

Методологические аспекты и трудности анализа свободных (физиологических) аминокислот и родственных соединений в биологических жидкостях и тканях

Дорошенко Е.М.

Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно

darashenka@rambler.ru

Анализ свободных (физиологических) аминокислот (СА) требует существенно более высокой разрешающей способности, так как заключается в одновременном определении как белковых аминокислот, в том числе образующихся при посттрансляционных модификациях, так и аминокислот, не содержащихся в белках, а также их производных (таких как фосфоэтаноламин, цистеиновая кислота, таурин, фосфосерин и др.). Кроме этого, требуется проверка аналитической пригодности метода для каждого вида биологического материала в связи с влиянием матрицы пробы. В настоящее время основной аналитической технологией анализа СА является обращенно-фазная ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией и детектированием по флуоресценции, как обеспечивающая наибольшую специфичность и чувствительность. Существует ряд методических трудностей при разработке таких методов, которые можно подразделить на связанные с дериватизацией, разделением, детектированием, а также проблемы автоматической идентификации пиков и обработки хроматограмм.

Нами разработана модификация метода определения СА, не уступающая традиционной катионообменной хроматографии СА, но превосходящую ее по чувствительности. Использована система Agilent 1100 с 4-градиентной системой подачи растворителя. Колонка Zorbax XDB C₈, 3,5 мкм, 2,1x150 мм, подвижная фаза – 0,1 М ацетатный буфер, pH 6,8 / ацетонитрил. В качестве биологического материала использовали хлорнокислые экстракты тканей и биологических жидкостей, которые вводили в хроматограф после предколоночной дериватизации с *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой (ОРА-3-МРА) – для первичных аминогрупп и флуоренилметилкарбонилхлоридом (ФМОС) – для вторичных. Было отработано разделение СА с разрешением, приемлемым для исследованных видов тканей и биологических жидкостей. Были идентифицированы основные источники ошибок и критичные параметры методов, использующих аналогичные принципы: pH реакционной смеси при дериватизации и после нейтрализации, pH подвижной фазы (критично для разделения аргинина, гистидина и метилгистидинов, этаноламина, фосфорилированных производных АК и этаноламина, омега-аминокислот), температура колонки, время (объем) задержки градиента. При переключении длин волн в ходе анализа критичным является также момент переключения. Типичное количество биологического материала для анализа составляет 20 мкг для тканей и 100 нл для плазмы крови. Основным ограничением для определения большинства соединений является разрешение с соседними пиками, что связано с одновременным присутствием в пробе соединений, выходящих соседними пиками, в концентрациях, различающихся на 3 порядка.