

Определение связанной фракции цистеина, гомоцистеина и цистеинилглицина в плазме крови с помощью капиллярного электрофореза

Иванов А.В., Лузянин Б.П., Вирус Э.Д., Рыбаков А.С., Кубатиев А.А.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН,
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Исследована возможность применения капиллярного электрофореза для анализа связанных аминотиолов плазмы крови при их дериватизации тиокарбонилдиимидазолом. Показано что электрокинетическое концентрирование соответствующих производных может значительно повысить чувствительность по сравнению с гидродинамическим вводом, однако эффективность такого концентрирования сильно ограничена присутствующими в пробе солями. Предложенная методика даёт возможность определения связанных аминотиолов плазмы крови (цистеина, гомоцистеина, цистеинилглицина) с достаточной чувствительностью (~1 мкМ гомоцистеина).

Ключевые слова: гомоцистеин, цистеин, цистеинилглицин, капиллярный электрофорез, тиокарбонилдиимидазол

Введение

Многочисленными исследованиями было показано, что гомоцистеин (Гцис) является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и связанных с ними осложнений [21, 26]. Изучение их физиологии и патоморфологии во многих случаях выявляет дисфункцию эндотелия как ключевую составляющую повреждения сосудов [10] и роли Гцис в развитии эндотелиальной дисфункции и тромбообразовании [19, 22].

Анализ общего Гцис давно был внедрен в клиническую практику для целей мониторинга, прогноза, исследовательских и популяционных работ, оценки статуса фолата и кобаламина, но до сих пор продолжается поиск новых, более доступных и совершенных путей его определения. Наибольшее распространение получили методы на базе ВЭЖХ с флуоресцентным детектором [23] и ИФА [24]. Также можно упомянуть методы ВЭЖХ-масс-спектрометрии [1, 12, 17], капиллярного электрофореза (КЭ) с флуоресцентным детектором [3, 13], КЭ-масс-спектрометрии [2, 8] и др. Большинство из них требует применения дорогостоящего оборудования или реагентов, поэтому представляет интерес использование распространенных УФ-детекторов в сочетании с ВЭЖХ или КЭ. Предложенные методики ВЭЖХ-УФ для определения Гцис и других аминотиолов в ряде случаев позволяют даже определять их фракционный состав с помощью 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты (ДТНБ) [15]. Здесь также стоит упомянуть такие реагенты, как дитиопиридин (постколоночная дериватизация [5]), 2-хлоро-1-метилхинолинтетрафлуороборат [7], 2-хлоро-1-метилпиридин [6] и даже наночастицы золота [20]. За исключением первого реагента все остальные использовали для предколоночной дериватизации и с обращенно-фазовой хроматографией. КЭ представляет альтернативу ВЭЖХ, обладая большим разделительным потенциалом (до 10^7 теоретических тарелок), однако проигрывает ей в чувствительности. К примеру, при переходе к КЭ чувствительность тионитробензойных производных недостаточна не только

для определения восстановленной фракции, но даже для определения общего содержания Гцис [25], что обусловлено малым объемом инъекции и необходимостью детектировать аналиты непосредственно в капилляре, имеющем внутренний диаметр всего 25—75 мкм. Существуют модификации капилляра (bubble-, Z-cell), позволяющие в несколько раз поднять чувствительность, но даже в этом случае чувствительность такой системы обычно остается гораздо ниже ВЭЖХ-УФ без применения специальных приемов концентрирования образца в капилляре. Если исключить исследования аминотиолов с применением реагентов для флуоресценции [14, 11] с КЭ-УФ детектированием, то на сегодняшний момент имеется лишь один пример успешного применения КЭ-УФ для анализа общего Гцис с помощью 2-хлоро-1-метилхинолинтетрафлуоробората [16]. Однако предложенный подход ограничен необходимостью самостоятельного синтеза дериватирующего реагента, что не везде возможно и требует постоянного контроля его качества.

В работе [4] применили тиокарбонилдиимидазол (ТКДИ) для определения общего содержания Гцис, цистеина (Цис) и цистеинилглицина (Цисгли). Реакция ТКДИ с аминотиолами имеет особенности по сравнению с другими реагентами. Во-первых, это слабоионизируемое соединение и в дальнейшем будет показано что это важно для КЭ. Во-вторых, в отличие от большинства модификаторов ТКДИ не присоединяется к аминотиолу всей структурой, а отдает молекуле аналита всего два атома C=S (тиокарбонильную группу), при этом высвобождается две молекулы имидазола. Обобщенно реакция показана на рис. 1, где под -R- подразумевается углеродный скелет аминотиола. Так образуются циклические 5-членные тиоксотиазолидиновые (из Цис, Цисгли, пеницилламина (ПА)) и 6-членные тиоксотетрагидротриазининовые (из Гцис) карбоксильные кислоты.

Таким образом, ТКДИ можно охарактеризовать как неспецифический бифункциональный сшивающий агент. У глутатиона, ввиду удаленности его -NH₂ и -SH групп,

затруднено образование циклического производного. Возможность S,N-тиокарбонилирования γ -глутамилцистеина ещё не исследована.

При разработке метода анализа с помощью КЭ-УФ ввиду низкой чувствительности важнейшей задачей является концентрирование аналитов в капилляре. Существует множество способов и большинство из них основаны на трех принципах:

- 1) создание в капилляре зон с различной электропроводностью;
- 2) образование градиента pH;
- 3) перераспределение аналитов в гетерогенной (мицеллярной или микроэмульсионной) системе.

Эти процессы могут использоваться самостоятельно или сочетаться друг с другом. Ввиду анионного и гидрофильного характера образующихся при действии ТКДИ производных метод электрокинетической инъекции (ЭИ) пробы с последующим pH-концентрированием в обращенном поле [10, 18], основанный на первых двух принципах концентрирования, может повысить чувствительность более чем на порядок по сравнению с обычной гидродинамической инъекцией.

При данном подходе основным мешающим компонентом в плазме крови являются ионы Na^+ , Cl^- и других электролитов, так как соотношение электропроводностей пробы и буферного раствора в капилляре определяет падение напряжения на границе проба/капилляр, т.е. силу действующую на аналиты. В нашей работе чтобы обойти эту проблему мы применили ультрафильтрацию, таким образом, определяя не общее содержание, а связанные с белками формы аминокислот, которые составляют ~50% от общего Цис и Цисгли, и ~70% от общего Гцис [27]. Также необходимо отметить, что применение слабоионизируемого реагента, такого, как ТКДИ, дает преимущество перед сильноионизируемым (ДТНБ и др.). Увеличить загрузку образца можно если после его введения провести ЭИ щелочи. При этом образуется градиент pH, который сужает зоны аналитов [10, 18].

В данной работе мы применили КЭ-УФ с ЭИ в обращенном поле для определения общего уровня белок-связанных Цис, Гцис и Цисгли с помощью дериватизации ТКДИ.

Материалы и методы

Оборудование

Система КЭ Agilent CE (Германия), центрифуга Elmi SM-50 (Латвия), термомиксер Eppendorf Thermomixer compact (Германия), деионизатор воды Millipore Simplicity 185 с картриджем Simpakor 1, УЗ-ванна Elma s10 (Германия).

Реактивы

ТКДИ (Sigma-Aldrich), NH_4Ac осч (Реахим), NaCl purum p.a. (Fluka), D-ПА (Sigma), DL-Дитиотреитол (ДТТ) >99,5% (Fluka), L-цистеин 97% (Aldrich), Цистеинилглицин >85% (Sigma), DL-гомоцистеин >95% (Sigma), гексадецилтриметиламмоний бромид (СТАВ, Sigma), NaOH чх.

Обработка результатов

Первичную обработку электрофореграмм (определение площадей пиков) осуществляли в ПО Data Analysis Chemstation (Agilent), построение калибровочных данных и статистический анализ в Microsoft Excel '97.

Пробоподготовка

Получение плазмы

В качестве материала для анализа использовали 8 образцов плазмы крови здоровых доноров в возрасте от 20 до 42 лет (средний возраст 32 ± 7 лет).

Венозную кровь, собранную в пробирки с цитратом Na , центрифугировали при 3000 g 3 минуты и отбирали плазму крови, которую замораживали при -20°C и хранили до дальнейших манипуляций.

Обработка плазмы крови

К 50 мкл плазмы добавили 450 мкл воды и центрифугировали через фильтр 15 мин при 14000 g. Затем к остатку (~100 мкл) добавили ещё раз 400 мкл воды и так же центрифугировали, таким образом получая 50-кратное разведение плазмы по низкомолекулярным соединениям. К остатку добавили 50 мкл 100 мкМ ПА (внутренний стандарт) и 20 мМ ДТТ. Смесь инкубировали 10 мин при 37°C и добавили 100 мкл 50 мМ ТКДИ. Пробу центрифугировали 5 мин при 5000 g для удаления нерастворимого осадка и 200 мкл супернатанта фильтровали 15 мин при 14000 g. Пробу хранили при 4°C и анализировали в течение 1–3 дней после дериватизации.

Приготовление калибровочных растворов

Раствор А: 500 мкМ цис, 200 мкМ цисгли, 100 мкМ гцис, 100 мкМ ПА и 10 мМ ДТТ. Раствор Б: 100 мкМ ПА, 10 мМ ДТТ. Раствор В: фильтрат плазмы (см. обработка плазмы крови). Растворы А и Б инкубировали 10 мин при 37°C и затем добавили эквивалентный объем 50 мМ ТКДИ и центрифугировали при 3000g 5 мин. Путем последовательного разбавления раствора А раствором Б получили серию калибровочных растворов с концентрациями Цис 15,6–500, Цисгли 6,3–200, Гцис 3,1–100 мкМ (без учета разбавления при дериватизации), которые непосредственно инжестировали в КЭ. Для оценки влияния плазмы эти калибровочные растворы разбавляли в 2 раза раствором В.

КЭ-УФ

Использовали кварцевый капилляр 48,5 см длиной (40 см эфф.) и внутр. диаметром 50 мкм. Регистрацию сигнала проводили по поглощению при 254 ± 20 нм. Перед работой капилляр промывали по 3 мин этанолом, 1 М NaOH , 10 мМ СТАВ, водой и электролитом (0,2 М NH_4Ac с 25 мкМ СТАВ), который предварительно обрабатывали в УЗ-ванне 2 мин. КЭ проводили в растворе электролита при -15 кВ в течение 15 мин, затем капилляр промывали водой 1 мин и электролитом 3 мин. Инжестировали образец при -15 кВ 30 с, затем 200 мМ NaOH 60 с при -15 кВ. Для предварительных экспериментов использовали короткий капилляр длиной 28,5 см (20 см эфф.), на который подавали напряжение -15 кВ.

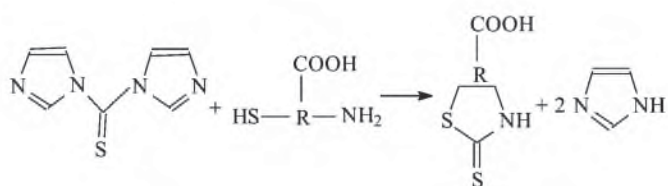


Рис. 1. Реакция ТКДИ с аминокислотами.

Результаты и обсуждение

КЭ-УФ

При ЭИ под действием электрического поля заряженные молекулы (анионы в случае так называемого «обращенного поля», когда входной конец капилляра служит катодом) попадают во входной конец капилляра, замещая ионы электролита. Зона ввода в капилляре определяется величиной поданного напряжения и временем ЭИ, а концентрация перешедших из пробы анионов в капилляре определяется ионной силой раствора электролита. Это основное отличие электрокинетического и гидродинамического ввода, так как в последнем случае все компоненты пробы попадают в капилляр и не происходит изменения их концентрации на этапе ввода. При анализе заряженных соединений одного знака ЭИ за счет вышеописанных особенностей позволяют многократно увеличить загрузку капилляра и соответственно чувствительность. На рис. 2 показаны электрофореграммы плазмы крови с использованием ЭИ и гидродинамической инъекции. Как видно, при одном времени инъекций ЭИ обеспечивает более чем 10-кратный рост интенсивности сигналов.

При продолжительной ЭИ ширина её зоны зачастую оказывается слишком велика для эффективного разделения компонентов, а интенсивность сигнала недостаточна. Чтобы сузить эту зону, дополнительно сконцентрировав аналиты, применяют так называемый «щелочной стэкинг», т.е. ЭИ раствора щелочи после ввода пробы. OH^- , попадая в капилляр, образуют градиент pH, за счет которого аналиты в зоне высокого pH имеют большую подвижность, и таким образом происходит сужение зоны ЭИ [10, 18]. На рис. 3 продемонстрировано влияние «щелочного стэкинга» на интенсивность и ширину получаемых пиков.

В процессе пробоподготовки нами была использована ультрафильтрация для очистки белков как биологической фазы, сорбирующей аналиты, от низкомолекулярных мешающих компонентов и для очистки ТКДИ-производных аминокислот от белков. Широко применяемые для ВЭЖХ-анализа методы кислотной, спиртовой депротенинизации, а также ионообменной экстракции мало совместимы с КЭ ввиду требования минимизировать содержание солей в пробе. На рис. 4 приведена электрофореграмма плазмы крови с использованием 200 мМ ацетата аммония в качестве электролита. Более высокие концентрации использовать было затруднительно из-за высокого тепловыделения, меньшие же не давали требуемое разделение и пропорционально снижали загрузку капилляра (данные не показаны). Для обращения электроосмотического потока в раствор вносили СТАВ в концентрации 25 мкМ, при этом предварительно раствор подвергали ультразвуковой обработке. Также перед экспериментами капилляр активировали обработкой щелочью и промывали раствором СТАВ большой концентрации. Без этих предварительных процедур наблюдалась невоспроизводимость КЭ.

Влияние содержания солей в пробе продемонстрировано на рис. 5. Видно, что добавление небольшого количества NaCl к пробе приводит к многократному падению сигнала. Это в немалой степени обуславливает низкую чувствительность КЭ-анализа в биологических образцах, таких, как плазма крови, внутриклеточная жидкость, микродиализаты. Таким образом, содержание соли в биопробах является основным фактором снижения чувствительности КЭ с применением ЭИ.

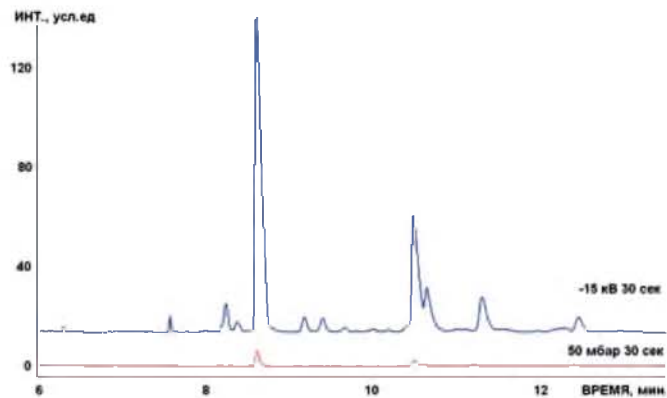


Рис. 2. Сравнение гидродинамической и электрокинетической инъекций плазмы крови. Условия: капилляр 48,5 см, 50 мкм внутр. диам., напряжение -15 кВ. Постинъекция 0,2 М NaOH -15 кВ, 60 с.

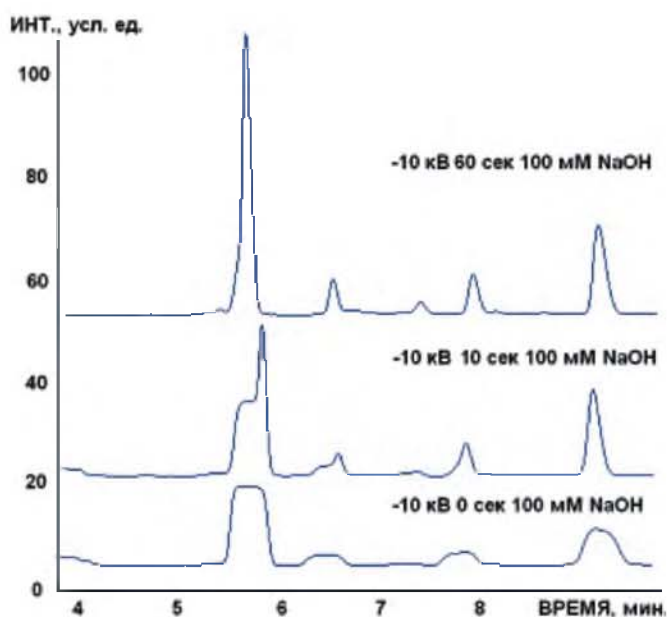


Рис. 3. Влияние «щелочного стэкинга» на концентрирование аналитов в капилляре. ЭИ плазмы крови 30 с при -10 кВ. Условия: капилляр 28,5 см, 50 мкм внутр. диам., напряжение -10 кВ.

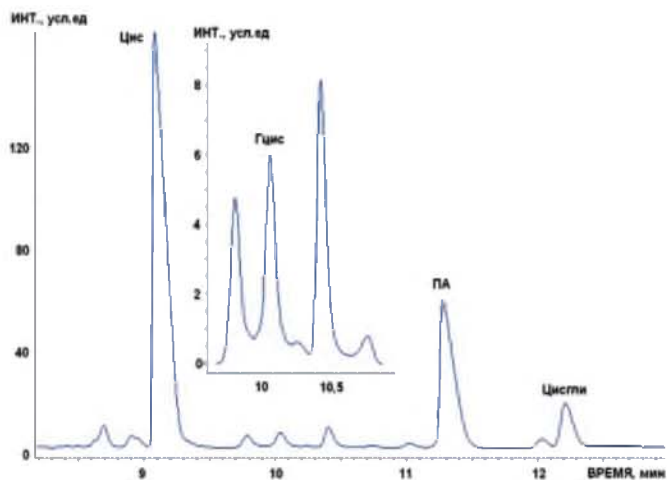


Рис. 4. Электрофореграмма плазмы крови. ЭИ 30 с при -15 кВ, постинъекция 0,2 М NaOH -15 кВ, 60 с. Капилляр 48,5 см, 50 мкм внутр. диам., напряжение -15 кВ.

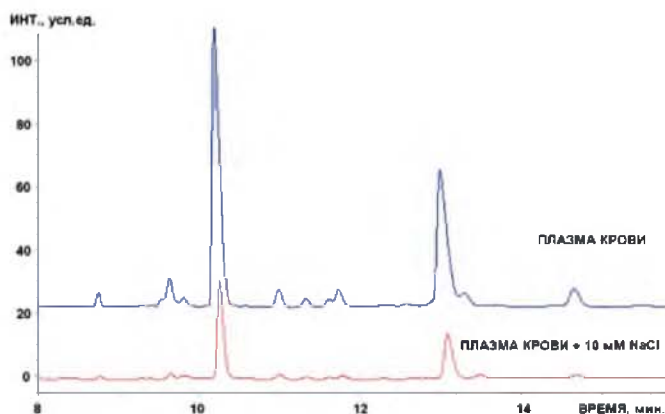


Рис. 5. Влияние концентрации солей в пробе на ЭИ (30 с при -15 кВ). Постинжекция $0,2$ М NaOH -15 кВ, 60 с. Капилляр $48,5$ см, 50 мкм внутр. диам., напряжение -15 кВ.

Линейность, чувствительность, воспроизводимость сигналов

На рис. 6 приведены калибровочные графики, полученные путем добавления к обработанной плазме крови известных количеств аналитов. Коэффициент корреляции во всех случаях превышал $0,99$, а разница коэффициентов наклона между калибровкой на плазме и воде не превышала 5% .

Воспроизводимость была исследована на серии ($n = 6$) последовательных инъекций. Стандартное отклонение Цис/ПА и Гцис/ПА не превышало 5% (Цисгли/ПА — до 11%), в то время как абсолютные интенсивности сигналов варьировались более существенно ($8-12\%$). Это подчеркивает необходимость применения внутреннего стандарта.

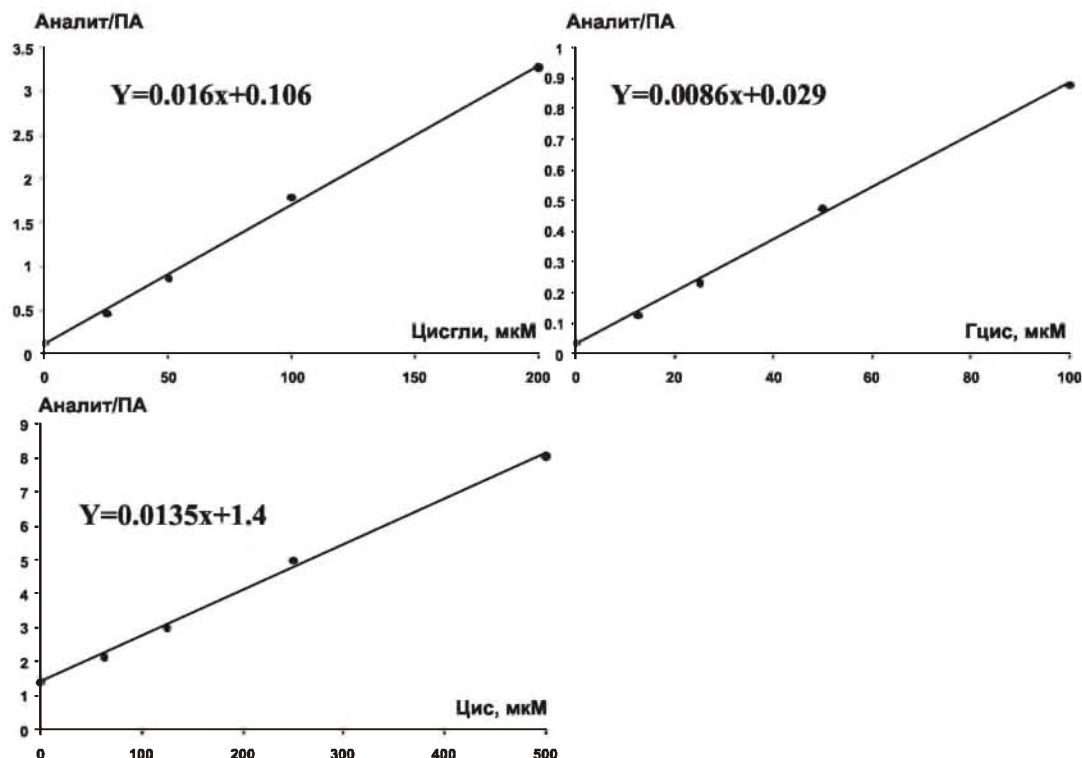


Рис. 6. Калибровочные графики для Цис, Гцис и Цисгли плазмы крови.

Для оценки чувствительности была подготовлена плазма крови с восстановлением ДТТ и без ДТТ (т.е. практически без тиолов в восстановленном состоянии). Оба образца дериватизировали ТКДИ и затем первый образец плазмы был разбавлен вторым в $2, 4$ и 8 раз. В последнем случае соотношение сигнал/шум для Гцис составило 7 , что соответствует его концентрации в $0,8$ мкМ.

Содержание связанных тиолов в плазме крови

Было проанализировано 8 образцов плазмы крови от здоровых доноров. Содержание связанного Цис, Гцис, Цисгли составило 110 ± 20 ; $5,5 \pm 1,25$; $11,3 \pm 2,5$ мкМ соответственно во всей выборке, у мужчин — 106 ± 17 ; $5,7 \pm 1,55$; 10 ± 2 мкМ, у женщин — 108 ± 20 ; $5,2 \pm 1$; $12,6 \pm 2,6$ мкМ соответственно.

Заключение

КЭ-УФ обладает рядом преимуществ по сравнению с методом ВЭЖХ: существенно меньший расход растворителя, не требуется применения фаз сорбентов, высокая эффективность разделения, регенерация капилляра занимает меньшее время, чем регенерация колонки. Представленная методика демонстрирует возможность применения КЭ-УФ для определения аминокислот плазмы крови с достаточной чувствительностью (порядка 1 мкМ по Гцис) и воспроизводимостью. Одновременно с этим достижение требуемой чувствительности накладывает существенное ограничение на содержание солей в пробе, что в свою очередь приводит к проблеме обессоливания образцов. Её решение за счет ультрафильтрации или диализа ограничивает анализ только связанными с белками аминокислотами, поэтому для анализа общего содержания нужны иные подходы, позволяющие удерживать низкомолекулярные соединения в процессе обессоливания.

Список литературы

1. Иванов А.В., Кудан П.В., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А. Определение основных низкомолекулярных аминокислот в плазме крови методом ВЭЖХ-МС // Патогенез. — 2012. — Т. 10. — С. 68–71.
2. Иванов А.В., Лузянин Б.П., Московцев А.А., Роткина А.С., Кубатиев А.А. Определение содержания общего гомоцистеина в плазме крови методом капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием // Журнал аналит. химии. — 2011. — Т. 66, №3. — С. 324–328.
3. Мельников И.О., Назимов И.В., Стукачева Е.А., Глубоков Ю.М. Определение содержания гомоцистеина и других низкомолекулярных аминокислот в плазме крови // Журн. аналит. химии. — 2006. — Т. 61, №11. — С. 1185–1191.
4. Amarnath K., Amarnath V., Amarnath K., Valentine H.L., Valentine W.M. A specific HPLC-UV method for the determination of cysteine and related aminothiols in biological samples // Talanta. — 2003. — Vol. 60, №6. — P. 229–238.
5. Andersson A., Isaksson A., Brattstrom L., Hultberg B. Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization // Clin. Chem. — 1993. — Vol. 39, №8. — P. 1590–1597.
6. Bald E., Kaniowska E., Chwatko G., Glowacki R. Liquid chromatographic assessment of total and protein-bound homocysteine in human plasma // Talanta. — 2000. — Vol. 50, №6. — P. 1233–1243.
7. Chwatko G., Bald E. Determination of different species of homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // J. Chromatogr. A. — 2002. — Vol. 949, №1–2. — P. 141–151.
8. D'Agostino L.A., Karen P.L., Lee R., Britz-McKibbin P. Comprehensive plasma thiol redox status determination for metabolomics // J. Proteome Res. — 2011. — Vol. 10, №2. — P. 592–603.
9. Feletou M., Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2006. — Vol. 291, №3. — P. 985–1002.
10. Hoque M.E., Arnett S.D., Lunte C.E. On-column preconcentration of glutathione and glutathione disulfide using pH-mediated base stacking for the analysis of microdialysis samples by capillary electrophoresis // J. Chrom. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. — 2005. — Vol. 827, №1. — P. 51–57.
11. Ivanov A.R., Nazimov I.V., Baratova L.A. Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. II. High-performance capillary electrophoresis with photometric detection // J. Chromatogr. A. — 2000. — Vol. 895, №1–2. — P. 167–171.
12. Jiang Z., Liang Q., Luo G., Hu P., Li P., Wang Y. HPLC-electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma aminothiols: application to studies of diabetic nephropathy // Talanta. — 2009. — Vol. 77, №4. — P. 1279–1284.
13. Kang S.H., Kim J.W., Chung D.S. Determination of homocysteine and other thiols in human plasma by capillary electrophoresis // J. Pharm. Biomed. Anal. — 1997. — Vol. 15, №9–10. — P. 1435–1441.
14. Kang S.H., Wei W., Yeung E.S. On-column derivatization for the analysis of homocysteine and other thiols by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection // J. Chromatogr. B. — 2000. — Vol. 744, №1. — P. 149–156.
15. Katrusiak A.E., Paterson P.G., Kamencic H., Shoker A., Lyon A.W. Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. — 2001. — Vol. 758, №2. — P. 207–212.
16. Kubalczyk P., Bald E. Transient pseudo-isotachopheric stacking in analysis of plasma for homocysteine by capillary zone electrophoresis // Anal. Bioanal. Chem. — 2006. — Vol. 384, №5. — P. 1181–1185.
17. Li S., Jia J., Liu G., Wang W., Cai Y., Wang Y., Yu C. Improved and simplified LC-ESI-MS/MS method for homocysteine determination in human plasma: Application to the study of cardiovascular diseases // J. Chromatogr. B. — 2008. — Vol. 870, №1. — P. 63–67.
18. Lin Ch.-H., Kaneta T. On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules // Electrophoresis. — 2004. — Vol. 25, №23–24. — P. 4058–4073.
19. Loscalzo J. Homocysteine-mediated thrombosis and angiostasis in vascular pathobiology // J. Clin. Investigation. — 2009. — Vol. 119, №11. — P. 3203–3205.
20. Lu C., Zu Y., Yam V.W.-W. Nonionic surfactant-capped gold nanoparticles as postcolumn reagents for high-performance liquid chromatography assay of low-molecular-mass biothiols // J. Chromatogr. A. — 2007. — Vol. 1163, №1–2. — P. 328–332.
21. Maron B., Loscalzo J. The treatment of hyperhomocysteinemia // Annu. Rev. Med. — 2009. — Vol. 60. — P. 39–54.
22. McCully K.S. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation // Ann. Clin. Lab. Sci. — 2009. — Vol. 39, №3. — P. 219–232.
23. Nolin T.D., McMenamin M.E., Himmelfarb J. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. — 2007. — Vol. 852, №1–2. — P. 554–561.
24. Powers H.J., Moat S.J. Developments in the measurement of plasma total homocysteine // Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. — 2000. — Vol. 3, №5. — P. 391–397.
25. Russell J., Rabenstein D.L. Speciation and quantitation of underivatized and Ellman's derivatized biological thiols and disulfides by capillary electrophoresis // Anal. Biochem. — 1996. — Vol. 242, №1. — P. 136–144.
26. Ueland P.M., Refsum H., Stabler S.P., Malinow M.R., Andersson A., Allen R.H. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications // Clin. Chem. — 1993. — Vol. 39, №9. — P. 764–769.
27. Williams R.H., Maggiore J.A., Reynolds R.D., Helgason C.M. Novel approach for the determination of the redox status of homocysteine and other aminothiols in plasma from healthy subjects and patients with ischemic stroke // Clin. Chem. — 2001. — Vol. 47, №6. — P. 1031–1039.

Посмунана 27.03.2013

Determination of bound cysteine, homocysteine and cysteinylglycine fraction in blood plasma by capillary electrophoresis

Ivanov A.V., Luzyanin B.P., Virus E.D., Rybakov A.C., Kubatiev A.A.

The Institute of General Pathology and Pathophysiology Russian Academy of Medical Science, Moscow, 125315, Baltiyskaya str., 8

The potential of capillary electrophoresis with thiocarbonyldiimidazole derivatization to detection of protein-bound aminothiols in blood plasma was investigated. The electrokinetic concentration of aminothiols derivatives allows to improve significantly the detection limit in comparison with hydrodynamic injection, but its effectiveness is limited by salts content in sample. The proposed method makes possible the quantitative determination of protein-bound aminothiols (cysteine, homocysteine and cysteinylglycine) in blood plasma with sufficient sensitivity (about of 1 mkM of homocysteine).

Key words: homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, capillary electrophoresis, thiocarbonyldiimidazole