анализа и значительно увеличивается селективность разделения (рис. 4). При этом, в отличие от ионов Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , наблюдается заметное влияние на величины их истинных электрофоретических подвижностей.

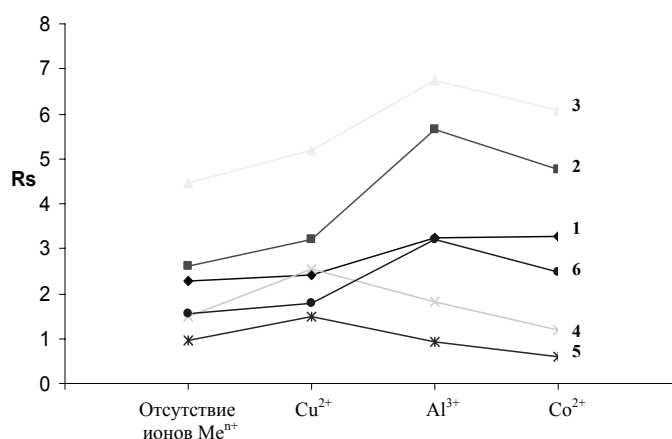


Рис. 4. Зависимость разрешения (R_s) различных пар органических кислот от природы добавленного в рабочий буфер катиона Me^{n+} (1 мМ) (1 – ванилинминдальная кислота/ гомованилиновая кислота; 2 – дигидроксибензойная к-та/ *m*-аминобензойная кислота; 3 – *m*-аминобензойная кислота/ салициловая кислота; 4 – салициловая кислота/ антраниловая кислота; 5 – антраниловая кислота/ никотиновая кислота; 6 – никотиновая кислота/ бензойная кислота). Остальные условия см. рис. 2

Таким образом, можно заключить, что влияние ионов Cu^{2+} , в первую очередь, сказывается на поведении кислот, в молекулах которых присутствуют аминогруппы или атом азота в составе гетероцикла, а присутствие ионов Al^{3+} и Fe^{3+} значительно изменяет электрофоретические характеристики кислот, молекулы которых содержат фенольные гидроксилы.

Установленные закономерности оказались полезными при электрофоретическом анализе реальных объектов (природные воды, витамины, моча) как при определении катионов металлов, так и органических лигандов в форме их комплексов.

Так, при электрофоретическом анализе ванилинминдальной и гомованилиновой кислот (маркеров нейроblastомы [17, 18]) в моче с использованием боратного буфера (pH 8,5) и добавкой в его состав ионов Cu^{2+} (1 мМ) наблюдается значительное улучшение разделения этих кислот от мешающих компонентов (рис. 5).

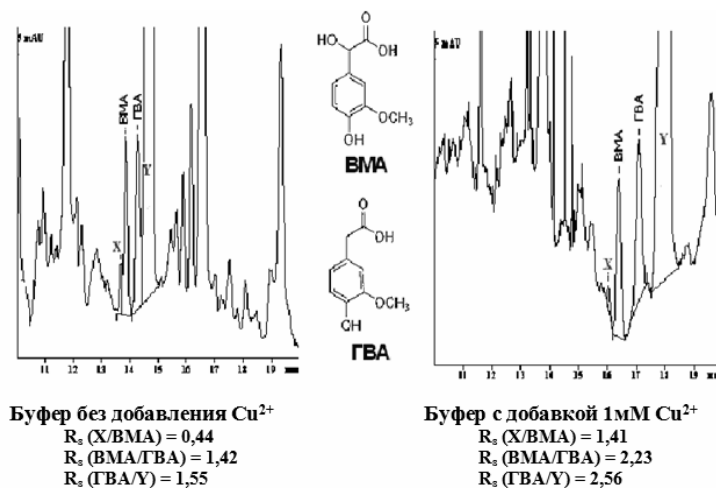


Рис. 5. Определение ванилинминдальной (VMA) и гомованилиновой (HVA) кислот в реальном объекте в режиме КЗЭ с использованием добавки Cu²⁺ в рабочий буфер

Градуировочный график линейен в диапазоне концентраций определяемых кислот 0,25 – 50 мг/л ($n = 5$, $P = 0,95$), а достигнутые пределы обнаружения ($1,25 \times 10^{-6}$ моль/л для ванилинминдальной кислоты и гомованилиновой – $1,35 \times 10^{-6}$ моль/л) позволяют проводить их определение в моче и крови на уровне нормы и тем более при патологии, когда их содержание заметно увеличивается. Ошибка определения при анализе реального объекта не более 5 %.

Полученные результаты обеспечили возможность одновременного качественного и количественного электрофоретического определения ванилинминдальной и гомованилиновой кислот VMA и HVA с приемлемым разрешением от сопутствующих компонентов, чего не удавалось добиться ранее. При этом процедура предварительной пробоподготовки не потребовалась.

Таким образом, зная природу определяемых веществ можно избирательным комплексобразованием «разгружать» необходимую зону детектирования при решении конкретных медико-биологических задач.

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. Chen Z., Naidu R. On-column complexation of metal ions using 2,6-pyridinedicarboxylic acid and separation of their anionic complexes by capillary electrophoresis with direct UV detection// J. Chromatogr. A. 2002. V. 966. № 1-2. P. 245-251.
3. Lin T.I., Lee Y.H., Chen Y.C. Capillary electrophoretic analysis of inorganic cations - role of complexing agent and buffer pH// J. Chromatogr. A. 1993. V. 654. P. 167 – 176.
4. Vogt C., Conradi S. Complex equilibria in capillary zone electrophoresis and their use for the separation of rare earth metal ions// Anal. Chim. Acta, 1994. V. 294. № 2. P. 145 – 153
5. Wiley J.P. Determination of polycarboxylic acids by capillary electrophoresis with

copper complexation// J. Chromatogr. A, 1995. V. 692. P. 267 – 274.

6. Harvey S.D. Migration behavior of alkali and alkaline-earthmetal ion-EDTA complexes and quantitative analysis of magnesium in real samples by capillary electrophoresis with indirect UF detection // J. Chromatogr. A. 1996. V. 736. P. 333-340.

7. Macka M., Haddad P.R., Buchberger W. Separation of some metallochromic ligands by capillary zone electrophoresis and micellar capillary chromatography// J. Chromatogr. A. 1995. V. 706. P. 493 – 501.

8. Cohen A.S., Terabe S., Smith J.A., Karger B.L. High-performance capillary electrophoresis separation of bases, nucleosides, and oligonucleotides: retention manipulation via micellar solution and metal additives// Anal. Chem. 1987. V. 59. P. 1021 – 1027

9. Mosher R.A. The use of metalion-supplemented buffers to enhance the resolution of peptides in capillary zone electrophoresis// Electrophoresis. 1990. V. 765. P. 11 – 21.

10. Chiari M., Dell'Orto N., Casella L. Separation of organic acids by capillary zone electrophoresis in buffers containing divalent metal cations // J. Chromatogr. A. 1996. V. 745. P. 93-101.

11. Gassner B., Friedl W., Kenndler E. Wall adsorption of small anions in capillary zone electrophoresis induced by cationic trace constituents of the buffer// J. Chromatogr. A. 1994. V. 680. P. 25 – 31

12. Deacon M., O'Shea T.J., Lunte S.M., Smyth M.R. Determination of peptides by capillary electrophoresis electrochemical detection using on-column Cu(II) complexation// J. Chromatogr. A. 1993. V. 652. № 2. P. 377 – 383

13. Практикум по аналитической химии: Учебн. пособие для вузов / Под ред. В.П. Васильева. Москва. Химия. 2000. 328 с.

14. Gozel P., Gassman E., Michelson H., Zare R.N. Electrokinetic resolution of amino acid enantiomers with copper (II) — aspartame support electrolyte// Anal. Chem. 1987. V. 59. P. 44 – 49.

15. Руководство по капиллярному электрофорезу. / Под ред. А.М. Волощука. Москва. 1996. 112 с.

16. Osbourn D.M., Weiss D.J., Lunte C.E. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis// Electrophoresis. 2000. V. 21. P. 2768-2779

17. Shirao M.K., Suzuki S., Kobayashi J., Nakazawa H., Mochizuki E. Analysis of creatinine, vanilmandelic acid, homovanillic acid and uric acid in urine by micellar electrokinetic chromatography// J. Chromatogr. B. 1997. V. 693. P. 463 – 467.

18. 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

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, тел. (812) 716 21 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

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