

УДК 543.545

© В. А. Казаков, М. Н. Сляднев, А. А. Сидорова,
А. А. Карцова, А. А. Ганеев, Л. Н. Москвин

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Работа посвящена оптимизации условий осуществления процессов в гибридной схеме анализа — капиллярный электрофорез с детектированием методом масс-спектрометрии с электроспрейионизацией (КЭ-ЭСИ-МС) применительно к определению катехоламинов. Исследованы физико-химические процессы электрофоретического разделения и ионизации в электроспрей-интерфейсе масс-спектрометра на примере определения катехоламинов. Выбран оптимальный рабочий буферный раствор для разделения аналитов методом капиллярного электрофореза и масс-спектрометрического детектирования, установлены оптимальные значения рабочих параметров камеры электроспрей-ионизации и масс-сепаратора. На модельной смеси продемонстрирована возможность определения катехоламинов при найденных оптимальных условиях.

ВВЕДЕНИЕ

К катехоламинам (КА) относится группа биогенных аминов, в молекулах которых содержится ядро катехола (1,2-дигидроксифенильное кольцо, называемое также пирокатехином). Наибольшее биологическое значение среди них имеют адреналин (эпинефрин), норадреналин (норэпинефрин), дофамин [1].

Катехоламины в организме человека являются гормонами надпочечников. Играя важную роль в деятельности центральной нервной системы, катехоламины являются активными участниками нервных процессов, регулируя кровяное давление и частоту пульса, а нарушение их обмена может стать причиной развития нервных и психических заболеваний. Определение содержания КА в биологических жидкостях (кровь и моча человека) имеет большое значение в практике клинической диагностики при установлении и лечении различных заболеваний [1].

Для определения КА в настоящее время обычно применяются спектроскопические [2] и флуориметрические [3] методы и ВЭЖХ с электрохимическим [4–7] или люминесцентным [8, 9] детектированием. Большинство из этих методов требует проведения многоступенчатых процессов пробоподготовки, включающих окисление или дериватизацию КА для перевода их в требуемую аналитическую форму, или использования сложного дорогостоящего оборудования, и при этом, как правило, не обеспечивается необходимое сочетание селективности и чувствительности.

В последнее время при анализе сложных биологических проб начинает использоваться метод

капиллярного электрофореза (КЭ), в том числе и при определении КА [10–16]. Метод КЭ имеет ряд достоинств по сравнению с другими гибридными методами, например, такими как ВЭЖХ. К этим достоинствам относятся: более высокая эффективность разделения (число теоретических тарелок на метр длины капилляра достигает в ряде случаев 10^6 – 10^7 теоретических тарелок/м [17]), малый расход проб и реагентов в процессе анализа, экспрессность и простота работы при относительной дешевизне оборудования.

Наиболее распространенным является вариант капиллярного электрофореза с УФ-детектированием (КЭ-УФ) [10, 11]. К недостаткам метода КЭ-УФ относятся довольно высокие пределы обнаружения и недостаточная селективность УФ-детектора, а также необходимость тщательной предварительной пробоподготовки. Пределы обнаружения метода КЭ-УФ для большинства соединений находятся в диапазоне 10^{-6} – 10^{-5} моль/дм³ и ограничены длиной оптического пути света в сечении капилляра (25–150 мкм).

Несмотря на высокую эффективность КЭ в идеальных условиях осуществления процесса разделения, при переходе к разделению компонентов биологических проб сложного состава с высоким фоновым содержанием солей и белков часто возникают сложности, связанные с трудностью достижения высокого разрешения пиков аналитов вплоть до их коэлюирования. К тому же при проведении предколоночной дериватизации определяемых компонентов еще одним фактором, ухудшающим аналитические параметры систем КЭ с неспецифичными детекторами, может стать неполное протекание дериватизации и образование

побочных продуктов, влияющих на аналитический сигнал аналитов.

Для решения многих проблем, возникающих при определении компонентов биологических проб, используется сочетание электрофоретических методов разделения с масс-спектрометрическим детектором (МС). Наиболее распространенным вариантом сочетания системы капиллярного электрофореза с блоком масс-спектрометрического детектирования является интерфейс с электроспрей-ионизацией (electrospray ionization, ESI) [18]. При использовании в качестве детектора масс-спектрометра с электроспрей-ионизацией (ESI-MS) компоненты пробы и рабочего буферного раствора образуют ионы, которые попадают в масс-анализатор, где происходит их разделение в зависимости от значения m/z и регистрация.

Известны три основных схемы реализации ESI-интерфейса для стыковки блока капиллярного электрофореза с масс-анализатором. Во-первых, это применение кварцевых капилляров с металлическим напылением на заостренный выходной конец капилляра, из которого происходит распыление [19]. Во-вторых, применение золотого или платинового проволоочного микроэлектрода, вставленного в выходной конец капилляра [20]. В-третьих, использование коаксиальной системы трех капилляров [21], о принципах функционирования которой далее будет сказано более подробно.

Единой теории, объясняющей сущность процессов, протекающих при электроспрей-ионизации нет, существуют лишь модельные представления. Механизмы процесса электрораспыления активно изучаются в настоящее время [22–27]. Электроспрей-ионизация — это распыление анализируемого раствора под действием кулоновских сил, при котором компоненты раствора сначала переводятся в аэрозоль, а потом в газообразное состояние. Для ускорения последней стадии процесса применяют легко испаряющиеся водные буферные растворы (например, ацетатный, формиатный, аммиачный) или водно-органические буферные смеси и используют нагретый до определенной температуры газ-испаритель (азот, аргон). Поток газа обеспечивает распыление потока жидкости и ее испарение с одновременной десольватацией ионов.

КЭ-ЭСИ-МС (CE-ESI-MS) в настоящее время является новым самостоятельным быстро развивающимся методом, характеризующимся высокой чувствительностью, возможностью работы с термолabile и неустойчивыми соединениями, а также возможностью анализа высокомолекулярных соединений. Метод представляет наибольший интерес при установлении структур полипептидов, белков, нуклеиновых кислот и других биологически важных веществ. Необходимо отметить, что ионы, образующиеся в условиях электроспрея,

обладают значительно меньшей внутренней энергией, чем, например, в случае бомбардировки быстрыми атомами. При оптимальных условиях осуществления процесса ионизации практически отсутствует эффект фрагментации, и соответственно масс-спектр легко поддается расшифровке, поскольку в этом случае он представляет собой набор пиков, обусловленных молекулярными ионами компонентов введенной пробы [18].

Настоящая работа посвящена оптимизации условий осуществления аналитических процессов в методе КЭ-ЭСИ-МС применительно к определению катехоламинов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворы и реактивы

Концентрированные растворы адреналина, норадреналина и дофамина с концентрацией аналитов 1 г/дм^3 готовили растворением точной навески соответствующего катехоламина-гидрохлорида ("Fluka", ФРГ) в 10^{-1} М растворе соляной кислоты. Растворы КА хранили в холодильнике при температуре около 0°C и использовали в течение месяца. Рабочие растворы катехоламинов готовили перед проведением измерений разбавлением соответствующих концентрированных растворов 10^{-3} М раствором уксусной кислоты. Концентрации КА в рабочих растворах при поиске оптимальных условий их определения находились в диапазоне от 0.1 до 20.0 мг/дм^3 . Раствор хинина сульфата дигидрата ("Fluka", ФРГ) концентрации 1 г/дм^3 готовили растворением его точной навески в воде. Все остальные реактивы (ледяная уксусная кислота, диэтиламин солянокислый, 25 % водный раствор аммиака, изопропиловый и метиловый спирт) были отечественного производства качества не ниже "х. ч.". Все растворы готовили при использовании бидистиллированной воды.

Перед употреблением растворы фильтровали через мембранные дисковые фильтры ФМ АЦ-1,2 с диаметром пор $\sim 1.2 \text{ мкм}$ и дегазировали под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом, в течение 15 минут.

Приборы

В работе был использован прибор капиллярного электрофореза "CE-ESI-MS 1100 HP" ("Agilent Technologies", США). Прибор включает систему капиллярного электрофореза с УФ-детектированием, камеру электроспрейера и квадрупольный масс-спектрометр. Схема реализации электроспрей-интерфейса для стыковки блоков КЭ и масс-спектрометрического детектирования с использованием коаксиальной системы трех капилляров (внешней металлической иглы, средней металли-

ческой иглы и кварцевого капилляра) подробно описана в работе [21]. В эту систему, расположенную в камере электроспрейера, по внешней металлической игле из камеры нагревания вводится поток газа-испарителя (азот, скорость потока 1–10 л/мин, давление 7–400 кПа, температура 25–350 °С) для распыления и испарения анализируемого раствора. По средней металлической игле подается поток обволакивающей жидкости (скорость потока 2–8 мкл/мин, давление 2–8 МПа) для обеспечения электрического контакта между этой иглой и рабочим буферным раствором, вытекающим из кварцевого капилляра. Для создания потока обволакивающей жидкости применяется жидкостной насос высокого давления, аналогичный применяемым в ВЭЖХ, с системой тройников-делителей потоков (деление начального потока 100:1). Разность потенциалов электрофоретического разделения (15–27 кВ) подается на концы кварцевого капилляра, причем "горячим" анодом служит входной конец капилляра, в который подается проба. К средней игле прикладывается нулевой потенциал, а к противоэлектроду масс-спектрометра потенциал отрицательной полярности (2–4.5 кВ) для детектирования положительных ионов [21]. Ионы анализируемого вещества за счет перепада давлений и ионного дрейфа в газовой фазе (давление 1 атм) попадают в камеру фрагментатора (10^{-2} Torr), где подвергаются дополнительной десольватации электронным ударом и могут быть фрагментированы (энергия электронов до 100 эВ), а затем после разделения в камере квадруполь (10^{-5} Torr) регистрируются с помощью вторичного электронного умножителя (ВЭУ). [28]

В работе были использованы кварцевые капилляры с защитным полимерным покрытием с внутренним диаметром 50 мкм (внешний диаметр 375 мкм) общей длиной 80 см, что соответствовало эффективной длине капилляра до зоны масс-спектрометрического детектирования. Защитное полимерное покрытие капилляра в зоне УФ-детектора и с концов капилляра удалялось. Для отбора и хранения проб и рабочих растворов использовались полипропиленовые сосуды с крышками ("Agilent Technologies", США) вместимостью 1 см³.

Новые капилляры перед проведением измерений кондиционировались последовательным пропусканием через них в течение 15 мин 1 М NaOH, воды, 1 М HCl, и снова воды, а затем промывались ведущим электролитом 20 мин. Перед каждым анализом проводили очистку внутренней поверхности кварцевого капилляра последовательным пропусканием через него разбавленного раствора аммиака (1:10), воды и раствора ведущего электролита в течение 5–10 мин на каждый раствор.

Проверка масс-спектрометрического детектора проводилась по тестовому раствору хинина сульфата

дигидрата в воде (1 г/дм³). При записи аналитического сигнала хинин регистрировался в форме положительно заряженного молекулярного иона $m/z = 325$. Проверку проводили по стандартной методике тестирования прибора, изложенной в руководстве по эксплуатации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий разделения катехоламинов методом КЭ

Адреналин, норадреналин и дофамин являются по своему строению амфолитами и в зависимости от кислотности среды могут существовать в растворе в виде катионов, нейтральных соединений или анионов. Исходя из значений констант кислотной диссоциации КА по различным функциональным группам [29], при pH буферного раствора меньше 7 катехоламины существуют в нем в виде однозаряженных катионов (происходит протонирование азота в молекулах катехоламинов), а при pH больше 11 — в виде анионов (депротонирование гидроксогрупп). При определении КА методом КЭ-УФ обычно применяют боратный буферный раствор (pH = 9.18) [10, 12, 13]. Для определения КА методом КЭ-ЭСИ-МС используют ацетатно-аммиачную буферную смесь (pH = 4–5) [14, 15] или 1 % водный раствор уксусной кислоты (pH = 2.8) [15]. Катехоламины соответственно определяют в форме положительно заряженных молекулярных ионов.

Из литературных данных были выбраны начальные условия электрофоретического разделения КА. Разность потенциалов, приложенная к концам кварцевого капилляра, при разделении модельных смесей КА составляла во всех случаях величину порядка 27 кВ и была максимально возможной для данной модификации прибора. Выбор максимально возможного приложенного напряжения вызван стремлением к повышению эффективности разделения компонентов пробы и экспрессности анализа в целом. Эффективная длина кварцевого капилляра при УФ-детектировании составляла во всех случаях 21.5 см, что обусловлено техническими особенностями прибора. Рабочая длина волны УФ-детектора при проведении всех измерений была выбрана 200 нм, что соответствует длине волны максимума поглощения КА.

Первым этапом работы явился выбор состава и концентрации ведущего электролита. С целью оптимизации условий разделения КА (адреналин, норадреналин, дофамин) методом КЭ были проведены эксперименты при различных составах буферных растворов (табл. 1). При использовании щелочных буферных растворов в их состав вводилась добавка антиоксиданта (сульфит натрия).

Табл. 1. Разрешение пиков КА (адреналина и норадреналина) при различных составах раствора ведущего электролита

Состав раствора ведущего электролита	Диапазон рабочих концентраций буферного раствора	pH	Rs (NA-A) при эффективной длине капилляра $L_{(эф.)} = 21.5$ см
Ацетатно-аммонийный буферный р-р, антиоксидант 3–5 мМ Na ₂ SO ₃	10–100 мМ / дм ³	9.25	0.7–0.9*
Ацетатно-аммонийный буферный р-р с 20 % добавкой изопропилового спирта, антиоксидант 3–5 мМ Na ₂ SO ₃	10–100 мМ / дм ³	9.25	0.5–0.7*
Ацетатно-аммонийный буферный р-р, 3 мМ диэтиламин гидрохлорид	25–100 мМ / дм ³	4–4.5	0.6–0.7*
1 % раствор уксусной кислоты	—	2.8	> 0.5

* Диапазон значений Rs(NA-A) соответствует диапазону рабочих концентраций буферного раствора ведущего электролита.

В ацетатно-аммонийный буферный раствор с pH = 4–4.5 дополнительно вводился диэтиламин гидрохлорид с целью экранирования поверхностного заряда стенок кварцевого капилляра [10]. Выбор составов был обусловлен прежде всего "летучестью" буферной смеси с ориентацией на дальнейшее применение масс-спектрометрического детектора с электроспрей-ионизацией. В качестве критерия оптимизации было выбрано разрешение пиков норадреналина и адреналина Rs(NA-A) на полученных электрофореграммах.

Разрешение пиков компонентов пробы рассчитывали по формуле, применяемой в хроматографии [30]

$$R_s = \frac{2 \cdot (T_2 - T_1)}{W_1 + W_2}, \quad (1)$$

где T_1 , T_2 — времена удерживания двух соседних компонентов пробы на электрофореграмме, с; W_1 , W_2 — ширины пиков компонентов пробы (норадреналина и адреналина) у их оснований на электрофореграмме, с.

На рис. 1 представлены электрофореграммы разделения компонентов пробы в ацетатно-аммонийном буферном растворе при различных значениях pH. Видно, что пики аналитов разделяются как при использовании кислого, так и щелочного ацетатно-аммонийного буферного

раствора, причем при pH = 9.25 наблюдается несколько лучшее разрешение. Однако время выхода пиков КА при pH = 9.25 увеличивается в 1.5 раза по сравнению с временем выхода при pH = 4.0–4.5, что отрицательно сказывается на экспрессности анализа. Кроме того, КА неустойчивы в щелочной среде и окисляются кислородом воздуха, поэтому при работе с щелочными буферными растворами в них необходимо добавлять антиоксиданты (сульфит натрия, аскорбиновая кислота) [10, 12, 13]. В предварительных экспериментах было замечено, что введение таких добавок приводит к уменьшению интенсивности аналитического сигнала масс-спектрометрического детектора за счет снижения эффективности ионизации из-за низкой "летучести" растворов с добавками антиоксидантов, а также к загрязнению камеры электроспрейера за счет образования на ее стенках солевого налета. Для увеличения "летучести" ацетатно-аммонийного щелочного буферного раствора и уменьшения загрязнения прибора добавляли изопропиловый спирт. При этом заметно увеличивается время выхода компонентов пробы за счет увеличения вязкости раствора ведущего электролита и происходит уширение пиков аналитических сигналов, что приводит к ухудшению разделения компонентов пробы (табл. 1). В итоге использование щелочных буферных смесей было признано нерациональным.

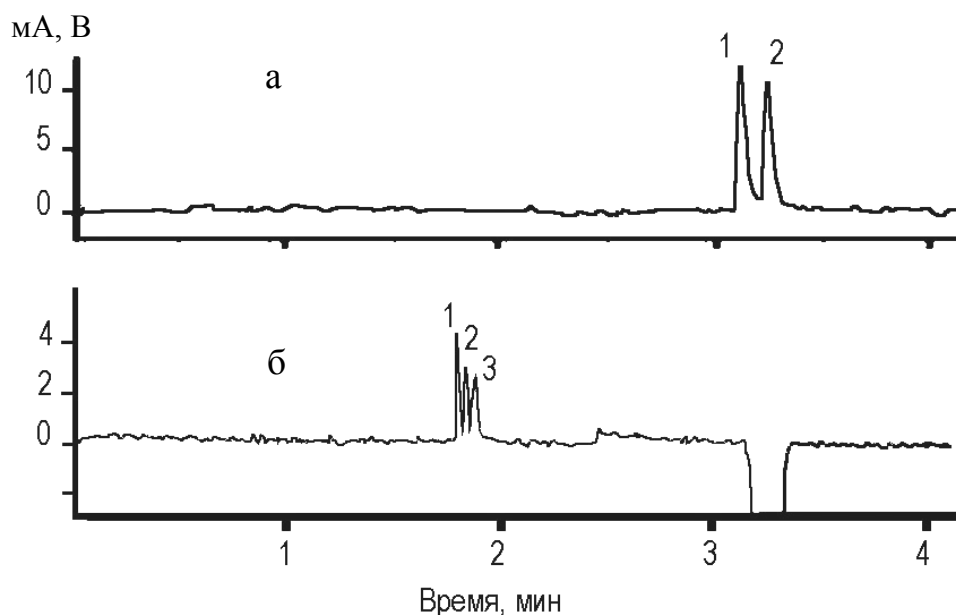


Рис. 1. Электрофореграммы разделения смеси катехоламинов.

а — ведущий электролит: 100 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор ($\text{pH} = 9.25$), 3 мМ сульфит натрия; капилляр: внутренний диаметр 50 мкм, $L_{(\text{эф.})} / L_{(\text{общ.})} = 21.5 \text{ см} / 80 \text{ см}$; гидродинамический ввод пробы (500 мбар·с); приложенное напряжение 27 кВ (сила тока 23.5 мкА); $\lambda = 200 \text{ нм}$; проба: модельный раствор катехоламинов в растворе ведущего электролита (концентрация каждого компонента равна 5 мг/дм³); порядок выхода катехоламинов на электрофореграмме: 1 — норадреналин, 2 — адреналин

б — ведущий электролит: 50 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор ($\text{pH} = 4.2$), 3 мМ диэтиламин гидрохлорид; капилляр: внутренний диаметр 50 мкм, $L_{(\text{эф.})} / L_{(\text{общ.})} = 21.5 \text{ см} / 80 \text{ см}$; гидродинамический ввод пробы (500 мбар·с); приложенное напряжение 27 кВ (сила тока 10.5 мкА); $\lambda = 200 \text{ нм}$; проба: модельный раствор катехоламинов в 10⁻³ М растворе уксусной кислоты (концентрация каждого компонента равна 1 мг/дм³); порядок выхода катехоламинов на электрофореграмме: 1 — дофамин, 2 — норадреналин, 3 — адреналин

При переходе к 1 % водному раствору уксусной кислоты, который иногда используется в качестве ведущего электролита [15], не происходит полного разделения компонентов пробы в выбранных условиях электрофореза даже при эффективной длине кварцевого капилляра порядка 80 см.

Уширение пиков на электрофореграммах может быть связано с несколькими причинами: стеночная адсорбция компонентов пробы, температурный градиент внутри капилляра, перегрузка системы по массе и объему и др. [17]. Для уменьшения влияния стеночной адсорбции, которая вносит наиболее существенный вклад в размывание пиков, повышали концентрацию ведущего электролита (до 100 мМ / дм³). Как уже отмечалось,

для экранирования поверхностного заряда стенок кварцевого капилляра производили добавку диэтиламина солянокислого в пробу и в раствор ведущего электролита при значении $\text{pH} = 4\text{--}4.5$ [11].

Эффективность разделения компонентов пробы при использовании ацетатно-аммонийного буферного раствора с $\text{pH} = 4\text{--}4.5$ была признана удовлетворительной, принимая во внимание небольшую эффективную длину кварцевого капилляра до зоны УФ-детектирования. При этом не возникало нежелательных осложнений, как при использовании щелочных буферных растворов. В качестве оптимального был выбран 50 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор ($\text{pH} = 4.2$) с добавкой диэтиламина солянокислого (3 мМ).

Оптимизация условий детектирования катехоламинов методом ЭСИ-МС

Выбор оптимальных условий ЭСИ-МС-детектирования катехоламинов включал оптимизацию режима работы камеры электроспрейера и камеры фрагментатора. В процессе оптимизации работы камеры электроспрейера подбирались: температурный режим электрораспыления, приложенное напряжение между средней иглой коаксиальной системы и противозлектродом масс-анализатора, а также скорости потоков обволакивающей жидкости и газа-испарителя (азот), подаваемого из нагревательной камеры под давлением. Критерием оптимизации служили регистрируемые масс-спектрометрическим детектором аналитические сигналы, которые при прочих равных условиях должны были быть максимальными. Также был оптимизирован состав обволакивающей жидкости. Составы применяемого в КЭ буферного раствора и обволакивающей жидкости играют определяющую роль в процессах распыления, и при малейшем их изменении требуется тонкая настройка режима работы спрейера.

В качестве обволакивающей жидкости при определении КА методом КЭ-МС используют водно-органические растворы уксусной кислоты [14, 15]. В качестве органических растворителей используют 2-пропанол, этанол, метанол или ацетонитрил. Выбор обусловлен в первую очередь их низкой температурой кипения и низкой температурой кипения соответствующих водно-органических смесей. Как видно из рис. 2, при использовании изопропилового спирта отношение сигнал/шум масс-спектрометрического детектора значительно выше, чем при использовании метанола и других растворителей, дающих аналогичные метанолу соотношения, что согласуется с данными работы [14]. Варьируя состав водно-органической смеси и концентрацию в ней уксусной кислоты (табл. 2), в качестве оптимального состава выбрали 0.5 % уксусной кислоты в 50 % водно-спиртовой смеси.

Скорость потока обволакивающей жидкости изменяли от 2 до 6 мкл/мин. Исходя из стабильности аналитического сигнала, в качестве оптимальной скорости жидкостного потока было выбрано 4 мкл/мин.

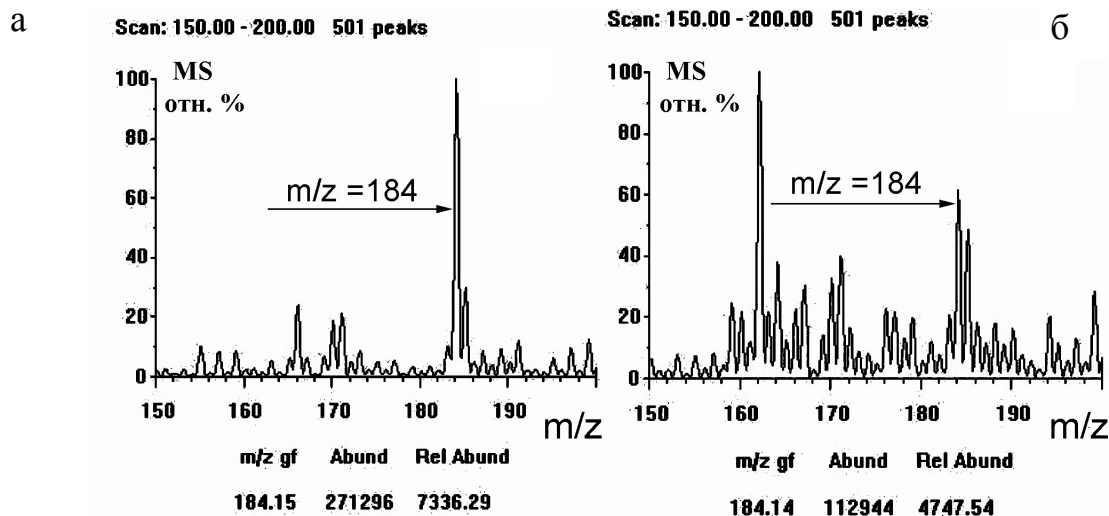


Рис. 2. Влияние состава обволакивающей жидкости на величину аналитического сигнала масс-спектрометрического детектора при прямом распылении пробы (раствор адреналина в 1% уксусной кислоте ($C = 1 \text{ мг/дм}^3$)) в масс-спектрометр из кварцевого капилляра под давлением 1 атм. Состав обволакивающей жидкости в электроспрейере: а — 0.5 % раствор уксусной кислоты в водно-изопропанольном растворе (отношение объемов = 50:50); б — 0.5 % раствор уксусной кислоты в водно-метанольном растворе (отношение объемов = 50:50). Скорость потока обволакивающей жидкости 4 мкл/мин. Скорость потока газа-испарителя (азот, $T = 150 \text{ }^\circ\text{C}$) — 6 л/мин при давлении 35 кПа

Табл. 2. Влияние состава обволакивающей жидкости на величину аналитического сигнала масс-спектрометрического детектора (имп.)

Состав обволакивающей жидкости	Адреналин* ($C = 1 \text{ мг / дм}^3$)	Норадреналин* ($C = 1 \text{ мг / дм}^3$)
Объемная доля 2 – пропанола, % / Объемная доля уксусной кислоты, %		
25 % / 0.5 %	$1.9 \cdot 10^5$	$0.9 \cdot 10^5$
50 % / 0.5 %	$2.7 \cdot 10^5$	$1.3 \cdot 10^5$
70 % / 0.5 %	$2.7 \cdot 10^5$	$1.3 \cdot 10^5$
50 % / 1 %	$2.6 \cdot 10^5$	$1.4 \cdot 10^5$

* Прямое распыление пробы в масс-спектрометр из кварцевого капилляра при давлении 1 атм.

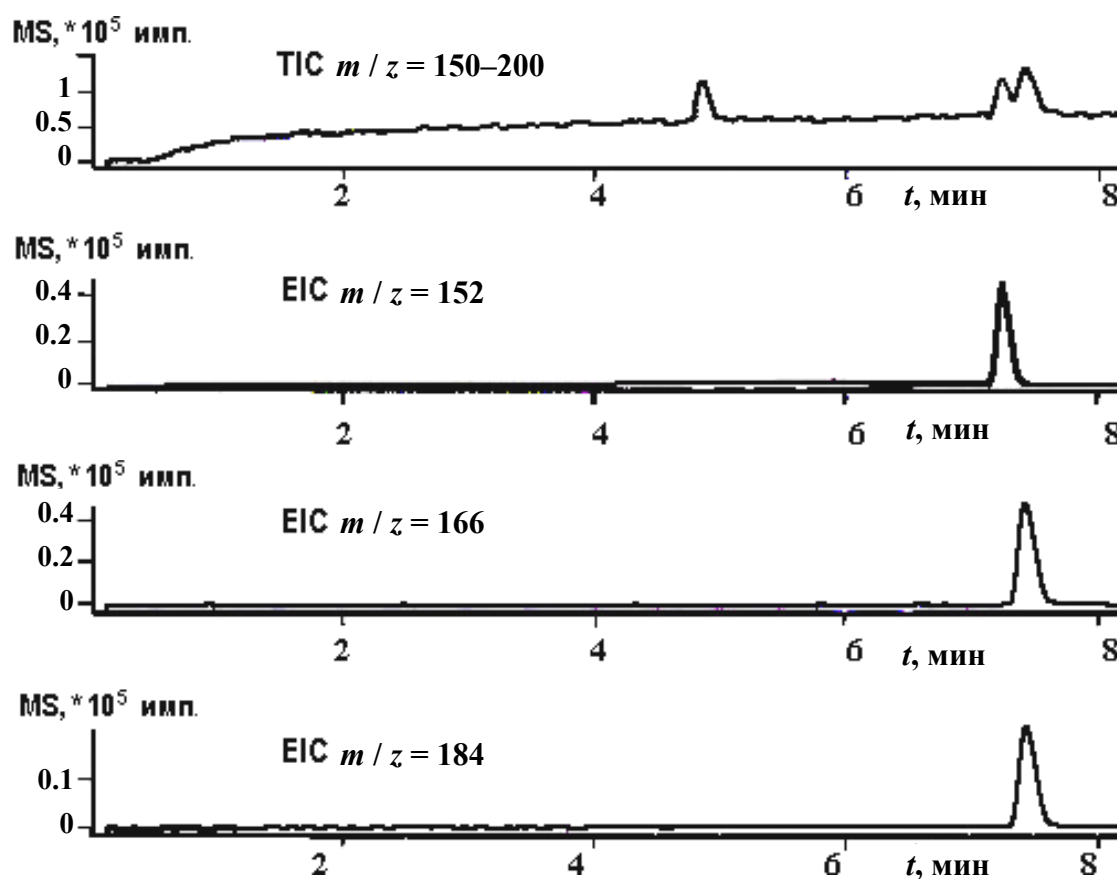


Рис. 3. Эффект фрагментации электронным ударом молекул катехоламинов (адреналин, норадреналин) в камере фрагментатора при энергии электронов 70 эВ (температура газа-испарителя 150 °С). Величина сигнала полного ионного тока (а) (диапазон регистрации масс ионов 150–200 m/z), ионного тока по выбранной величине m/z (б, в, г) в зависимости от времени

Для успешной реализации процесса электро-распыления прикладывали напряжение между средней иглой коаксиальной системы спрейера и противозлектродом масс-спектрометра порядка 4.5 кВ. В качестве газа-испарителя использовали азот. Рабочее давление азота составляло порядка 35 кПа. Температуру газа-испарителя изменяли в широких пределах от 100 °С до 300 °С. В случае увеличения температуры газа выше 200 °С при рабочей скорости газового потока 3–7 дм³/мин был замечен эффект фрагментации молекул катехоламинов. При этом компоненты пробы регистрируются МС-детектором как в форме положительно заряженных молекулярных ионов ($m/z = 170$ (норадреналин), $m/z = 184$ (адреналин)), так и в форме дегидратированных фрагментов ($m/z = 152$ (норадреналин), $m/z = 166$ (адреналин)). Термическая

фрагментация ионов отрицательно сказывается на чувствительности определения, т. к. аналит одновременно находится в виде нескольких ионных форм. Оптимальными были выбраны температура азота $T = 100\text{--}150$ °С и скорость потока 5 дм³/мин, при которых практически не наблюдалась термическая фрагментация.

Фрагментация молекул КА под воздействием электронного удара также отрицательно сказывалась на чувствительности определения аналитов. На рис. 3 приведены значения величин сигнала МС-детектора: полного ионного тока (TIC) — а; ионного тока по выбранной с помощью программы обработки результатов величине m/z (EIC) — б, в и г — в зависимости от времени. Как видно из рис. 3, при энергии электронов порядка 70 эВ норадреналин не регистрировался МС-детектором

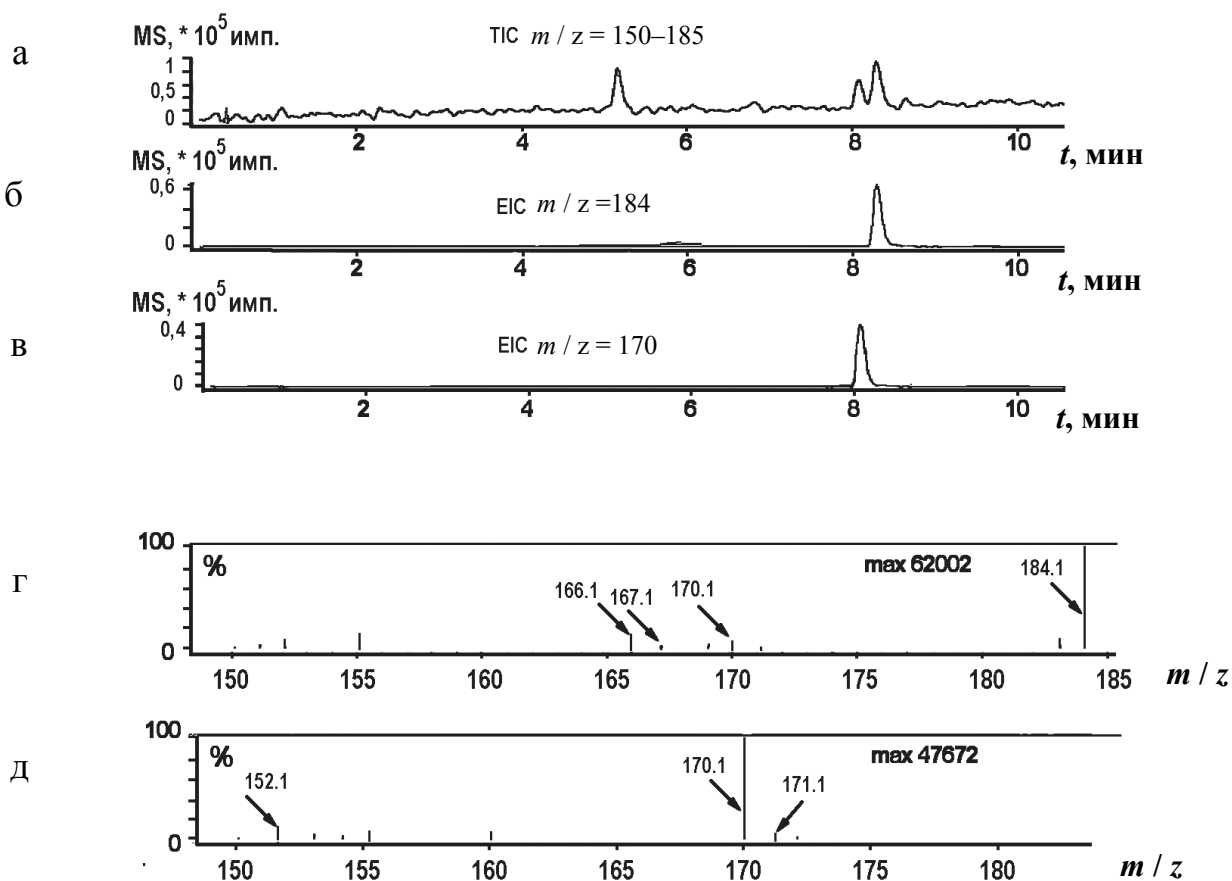


Рис. 4. Определение КА в сканирующем режиме работы МС-детектора (SCAN). Проба — модельный раствор адреналина ($m = 183$ а.е.м.) и норадреналина ($m = 169$ а.е.м.) в 10^{-3} М уксусной кислоте (концентрация каждого компонента 20 мг/дм³). а — величина сигнала общего ионного тока; б, в — ионного тока по выбранной величине m/z ; г, д — масс-спектры, полученные во время регистрации максимумов пиков аналитических сигналов выбранных ионов

в форме молекулярного иона ($m/z = 170$) и практически полностью фрагментировался до иона с $m/z = 152$, а адреналин, хотя и регистрировался в виде молекулярного иона ($m/z = 184$), преимущественно находился в форме дегидратированного фрагмента ($m/z = 166$). При энергии электронов свыше 70 эВ адреналин и норадреналин практически не регистрировались в форме положительно заряженных молекулярных ионов. Было замечено, что при этом начинают наблюдаться эффекты дальнейшего расщепления дегидратированных фрагментов. Эффект фрагментации уменьшался при снижении энергии электронов, однако при энергиях ниже 30 эВ не происходила десольватация аналитов, что вызывало резкое снижение аналитического сигнала детектора. На основании проведенной оптимизации аналитического сигнала (по массам молекулярных ионов $m/z = 184, 170$) оптимальной для дальнейших исследований была выбрана энергия электронов порядка 50 эВ, при которой степень фрагментации КА в камере фрагментатора была воспроизводимой величиной и составляла около 10 % от общей концентрации аналитов.

Проверка разработанной методики определения КА методом КЭ-ЭСИ-МС

Масс-спектрометрический детектор может работать в нескольких режимах: в режиме полного сканирования (SCAN) в выбранном диапазоне m/z (рис. 4) и в режиме выбранного иона (SIM) (рис. 5), когда в каждый заданный момент времени происходит накопление сигналов только для ионов с определенным значением m/z . В последнем случае важным становится полное разделение аналитов в кварцевом капилляре перед их распылением в масс-спектрометр. Только при этом условии, зная времена миграции каждого компонента пробы, можно, работая в SIM-режиме, получить аналитические сигналы масс-спектрометрического детектора для каждого компонента пробы. Работа в SIM-режиме масс-спектрометрического детектора позволяет повысить чувствительность определения в несколько раз. Критерием при выборе режима работы масс-спектрометра (SIM или SCAN) в общем случае является полнота разделения компонентов пробы. Поэтому при определении веществ, которые близки по своему строению и их полного разделения в многокомпонентной смеси достичь не всегда удастся, более привлекательно применение масс-спектрометра в SCAN-режиме работы, чтобы устранить влияние неопределенности времени миграции аналитов на результаты анализа, а при полном разделении аналитов предпочтительным будет SIM-режим. С целью оптимизации условий определения КА был проведен

сравнительный анализ аналитических характеристик масс-спектрометрического детектора при работе в различных режимах. На рис. 4 приведен общий вид сигнала MS-детектора при заданном диапазоне сканирования по массам ($m/z = 150-185$) — величина полного ионного тока (TIC) в зависимости от времени (рис. 4, а). Размах диапазона сканирования задавался с помощью программы управления масс-спектрометром и был выбран с учетом возможности регистрации не только молекулярных ионов аналитов (адреналин и норадреналин), но и их дегидратированных фрагментов. Также на этом рисунке показаны аналитические сигналы компонентов пробы (EIC), выделенные из общего с помощью программы обработки результатов (рис. 4, б, в), и масс-спектры в заданном диапазоне m/z , определенном из рис. 4, б, в (соответственно рис. 4, г, д). Как видно из анализа масс-спектров, степень дегидратации аналитов в камере масс-спектрометра незначительна и КА регистрируются в форме молекулярных ионов.

На рис. 5 представлен общий вид аналитического сигнала MS-детектора при работе в SIM-режиме, а также аналитические сигналы отдельных КА (рис. 5, а и б), выделенные из общего с помощью программы обработки результатов. При таком режиме работы масс-спектрометр до определенного момента времени ($t = 8.6$ мин) регистрировал только наличие ионов с заданной величиной $m/z = 170$ (норадреналин), а затем — с заданной величиной $m/z = 184$ (адреналин). Автоматическое время переключения масс-спектрометра из одного режима регистрации в другой устанавливалось на основании предварительного определения времен миграции КА при проведении серии измерений в сканирующем режиме работы детектора. Воспроизводимость времен миграции аналитов при серийном анализе и их разделение зависят в первую очередь от качества поверхности кварцевого капилляра. С целью повышения воспроизводимости перед проведением каждого анализа проводили процедуру кондиционирования (очистки) капилляра. При этом изменение времен миграции аналитов в ходе проведения серии измерений ($N = 5$) составляло 3 %. Как видно из рис. 5, чувствительность MS-детектирования при работе в SIM-режиме выше в 3 раза, однако при этом важным становится полное разделение аналитов в кварцевом капилляре перед их распылением в масс-спектрометр — только в этом случае можно, работая в SIM-режиме и зная времена миграции каждого компонента пробы, получить максимальные аналитические сигналы масс-спектрометрического детектора для каждого компонента пробы.

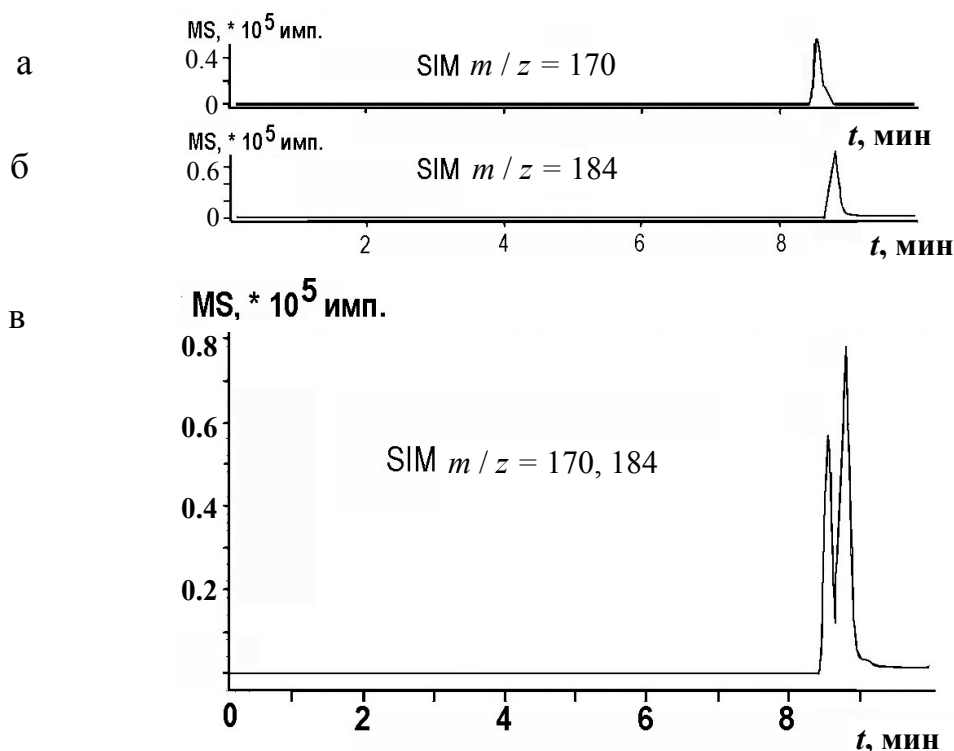


Рис. 5. Определение КА при работе MS-детектора в режиме выбранного иона (SIM). Режим регистрации MS-сигнала: а — SIM 170 m/z (время регистрации сигнала от 0 мин до 8.6 мин); б — SIM 184 m/z (время регистрации сигнала от 8.6 мин до конца анализа). Общий вид аналитического сигнала (SIM 170, 184 m/z) приведен на нижнем графике (в). Проба: модельный раствор адреналина ($m = 183$ а.е.м.) и норадреналина ($m = 169$ а.е.м.) в 10^{-3} М уксусной кислоте (концентрация каждого компонента 10 мг/дм³)

ВЫВОДЫ

Значения аналитических характеристик разработанной методики при различных режимах работы MS-детектора приведены в табл. 3. Достигнутые пределы обнаружения метода КЭ-ЭСИ-МС при определении КА сравнимы с данными работ [14, 15], а линейный диапазон определяемых концентраций (табл. 3) соответствует содержанию КА в образцах, полученных из проб мочи после пробоподготовки с помощью твердофазной экстракции [7, 11, 15, 16], что позволяет рекомендовать данную методику для решения задач клинической диагностики. Дальнейшим развитием метода КЭ-ЭСИ-МС с ориентацией разработанных на его принципах методик на проведение массовых биохимических анализов может явиться сочетание ЭСИ-МС-детектирования с микроchipовым КЭ-разделением [31].

1. В результате исследования процессов электрофоретического разделения и ионизации катехоламинов в камере электроспрейера найдены оптимальные условия их определения методом КЭ-ЭСИ-МС. Экспериментально выбраны оптимальный состав ведущего электролита и режим работы камеры электроспрей-ионизации: состав обволакивающей жидкости (0.5 % раствор уксусной кислоты в водно-изопропанольном растворе (объемное отношение = 50:50)), рабочие скорости потоков газа-испарителя и обволакивающей жидкости (которые составили соответственно 5 л/мин и 4 мкл/мин), температура газа-испарителя ($T = 100-150$ °С), при которой на результаты измерений не влияют процессы термической фрагментации аналитов.

Табл. 3. Значения аналитических характеристик определения КА методом КЭ-ЭСИ-МС при различных режимах работы МС-детектора

Определяемые компоненты пробы	Линейный диапазон определяемых концентраций, мг/дм ³	Характеристики погрешности определения при доверительной вероятности $P = 0.95$ ($N = 5$)		Пределы обнаружения МС-детектора*, мг/дм ³	Пределы обнаружения МС-детектора**, моль
		Случайная сост. погрешности, $\pm\sigma(\delta)$, %	Систематич. сост. погрешности, $\pm\delta_c$, %		
Адреналин	0.10–20.00 (SIM), 0.20–20.00 (SCAN)	6	4	0.05 (SIM), 0.13 (SCAN)	$2.4 \cdot 10^{-15}$ (SIM), $6.4 \cdot 10^{-15}$ (SCAN)
Норадреналин	0.15–20.00 (SIM), 0.50–20.00 (SCAN)	6	4	0.10 (SIM), 0.30 (SCAN)	$5.3 \cdot 10^{-15}$ (SIM), $1.59 \cdot 10^{-14}$ (SCAN)

Примечание. * — пределы обнаружения при соотношении сигнал / шум = 3:1.

** — ввод пробы давлением, 250 мбар·с, объем пробы 9 нл (расчет объема пробы на основе закона Хагена—Пуазейля [17]).

Оптимизирован режим работы камеры фрагментатора масс-спектрометра (энергия электронов 50 эВ), при котором процессы фрагментации молекул под действием электронного удара сведены к минимуму.

2. Методика КЭ-ЭСИ-МС-определения КА в оптимизированных условиях испытана на модельной смеси аналитов. Проведен сравнительный анализ возможностей методики при различных режимах работы МС-детектора и установлены ее аналитические характеристики. Пределы обнаружения методики при различных режимах работы детектора составили 0.05–0.13 мг/дм³ (адреналин) и 0.10–0.30 мг/дм³ (норадреналин) и являются достаточными для определения КА в моче человека после проведения соответствующей пробоподготовки, например твердофазной экстракции.

Благодарности. Авторы работы приносят благодарности ООО «Центр коллективного пользова-

ния "Аналитическая спектрометрия"» в лице директора Поповой В.А. за предоставленное для работы оборудование и систему "Agilent" CE-ESI-MS HP1100.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Розен В.Б. Основы эндокринологии. М.: Изд-во МГУ, 1994. 384 с.
2. Camanas R.M.V. et al. // Anal. Lett. 1992. V. 25. P. 1425–1432.
3. Canizares P., Luque de Castro M.D. // Anal. Chim. Acta. 1995. V. 317. P. 335–346.
4. Cao G.M., Hoshino T. // Anal. Sci. 1996. V. 12. P. 183–193.
5. Coquest A. et al. // Fresenius J. Anal. Chem. 1991. V. 339. P. 475–481.
6. Backer B.L. et al. // Anal. Chim. Acta. 1993. V. 273, N 1-2. P. 449–457.

7. Talnar D. *et al.* // J. Chrom. B. 2002. V. 769. P. 341–349.
8. Higashidate S., Imai K. // Analyst. 1992. V. 117. P. 1863–1868.
9. Nohta H., Jeon H.K., Kai M., Ohkura Y. // Anal. Sci. 1993. N 9. P. 53–59.
10. Britz-McKibbin P., Chen D.D.Y. // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 1242–1252.
11. Vuorensola K. *et al.* // J. Chrom. A. 2000. V. 895. P. 317–327.
12. Robert F., Bert L., Denoroy L., Renaud B. // Anal. Chem. 1995. V. 67. P. 1838–1844.
13. Waldron K.C. *et al.* // J. Chrom. B. 1998. V. 714. P. 47–57.
14. Vuorensola K. *et al.* // Elektrophoresis. 2001. V. 22. P. 4347–4354.
15. Peterson Z.D. *et al.* // J. Chrom. B. 2002. V. 776. P. 221–229.
16. Siren H., Karjalainen U. // J. Chrom. A. 1999. V. 853. P. 527–533.
17. Практическое руководство по капиллярному электрофорезу / Под ред. А.М. Волощука. М.: РАН, 1996. 231 с.
18. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: ЮНИМЕДИАСТАЙЛ, 2003. 493 с.
19. Wahl J.H., Smith J. // J. Cap. Elec. 1994. N 1. P. 62–67.
20. Fang L. *et al.* // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 3696–3702.
21. Banks J.F. // J. Chrom. A. 1995. V. 712. P. 245–252.
22. Christie G., Enke C.G. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 4885–4893.
23. Foret F., Thompson T.J., Vouors P., Karger B.L. // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 4450–4458.
24. Gaskell S.J. // J. Mass Spectrom. 1997. V. 32. P. 677–682.
25. Gamero-Castano M., Fernandes de la Mora J. // J. Mass Spectrom. 2000. V. 35. P. 790–796.
26. Fernandes de la Mora J. *et al.* // J. Mass Spectrom. 2000. V. 35. P. 939–947.
27. Applied electrospray mass spectrometry / Ed. by B.N. Pramanik, A.K. Ganguly, M.L. Gross. Marcel Dekker Inc., 2002. 464 p.
28. Peri-Okonny U.L. *et al.* // Elektrophoresis. 2003. N 24. P. 139–150.
29. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика (перевод с англ.). М.: Мир, 1991. 544 с.
30. Основы аналитической химии (в 2 т.) / Под ред. А.Ю. Золотова. М.: Высшая школа, 2000. Том 1, 282 с.
31. Andrew J. de Mello // Lab on a Chip. 2001. N 1. P. 7N–12N.

Санкт-Петербургский государственный университет (Казаков В.А., Сляднев М.Н., Сидорова А.А., Карцова А.А., Ганеев А.А., Москвин Л.Н.)

НПФ АП "Люмэкс" (Казаков В.А., Сляднев М.Н., Ганеев А.А.)

Материал поступил в редакцию 27.11.2003.

OPTIMIZATION OF ANALYTICAL CONDITIONS FOR CATECHOLAMINES DETERMINATION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY DETECTION

**V. A. Kazakov^{1,2}, M. N. Slyadnev^{1,2}, A. A. Sidorova¹,
A. A. Kartsova¹, A. A. Ganeev^{1,2}, L. N. Moskvina¹**

¹*St. Petersburg State University*

²*Lumex Ltd.*

This paper deals with optimization of analytical processes in a hyphenated system of capillary electrophoresis – quadrupole mass spectrometer with electrospray ionization (CE-ESI-MS) applied to determination of catecholamines (CA). Conditions of electrophoretic separation and electrospray ionization of model CA mixtures were studied. Optimal buffer composition for CE separation and ESI-MS detection conditions were obtained both for the electrospray chamber and mass analyzer. Determination of CA using the model mixture under optimal analytical conditions was demonstrated.