Сорбционно-спектрофотометрическое определение катехоламинов в моче и плазме крови

с использованием сверхсшитого полистирола и наностержней золота

М. В. Горбунова, к. х. н.¹, В. В. Толмачева, к. х. н.¹,
В. В. Аяри, д. х. н.^{1,2}

УДК 543.06, 543.422.3, 543.645.9, 543.544.53

Исследована возможность сочетания твердофазной экстракции природных катехоламинов (адреналина, норадреналина и дофамина) на микроколоне, заполненной сверхсшитым полистиролом, с их последующим спектрофотометрическим или твердофазно-спектроскопическим определением в элюате с использованием наностержней золота или их нанокмпозитов с пенополиуретаном. Изучена десорбция катехоламинов со сверхсшитого полистирола различными элюентами. Показано, что количественное элюирование всех трех катехоламинов достигается при использовании 6 М уксусной кислоты, которая в качестве элюента хорошо сочетается с предложенными вариантами определения. Описаны особенности динамического сорбционного извлечения катехоламинов из мочи и сыворотки крови. Оно позволяет снизить влияние компонентов матрицы и повысить чувствительность анализа за счет концентрирования. Средний коэффициент концентрирования составляет 10–56 при объемах пробы 10–300 мл. Разработанные способы дают возможность определять катехоламины в моче на уровне их нормального содержания.

Ключевые слова: сорбция, спектрофотометрия, наночастицы, катехоламины, анализ мочи

The possibility of combining solid-phase extraction of natural catecholamines (epinephrine, norepinephrine, and dopamine) on a microcolumn filled with hypercrosslinked polystyrene with their subsequent spectrophotometric or solid-phase spectroscopic determination in the eluate using gold nanorods or their nanocomposites with polyurethane foam was studied. The desorption of catecholamines from hypercrosslinked polystyrene by various eluents was examined. Quantitative elution of all three catecholamines is achieved using 6 M acetic acid. Moreover, this eluent is compatible with the indicated determination variants. The features of dynamic sorption of catecholamines from urine and blood serum are described. It allows to reduce the influence of matrix components and increase sensitivity of the analysis due to preconcentration. The average enrichment factor is 10–56 with sample volumes of 10–300 ml. The developed methods allow to determine catecholamines in urine at the level of their normal content.

Keywords: sorption, spectrophotometry, nanoparticles, catecholamines, urine analysis

Статья получена 21.05.2020

Принята к публикации 20.06.2020

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва.

² ayari@mail.ru.

Введение

Разработка чувствительных и экспрессных способов определения катехоламинов (КА) – задача весьма актуальная, поскольку эти вещества, будучи нейромедиаторами и гормонами, отвечают за регуляцию множества важных процессов в организме.

Своевременное обнаружение резкого изменения содержания катехоламинов в биологических жидкостях позволяет диагностировать различные заболевания на их начальных стадиях [1–6]. Основной проблемой при определении катехоламинов в биологических жидкостях является их низкое содержание (табл. 1), поэтому наиболее распространенные методики определения катехоламинов основаны на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для анализа же образцов, характеризующихся простым составом матрицы и высоким содержанием КА (медицинские препараты), чаще всего применяют более простые, дешевые и экспрессные методы, такие как спектрофотометрия [7].

Целесообразно сочетание методов концентрирования, прежде всего сорбционного, позволяющих повысить чувствительность и селективность определения катехоламинов, с экспрессными и экономически оправданными способами определения, например со спектрофотометрией. При таком сочетании существенную роль играет элюент, используемый для десорбции сконцентрированных веществ, поскольку он должен обеспечить не только, по возможности, максимальную степень десорбции аналитов, но и не оказывать негативного воздействия на характеристики последующего их определения выбранным методом в элюате.

Ранее показано, что количественное сорбционное извлечение катехоламинов из водных растворов и некоторых биологических жидкостей возможно с помощью сверхсшитого полистирола (ССПС) [8, 9].

В настоящей работе детально изучены особенности десорбции катехоламинов после их динамического сорбционного извлечения на ССПС и показана перспективность сочетания предложенного варианта

Таблица 1. Среднее содержание катехоламинов в биологических жидкостях [6]

	Адреналин	Норадреналин	Дофамин	Суммарное содержание
Кровь	<0,5 нМ	1,3–6,5 нМ	<0,13 нМ	1,3–7,2 нМ
Суточная моча	0,01–0,1 мкМ	0,1–0,6 мкМ	0,3–3,1 мкМ	0,4–4 мкМ

твердофазной экстракции и спектрофотометрического определения КА с использованием наностержней золота при анализе мочи и плазмы крови.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования выбраны дофамин (в виде гидрохлорида), норадреналин (в виде гидрохлорида) и адреналин (все ч. д. а., Sigma-Aldrich). В табл. 2 приведены их структурные формулы и некоторые параметры. Исходные растворы дофамина гидрохлорида и норадреналина гидрохлорида (2,5 мМ) готовили растворением их точных навесок в деионизованной воде и хранили при –20 °С. Адреналин растворяли в 0,01 М HCl и также хранили при –20 °С. Перед использованием исходные растворы размораживали, рабочие растворы соединений готовили разбавлением исходных.

Твердофазную экстракцию (ТФЭ) катехоламинов на ССПС проводили в динамическом режиме. Для этого через концентрирующую микроколонку

Таблица 2. Объекты исследования и некоторые их параметры

Название (сокращение)	Структурная формула	Молярная масса, г / моль	lgD* при pH 9	lgP*
Дофамин (ДА)		153	–0,79	0,12
Норадреналин (НА)		169	–1,14	–0,88
Адреналин (А)		183	–1,19	–0,63

* Логарифмы коэффициентов распределения катехоламинов в системе октанол – вода при pH 9 (pH соответствует выбранным условиям эксперимента) и параметры гидрофобности рассчитаны с помощью программы ACD Labs 6.00 (Торонто, Канада)

($l=6$ мм, $d=10$ мм), заполненную 20 мг ССПС (патроны Диапак П-3, ЗАО «БиоХимМак СТ», размер частиц сорбента 50–100 мкм, диаметр пор 10–1000 Å) и предварительно кондиционированную 3 мл ацетонитрила и промытую 10 мл воды, пропускали раствор катехоламинов со средней скоростью 1 мл/мин. Скорость пропускания раствора регулировали с помощью вакуумной установки для ТФЭ М6, манифолд (АО «Аквилон», Россия). Колонку с сорбентом промывали 10 мл воды. После этого через сорбент пропускали определенный объем выбранного элюента. В отдельные пробирки собирали как раствор катехоламинов, прошедший через колонку, так и последовательные порции элюента.

Содержание катехоламинов в собранных образцах определяли методом ВЭЖХ в обращенно-фазовом режиме. Хроматограммы образцов регистрировали на жидкостном хроматографе «Цвет-Яуза-04» (НПО «Химавтоматика», Россия) с амперометрическим детектором ($U=1,0$ В). Использовали хроматографическую колонку Eclipse XDB-C18 (Agilent), снабженную предколонкой Security Guard C18. Подвижная фаза – смесь ацетонитрил (10%)/0,1% фосфорная кислота (90%)+0,3 мМ октансульфоната натрия. Объем пробы составлял 20 мкл, ввод пробы осуществляли с помощью петли дозатора. Скорость потока составляла 0,4 мл/мин. Растворы кислот и октансульфоната натрия для приготовления элюента фильтровали через мембранный фильтр из фторопласта 0,2 мкм (ЗАО «БиоХимМак СТ») с помощью вакуумного насоса Millipore. Дегазацию элюентов проводили в ультразвуковой ванне Bransonic 1510R-DTH (США).

Для синтеза наностержней золота (НСт) использовали золотохлористоводородную кислоту (х. ч.), нитрат серебра (ч. д. а.), борогидрид натрия (ч. д. а.), аскорбиновую кислоту (х. ч.), бромид цетилтриметиламмония (ЦТМА) (х. ч.). Синтез проводили по методике, описанной в [10]. Полученный раствор НСт выдерживали в течение двух недель, затем центрифугировали в течение 30 мин с частотой 8000 об/мин и удаляли супернатант декантацией, промывали НСт деионизованной водой путем редиспергирования в ней осадка. Отделение супернатанта центрифугированием и редиспергирование НСт в деионизованной воде повторяли дважды.

Для синтеза нанокмпозитов НСт применяли пенополиуретан (ППУ) на основе простых эфиров (ООО «Дагмар»). Таблетки ППУ диаметром 16 мм и массой (20 ± 2) мг выбивали металлическим пробойником из промышленного листа полимера. Для очистки от примесей таблетки ППУ помещали в ацетон и встряхивали в течение 10 мин, процедуру повторяли дважды, после чего их высушивали под

струей воздуха. Методика получения нанокмпозитов на основе НСт и ППУ и их модифицирование нитратом серебра с целью последующего использования для определения КА подробно описаны в [11].

Измерение оптических характеристик растворов НСт проводили на спектрофотометре СФ-103 (АО «Аквилон», Россия) в диапазоне длин волн 400–800 нм. Диффузное отражение в видимой области регистрировали на мини-спектрофотометре Eye-One Pro (X-Rite, США).

Уровень pH контролировали на pH-метре – иономере «Эксперт 001» («Эконикс-Эксперт», Россия), деионизованную воду получали с помощью системы очистки Millipore Simplicity (Millipore, Германия).

Результаты и обсуждение

Эффективность сорбционного концентрирования в целом зависит от степени сорбции и десорбции. В случае гидрофильных соединений, которыми являются катехоламины, и объектов со сложной матрицей, таких как биологические жидкости, необходимы сорбенты с хорошими сорбционными характеристиками по отношению к этим классам веществ. Сорбент должен сохранять свою эффективность в условиях высоких содержаний солей и белков, по возможности, снижая матричные эффекты при последующем определении. Ранее было показано, что ССПС количественно извлекает катехоламины из водных растворов. Этот сорбент хорошо зарекомендовал себя как в статическом, так и в динамическом режиме, причем в случае динамической ТФЭ степени извлечения всех трех катехоламинов близки к 100%, а десорбция катехоламинов возможна малыми порциями элюентов [8, 9]. В рамках поставленной цели проведено систематическое изучение различных десорбентов для выбора наиболее подходящего для количественного извлечения КА и последующего их спектрофотометрического определения с использованием НСт.

Десорбция катехоламинов с использованием различных элюентов

Согласно литературным данным, десорбцию катехоламинов, как правило, проводят водными растворами различных кислот (муравьиной [12, 13], уксусной [14–17]), а также их смесей с ацетонитрилом, метанолом [18, 19]. Использование таких элюентов, в первую очередь, связано с тем, что в щелочной среде катехоламины легко окисляются кислородом воздуха.

Удерживание катехоламинов на ССПС, в силу особенностей этого сорбента [20], может достигаться за

счет реализации различных механизмов: гидрофобного удерживания, п-п-, катион-п- и электростатических взаимодействий. Эффективная десорбция КА может быть достигнута путем блокирования основных механизмов выбранным элюентом. С этой точки зрения и с учетом данных литературы в работе рассмотрены следующие элюенты:

- ацетонитрил (5%)/0,1% уксусная кислота (95%);
- ацетонитрил (10%)/0,1% фосфорная кислота (90%);
- 0,1 М глицин (50%)/0,1 М уксусная кислота (50%);
- ацетонитрил (5%)/0,1% уксусная кислота (95%) + 0,3 мМ октансульфонат натрия;
- 6 М уксусная кислота.

Помимо классических элюентов, содержащих ацетонитрил, изучены смеси, включающие глицин (для блокирования по конкурентному механизму возможного вклада в удерживание алифатической аминогруппы КА) и октансульфонат натрия (который способен модифицировать поверхность сорбента, придавая ей отрицательный заряд и блокируя таким образом практически все типы взаимодействий, кроме электростатических). Полученные данные по десорбции КА с использованием перечисленных элюентов систематизированы в табл. 3.

Из представленных в табл. 3 данных видно, что при десорбции смесью ацетонитрила (5%) с 0,1%-ной уксусной кислотой (95%) высокие степени десорбции при использовании малого количества элюента (3,0 мл) не достигаются. Если проводить последовательную десорбцию порциями по 3,0 мл и по отдельности анализировать соответствующие элюаты, то можно заметить, что в первой порции преобладает норадреналин, во второй – значительно увеличивается содержание адреналина. Третьей порцией полностью извлекается норадреналин и все

еще не полностью – адреналин и дофамин. Таким образом, имеет место частичное хроматографическое разделение катехоламинов, что, с одной стороны, можно использовать для повышения селективности определения. Так, например, для первой порции элюента коэффициенты селективности норадреналина по отношению к адреналину и дофамину составляют 7 и 14 соответственно. С другой стороны, резко ухудшается эффективность концентрирования – степень десорбции с каждой порцией по 3 мл элюента не превышает 45%. Уменьшение степеней десорбции в ряду норадреналин > адреналин > дофамин соответствует увеличению их параметров гидрофобности (табл. 2).

Показано, что элюенты в виде смеси ацетонитрил (10%)/0,1% фосфорная кислота (90%) или 0,1 М глицин (50%)/0,1 М уксусная кислота (50%) дают увеличение степеней десорбции аналитов (в случае норадреналина они составляют уже 89 и 76% соответственно), однако закономерность их выхода с картриджа сохраняется, а десорбцию все еще не следует считать эффективной. Введение в смесь ацетонитрил (5%)/0,1% уксусная кислота (95%) 0,3 мМ октансульфоната натрия в роли добавки, модифицирующей сорбент и препятствующей гидрофобным взаимодействиям, напротив, приводит к заметному снижению степеней десорбции (они не превышают 21%). Из чего следует, что гидрофобные взаимодействия не вносят решающий вклад в удерживание катехоламинов на ССПС. Несмотря на ухудшение эффективности десорбции, указанный элюент позволяет добиться наибольших из полученных коэффициентов селективности норадреналина по отношению к адреналину и дофамину (15 и 35 соответственно). Полученный результат интересен для селективного

Таблица 3. Степени десорбции адреналина, норадреналина и дофамина порциями по 3,0 мл различных элюентов после извлечения из 10 мл их эквимольной смеси (суммарное содержание 5–15 мкМ) на 20 мг ССПС (n = 3, P = 0,95)

Элюент	Номер порции элюента	Содержание КА по отношению к исходному ($R \pm t_{p,f} \cdot s / \sqrt{n}$, %)		
		норадреналин	адреналин	дофамин
Ацетонитрил (5%)/0,1% уксусная кислота (95%)	1	41 ± 3	6 ± 3	3 ± 2
	2	44 ± 2	28 ± 3	11 ± 3
	3	11 ± 2	29 ± 4	20 ± 2
Ацетонитрил (10%)/0,1% фосфорная кислота (90%)	1	89 ± 2	40 ± 10	17 ± 6
0,1 М глицин (50%)/0,1 М уксусная кислота (50%)	1	76 ± 8	27 ± 3	20 ± 2
	2	21 ± 2	30 ± 3	27 ± 3
	3	4 ± 1	19 ± 2	20 ± 2
Ацетонитрил (5%)/0,1% уксусная кислота (95%) + 0,3 мМ октансульфонат натрия	1	21 ± 2	1,4 ± 0,7	0,6 ± 0,4
6М уксусная кислота	1	100 ± 8	105 ± 5	110 ± 10

определения норадреналина на фоне других катехоламинов. Таким образом, полученные экспериментальные данные говорят о значительном вкладе в удерживание катехоламинов полярных взаимодействий (вероятно, преимущественно с участием алифатической аминогруппы). Выявленные особенности десорбции КА с ССПС могут быть использованы для управления ее селективностью, что важно для спектрофотометрического определения.

Показано, что полное извлечение катехоламинов уже с первой порцией элюента происходит при использовании 6 М уксусной кислоты. Помимо полноты десорбции аналитов, важным критерием при выборе элюента является отсутствие мешающего влияния с его стороны на стадии определения. В данной работе в качестве спектрофотометрического реагента для определения КА использовали НСт. Выбор НСт для определения КА связан с их высокой чувствительностью при малых концентрациях НСт, хорошей селективностью по отношению ко многим компонентам неорганической и органической природы, а также легкостью реализации определения в варианте полуколичественного визуально-колориметрического тест-метода [11, 21–23]. Для определения КА НСт могут быть использованы в виде коллоидного раствора или их нанокompозита с ППУ.

Оценено влияние некоторых из используемых элюентов на НСт. Установлено, что присутствие ацетонитрила вызывает агрегацию НСт, если они находятся в коллоидном растворе. В случае нанокompозитов с ППУ данный эффект не проявляется – иммобилизация НСт на твердой полимерной матрице способствует повышению их стабильности. Элюаты на основе уксусной кислоты после доведения до необходимого значения pH не вызывают разрушения коллоидной структуры НСт. Таким образом, 6 М уксусная кислота позволяет не только количественно извлекать КА с ССПС, но и обеспечивает возможность последующего спектрофотометрического определения КА с использованием НСт. Этот элюент использовали в дальнейшем для извлечения адреналина, норадреналина и дофамина с сорбента.

Оценены коэффициенты концентрирования, которых можно достичь, используя сорбцию катехоламинов на 20 мг сверхсшитого полистирола с последующим элюированием 3,0 мл 6 М уксусной кислоты. Для этого через картридж с 20 мг ССПС пропускали 30/100/300 мл эквимольного раствора катехоламинов (суммарное содержание – 1 мкМ), промывали картридж 10 мл воды и элюировали КА 3,0 мл 6 М уксусной кислоты. Содержание КА в элюате определяли хроматографически и вычисляли степени извлечения и коэффициенты концентрирования. Полученные данные приведены в табл. 4. Видно, что можно достичь концентрирования катехоламинов в 56 раз. При концентрировании из объема 300 мл и более степени извлечения снижаются.

Твердофазная экстракция катехоламинов из мочи и сыворотки крови

Изучена возможность твердофазной экстракции адреналина, норадреналина и дофамина из мочи и сыворотки крови с использованием ССПС и 6 М уксусной кислоты. Сорбцию проводили из объема 10 мл растворов, содержащих 1 мл биологической жидкости и различные добавки катехоламинов, элюент – 3,0 мл 6 М уксусной кислоты. Полученные элюаты вводили в хроматограф, в качестве аналитического сигнала при анализе образцов мочи использовали площади пиков на 7,5, 8,5 и 11,8 мин, а при анализе сыворотки крови – на 6,8, 7,8 и 10,4 мин, отвечающие норадреналину (НА), адреналину (А) и дофамину (ДА) соответственно. На рис. 1 приведены хроматограммы образцов мочи, разбавленной в 10 раз, без добавок КА и с добавкой 15 мкМ КА (суммарно), на рис. 2 – хроматограммы элюатов после ТФЭ КА из таких же образцов мочи. Как видно из полученных хроматограмм, проведение твердофазной экстракции позволяет существенно снизить влияние матричных компонентов и уменьшить время хроматографирования. После непосредственного введения образцов мочи в хроматограф время выхода всех компонентов матрицы достигает 30 мин, а после твердофазной экстракции процесс хроматографирования сокращается до 13 мин. Эти же эффекты

Таблица 4. Степени извлечения и коэффициенты концентрирования катехоламинов с использованием ТФЭ на ССПС

Объем анализируемого раствора, мл	Средняя степень извлечения (R, %)			Средний коэффициент концентрирования
	норадреналин	адреналин	дофамин	
30	95	102	99	10
100	89	105	102	33
300	25	71	72	56

Рис. 1. Хроматограммы мочи, разбавленной в 10 раз деионизованной водой: а – без добавок КА, б – с добавкой 15 мкМ КА (суммарно), А(2):НА(1):ДА(3)=1:7:32 (по молям)

наблюдаются и при анализе сыворотки крови: сумма площадей всех пиков посторонних компонентов при условии предварительной твердофазной экстракции уменьшается в 25 раз, что свидетельствует об уменьшении матричного эффекта, а время анализа сокращается с 63 до 23 мин.

Спектрофотометрическое определение катехоламинов с использованием наностержней золота

Ранее показано, содержание катехоламинов можно определить спектрофотометрически с использованием растворов наностержней золота и их нанокомпозитов на основе пенополиуретана в присутствии нитрата серебра [11, 21-23]. Измеряют величину гипсохромного сдвига ($\Delta\lambda$) максимумов поверхностного плазмонного резонанса НСт, обусловленного формированием на поверхности НСт оболочки серебра в результате его восстановления из нитрата серебра катехоламинами. Схема взаимодействия представлена на рис. 3. Зависимости $\Delta\lambda$ растворов НСт и их нанокомпозитов от

Рис. 2. Хроматограммы элюатов мочи, полученных десорбцией 3,0 мл 6 М АсОН с картриджей, содержащих 20 мг ССПС, на которых предварительно были сорбированы 10,0 мл растворов, содержащих 1,0 мл мочи: а – без добавок КА, б – 1 мкМ добавки КА, НА(1):А(2):ДА(3)=1:1:1

Рис. 3. Схема взаимодействия катехоламинов с НСт в присутствии нитрата серебра

концентрации катехоламинов на определенном участке монотонны. Поскольку коэффициенты чувствительности в уравнениях градуировочных графиков определения индивидуальных адреналина, норадреналина и дофамина различаются незначительно, можно проводить определение их суммарного содержания [23]. В роли стандартов, в пересчете на которые следует выражать суммарное содержание, можно использовать как индивидуальные катехоламины, так и их смеси. Диапазон определяемых содержаний при анализе смеси КА с использованием растворов НСт составляет 0,3–5,0 мкМ, в случае нанокompозитов – 0,9–25,0 мкМ.

При проведении анализа с помощью растворов НСт реакционная смесь включает в себя 0,3 мл раствора НСт ($c=70$ мкг/мл); 0,02 мл 0,01 М раствора нитрата серебра; 0,1 мл глицинового буферного раствора; раствор катехоламина (0–5 мкМ). Суммарный объем всех компонентов – 2,5 мл, после взаимодействия измеряют оптическую плотность образцов (рис. 4а). С помощью нанокompозитов анализ проводят по следующей схеме: берут 5,0 мл раствора, содержащего 1,0 мл глицинового буферного раствора и катехоламины (0–25 мкМ), опускают в него таблетку нанокompозита, модифицированного нитратом серебра, затем встряхивают на шейкере в течение 30 мин. Потом таблетку извлекают, просушивают между листов фильтровальной бумаги, измеряют коэффициенты диффузного отражения (R), после

чего вычисляют функцию Кубелки – Мунка и строят зависимость $F(\lambda)$, из которой далее находят величину $\Delta\lambda$ (рис 4б).

В обоих случаях взаимодействие проводят при значениях pH–8–9, которые получают за счет присутствия в реакционной смеси глицинового буфера. При анализе биологических жидкостей с предварительной ТФЭ, к полученным элюатам добавляли 10 М NaOH для достижения pH=8, после чего алиquotы элюатов вводили в реакционную смесь. Величину $\Delta\lambda$ вычисляли относительно реакционной смеси, в которую внесены соответствующие количества уксусной кислоты и гидроксида натрия без добавки КА для учета влияния ионной силы.

Оценена возможность определения катехоламинов методом добавок в моче при их сорбционном извлечении из разбавленных в 10 и в 1,2 раза образцов, содержащих 0, 0,5 и 1 мкМ и 0, 5 и 10 мкМ добавки катехоламинов соответственно (объемы растворов для сорбции составляли 10,0 и 15,0 мл). В первом случае определение методом добавок возможно только с использованием растворов НСт, полученные данные представлены в табл. 5. Поскольку содержание катехоламинов в элюатах без добавок было ниже предела обнаружения методики с использованием нанокompозитов, провести анализ этим способом не удалось. При сорбции из 15,0 мл образцов мочи, разбавленной в 1,2 раза, возможно определение КА методом добавок и с использованием нанокompозитов.

Рис. 4. Спектры поглощения растворов наностержней золота (а) и диффузного отражения нанокомпозитов (б) до (1) и после (2) взаимодействия с катехоламинами. а) $c_{\text{НСт}} = 8,5 \text{ мкг/мл}$, $c_{\text{AgNO}_3} = 80 \text{ мкМ}$, $c_{\text{КА}} = 0,4 \text{ мкМ}$, $V = 2,50 \text{ мл}$, $t = 3 \text{ мин}$, глициновый буфер, pH 9; б) $c_{\text{КА}} = 0,25 \text{ мкМ}$, глициновый буфер, pH 9, $V = 5,0 \text{ мл}$, $m \text{ (ПГУ)} = 0,02 \text{ г}$, время контакта фаз 30 мин

Этот факт подтвержден хорошим соответствием данным, полученным для этого же образца мочи (разбавленного в 10 раз), с помощью коллоидных растворов НСт и ВЭЖХ (табл. 5). Пределы обнаружения суммы катехоламинов в исследованных с помощью растворов НСт образцах находятся ниже нормального содержания катехоламинов, а в случае нанокомпозитов – соответствуют нижней границе нормального содержания.

Таблица 5. Суммарное содержание КА (мкМ) в образцах мочи по результатам разных методов анализа

Способ анализа	Образец 1	Образец 2
С использованием растворов НСт	$1,50 \pm 0,05^a$ ($s_r 0,01$)	$3,0 \pm 0,1^a$ ($s_r 0,02$)
С использованием нанокомпозитов	–	3 ± 1^b ($s_r 0,2$)
ВЭЖХ	$1,5 \pm 0,4^a$ ($s_r 0,1$)	$3,7 \pm 0,7^a$ ($s_r 0,08$)

Составы растворов для сорбции:

^a 1,0 мл мочи, 0/0,5/1 мкМ добавки эквимольной смеси КА в 10,0 мл;

^б 12,5 мл мочи, 0/5/10 мкМ добавки эквимольной смеси КА в 15,0 мл.

Методом «введено-найденно» показана возможность определения катехоламинов с использованием растворов НСт и их нанокомпозитов в сыворотке крови после их извлечения на ССПС. Предварительно строили градуировочный график с помощью эквимольной смеси катехоламинов, растворы для сорбции содержали 1,0 мл сыворотки крови и разные добавки эквимольной смеси КА. Полученные данные представлены в табл. 6. Проверена правильность

Таблица 6. Суммарное содержание катехоламинов в сыворотке крови по результатам анализов с использованием растворов НСт и их нанокомпозитов после ТФЭ на ССПС ($n = 3$, $P = 0,95$)

Способ анализа	Введено КА, мкМ	Найдено КА, мкМ	s_r
С использованием растворов НСт	0,5	$0,5 \pm 0,1$	0,08
С использованием нанокомпозитов	2,5	$2,1 \pm 0,3$	0,06
	5,0*	$4,5 \pm 0,7^*$	0,06

* Определение содержания индивидуального катехоламина (дофамина), элюент: 5% АсН – 95% АсОН (0,1%)

определения дофамина методом нанокомпозитов после ТФЭ из сыворотки крови с добавкой 5 мкМ дофамина при элюировании 5% АсН – 95% АсОН (0,1%) (как было отмечено выше, присутствие ацетонитрила в реакционной смеси не вызывает изменения спектральных характеристик нанокомпозитов). Результаты говорят о хорошей правильности определения. Тем не менее так как содержание катехоламинов в крови оказалось ниже предела определения разработанной методики, проведенный эксперимент показывает лишь потенциальную возможность использования НСт для определения катехоламинов в сыворотке крови. Количественный анализ, вероятно, удастся реализовать при уменьшении объемов как элюента, так и объема реакционной смеси.

Заключение

Сравнение ряда элюентов для извлечения катехоламинов со сверхсшитого полистирола позволяет сделать вывод о значительном вкладе полярных взаимодействий в удерживание катехоламинов на сорбенте. Показано, что количественное извлечение катехоламинов возможно с помощью раствора 6 М уксусной кислоты. Для повышения селективности разделения катехоламинов в качестве элюента можно выбрать смесь ацетонитрила с 0,1%-ной уксусной кислотой с добавкой 0,3 мМ октансульфоната натрия. В результате коэффициенты селективности норадреналина по отношению к адреналину и дофамину составляют 15 и 35 соответственно.

Показана возможность спектрофотометрического определения катехоламинов в сыворотке крови и моче с использованием наностержней золота или их нанокомпозитов с пенополиуретаном после твердофазной экстракции на сверхсшитом полистироле. Разработанные способы можно применить для определения катехоламинов в моче на уровне их нормального содержания. Установлено, что твердофазная экстракция существенно снижает влияние матричных компонентов и повышает скорость ВЭЖХ-определения катехоламинов, открывая перспективы для анализа объектов сложного состава.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-73-10001).

Литература

- Southwick S.M., Paige S., Morgan C.A., Bremner J.D., Krystal J.H., Charney D.S. Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin // *Semin. Clin. Neuropsychiatry*. 1999. V. 4. P. 242–248.
- Whiting M.J., Doogue M.P. Advances in biochemical screening for pheochromocytoma using biogenic amines // *Clin. Biochem. Rev.* 2009. V. 30. P. 3–17.
- Веселова И.А., Сергеева Е.А., Македонская М.И., Еремина О.Е., Калмыков С.Н., Шеховцова Т.Н. Методы определения маркеров нейромедиаторного обмена в целях клинической диагностики // *Журн. аналит. химии*. 2016. Т. 71. № 12. С. 1235–1249.
- Pussard E., Neveux M., Guigueno N. Reference intervals for urinary catecholamines and metabolites from birth to adulthood // *Clin. Biochem.* 2009. V. 42. P. 536–539.
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Катехоламины: Биохимия, Фармакология, Физиология, Клиника // *Вопросы медицинской химии*. 2002. Т. 48. № 1. С. 44–67.
- Gardner D.G., Shoback D. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. 9th edition. McGraw-Hill Education. Medical: New York, 2011. 897 p.
- Gorbunova M.V., Gutorova S.V., Berseneva D.A., Apyari V.V., Zaitsev V.D., Dmitrienko S.G., Zolotov Y.A. Spectroscopic methods for determination of catecholamines: A mini-review // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2019. V. 54. No. 8. P. 631–652.
- Tolmacheva V.V., Yarykin D.I., Serdiuk O.N., Apyari V.V., Dmitrienko S.G., Zolotov Yu. A. Adsorption of catecholamines from their aqueous solutions on hypercrosslinked polystyrene // *React. Funct. Polym.* 2018. V. 131. P. 56–63.
- Толмачева В.В., Ярыкин Д.И., Горбунова М.В., Апыри В.В., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. Концентрирование катехоламинов на сверхсшитом полистироле и их определение методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Журн. аналит. химии*. 2019. Т. 74. № 11. С. 803–809.
- Nikoobakht B., El-Sayed M.A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method // *Chem. Mater.* 2003. V. 15. P. 1957–1962.
- Gorbunova M.V., Apyari V.V., Zolotov I.I., Dmitrienko S.G., Garshev A.V., Volkov P.A., Bochenkov V.E. A new nanocomposite optical sensor based on polyurethane foam and gold nanorods for solid-phase spectroscopic determination of catecholamines // *Gold Bull.* 2019. 10 p. <https://doi.org/10.1007/s13404-019-00267-9>.
- Dunand M., Gubian D., Stauffer M., Abid K., Grouzmann E. High-throughput and sensitive quantitation of plasma catecholamines by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a solid phase microwell extraction plate // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. P. 3539–3544.
- Whiting M.J. Simultaneous measurement of urinary metanephrines and catecholamines by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection // *Ann. Clin. Biochem.* 2009. V. 46. P. 129–136.
- Talwar D., Williamson C., McLaughlin A., Gill A., O'Reilly D.S.J. Extraction and separation of urinary catecholamines as their diphenyl boronate complexes using solid-phase extraction C18 sorbent and high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B.* 2002. V. 769. P. 341–349.
- Li X., Li S., Kellermann G. Pre-analytical and analytical validations and clinical applications of a miniaturized, simple and cost-effective solid phase extraction combined with LC-MS/MS for the simultaneous determination of catecholamines and metanephrines in spot urine samples // *Talanta*. 2016. V. 159. P. 238–247.
- Li X., Li S., Wynveen P., Mork K., Kellermann G. Development and validation of a specific and sensitive LC-MS/MS method for quantification of urinary catecholamines and application in biological variation studies // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. P. 7287–7297.

17. Lee M., Oh S.Y., Pathak T.S., Paeng I.R., Cho B.Y., Paeng K.-J. Selective solid-phase extraction of catecholamines by the chemically modified polymeric adsorbents with crown ether // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1160. P. 340–344.
18. Claude B., Morin P., Denoroy L. Selective solid-phase extraction of catecholamines and metanephrines from serum using a new molecularly imprinted polymer // *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 2014. V. 37. P. 2624–2638.
19. Zhang G., Zhang Y., Ji C., McDonald T., Walton J., Groeber E.A., Steenwyk R.C., Lin Z. Ultra sensitive measurement of endogenous epinephrine and norepinephrine in human plasma by semi-automated SPELC-MS/MS // *J. Chromatogr. B*. 2012. V. 895–896. P. 186–190.
20. Дмитриенко С.Г., Апыри В.В., Толмачева В.В. Особенности концентрирования полярных биологически активных соединений на сверхсшитом полистироле // *Аналитика*. 2019. Т. 9. № 1. С. 60–67.
21. Liu J.-M., Wang X.-X., Cui M.-L., Lin L.-P., Jiang S.-L., Jiao L., Zhang L.-H. A promising non-aggregation colorimetric sensor of AuNRs-Ag⁺ for determination of dopamine // *Sens. Actuat. B-Chem.* 2013. V. 176. P. 97–102.
22. Gorbunova M.V., Apyari V.V., Dmitrienko S.G., Garshev A.V. Formation of core-shell Au@Ag nanorods induced by catecholamines: A comparative study and an analytical application // *Anal. Chim. Acta*. 2016. V. 936. P. 185–194.
23. Gorbunova M.V., Shlenova A.O., Klimenko R.V., Gutorova S.V., Apyari V.V., Dmitrienko S.G. Gold nanorods and a nanocomposite material based on them: analytical possibilities for spectrophotometric determination of total catecholamines // *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. 2019. V. 525. 11 p. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/525/1/012012>.
- determination by high-performance liquid chromatography // *J. Anal. Chem.* 2019. V. 74. No. 11. P. 1057–1063.
10. Nikoobakht B., El-Sayed M.A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method // *Chem. Mater.* 2003. V. 15. P. 1957–1962.
11. Gorbunova M.V., Apyari V.V., Zolotov I.I., Dmitrienko S.G., Garshev A.V., Volkov P.A., Bochenkov V.E. A new nanocomposite optical sensor based on polyurethane foam and gold nanorods for solid-phase spectroscopic determination of catecholamines // *Gold Bull.* 2019. 10 p. <https://doi.org/10.1007/s13404-019-00267-9>.
12. Dunand M., Gubian D., Stauffer M., Abid K., Grouzmann E. High-throughput and sensitive quantitation of plasma catecholamines by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a solid phase microwell extraction plate // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. P. 3539–3544.
13. Whiting M.J. Simultaneous measurement of urinary metanephrines and catecholamines by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection // *Ann. Clin. Biochem.* 2009. V. 46. P. 129–136.
14. Talwar D., Williamson C., McLaughlin A., Gill A., O'Reilly D.S.J. Extraction and separation of urinary catecholamines as their diphenyl boronate complexes using solid-phase extraction C18 sorbent and high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B*. 2002. V. 769. P. 341–349.
15. Li X., Li S., Kellermann G. Pre-analytical and analytical validations and clinical applications of a miniaturized, simple and cost-effective solid phase extraction combined with LC-MS/MS for the simultaneous determination of catecholamines and metanephrines in spot urine samples // *Talanta*. 2016. V. 159. P. 238–247.
16. Li X., Li S., Wynveen P., Mork K., Kellermann G. Development and validation of a specific and sensitive LC-MS/MS method for quantification of urinary catecholamines and application in biological variation studies // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. P. 7287–7297.
17. Lee M., Oh S.Y., Pathak T.S., Paeng I.R., Cho B.Y., Paeng K.-J. Selective solid-phase extraction of catecholamines by the chemically modified polymeric adsorbents with crown ether // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1160. P. 340–344.
18. Claude B., Morin P., Denoroy L. Selective solid-phase extraction of catecholamines and metanephrines from serum using a new molecularly imprinted polymer // *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 2014. V. 37. P. 2624–2638.
19. Zhang G., Zhang Y., Ji C., McDonald T., Walton J., Groeber E.A., Steenwyk R.C., Lin Z. Ultra sensitive measurement of endogenous epinephrine and norepinephrine in human plasma by semi-automated SPELC-MS/MS // *J. Chromatogr. B*. 2012. V. 895–896. P. 186–190.
20. Dmitrienko S.G., Apyari V.V., Tolmacheva V.V. Peculiarities of Preconcentration of Polar Biologically Active Compounds on Hypercrosslinked Polystyrene // *Analytics*. 2019. V. 9. No. 1. P. 60–67.
21. Liu J.-M., Wang X.-X., Cui M.-L., Lin L.-P., Jiang S.-L., Jiao L., Zhang L.-H. A promising non-aggregation colorimetric sensor of AuNRs-Ag⁺ for determination of dopamine // *Sens. Actuat. B-Chem.* 2013. V. 176. P. 97–102.
22. Gorbunova M.V., Apyari V.V., Dmitrienko S.G., Garshev A.V. Formation of core-shell Au@Ag nanorods induced by catecholamines: A comparative study and an analytical application // *Anal. Chim. Acta*. 2016. V. 936. P. 185–194.
23. Gorbunova M.V., Shlenova A.O., Klimenko R.V., Gutorova S.V., Apyari V.V., Dmitrienko S.G. Gold nanorods and a nanocomposite material based on them: analytical possibilities for spectrophotometric determination of total catecholamines // *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. 2019. V. 525. 11 p. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/525/1/012012>.

References

1. Southwick S.M., Paige S., Morgan C.A., Bremner J.D., Krystal J.H., Charney D.S. Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin // *Semin. Clin. Neuropsychiatry*. 1999. V. 4. P. 242–248.
2. Whiting M.J., Doogue M.P. Advances in biochemical screening for pheochromocytoma using biogenic amines // *Clin. Biochem. Rev.* 2009. V. 30. P. 3–17.
3. Veselova I.A., Sergeeva E.A., Makedonskaya M.I., Eremina O.E., Kalmykov S.N., Shekhovtsova T.N. Methods of determining neurotransmitter metabolism markers for clinical diagnostics // *J. Anal. Chem.* 2016. V. 71. No. 12. P. 1155–1168.
4. Pussard E., Neveux M., Guigueno N. Reference intervals for urinary catecholamines and metabolites from birth to adulthood // *Clin. Biochem.* 2009. V. 42. P. 536–539.
5. Kulinskii V.I., Kolesnichenko L.S. Catecholamines. Biochemistry, pharmacology, physiology, clinic // *Vopr. Meditsynskoi Khimii*. 2002. V. 48. P. 44–67.
6. Gardner D.G., Shoback D. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. 9th edition. McGraw-Hill Education. Medical: New York, 2011. 897 p.
7. Gorbunova M.V., Gutorova S.V., Berseneva D.A., Apyari V.V., Zaitsev V.D., Dmitrienko S.G., Zolotov Y.A. Spectroscopic methods for determination of catecholamines: A mini-review // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2019. V. 54. No. 8. P. 631–652.
8. Tolmacheva V.V., Yarykin D.I., Serdiuk O.N., Apyari V.V., Dmitrienko S.G., Zolotov Yu.A. Adsorption of catecholamines from their aqueous solutions on hypercrosslinked polystyrene // *React. Funct. Polym.* 2018. V. 131. P. 56–63.
9. Tolmacheva V.V., Yarykin D.I., Gorbunova M.V., Apyari V.V., Dmitrienko S.G., Zolotov Yu.A. Preconcentration of catecholamins on hypercrosslinked polystyrene and their