

報 文

キャピラリーゾーン電気泳動法によるカテコールアミン類の 酸解離定数の決定

伊藤 大地¹, 水口 仁志², 高柳 俊夫^{*2}

塩基性溶液中で分解性を有する4種類のカテコールアミンについて、キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)の電気泳動移動度の変化により酸解離定数を決定した。カテコールアミンは塩基性溶液中で分解するため、エレクトロフェログラム上で分解生成物に対応するCZEピークが検出された。泳動緩衝液のpH上昇に伴い、エレクトロフェログラム上のカテコールアミンのピーク高さは分解反応により減少したが、検出されたピークの有効電気泳動移動度を用いてカテコールアミンの酸解離定数を決定することができた。測定された有効電気泳動移動度から、ドーパミンは弱酸性～弱塩基性pH領域で陽イオン、 $\text{pH} > 10$ の塩基性pH領域で陰イオンであり、測定pH範囲では2段階で連続的に酸解離することが示唆された。CZEによる解析法は分解反応物を生成する系であっても解析が可能という特長を活用して、有効電気泳動移動度の解析によりドーパミンの酸解離定数として $\text{p}K_{a1} = 9.12 \pm 0.03$, $\text{p}K_{a2} = 10.85 \pm 0.16$ が得られた。

1 緒 言

酸解離反応は基本的な溶液内の平衡反応であり、一般的に酸解離定数 ($\text{p}K_a$) は電位差滴定法や光度滴定法により決定されてきた¹⁾。電位差滴定法や光度滴定法は均一系での測定法であるため、夾雑物により対象物質の測定が妨害されるという欠点がある²⁾。すなわち、測定中に分析対象物質に分解反応が伴う場合や分離精製が難しい物質を扱う場合には、均一系での測定法により精確な $\text{p}K_a$ を決定することは困難である。一方、分離分析の手法であるキャピラリーゾーン電気泳動法 (capillary zone electrophoresis, CZE) は、電気泳動移動度の測定を通じて酸解離定数の決定法としても利用されている³⁾。CZE は分離分析であるため、測定対象となる目的物質の分離検出により夾雑物や分解反応生成物の影響を除外して、目的物質の $\text{p}K_a$ を決定することができるという特長を有する⁴⁾。CZE の分離分析の特長を利用することにより、著者らはアルカリ性溶液中で不可逆的に分解するフェノールフタレインの2段階の $\text{p}K_a$ の決定に成功し、易分解性物質の平衡反応の解析にCZEを用いる有用性を示した⁴⁾。CZEによる易分解性物質の $\text{p}K_a$ の決定は、易分解性の医薬品⁵⁾、抗酸化作用を有するポリフェノールカルボン酸類⁶⁾、酸性で分解するテトラプロモフェノールフタレインエチルエステル⁷⁾、分解性を有する

医薬品であるハロペリドール⁸⁾、プラバスタチン⁹⁾に適用されている。

本研究では、CZEの特長を活かした $\text{p}K_a$ の解析手法を、塩基性pH領域で酸化分解・光分解を受けやすいカテコールアミン類¹⁰⁾に適用した。カテコールアミン類として、ドーパミン (dopamine, DA), L-アドレナリン (L-adrenaline, AD), L-ノルアドレナリン (L-noradrenaline, NA), L-ドーパ (L-dopa, LD) の4種類の物質を対象とした。これらカテコールアミン類は神経伝達物質として知られているが、それらの酸解離定数は従来の均一系での解析手法である電位差滴定、光度滴定で決定されているに過ぎず、分解生成物の影響を排除して $\text{p}K_a$ を決定できているかは疑わしい。すなわち、分解を伴う物質では測定時の濃度が溶液調製当初の濃度よりも減少しているため、電位差滴定では滴定液の当量点体積の低下と分解生成物の中和反応による妨害があり、光度滴定では対象物質の減少による吸光度低下と分解生成物の吸光度による妨害があるためである。CZEによる解析ではこれら分解反応生成物は電気泳動分離されるので、測定対象物質だけを分離検出することで信頼性の高い解析が可能である。カテコールアミン類に適用した結果を報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

Fig. 1 に本研究で使用したカテコールアミン類を示す。AD (酒石酸水素塩), NA (酒石酸水素塩, 一水和物) は東京化成工業製のものを、DA (塩酸塩), LD はナカライテス

* E-mail: toshio.takayanagi@tokushima-u.ac.jp

¹ 徳島大学大学院先端技術科学教育部: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

² 徳島大学大学院社会産業理工学研究部: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

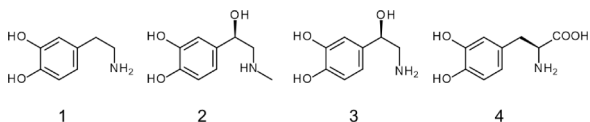


Fig. 1 Degradable catecholamines examined
1, dopamine (DA); 2, L-adrenaline (AD); 3, L-noradrenaline (NA); and 4, L-dopa (LD).

ク製のものをを用いた。

CZE で用いる泳動緩衝液として、Good の緩衝液である MES-NaOH (2-morpholinoethanesulfonic acid, pH 5.2~6.9), HEPES-NaOH (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, pH 6.8~8.3), TAPS-NaOH (*N*-tris (hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid, pH 8.0~9.3), CHES-NaOH (*N*-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid, pH 8.8~10.4), CAPS-NaOH (*N*-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid, pH 9.9~11.3) を用いた。それぞれ緩衝剤濃度を 10 mmol L⁻¹ に調製し、NaOH を添加して所定の pH に調整した。酢酸緩衝液 (pH 4.3~5.3) あるいはホウ酸緩衝液 (pH 8.5~9.3) も同様に調製し、併せて用いた。なお、それぞれの泳動緩衝液は、イオン強度 (*I*) が 0.010 mol L⁻¹ になるように NaCl を添加した。また、電気泳動移動度の基準物質として、*N*-エチルキノリニウムイオン (*N*-ethylquinolinium ion, EtQ⁺, I⁻ 塩) とナフタレン-1-スルホン酸イオン (naphthalene-1-sulfonate ion, 1-NS⁻, Na⁺ 塩) を用いた。

使用した水はメルクミリポア製 Milli-Q Gradient A10 より精製して用いた。

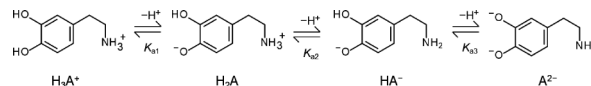
2.2 装置

キャピラリー電気泳動装置として、アジレントテクノロジー製の^{3D}CEを用い、付属のフォトダイオードアレー検出器により吸光検出した。溶融シリカキャピラリーは GLサイエンス製の内径 50 μm, 外径 375 μm のものを全長 64.5 cm に切断して用いた。吸光検出部分は、注入端から 56 cm の位置のポリイミド被覆を焼却除去して作製した。アジレントテクノロジー製の ChemStation (Ver. B 04.02) により装置の制御とエレクトロフェログラムの解析を行った。

pH メーターは東亜ディーケーケー製の HM-25G に複合ガラス電極を装着し、pH 標準溶液を用いて校正したのちに測定に用いた。

2.3 操作

pH とイオン強度を調整した泳動緩衝液をカソード側とアノード側の緩衝液バイアルにセットし、アノード側バイアルに加圧してキャピラリー内にも泳動緩衝液を満たした。1 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ ~ 5 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ のカテコールアミン



Scheme 1 Acid dissociation equilibria of dopamine

Either phenolic proton dissociates at the p*K*_{a1} step, and the other at the p*K*_{a3} step⁽¹¹⁾⁽¹²⁾.

を含む試料液をアノード側から加圧法により 50 mbar × 5 s キャピラリー内に注入したのちに、25 kV の直流電圧を印加して CZE を行った。試料液注入端から 56 cm の位置に設置したフォトダイオードアレー検出器により、検出波長 204 nm あるいは 220 nm で吸光検出した。測定中、25 °C に設定したカセット中にキャピラリーを保持して恒温とした。得られたエレクトロフェログラム上で、電気浸透流の泳動時間と試料成分の泳動時間から、常法により試料成分の有効電気泳動移動度 (μ_{eff}) を計算した。なお、1 % (v/v) のエタノールを試料液に添加して電気浸透流を検出した。また、電気泳動移動度の基準物質として、5 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ の EtQ⁺ 及び 2 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ の 1-NS⁻ を試料液に添加して検出した。

2.4 電気泳動移動度を用いる p*K*_a の解析

CZE では電圧印加によりジュール熱が発生するので高塩濃度の溶液を測定することは難しく、測定可能な pH 範囲はおおよそ 2~12 であり、解析可能な p*K*_a の範囲もそれに準じた範囲になる。そのため、Scheme 1 に示すように 3 段階の酸解離平衡を有する⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ カテコールアミン類について、本研究ではそのなかの K_{a1}, K_{a2} の 2 段階の酸解離平衡の解析を行う。酸性側の H₃A⁺, アルカリ性側の HA⁻ はそれぞれ +1 価, -1 価のイオンであり、各化学種の電気泳動移動度 μ_{ep,H3A}, μ_{ep,HA} はそれぞれ正, 負の値となる。両性イオンである H₂A は全体としての電荷がゼロになるので、その電気泳動移動度 μ_{ep,H2A} はゼロとなる。2 段階の酸解離平衡を伴う場合、任意の pH 条件下でのカテコールアミンの有効電気泳動移動度 μ_{eff} は H₃A⁺, H₂A, HA⁻ の存在分率を反映した値となり、次式(1) で示される。

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{[\text{H}_3\text{A}^+] \mu_{\text{ep,H3A}} + [\text{H}_2\text{A}] \mu_{\text{ep,H2A}} + [\text{HA}^-] \mu_{\text{ep,HA}}}{[\text{H}_3\text{A}^+] + [\text{H}_2\text{A}] + [\text{HA}^-]} \quad (1)$$

$$= \frac{[\text{H}_3\text{A}^+] \mu_{\text{ep,H3A}} + [\text{HA}^-] \mu_{\text{ep,HA}}}{[\text{H}_3\text{A}^+] + [\text{H}_2\text{A}] + [\text{HA}^-]}$$

酸解離定数の式を式(1) に代入して式(2) が得られる。

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{[\text{H}^+]^2 \mu_{\text{ep,H3A}} + K_{a1} K_{a2} \mu_{\text{ep,HA}}}{[\text{H}^+]^2 + [\text{H}^+] K_{a1} + K_{a1} K_{a2}} \quad (2)$$

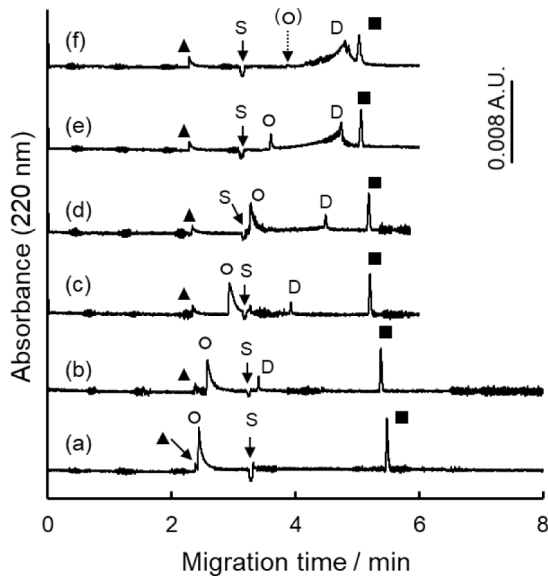


Fig. 2 Typical electropherograms of dopamine at several pH conditions

The sample solution contained 5×10^{-4} mol L⁻¹ dopamine, 2×10^{-5} mol L⁻¹ 1-NS⁻ and 5×10^{-5} mol L⁻¹ EtQ⁺ as internal standards, and 1 % (v/v) ethanol as an EOF marker. Separation buffers contained 10 mmol L⁻¹ buffer component with its pH controlled with NaOH and its ionic strength controlled at 0.01 mol L⁻¹ with NaCl. Signals: ○, dopamine; ▲, EtQ⁺; ■, 1-NS⁻; S, EOF; D, degradant from dopamine. pH of the separation buffer: (a), 7.42; (b), 8.62; (c), 9.56; (d), 10.33; (e), 10.72; (f), 11.05. CZE conditions: sample injection at 50 mbar for 5 s, applied voltage at 25 kV, measurement wavelength at 220 nm, and capillary temperature at 25 °C.

また, LD はカルボキシ基を有するために 4 段階の酸解離平衡を有するが, カルボキシ基の解離した両性イオン H₃D から 2 段階目, 3 段階目の酸解離平衡の解析を行う. 対象とする LD の 2 段階の酸解離平衡では, 任意の pH 条件下での LD の有効電気泳動移動度 μ_{eff} は H₃D, H₂D⁻, HD²⁻ の存在分率を反映した値となり, 次式(3) で示される.

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{[\text{H}_3\text{D}]\mu_{\text{ep,H3D}} + [\text{H}_2\text{D}^-]\mu_{\text{ep,H2D}} + [\text{HD}^{2-}]\mu_{\text{ep,HD}}}{[\text{H}_3\text{D}] + [\text{H}_2\text{D}^-] + [\text{HD}^{2-}]} \quad (3)$$

$$= \frac{[\text{H}_2\text{D}^-]\mu_{\text{ep,HD}} / 2 + [\text{HD}^{2-}]\mu_{\text{ep,HD}}}{[\text{H}_3\text{D}] + [\text{H}_2\text{D}^-] + [\text{HD}^{2-}]}$$

電荷量を考慮して H₂D⁻ の電気泳動移動度を HD²⁻ の電気泳動移動度の半分とするのは, フェノールフタレイン⁴⁾, フルオレセイン誘導体¹³⁾ で妥当であることが示されている. 上記の 3 種類のカテコールアミンと同様に酸解離定数の式を式(3) に代入して式(4) が得られる.

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{[\text{H}^+]K_{\text{a}2}\mu_{\text{ep,HD}} / 2 + K_{\text{a}2}K_{\text{a}3}\mu_{\text{ep,HD}}}{[\text{H}^+]^2 + [\text{H}^+]K_{\text{a}2} + K_{\text{a}2}K_{\text{a}3}} \quad (4)$$

測定条件として設定した各 pH 下でそれぞれの μ_{eff} 値が得られ, pH- μ_{eff} の一連のデータセットを式(2), 式(4) に入力して解析することにより酸解離定数と各化学種の電気泳動移動度を決定することができる. なお, 解析に際しては μ_{eff} 値を電気泳動移動度の基準物質 1-NS⁻ により規格化した値を用い, R プログラム¹⁴⁾ 上の非線形最小二乗解析により各 K_a を決定した.

3 結果と考察

3.1 CZE によるカテコールアミン類の測定

カテコールアミンに属する DA, AD, NA, LD について, 各 pH 条件下において CZE 測定を行った. 例として DA の測定結果を Fig. 2 に示す. Scheme 1 に示したように, DA は弱酸性 pH 領域で陽イオン, 塩基性 pH 領域で陰イオンであり, 荷電状態を反映したエレクトロフェログラムが得られている. すなわち, 弱酸性~弱塩基性 pH 領域で DA は電気浸透流よりも速く陽イオン化学種として, 塩基性の強い pH 領域 (pH > 10) で電気浸透流よりも遅く陰イオン化学種として検出されている.

また, DA は購入した塩酸塩を水へ溶解して調製したのみで, 特別な分解操作を加えずに CZE 測定しているが, Fig. 2 (b)~(f) に示すように塩基性 pH 領域で陰イオン性の分解生成物 D が検出されている. 泳動緩衝液の pH 上昇に伴って DA のシグナルは小さくなり, pH 11.05 では DA がほとんど検出されていない一方, 分解生成物 D のシグナルは相補的に大きくなっている. したがって, 泳動緩衝液中を DA が電気泳動する短い測定時間の間に, DA は徐々に分解生成物を生じたものと考えられる. なお, Fig. 2 (a)~(c) でほとんど分解生成物がないにもかかわらず DA のピークが小さくなっているが, これはプロトン付加体 H₃A⁺ からプロトン解離により生成する H₂A, HA⁻ のモル吸光係数が異なるためだと考えられる. 分解生成物と考えられるエレクトロフェログラム上のシグナルは, NA においても検出された.

3.2 カテコールアミン類の酸解離定数の決定

CZE では, 塩基性 pH の溶液中でカテコールアミン類が分解しても, 残存するカテコールアミンを分離検出できるため, その有効電気泳動移動度 (μ_{eff}) の測定を通して酸解離定数を決定することができる. 泳動緩衝液の pH に伴う DA の電気泳動移動度の変化を Fig. 3 に示す. 電気泳動移動度の基準物質として陽イオンの EtQ⁺ あるいは陰イオンの 1-NS⁻ を用いて μ_{eff} を規格化した. そのため, 弱酸性領

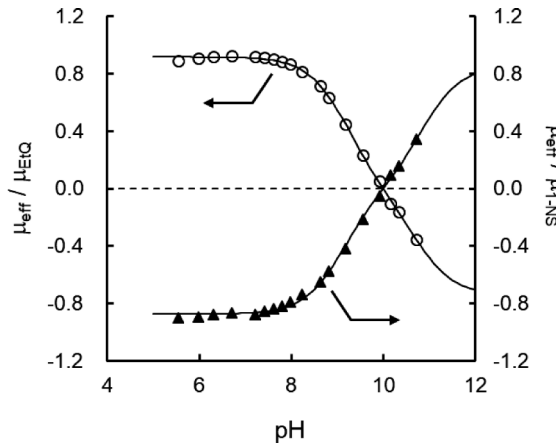


Fig. 3 Changes in the standardized electrophoretic mobility of dopamine

The effective electrophoretic mobility of dopamine, μ_{eff} , was standardized with EtQ^+ (\circ) or 1-NS^- (\blacktriangle). The fitted curves are drawn on the basis of Eq. (2). CZE conditions are the same as in Fig. 2.

域で正の値、弱塩基性領域で負の値となる μ_{eff} に対して、 EtQ^+ を基準物質として用いた場合には規格化した値は正から負に、 1-NS^- を用いた場合には負から正になっている。規格化した μ_{eff} 値は一定の pH 範囲でゼロとならずに正から負に（あるいは負から正に）連続的に変化していることから、酸解離反応も連続した反応であることが示唆される。そのため、 K_{a1} と K_{a2} を個別に解析するのではなく、連続した K_{a1} と K_{a2} を解析できる式(2)を用いて解析を行った。 EtQ^+ により規格化した μ_{eff} 値を式(2)に基づいて酸解離定数を解析したところ、Table 1 に示すように $\text{p}K_{a1} = 9.19 \pm 0.02$ 、 $\text{p}K_{a2} = 10.70 \pm 0.08$ が得られた。しかしながら、収束した $\mu_{\text{ep,H3A}}/\mu_{\text{ep,EtQ}}$ 値と $\mu_{\text{ep,HA}}/\mu_{\text{ep,EtQ}}$ 値はそれぞれ 0.92 と -0.73 であり、分子量がほぼ等しく電荷の絶対値だけが異なる H_3A^+ と HA^- に対してやや大きな差がある。一方、 1-NS^- により規格化した μ_{eff} 値を用いて解析したところ、 $\text{p}K_{a1} = 9.12 \pm 0.03$ 、 $\text{p}K_{a2} = 10.85 \pm 0.16$ が得られ、収束した $\mu_{\text{ep,H3A}}/\mu_{\text{ep,1NS}}$ 値と $\mu_{\text{ep,HA}}/\mu_{\text{ep,1NS}}$ 値はそれぞれ -0.87 と 0.86 で良好に一致した。カテコールアミン類は塩基性溶液中で分解するため、塩基性 pH 領域で陰イオンとして存在するカテコールアミン類の電気泳動移動度を測定することがより重要であり、 1-NS^- により規格化した μ_{eff} 値を用いて式(2)により解析することにした。

DA を含む 4 種類のカテコールアミン類の有効電気泳動移動度を弱酸性から塩基性の pH 領域で測定し、 1-NS^- により規格化した μ_{eff} 値を Fig. 4 に示す。AD, NA は DA と同様に弱酸性での陽イオンから塩基性で陰イオンへと連続的に変化することがわかる。一方、LD は構造中にカルボキシ基を有し、その報告されている $\text{p}K_a$ 値が $2.32^{10)}$ のため、弱酸性領域で両性イオンとなり、形式上無電荷化学種 H_3D

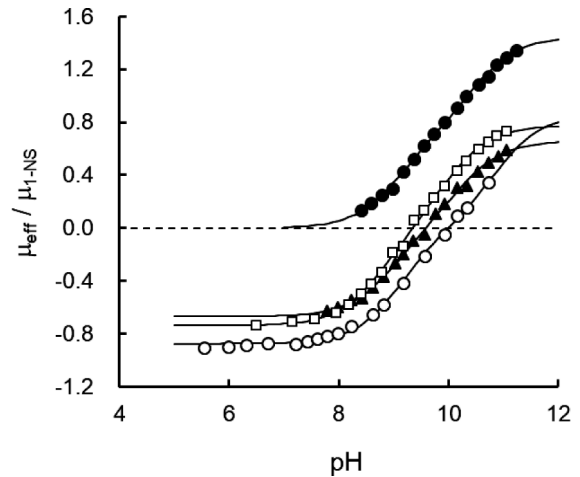


Fig. 4 Changes in the effective electrophoretic mobility of catecholamines

The effective electrophoretic mobility was standardized with 1-NS^- . The fitted curves are drawn on the basis of Eqs. (2) or (4). Symbols: \circ , DA; \blacktriangle , AD; \square , NA; \bullet , LD. CZE conditions are the same as in Fig. 2.

のゼロの電気泳動移動度から pH 上昇に伴い酸解離した陰イオン性化学種 H_2D^- 、 HD^{2-} の電気泳動移動度へと増加することがわかる。

式(2)あるいは式(4)を用いる解析により得られた $\text{p}K_a$ 値を Table 1 にまとめた。なお、陽イオンから陰イオンへと変化する 3 種類のカテコールアミンについて、解析により収束した $\mu_{\text{ep,H3A}}/\mu_{\text{ep,1NS}}$ 値と $\mu_{\text{ep,HA}}/\mu_{\text{ep,1NS}}$ 値とは 5% の範囲内で近い値が得られた。 $\text{p}K_a$ 値の既報値との比較では、DA, AD, NA で $\text{p}K_{a1}$ 値は比較的近い値が得られているが、 $\text{p}K_{a2}$ 値では本法で得られた値がやや大きくなっている。カテコールアミン類は神経伝達物質としてよく知られている物質群であるが、報告されている $\text{p}K_a$ 値は電位差滴定あるいは光度滴定で求められた値しかなく、報告されている値もばらばらであり、正しい測定結果とは言い難い。塩基性溶液中で分解するカテコールアミン類について、分解物共存下では測定が妨害される手法で求めた値であり、報告値は大きな誤差を含むものと考えられる。一方、分離分析を伴う CZE では、測定対象物質が CZE ピークとして検出される限りは正確な電気泳動移動度の測定が可能であり、信頼性の高い結果が得られたものと考えている。

なお、LD で $\text{p}K_{a1} = 2.32$ の報告値があるが、酸性領域で LD は分解しないので電位差滴定などの通常法で容易に $\text{p}K_a$ を決定することができる。CZE による解析法は電位差滴定法などの方法と相補的であることはすでに多くの物質で示されている²⁾³⁾。分解性を有するなど通常の方法では解析できない物質群に対して CZE による解析法は有効であり、通常法でできる物質群をわざわざ CZE を用いて解析す

Table 1 Acid dissociation constants of catecholamines

	This study (CZE) ^{a)}			Reference value				Method [Ref.] ^{b)}
	p <i>K</i> _{a1}	p <i>K</i> _{a2}	p <i>K</i> _{a3}	p <i>K</i> _{a1}	p <i>K</i> _{a2}	p <i>K</i> _{a3}	p <i>K</i> _{a4}	
Dopamine	9.12 ± 0.03	10.85 ± 0.16	– ^{d)}	8.96	10.50	–		Pot. [15]
	(9.19 ± 0.02) ^{c)}	(10.70 ± 0.08) ^{c)}		8.9	10.6	–	N/A ^{e)}	Handbook [10]
L-adrenaline	8.95 ± 0.04	10.21 ± 0.04	–	9.84	–	–		Pot. [15]
				8.02	9.46	10.28	N/A	Spec. [16]
L-noradrenaline	8.74 ± 0.03	9.97 ± 0.03	–	8.55-8.88	9.8-9.9			Handbook [10]
				8.57	9.73	11.13		Pot. [15]
L-dopa	–	9.08 ± 0.02	10.47 ± 0.05	8.82	9.98	–		Handbook [10]
				2.32	8.72	9.96	11.79	Handbook [10]

a) Ionic strength at 0.010 mol L⁻¹. Error: standard error. 1-NS⁻ was used as an internal standard. b) Pot.: potentiometric titration; Spec.: spectrophotometric titration. c) Determined with EtQ⁺ as an internal standard. d) Not available. e) Not applicable.

る必然性はない。

4 結 言

本研究では, CZE の電気泳動移動度を用いる酸解離定数の解析手法を塩基性溶液中で分解する 4 種類のカテコールアミン類に適用した. CZE は電気泳動分離を伴う分離分析法であることから, プロトン付加/プロトン解離平衡に関与する化学種を分解生成物から分離検出することにより, 分解生成物の影響を受けることなく測定対象物質の酸解離定数を決定できる有効な手法であることが示された.

謝 辞

本研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費補助金「基盤研究 (C)」(17K05903) の支援によりなされたことを付記し, ここに謝意を表します.

文 献

- 1) 吉野諭吉: “酸・塩基とは何か”, (1989), (共立出版).
- 2) M. Andrasi, P. Buglyo, L. Zekany, A. Gaspar: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 1040 (2007).
- 3) C. Dardonville: *Drug Discov. Today*, **27**, 49 (2018).
- 4) T. Takayanagi, S. Motomizu: *Chem. Lett.*, **30**, 14 (2001).

- 5) E. Örnkov, A. Linusson, S. Folestad: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 379 (2003).
- 6) S. P. Ozkorucuklu, J. L. Beltrán, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Alsancak, J. Barbosa: *J. Chem. Eng. Data*, **54**, 807 (2009).
- 7) T. Takayanagi, A. Tabara, T. Kaneta: *Anal. Sci.*, **29**, 547 (2013).
- 8) 島上夏美, 藪谷智規, 高柳俊夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **63**, 643 (2014).
- 9) T. Takayanagi, M. Amiya, N. Shimakami, T. Yabutani: *Anal. Sci.*, **31**, 1193 (2015).
- 10) 日本生化学会編: “生化学データブック”, p. I-1383 (1979), (東京化学同人).
- 11) T. Baba, T. Matsui, K. Kamiya, M. Nakano, Y. Shigeta: *Int. J. Quantum Chem.*, **114**, 1128 (2014).
- 12) R. Romero, P. R. Salgado, C. Soto, D. Contreras, V. Melin: *Front. Chem.*, **6**, 208 (2018).
- 13) K. Hirabayashi, K. Hanaoka, T. Takayanagi, Y. Toki, T. Egawa, M. Kamiya, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, K. Yoshida, M. Uchiyama, T. Nagano, Y. Urano: *Anal. Chem.*, **87**, 9061 (2015).
- 14) The R Project for Statistical Computing, available from <<https://www.r-project.org/>>, (accessed 2019-7-11).
- 15) K. S. Rajan, J. M. Davis, R. W. Colburn: *J. Neurochem.*, **18**, 345 (1971).
- 16) S. Corona-Avenidaño, G. Alarcón-Angeles, A. Rojas-Hernández, M. A. Romero-Romo, M. T. Ramírez-Silva: *Spectrochim. Acta A*, **61**, 305 (2005).

Determination of Acid Dissociation Constants of Degradable Catecholamines by CZE

Daichi ITOH¹, Hitoshi MIZUGUCHI² and Toshio TAKAYANAGI^{*2}

* E-mail : toshio.takayanagi@tokushima-u.ac.jp

¹ Department of Chemical Science and Technology, Graduate School of Advanced Technology and Science, Tokushima University, 2-1, Minamijyousanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

² Department of Applied Chemistry, Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University, 2-1, Minamijyousanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

(Received July 12, 2019; Accepted July 24, 2019)

The acid dissociation constants (pK_a) of four catecholamines were determined through changes in the effective electrophoretic mobility by capillary zone electrophoresis (CZE). The catecholamines are degradable in alkaline aqueous solutions, and the CZE peaks corresponding to the degraded species from the catecholamine were detected in the electropherogram. Although the peak height of the catecholamine in the electropherogram decreased under alkaline pH conditions, the acid dissociation constants of catecholamines were determined based on the peak of the catecholamine detected. The effective electrophoretic mobility of dopamine ($\mu_{\text{eff,DA}}$), as an example, was positive at weakly acidic to weakly alkaline pH conditions, suggesting that dopamine was positively charged by protonation. The $\mu_{\text{eff,DA}}$ value decreased with increasing pH of the separation buffer, and the value was negative at alkaline pH conditions of $\text{pH} > 10$; the protonated dopamine dissociates at two steps, and it becomes anionic. Two steps of the acid dissociation constants were determined through changes in the effective electrophoretic mobility; $pK_{a1} = 9.12 \pm 0.03$ and $pK_{a2} = 10.85 \pm 0.16$ were determined for dopamine.

Keywords: catecholamines; acid dissociation constants; capillary zone electrophoresis; degradable compounds.