

# **АНАЛИЗ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АМИНОТИОЛОВ МЕТОДАМИ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ОФ ВЭЖХ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И ПРЯМОЙ УФ-ДЕТЕКЦИЕЙ**

<sup>1</sup> Мельников И.О., <sup>2</sup> Назимов И.В., <sup>1</sup> Глубоков Ю.М.

<sup>1</sup> Московская государственная академия тонкой химической  
технологии им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова

Количественное определение содержания низкомолекулярных аминотиолов с каждым годом становится все более актуальным. Это обусловлено тем, что некоторые из них являются молекулярными (биологическими) маркерами целого ряда заболеваний. По содержанию гомоцистеина в крови определяют тяжесть заболеваний нервной системы, а также инфаркт, инсульт, диабет и др. Общепринятыми методами анализа данного класса соединений являются высокоэффективная жидкостная и газовая хроматография, капиллярный электрофорез. Однако определение аминотиолов в образцах биологического происхождения с применением данных методов сопряжено с целым рядом трудностей, что связано в значительной мере с сложным составом анализируемой смеси и низким содержанием (10-100 нм/мл) определяемых компонентов. Обычно для идентификации аминотиолов применяют фотометрический, флуориметрический и масс-спектрометрический и электрохимический, способы детекции. Каждый из них имеет определенные недостатки и в этой связи ограниченное применение. Электрохимический способ имеет плохую воспроизводимость, масс-спектрометрический способ крайне дорог, фотометрический и флуориметрический способ требует предварительной модификации аминотиолов. Цель выполненной работы заключалась в разработке максимально эффективного и хорошо воспроизводимого метода анализа, отличающегося быстротой выполнения и экономичностью.

Нами проведен анализ модельных растворов содержащих одновременно цистеин, гомоцистеин и глутатион методом ОФ ВЭЖХ с прямой УФ и флуоресцентной детекцией. Найдены оптимальные условия, включая систему элюентов, позволяющие провести полное разделение определяемых компонентов и возможность количественной

оценки концентраций в указанном выше диапазоне. В зависимости от определяемой концентрации воспроизводимость анализа по площади пика составляет 0,8-4,3%, а по времени удерживания - 0,1-2,1%. Время анализа – 20 мин. Оптимизирована стадия дериватизации аминотиолов. В качестве флуоресцентной метки использовали монобромбиман. Изучена зависимость выхода реакции дериватизации от pH реакционного объема. Показано, что чувствительность флуоресцентной детекции на порядок превышает чувствительность прямой УФ. Предел чувствительности детектирования по флуоресценции составил  $\approx 1-2,5$  нм/мл, что позволяет определить патологию пониженного содержания гомоцистеина в крови. Каждое из исследуемых соединений выделено из смеси и охарактеризовано масс-спектрометрически.

Параллельно проводили разделение и идентификацию аминотиолов в модельных образцах методом капиллярного электрофореза с прямым УФ детектированием. В качестве метки также использовали монобромбиман ( $\lambda_{\max} = 234, 250$  нм). Проведено полное разделение смесей содержащих цистеин, гомоцистеин и глутатион. Разделение методом мицеллярной электрокинетической хроматографии дает значительно лучшие результаты, чем метод классического зонального электрофореза. Лучшие результаты достигнуты при использовании боратных буферных растворах (pH 10,5). В качестве детергента служил додецилсульфат натрия. Предел чувствительности детекции по поглощению составляет  $\approx 25$  нм/мл. Время анализа не превышает 14 мин.

Полученные результаты позволили сделать вывод о возможности количественного определения указанными методами содержания цистеина, гомоцистеина и глутатиона при их совместном присутствии в диапазоне концентраций 2,5-100 нм/мл. Чувствительность определения методом ОФ ВЭЖХ с флуоресцентной и прямой УФ детекцией несколько выше чувствительности метода капиллярного электрофореза с прямой УФ. В то же время метод капиллярного электрофореза обеспечивает получение более ясной картины разделения. Это позволяет проводить качественный анализ сложных смесей, содержащих низкомолекулярные аминотиолы.