

## CATECHOLAMINES AND RELATED COMPOUNDS SEPARATION ON A MIXED MODE COLUMN

## SEPARATION DE CATECHOLAMINES ET MOLECULES APPARENTEES SUR UNE COLONNE EN MODE MIXTE

**Raluca-Ioana Tampu<sup>1\*</sup>, Oana-Irina Patriciu<sup>1</sup>, Claire Elfakir<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Université "Vasile Alecsandri" de Bacau, Faculté d'Ingénierie,  
Département de Génie Chimique et Alimentaire, 157, Calea Marasesti,  
600115, Bacau, Roumanie*

<sup>2</sup> *Université d'Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, Institut de Chimie  
Organique et Analytique, rue de Chartres, BP 6759, F-45067 Orléans,  
France*

\*Corresponding author: [tampu.raluca@ub.ro](mailto:tampu.raluca@ub.ro)

Received: June, 10, 2014

Accepted: July, 18, 2014

**Abstract:** The present paper presents the evaluation of a mixed mode column (reversed phase and cation exchange) performance for the separation of 12 catecholamines, indolamines and their precursors and metabolites. The influence of different parameters, like organic modifier nature and percentage, salts nature and percentage, on the compounds separation was investigated.

Good separation of the 12 selected compounds was obtained in the isocratic mode using a mobile phase composed of 90 % methanol and 10% ammonium acetate 20 mM, however the analysis time was excessively long (80 minutes). Thus an elution gradient was optimized and it reduced the analysis time to less than half (35 minutes).

**Keywords:** *catecholamines, indolamines, mixed mode column,  
reversed phase liquid chromatography*

## INTRODUCTION

Les catécholamines et les indolamines font partie de la famille des neurotransmetteurs et jouent des rôles importants dans la transmission de l'information dans le cerveau. Des déséquilibres dans leurs concentrations peuvent provoquer de graves maladies neurodégénératives, telles les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer [1 - 4] ou même des maladies d'ordre psychiatrique, telles la schizophrénie [5], la dépression ou les troubles anxieux [6]. Les taux de concentration de ces composés peuvent offrir des informations importantes sur l'état de santé d'une personne. Dans ce contexte des méthodes d'analyse très précises et sensibles sont nécessaires afin de détecter des faibles différences de concentration de ces composés dans les différents tissus et fluides biologiques.

A cause de l'importance biologique élevée de ces composés, une grande variété des méthodes d'analyse sont rapportées dans la littérature. Les catécholamines ont été dérivées soit pour les rendre volatiles, et donc compatibles avec une analyse par chromatographie en phase gazeuse [7] ou pour les rendre moins polaires, afin d'être plus facilement retenues en chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) [8, 9].

Pour la séparation des catécholamines non dérivées en RPLC on peut observer deux grandes tendances dans la littérature. D'une part, les séparations sur colonne C18 avec des phases mobiles, pour la plupart, très riches en eau [10] et d'autre part, les séparations sur colonne carbone graphite poreux (PGC) avec des phases mobiles plus riches en modificateur organique [11].

La chromatographie d'échange d'ions (IEC) est basée sur un processus d'échange d'ions entre la phase mobile et des groupements fonctionnels ionisés greffés sur le support solide. Les anions sont séparés sur des phases greffées de type ammonium quaternaire et les cations sur des phases contenant des groupements sulfonate, carboxyle ou phosphate [12]. Les catécholamines étant des composés facilement ionisables, il existe dans la littérature quelques exemples de séparation de catécholamines par échange de cations [13 - 15]. Toutefois, sur une colonne simple d'échange d'ions, on ne peut séparer au cours d'une même analyse que les solutés de même signe et de charge opposée à celle du support séparatif. Les solutés de même signe que le support sont repoussés et sortent très proches du volume mort.

Dans le cas de l'analyse simultanée des catécholamines et de leurs métabolites qui n'ont pas tous le même état de charge à un pH donné (certains pouvant être cationiques ou neutres et d'autres sous forme anionique), il n'est pas possible d'avoir de la rétention pour chacun de ces solutés et une séparation sur un même type d'échangeur d'ions. Dans cette optique, nous avons testé les colonnes de type « mode mixte » qui offre la possibilité d'avoir simultanément des interactions de types échangeur de cations et phase inverse. Les premiers résultats présentés par H. Luo *et al.* [15] pour la séparation d'un mélange réduit de 9 catécholamines contenant à la fois des composés aminés et des composés acides sur la colonne en mode mixte Primsep 200 sont prometteurs.

La détection électrochimique (ED) [16, 17] est le mode de détection préféré pour les catécholamines, mais la détection par spectrométrie d'absorbance UV [11] ou par spectrofluorométrie (après dérivation) [18] ont également été signalées. Plus récemment la détection par spectrométrie de masse (SM) s'est développée en raison des informations structurales supplémentaires apportées et de la sensibilité de détection relativement élevée [19 - 22]. En outre, la SM peut être utilisée pour l'identification

structurale de nouveaux métabolites qui peuvent apparaître lors de l'analyse de nouveaux échantillons biologiques.

Le but de ce travail a été l'optimisation d'une méthode chromatographique compatible avec une détection par spectrométrie de masse et permettant la séparation sur une colonne de type mode mixte de 12 composés : 3 catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline), 1 indolamine (sérotonine), 3 précurseurs (3,4-dihydroxyphényl alanine, tyrosine et tryptophane), 4 métabolites (3-méthoxytyramine, acide homovanillique, acide 3,4-dihydroxyphénylacétique et acide 5-hydroxyindole-3-acétique) et un standard interne (3,4-dihydroxybenzylamine). Ce dernier composé a été ajouté au mélange pour la quantification.

## MATERIAUX ET METHODES

L'acétonitrile (ACN) et le méthanol (MeOH) sont de pureté analytique et achetés chez JT Baker (Noisy le Sec, France).

Le formiate d'ammonium, l'acétate de sodium, l'acide acétique, l'acide formique et 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) sont achetés chez Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France). La dopamine (DA), la noradrénaline (NA), l'adrénaline (A), la 3-méthoxytyramine (3-MT), la sérotonine (S), l'acide homovanillique (HVA), la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA), le tryptophane (Trp), l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC), l'acide 5-hydroxyindole-3-acétique (5HIAA), la tyrosine (Tyr) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). La structure de ces composés est présentée dans la Figure 1.

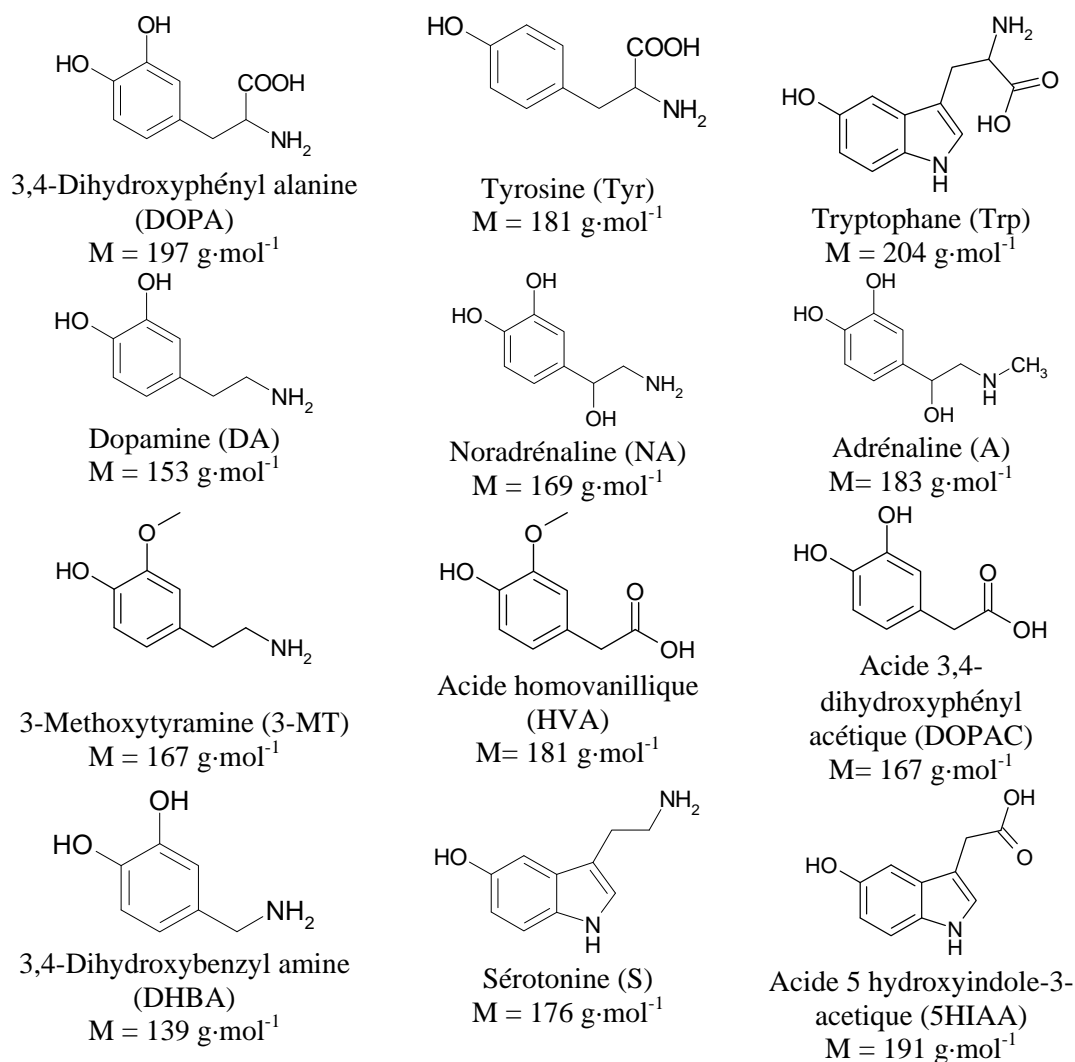
Les phases mobiles ont été préparées en utilisant de l'eau purifiée et déionisée au moyen d'un système Elgastat UHQ II (Elga, Antony, France).

Pour chacun des solutés, une solution mère à  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a été préparée dans l'acide perchlorique 0,2 M et stockée au congélateur à  $-80^\circ\text{C}$ . L'utilisation de l'acide perchlorique est imposée par l'instabilité des catécholamines aux pH supérieurs à 3 et par le fait que l'analyse de catécholamines s'inscrit dans une étude plus vaste visant à analyser ces molécules dans des extraits de cerveau, qui sont préparés dans de l'acide perchlorique. Les solutions filles injectées ont été préparées à partir de la solution mère par dilution dans la phase mobile le jour même de l'analyse.

Pour l'analyse de l'influence de la nature et du pourcentage de modificateur organique sur la rétention des composés nous avons testé le méthanol (MeOH) et l'acétonitrile (ACN), avec des pourcentages variant entre 5 et 30 %. Ensuite pour l'étude de l'influence de la concentration en sel sur le facteur de rétention des composés nous avons utilisé une phase mobile composée de méthanol et de formiate d'ammonium avec les concentrations suivants : 10, 20, 30, 50 et 100 mM.

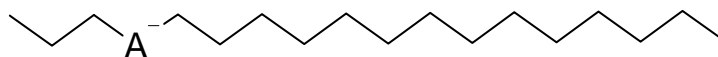
Pour éviter la dégradation des composés la séparation chromatographique a été effectuée dans des conditions acides (pH). Dans un tampon purement aqueux à pH 3, les six amines biogènes (A, NA, DA, 3-MT, S et DHBA) sont protonées, en gardant ainsi une charge positive nette. HVA, DOPAC et 5HIAA, contenant des fonctions carboxyliques, avec des valeurs de  $pK_a$  respectives de 3,9, 3,6 et 4,2, ne sont que partiellement dissociés, portant ainsi une charge négative partielle. Pour les trois acides aminés (Tyr, Trp et DOPA), les fonctions amines sont protonées, tandis que les fonctions acide carboxylique, avec des valeurs de  $pK_a$  de 2,0, 2,5 et 1,6 respectivement,

sont essentiellement déprotonées ainsi les composés zwitterioniques ont une charge globale nominale égale à zéro.



**Figure 1.** Structure chimique des composés analysés

Le système chromatographique comprend une pompe quaternaire Merck Hitachi (Darmstadt, Allemagne) modèle Lachrom L-7100 équipée avec une vanne d'injection Rheodyne (Cotati, CA, USA) modèle 7725 munie d'une boucle d'injection de 10  $\mu\text{L}$  et d'un détecteur UV-visible 785A fourni par Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). La longueur d'onde pour le détecteur UV a été fixée à 280 nm afin d'obtenir un maximum d'absorption pour l'ensemble des composés du mélange. La séparation a été réalisée sur une colonne Stability IP (Cluzeau, France) (L x Ø 150 x 2,1 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), qui est une colonne de type silice greffée phase inverse avec un groupement acide incorporé dans le greffage (Figure 2). Ce dernier est responsable de la rétention des cations par le mécanisme complémentaire d'échange d'ions. Le débit de la phase mobile pour toutes les analyses a été fixe à 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . L'acquisition des données chromatographiques a été réalisée avec EZChrom Server software (Merck, Darmstadt, Germany).

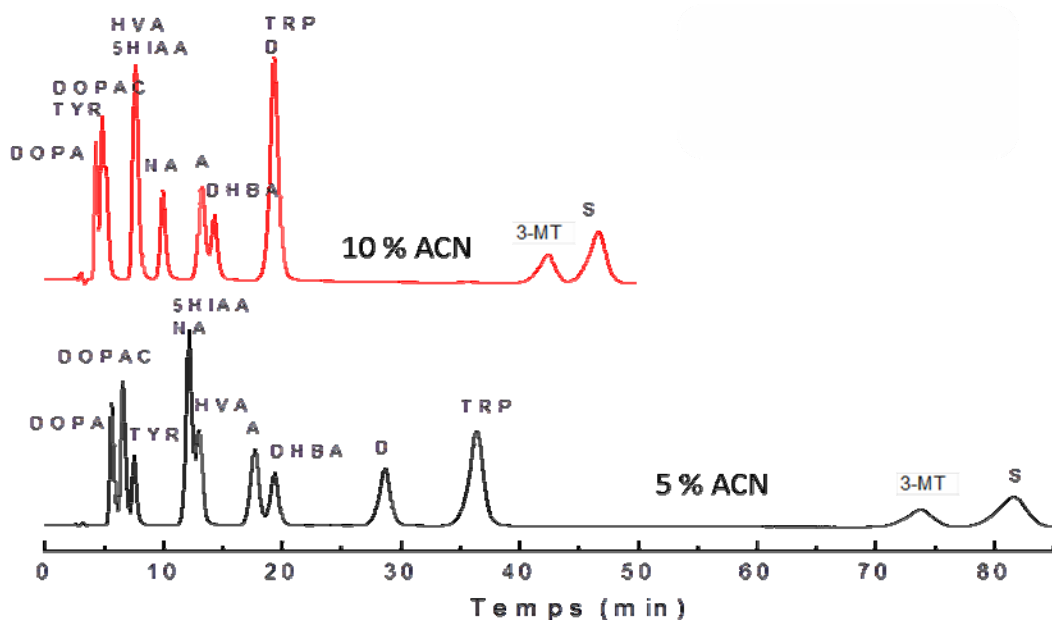


**Figure 2.** Représentation du greffon de la colonne Stability IP [23]

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

### Influence de la nature et du pourcentage du modificateur organique en phase mobile

La Figure 3 illustre le comportement très particulier du support Stability IP par rapport aux supports classiques de la phase inverse, car l'ordre de rétention a été complètement modifié.

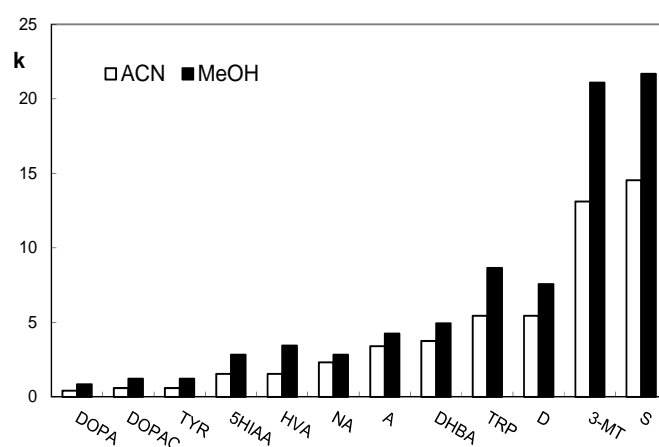


**Figure 3.** Influence du pourcentage d'ACN sur la séparation des catécholamines  
Phase mobile : ACN /  $\text{HCOONH}_4$  20 mM pH 3  
(10/90 v/v (en haut) et 5/95 v/v (en bas)) [23]

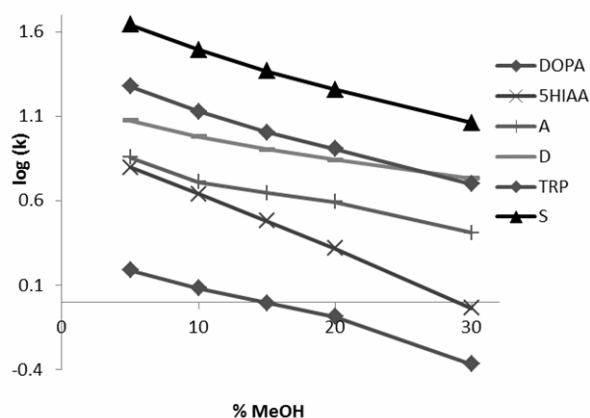
Les composés acides (DOPAC, HVA et 5HIAA) qui étaient les plus retenus sur les colonnes précédemment étudiées (greffage C18, carbone graphite poreux et pentafluorophényle) [24, 25] sont maintenant élués en début de chromatogramme avec une séparation insuffisante dans des conditions de phase mobile ACN/formiate d'ammonium ( $\text{HCOONH}_4$ ) 20 mM (10/90 v/v) pH 3. Cette faible rétention peut s'expliquer en partie par un effet de répulsion électrostatique entre ces composés chargés négativement et la charge négative portée par le greffon du support. À l'opposé, des composés positivement chargés (S et 3-MT) sont les plus retenus ce qui confirme la présence d'interactions complémentaires par rapport à un mécanisme simple de type RPLC. Parmi les 3 acides aminés du mélange, Trp est le soluté le plus hydrophobe et celui qui a la rétention la plus élevée, mettant ainsi en évidence qu'un mécanisme de

rétenion de type phase inverse intervient également sur ce support. Ces interactions hydrophobes sont confirmées par l'augmentation de la rétenion de tous les composés avec la diminution du pourcentage d'ACN (de 10 % à 5 %) dans la phase mobile.

La Figure 4 met en évidence que sur cette colonne, l'ACN a un pouvoir éluant plus important que le MeOH, ce qui a été précédemment observé en phase inverse (C18, PGC et PFP) [24, 25]. De même, une augmentation des facteurs de rétenion ( $k$ ) est enregistrée avec la diminution du pourcentage de modificateur organique dans la phase mobile (Figure 4 b).



a.



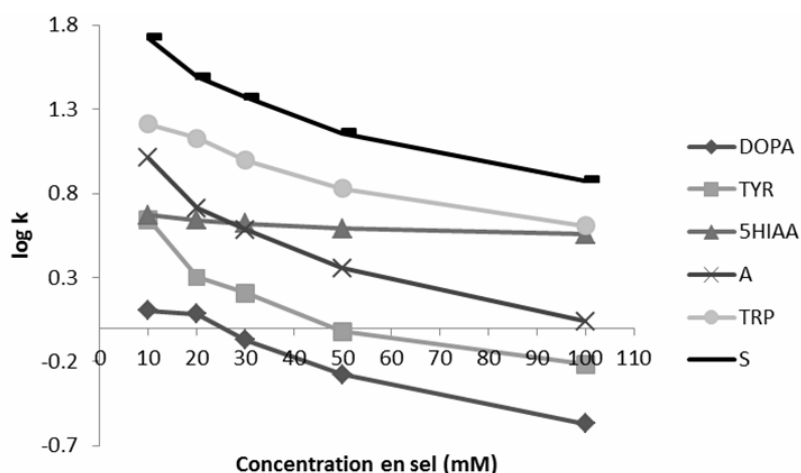
b.

**Figure 4.** Influence de la nature et du pourcentage du modificateur organique en phase mobile sur la rétenion des catécholamines  
Phase mobile : a. ACN ou MeOH /  $\text{HCOONH}_4$  20 mM, pH 3 (20/80 v/v),  
b. MeOH /  $\text{HCOONH}_4$  20 mM, pH 3 en proportions variables

Pour la suite des manipulations, le MeOH sera préféré comme modificateur organique afin d'avoir une rétenion plus importante qui nous donnera plus de souplesse pour l'optimisation des paramètres suivants.

### Influence de la concentration et de la nature du sel

Une augmentation de la concentration en sel dans la phase mobile conduit à des effets différents selon l'analyte. Si les facteurs de rétention des acides (DOPAC, 5HIAA, HVA) varient très peu avec la concentration, pour les autres analytes qui ont des amines dans leurs structures, la rétention diminue avec l'augmentation de la force ionique de la phase mobile, comme attendu lorsque la rétention est gouvernée par un mécanisme de type échange d'ions (Figure 5). Cette différence de comportement entraîne un ordre d'élution qui est dépendant de la concentration en sel et on peut donc jouer sur la force ionique de la phase mobile pour moduler la sélectivité entre les composés en fonction des besoins lors de l'analyse des échantillons biologiques.

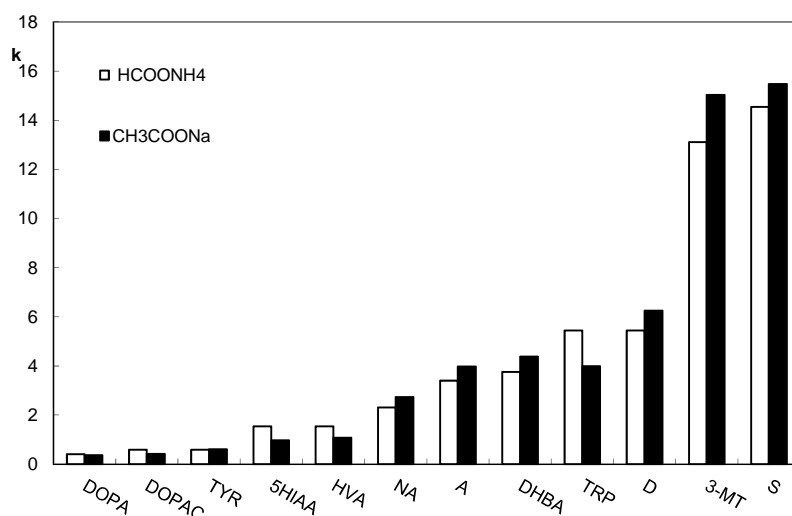


**Figure 5.** Influence de la concentration en sel dans la phase mobile sur la rétention des composés

Mobile phase : MeOH / HCOONH<sub>4</sub>, pH 3,0 (10/90, v/v)

Quand on remplace le formiate d'ammonium par l'acétate de sodium, les effets sur la rétention ne sont pas les mêmes selon l'analyte (Figure 6). On observe deux tendances contraires :

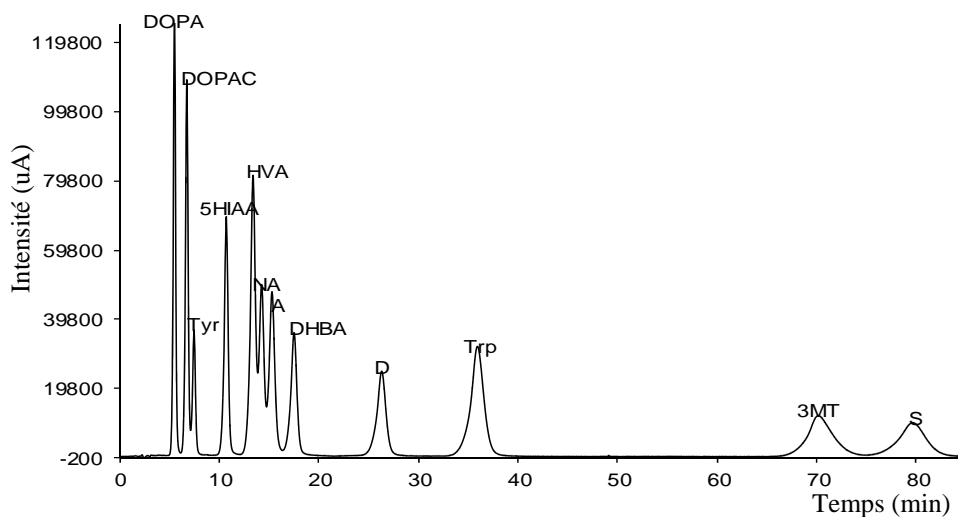
- pour les composés acides et des acides aminés (DOPA, DOPAC, HVA, 5HIAA et Trp), la rétention diminue en présence de CH<sub>3</sub>COONa ;
- pour les composés aminés (NA, A, DA, S, 3-MT et DHBA) chargés positivement, le sel de sodium est moins éluant que le sel d'ammonium, comme attendu en échange de cations.



**Figure 6.** Influence de la nature du sel sur la rétention des catécholamines  
Phase mobile : ACN / solution saline 20 mM pH 3 (10/90 v/v)

Pour la suite de notre travail, nous avons choisi d'utiliser comme sel dans la phase mobile le formiate d'ammonium à une concentration de 20 mM, du fait de sa volatilité et de sa compatibilité avec une détection par spectrométrie de masse.

La séparation optimisée des 12 composés dans ces conditions d'analyse est présentée dans la Figure 7.



**Figure 7.** Séparation isocratique des catécholamines sur la colonne Stability IP  
Phase mobile : MeOH / HCOONH<sub>4</sub> 20 mM pH 3 (10/90 v/v)

### Optimisation du gradient d'élution

Les différences importantes entre les facteurs de rétention des solutés, qui vont de la valeur 1,5 pour DOPA à 31 pour S (pour une phase mobile MeOH/HCOONH<sub>4</sub> 20 mM, pH 3, (10/90 v/v)) et qui entraîne une durée d'analyse de 80 min impose la mise au



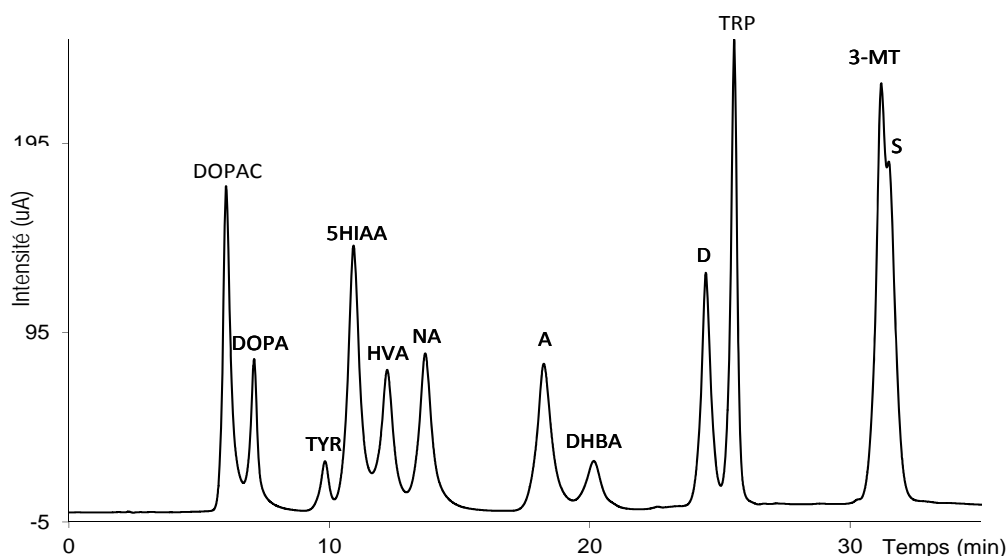
point d'un gradient d'élution, afin de diminuer le temps total d'analyse tout en gardant la séparation des premiers composés.

La bonne séparation des composés obtenue en début de chromatogramme avec une phase mobile MeOH/HCOONH<sub>4</sub> 20 mM, pH 3, (10/90 v/v) (éluant A) (voir la Figure 7) nous a conduit à choisir comme conditions initiales du gradient un palier de 5 min à cette composition de phase mobile avant d'augmenter le pourcentage de MeOH à l'aide de l'éluant B : MeOH/HCOONH<sub>4</sub> 20 mM, pH 3 (50/50 v/v) (Tableau 1).

**Tableau 1.** Composition du gradient d'élution optimisé

Temps (min)	% éluant A	% éluant B
0	100	0
5	100	0
15	80	20
17	30	70
25	0	100
35	0	100

La Figure 8 montre les meilleures conditions de gradient obtenues sur le support Stability IP.



**Figure 8.** Séparation des catécholamines avec le gradient d'élution optimisé sur colonne Stability IP

Phase mobile: A: MeOH/HCOONH<sub>4</sub> 20 mM, pH 3 (10/90 v/v)

B : MeOH/HCOONH<sub>4</sub> 20 mM, pH 3 (50/50 v/v) en gradient d'élution

## CONCLUSIONS

La colonne de type mode mixte (échange d'ions et phase inverse) offre des sélectivités nouvelles par rapport aux colonnes phase inverse classiques (PGC et C18) du fait que l'échange de cations intervient comme mécanisme supplémentaire de rétention sur ce support. Elle permet l'obtention d'une bonne séparation isocratique entre les

12 composés de notre mélange néanmoins avec un temps d'analyse trop important. La mise au point d'un gradient d'élution amènent une diminution du temps d'analyse tout en gardant une séparation totale est, à l'exception de la paire 3-MT/S. Le gain de temps apporté par le gradient est très important, la durée de l'analyse est réduite de moitié par rapport à l'analyse isocratique.

En perspective, le couplage de ce système avec la SM peut être une solution pour l'analyse du mélange des 12 catécholamines. La faible résolution de la paire 3-MT/S n'est pas un problème pour la détection en spectrométrie de masse puisque ces deux composés n'ont pas la même masse molaire et ne fragmentent pas de la même façon.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Umegaki, H., Ikari, H., Nakahata, H., Yoshimura, J., Endo, H., Yamamoto, T., Iguchi, A.: Low plasma epinephrine in elderly female subjects of dementia of Alzheimer type, *Brain Research*, **2000**, 858 (1), 67-70;
2. Cropley, V.L., Fujita, M., Innis, R.B., Nathan, P.J.: Molecular imaging of the dopaminergic system and its association with human cognitive function, *Biological Psychiatry*, **2006**, 59 (10), 898-907;
3. Fuchs, G.A., Gemende, I., Herting, B., Lemke, M.R., Oehlwein, C., Reichmann, H., Rieke, J., Emmans, D., Volkmann, J.: Dementia in idiopathic Parkinson's syndrome, *Journal of Neurology*, **2004**, 251 (Suppl 6), VI/28-VI/32;
4. Lemke, M.R., Fuchs, G., Gemende, I., Herting, B., Oehlwein, C., Reichmann, H., Rieke, J., Volkmann, J.: Depression and Parkinson's disease, *Journal of Neurology*, **2004**, 251 (Suppl 6), VI/24- VI/27;
5. Yamamoto, K., Hornykiewicz, O.: Proposal for a noradrenaline hypothesis of schizophrenia, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **2004**, 28 (5), 913-922;
6. von Bohlen und Halbach, O., Dermietzel, R.: *Neurotransmitters and Neuromodulators : Handbook of Receptors and Biological Effects*, 2<sup>nd</sup> edition, Wiley-VCH, Darmstadt, **2006**;
7. Xie, S., Suckow, R.F., Cooper, T.B.: Determination of 3,4-dihydroxyphenyl glycol in plasma by gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography methods, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **1996**, 677 (1), 37-43;
8. Siri, N., Lacroix, M., Garrigues, J.-C., Poinot, V., Couderc, F.: HPLC-fluorescence detection and MEKC-LIF detection for the study of amino acids and catecholamines labelled with naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 4446-4455;
9. Yoshitake, T., Kehr, J., Yoshitake, S., Fujino, K., Nohta, H., Yamaguchi, M.: Determination of serotonin, noradrenaline, dopamine and their metabolites in rat brain extracts and microdialysis samples by column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine, *Journal of Chromatography B*, **2004**, 807 (2), 177-183;
10. Kumarathasan, P., Vincent, R.: New approach to the simultaneous analysis of catecholamines and tyrosines in biological fluids, *Journal of Chromatography A*, **2003**, 987 (1-2), 349-358;
11. Koivisto, P., Tornkvist, A., Heldin, E., Markides, K.E.: Separation of L-DOPA and four metabolites in plasma using a porous graphitic carbon column in capillary liquid chromatography, *Chromatographia*, **2002**, 55 (1-2), 39-42;
12. Weiss, J.: *Handbook of Ion Chromatography*, 3<sup>th</sup> edition, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**;
13. De Borja, B.M., Rohrer, J.S.: Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection, *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1155 (1), 22-30;
14. Heidbreder, C.A., Lacroix, L., Atkins, A.R., Organ, A.J., Murray, S., West, A., Shah, A.J.: Development and application of a sensitive high performance ion-exchange chromatography method for the simultaneous measurement of dopamine, 5-hydroxytryptamine and norepinephrine in microdialysates from the rat brain, *Journal of Neuroscience Methods*, **2001**, 112 (2), 135-144;

15. Luo, H., Ma, L., Paek, C., Carr, P.W.: Application of silica-based hyper-crosslinked sulfonate-modified reversed stationary phases for separating highly hydrophilic basic compounds, *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1202 (1), 8-18;
16. Yaghoubian, H., Karimi-Maleh, H., Khalilzadeh, M.A., Karimi, F.: Electrochemical detection of carbidopa using a ferrocene-modified carbon nanotube paste electrode, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **2009**, 74 (12), 1443-1453;
17. Dawoud, A.A., Kawaguchi, T., Markushin, Y., Porter, M.D., Jankowiak, R.: Separation of catecholamines and dopamine-derived DNA adduct using a microfluidic device with electrochemical detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2006**, 120 (1), 42-50;
18. Wood, A.T., Hall, M.R.: Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and indoleamines using a simple gradient solvent system and native fluorescence detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **2000**, 744 (1), 221-225;
19. Bourcier, S., Benoist, J.F., Clerc, F., Rigal, O., Taghi, M., Hoppilliard, Y.: Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquide chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2006**, 20 (9), 1405-1421;
20. Lionetto, L., Lostia, A.M., Stigliano, A., Cardelli, P., Simmaco, M.: HPLC-mass spectrometry method for quantitative detection of neuroendocrine tumor markers: Vanillylmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid, *Clinica Chimica Acta*, **2008**, 398 (1-2), 53-56;
21. Rinne, S., Holm, A., Lundanes, E., Greibrokk, T.: Limitations of porous graphitic carbon as stationary phase material in the determination of catecholamines, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1119 (1-2), 285-293;
22. Tornkvist, A., Nilsson, S., Amirkhani, A., Nyholm, L.M., Nyholm, L.: Interference of the electrospray voltage on chromatographic separations using porous graphitic carbon columns, *Journal of Mass Spectrometry*, **2004**, 39 (2), 216-222;
23. Chirita, R.-I.: *Développement de nouvelles méthodes séparatives compatibles avec une détection par spectrométrie de masse et par électrochimie pour l'analyse de traces de catécholamines et molécules apparentées* (thèse de doctorat), Université d'Orléans, **2009**;
24. Chirita, R.-I., Finaru, A.-L., Elfakir, C.: Evaluation of fused-core and monolithic versus porous silica-based C18 columns and porous graphitic carbon for ion-pairing liquid chromatography analysis of catecholamines and related compounds, *Journal of Chromatography B*, **2011**, 879 (9-10), 633-640;
25. Grosu, L., Chirita-Tampu, R.I., Gavrilă, L., Finaru, A., Elfakir, C.: Twelve catecholamines and metabolites efficient separation, *Revista de Chimie (Bucharest)*, **2011**, 62 (9), 932-936.