

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГОМОЦІСТЕЇНУ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ.

ã Пентюк О.О., Ильченко О.В., Шевчук С.В., Андрушко І.І., Данченко О.П.

Вінницький державний медичний університет ім.М.І.Пирогова

Наведено порівняльний аналіз апаратури та реагентів, які застосовуються при визначенні концентрації гомоцістеїну у біологічних рідинах методом високоефективної рідинної хроматографії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гомоцістеїн, високоефективна рідинна хроматографія, ішемія, інфаркт міокарду.

Той факт, що концентрація гомоцістеїну в крові є важливим та незалежним маркером ризику появи серцево-судинних захворювань, вже став загальновідомим. Визначення концентрації гомоцістеїну також дозволяє визначити дефіцит фолатів та вітаміну В₁₂.

Методів визначення концентрації гомоцістеїну в крові існує значна кількість, однак питання полягає у виборі найбільш придатного для конкретних умов. Найчастіше загальну кількість гомоцістеїна визначають методами ВЕРХ (високоефективної рідинної хроматографії), які є найлегшими для автоматизації.

Слід вказати, що в клінічній біохімії вираз "рівень гомоцістеїну", або вірніше, "рівень загальної кількості гомоцістеїну" по відношенню до біологічних зразків типа плазми, завжди відноситься до суми концентрацій всього пула гомоцістеїна та включає як вільний, так й зв'язаний по дісульфідним місткам.

Нижня межа концентрацій для гомоцістеїна практично не визначена і значення концентрацій нижче середніх меж не було досліджено. Можливо, низькі концентрації гомоцістеїна не мають ніяких клінічних проявів. Тому аналітична чутливість метода не є проблемою. Найнижча концентрація, яка визначається тим або іншим методом, має приблизно дорівнювати 2 мкмоль/л, причому всі методи, які обговорено нижче, цього досягають.

Визначення концентрації тіолів в сироватці (плазмі) крові є непростю задачею, що обумовлено низкою обставин.

По-перше, речовини, що досліджуються є сильними відновниками і присутні в організмі у вигляді окислених похідних - дісульфідів, білкових кон'югатів тощо. Це вимагає попереднього їх відновлення. Але відновлені форми (тіоли) знову швидко окислюються. Так, за [31] втрата 75% добавленого до сироватки GSH спостерігалась за 30 хвилин та повністю пояснюється формуванням дисульфідів GSSG (24%) та CSSG (74%). Такі ж зміни спостерігаються і для інших типів тіолів, які додаються до плазми.

По-друге, базальні концентрації гомоцістеїна досить малі. Так, за [23] концентрація вільного гомоцістеїну в плазме дорівнює 1.57 мкмоль/л, що становить 10-15% від середньої повної концентрації гомоцістеїна.

По-третє, речовини типа цистеїна, гомоцістеїна слабо поглинають в середньому та ближньому ультрафіолеті, що ускладнює їх безпосереднє оптичне визначення й спонукає дослідника проводити перед- або післяколоночну дериватизацію - прививання флуоресцентної мітки або функціональної групи, яка має оптичну активність.

Можливо пряме визначення у дальньому ультрафіолеті [29] при 190 нм. При цьому не треба проводити дериватизацію та відновлення окислених форм. Але такий метод потребує дорогих надчистих реагентів, та є достатньо трудомістким. Крім того, чутливість цього метода не перевищує чутливості спектрофотометричних методів, заснованих на одержанні оптично активних похідних.

З іншого боку, у справі визначення концентрації гомоцістеїна є і позитивні моменти. Виявилось [55], що межіндивідуальні розбіжності у рівнях гомоцістеїну є достатньо великими, але протягом місяця для кожного індивідуума концентрація гомоцістеїну залишається практично незмінною (коефіцієнт надійності R=0.94). Довготривалий (30 місяців) коефіцієнт надійності, який знаходиться під значним зовнішнім впливом, дорівнює 0.65, однак виключення зовнішнього впливу дало значення R = 0.82. Тому вважають, що концентрація плазменного гомоцістеїна є відносна константа, незмінна протягом не менше 1 місяця, і що єдине визначення достатньо хорошо характеризує середню концентрацію. За деяких умов достатню діагностичну точність має і одиничне визначення через 30 місяців.

Практично в усіх роботах концентрація гомоцістеїна визначалась в плазмі. Концентрації гомоцістеїна в цереброспинальній рідині дорівнюють приблизно або нижче звичайної границі чутливості 0,2 мкмоль/л [51], й нам відома лише одна робота [48], де повідомляється

про високу концентрацію гомоцистеїна в цереброспинальній рідині 11 пацієнтів з фіброблігемією або хронічним синдромом втоми (0,61 мкмоль/л) порівняно з контролем (0,13 мкмоль/л). Але навіть ці високі концентрації на порядок нижче середніх концентрацій гомоцистеїна в плазмі.

Практично не проводиться визначення концентрації гомоцистеїна в сечі, тому що він майже повністю реабсорбується в нирках.

Типова обробка

Стандартизація процедур прободготовки при визначенні гомоцистеїну порівняно з такою для, наприклад, холестерина, практично відсутня.

Вибір протикоагулюючого засобу залежить від подальшого ходу аналіза, але більшість методів базується на стабілізації стандартними концентраціями ЕДТА або гепарина. Помірний гемоліз не впливає на концентрацію гомоцистеїна в плазмі [19].

Після відбору крові клітини крові продукують гомоцистеїн та вивільняють його в плазму, що веде до збільшення концентрації гомоцистеїна в плазмі при кімнатній температурі приблизно на 10% за годину [3, 56].

Це є основною причиною того, чому не слід визначати гомоцистеїн в сироватці, бо його його концентрація збільшиться на 5-10% за проміжок часу, потрібний для завершення коагуляції перед центрифугуванням.

Абсолютне збільшення концентрації не залежить від концентрації гомоцистеїна в плазмі [20], тому неоптимальна обробка зразка веде до зменшення різниці між зразками з високою та низькою концентраціями гомоцистеїна [47].

Якщо нагальне центрифугування стабілізованої крові неможливо, то мінімізувати збільшення концентрації гомоцистеїна можна зберіганням крові на льоду з відокремленням плазми за час, що не перевищує 1 години [3]. Якщо це неможливо, кров збирають у гепаринізовані пробірки, що містять від 2 до 4 мг фториду натрія на 1 мл крові – це запобігає суттєвому збільшенню концентрації гомоцистеїна терміном до 2 годин [39].

Багатообіцяючою альтернативою є застосування 3-деазааденозину, специфічного інгібітора перетворення 5-аденозилгомоцистеїна в гомоцистеїн [2]. Оскільки 3-деаза-аденозін інгібує початкове перетворення гомоцистеїна в 5'-аденозилгомоцистеїн в імуноферментних методах, ця добавка не може застосовуватися із зразками для цих наборів [58].

Умови зберігання

Після відокремлення плазми від клітин, гомоцистеїн є стабільним щонайменше протягом 4 днів при кімнатній температурі [20], що дозволяє транспортування незаморожене-них зразків лабораторії. Більш того, гомоцистеїн стійкий кілька тижнів при 0-2°C [54], а при зберіганні в замороженому стані при температурі -20°C – протягом кількох місяців, а можливо і років [8, 47,

56]. Повторне заморожування і розморожування не впливає на концентрацію гомоцистеїна в плазмі [56]. Немає різниці між кровью гепаринізованою та обробленою ЕДТА [12].

Потрібний об'єм

Більшість методів потребує 50-150 мкл плазми, для менш чутливих способів потрібний об'єм досягає 1000 мкл. Для порівняння - імунологічні аналізи потребують лише 25 мкл.

Відновлення окисленого гомоцистеїну плазми

Всі аналітичні методи для визначення загального гомоцистеїна включають стадію відновлення перед розділенням та визначенням. Найбільш поширеними відновниками є реактиви, що містять сульфгідрильні групи, наприклад дітіотреїтол (DTT), дітіоеритриол (DTE), меркаптоетанол, борогідрид натрія або калія, трибутилфосфін (TBP). Їх застосування ретельно розглянуто в [54]. Стандартними є такі твердження: відновлення достатньо проводити з 10-кратним молярним надлишком відновника типу DTT або TCEP. Бажано проводити відновлення в безкисневому середовищі. Модифікуючі розчини належить готувати безпосередньо перед вживання, максимально захищаючи їх від світла. Реакція відновлення при застосуванні DTT завершується за 2 години при кімнатній температурі, при застосуванні TBP- за 30 хвилин.

Але кожен з цих відновників має свої вади. Сульфгідрил-вмістні відновники можуть конкурувати з гомоцистеїном за реактиви в подальших етапах одержання похідних, борогідриди непрактичні в автоматизованих процедурах внаслідок утворення газів. Крім того, відновлення борогідридом натрія потребує великих витрат часу [49] та дає найбільшу похибку.

За думкою [46] сильний неприємний запах трибутил-фосфіну та необхідність розчиняти його в діметилформаміді (внаслідок слабкої розчинності у воді) перешкоджають використанню ТБФ в клінічній лабораторії. Але ми не можемо погодитися з цим – на нашу думку запах dietyлового ефіну значно сильніше і є більш неприємним. В усякому випадку, використання найпростішої витяжної шафи повністю вирішує всі проблеми.

З 1997 року найсучаснішим відновником вважається тріс-(2-карбоксіетіл)фосфін (TCEP) [24, 43]. Цей реагент є нелетким, легко розчиняється в воді, його розчини порівняно стійки.

Час відновлення за допомогою TCEP не перевищує 1 хвилини, в той час, як відновлення борогідридом натрію за 30 хвилин є неповним. Крім того, коефіцієнт варіації між визначеннями із застосуванням TCEP в декілька раз нижче порівняно з методами, заснованими на борогідриді натрію [24].

Додаткову інформацію щодо потрібної кількості відновника можна одержати в [28], де показано, що загальний гомоцістеїн плазми має приблизно 4% відновлювальної зданості плазми по борогідриду.

Окислення гомоцістеїна під час аналізу

Якщо відновник витрачено або видалений в ході аналізу після відновлення, відновлений гомоцістеїн може знову окислитися з повторним утворенням дисульфідів. Реокислення може обмежено підвищенням швидкості аналітичних процедур після початкової стадії відновлення, або використанням ЕДТА [54]. Урахування часткового реокислення можливе введенням внутрішніх стандартів, але лише гомоцістеїн, маркований стійким ізотопом (наприклад дейтерієм) [50] дає точну поправку для будь-якого ступені реокислення. Цей метод має ту перевагу, що він придатний і для неповного відновлення.

Одержання похідних гомоцістеїна

Три активних групи гомоцістеїна (аміногрупа, карбонова і тіо-група) - легко вступають в реакцію з флуоресцентними мітками або хромофорами, що використовується для визначення в ВЕРХ аналізі із застосуванням УФ або флуоресцентного детектора. Єдиний тип аналізу без дериватизації функціональних груп гомоцістеїна - ВЕРХ-аналіз з електрохімічною детекцією.

Флуоресцентна детекція

Хоча ВЕРХ-методи визначення гомоцістеїна все ще розвиваються, більшість їх засновано на визначенні флуоресцентних похідних гомоцістеїна [25]. Найбільш поширеною міткою є SBD-F (7-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid) - мабуть внаслідок позитивних її властивостей, що не відображено в літературі, бо за [14] флуоресцентні похідні SBD та гомоцістеїна, цистеїна були зовсім нестійкі на світлі, а у темряві зберігались лише декілька годин. Це ускладнює метод та робить його менш придатним для масових вимірювань, призводить до збільшення похибки вимірювання.

Та ж мітка застосовувалась й іншими авторами [5, 53, 56] тривалість хроматографування склала 6 хвилин, чутливість - 0,16-0,3 мкмоль/л [19, 43, 55].

Ще однією флуоресцентною міткою може бути 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide (ABD-F), який має деякі переваги перед SBD-F [27]. Дериватизація відбувається протягом 20 хвилин при 50°C и pH 8. При pH=2 деривати стійкі не менше 5 діб.

Застосовується й N-[4-(6-dimethylamino-2-benzofuranyl)-phenyl]-maleimide (NDB) [40].

Вже 13 років тому був синтезований 4-(N,N-Dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F), здатний замінити собою ABD-F [52]. DBD-F більш реакційноздатний (кількісно реагував з тіолами за 10 хвилин) та

тіол-специфічний порівняно з ABD-F, та ступінь флуоресценції в нього вище.

Однією з традиційних та поширених у застосуванні флуоресцентних міток є монобромбіман. Ще в 1989 році його застосовували для визначення гомоцістеїну [28], а чутливість методу склала 4.4 пмоль. Подальшим розвитком застосування монобромбімана в ВЕРХ аналізі був метод [36], що дозволяв визначати окределіть відновлені, окислені і білок-зв'язані форми цистеїна, цистеїнілглїцина, гомоцістеїна і глютаміна в плазмі. Присутність 50 мкМ дітіоеритріола забезпечує лінійність стандартних кривих при дуже низьких концентраціях тіолів. Метод достатньо швидкий - [42] дозволяє за 6 хвилин визначати загальну концентрацію важливіших тіолів плазми, за добу провести до 100 визначень, що є достатньо високим показником. Оскільки для аналізу необхідно лише 10 мкл плазми, то цей метод особливо привабливий для педіатрії. Межа чутливості складає 50 нмоль/л для всіх тіолів.

В [22] розглянуто новий флуоресцентний маркер - метіловий ефір 4-(6-methoxy-naphthalen-2-yl)-4-oxo-2-butenoic кислоти. Речовина реагує з тіолами селективно та швидко (10 хв при кімнатній температурі при pH=7.5). При визначенні довжина світла збудження 310 nm, емісії 450 nm. Але в подальшому роботі, виконаних з цим маркером, практично не було. Можливо, що він має деякі вади, які ускладнюють його застосування.

Відносно низьку чутливість (до 1 мкМ/л) та точність показав метод [26] з використанням дериватизації о-фталевим діальдегідом. В подальшому цей маркер також не набув широкого застосування.

Унікальну стабільність похідних має новий модифікатор тіолів N-(1-pyrenyl)maleimide (NPM) - до 2 місяців при 4°C. Метод з його використанням дозволяє розділити та визначити глутатіон, цистеїн, гомоцістеїн, цистеїнілглїцин, похідні γ -глутамілцистеїна. Межа чутливості за глутатіоном - приблизно 50 fmol. У порівнянні з монобромбімановим методом помітні підвищена селективність, швидкість, чутливість і легкість використання [57].

Застосовуються і інші флуоресцентні модифікатори тіолів у комплексі з зворотньо-фазним ВЕРХ-розділенням продуктів дериватизації - це 9-fluorenylmethylchloroformate [15], phenylisothiocyanate (PITC) [6, 18] dimethylamino-naphthalene-sulfonyl хлорид [33].

УФ-детекція

В зв'язку з відносно слабою чутливістю методів, заснованих на УФ-детекції, є порівняно мало.

Післяколонкова дериватизація

Одним з перших ВЕРХ методів визначення біологічних тіолів в наномольних кількостях з оптичною детекцією був метод [41], який базувався на післяколонковій дериватизації 6,6'-дітіодінікотиновою кислотою. При цьому, с

використанням як елюента 33 мМ калій-фосфатного буферу (рН 2,2), одночасно визначали цистеїн, цистеамін, гомоцистеїн, глутамін та пеніциламін з чутливістю до 0,1 нмоль в колонці.

Набагато нижчу межу чутливості має метод [4], придатний для визначення гомоцистеїну та інших сульфгідрилов плазми. Плазма відновлюється дітіотреїолом, білки осаджуються сульфосаліциловою кислотою. При ізохроматичному елюванні методом іон-парної хроматографії при рН 2,4 і післяколонкової дериватизації 4,4'-дітіодіпіридином можливим стає визначення при 324 нм. Межа чутливості за гомоцистеїном - 50 нмоль/л плазми. Все це занадто гарно, щоб бути правдою.

Ще один відносно простий метод базується на післяколонковій дериватизації ціано-нітроприсидним реагентом та детектуванням при 521 нм (цистин) і 524 нм (гомоцистин). Важливим є те, що за присутності нітрата срібла дериватизація проходить лише для гомоцистину. З іншого боку, оптично активні комплекси, що утворюються, стійкі протягом не більше 3 хвилин для цистіна та десятков секунд для гомоцистину [59].

З метою автоматизації метода, розроблено автоматичний аналізатор, в якому забезпечено *on-line* підмішування нінгідрин в елюент, який виходить з колонки [7]. Цей метод потребує різних високоякісних та дорогих реагентів. З іншого боку, об'єм плазми, необхідний для проведення аналізу, дорівнює лише 20 мкл. Собівартість одного аналізу склала 15 доларів США. Недоліком є те, що загальний час, необхідний для проведення 1 аналізу, складає 149 хвилин.

До речі, нінгідрин є найбільш поширеним модифікатором внаслідок властивих йому технологічних переваг, проте він має ваду – готовий реактив придатний протягом лише 2 тижнів.

Передколонкова дериватизація

Методи, що базуються на післяколонковій дериватизації, потребують відносно складного апаратурного оформлення, вони малоприменні для серійних визначень. Реагенти мають відповідати низці суворих вимог, в т.ч. мати високу спорідненість до тіолів та надзвичайно малий час реакції. Все це робить метод дорогим. Тому значно ширше розвивались методи з передколонковою дериватизацією. В роботах [10, 16] використовувався традиційний хромофор - о-фталевий діальдегід. Чутливість методу становила 1 пмоль колонці, тобто в перерахунку на концентрацію у плазмі - 0,05 мМ.

У автоматичному методі для визначення концентрації амінокислот у сечі [9] використовувались о-фталальдегідо-3-меркаптопропіонова кислота і 9-fluoroethylmethyl chloroformate. Повний спектр амінокислот (40 шт) одержано за 92 хвилини.

Дериватизація цистеїну та гомоцистеїну сечі 2-chloro-1-methyl pyridinium йодидом описана в [30]. За результатами експерименту показано, що

середня концентрація повного цистеїна і гомоцистеїна сечі в нормі складає для жінок 92.0 ± 45.8 і 16.4 ± 4.8 відповідно, для чоловіків 120.9 ± 46.6 і 21.5 ± 7.4 нмоль/мл, відповідно.

Можливим є й визначення гомоцистеїну за допомогою п-хлормеркурібензоату натрію (ПХМБ) (Власне дослідження). Метод розроблявся виходячи з максимальної дешевизни та дозволяє визначати одночасно цистеїн, гомоцистеїн і глутатіон, час виходу яких з колонки складає відповідно 5, 6, 9 хвилин.

Внутрішні стандарти

Майже всі дослідники збігаються у думці, що використання внутрішнього стандарту, який має хімічну структуру подібну до гомоцистеїну, поліпшує точність метода [37, 45, 54, 56].

Лише в роботі [1] наведено негативні наслідки введення стандарту (меркаптопропіонілгліцину, меркаптоетиламіну, або N-ацетилцистеїну) – зниження відтворюваності, збільшення похибки, уповільнення проведення аналізу. Але це можна пояснити занадто низькими концентраціями реактивів в реакційній суміші.

Найкращим внутрішнім стандартом є, мабуть, цистеамін [45], який був запропонований як заміна меркаптопропіонілгліцину і N-ацетилцистеїну [21, 56]. На відміну від цистеаміну, ці речовини виходять з колонки після гомоцистеїна, що збільшує час аналізу. Цистеамін ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$) хімічно подібний до гомоцистеїну, а вміст цистеаміну в крові надзвичайно низький (< 0.1 мкмоль/л) [49], що надає йому необхідні властивості внутрішнього стандарту. Цистеамін не впливає на процес відновлення та визначення гомоцистеїна в плазмі, а його додавання компенсує вплив розчинника на величину піка гомоцистеїна, що підвищує точність визначення [32].

Електрохімічна детекція

Присутність тіолової групи в гомоцистеїні дає можливість проводити електрохімічну детекцію, засновану на реакціях окислення-відновлення. При цьому пробопідготовка потребує менше часу. З іншого боку, електрохімічний детектор у використанні складніший порівняно з УФ- або флуоресцентним детекторами. Стабільність і точність аналізів залежать від ретельності пробопідготовки, націленої на запобігання забруднення проточної камери та псування Au-Hg-електрода. [17], що взагалі є великою вадою електрохімічних детекторів. Взагалі роботи з їх використання є чередою рапортів про усунення тих чи інших суто технічних проблем [11, 13, 34, 35, 37, 38]. Ці методи дозволяють проводити до 30 аналізів в день з нижньою межею визначення 2 pmol , (по концентрації - 1.0 мкмоль/л)

Вартісна оцінка методологій

Визначення гомоцистеїна плазми - все ще відносно дорога лабораторна процедура, що в 10-20 разів дорожче, ніж більшість стандартних біохімічних процедур типа визначення

холестерина плазми. Наведемо існуючі на момент написання статті ціни на деякі реактиви, що знаходять застосування при ВЕРХ-визначенні гомоцистеїну. Так, флуоресцентні модифікатори SBD-F, ABD-F, NDB, DBD-F, монобромбіман або йодацетамидофлуоресцеїн коштують 2-5 тис.доларів США за 1 грам, на УФ-модифікатори - ортофталевого альдегіду – 10-15 доларів США за 1 грам, ПХМБ – 5 доларів за 1 грам. Витрата модифікаторів складає приблизно 0,01-0,02 г на 100 аналізів.

Вартість відновників складає: ТСЕР – 40-45 доларів США за 1 г, дитіеритріолу та дітіотреїтол – 10-12 доларів США за 1 грам, тетрагідроборату натрія – 1 долар США за 1 грам, трибутилфосфіну – 0,15-0,18 долару США за 1 грам. Витрата відновників складає приблизно 1 г на 100 аналізів.

Література

1. Accinni R., Campolo J., Bartesaghi S. et al. Determination of plasma and serum homocysteine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. // J.Chromatogr.- 1998.- V.828.- P. 397-400.
2. Al-Khafaji F., Bowron A., Day A.P. et al. Stabilization of blood homocysteine by 3-deazaadenosine. // Ann.Clin. Biochem.- 1998.- V. 35.- P. 780-782.
3. Andersson A., Isaksson A., Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling. //Clin. Chem.- 1992.- V. 38.- P. 1311-1315.
4. 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.- Aug, 39:8.- P. 1590-1597.
5. Araki A., Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.// J.Chromatogr.- 1987.- V. 422.- P. 43-52.
6. Biggs H.G., Gentilcore L.J. Liquid-chromatographic measurement of amino acids in biological samples after formation of phenylthiohydantoin derivatives.// Clin.Chem.- 1984.- V. 30.- P. 851-855.
7. Boucher J.L., Charret C., Coudray-Lucas C. et al. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A // Clinical Chemistry.- 1997.- V.43.- P. 1421-1428.
8. Brattstrom L.E., Israelsson B., Jeppsson J.O., Hultberg B.L. Folic acid-an innocuous means to reduce plasma homocysteine. // Scand. J.Clin.Lab.Invest.- 1988.- V. 48.- P. 215-221.
9. Carducci C., Birarelli M., Leuzzi V. et al. Automated method for the measurement of amino acids in urine by high-performance liquid chromatography. //J.Chromatogr.- 1996.- Apr, 729:1-2.- P. 173-180.
10. Carducci C., Birarelli M., Nola M., Antonozzi I. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of homocysteine in plasma samples. //J.Chromatogr.- 1999.- Jun, 846:1-2.- P. 93-100.
11. Cole D.E.C., Lehotay D.C., Evrovski J. Simplified Simultaneous Assay of Total Plasma Homocysteine and Methionine by HPLC and Pulsed Integrated Amperometry // Clinical Chemistry.- 1998.- V. 44.- P. 188-190.
12. Daskalakis I., Lucock M.D., Anderson A. et al. Determination of plasma total homocysteine and cysteine using HPLC with fluorescence detection and an ammonium 7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole-4-sulphonate (SBD-F) derivatization protocol optimized for antioxidant concentration, derivatization reagent concentration, temperature and matrix pH. // Biomed.Chromatogr.- 1996.- Sep-Oct;10(5).- P. 205-212.
13. D`Eramo J.L., Finkelstein A.E., Boccazzi F.Q., Fridman O. Total homocysteine levels in plasma: high-performance liquid chromatographic determination with electrochemical detection and glassy carbon electrode. // J.Chromatogr. B Biomed.Sci.Appl.- 1998.- Dec, 720:1-2.- P. 205-210.
14. Dudman N.P., Guo X.W., Crooks R. et al. Assay of plasma homocysteine: light sensitivity of the fluorescent 7-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid derivative, and use of appropriate calibrators. // Clin.Chem.- 1996.- Dec; 42(12).- P. 2028-2032.
15. Einarsson S., Josefsson B., Lagerkvist S. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography.// J. Chromatogr.- 1983.- V. 282.- P. 609-618.
16. Fermo I., Arcelloni C., De Vecchi E. et al. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of total homocyst(e)ine in plasma. // J.Chromatogr.- 1992.- Feb 28;593(1-2).- P. 171-176.
17. Fermo I., De Vecchi E., Arcelloni C. et al. Methodological aspects of total plasma homocysteine measurement [technical note]. //Haematologica.- 1997.- V. 82.- P. 246-250.
18. Feste A.S. Reversed-phase chromatography of phenylthiocarbamyl amino acid derivatives of physiological amino acids: an evaluation and comparison with analysis by ion-exchange chromatography. //J. Chromatogr.- 1992.- V.574.- P. 23-34.
19. Feussner A., Rolinski B., Weiss N. et al. Determination of total homocysteine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography. // Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.- 1997.- Sep;35(9).- P. 687-691.
20. Fiskerstrand T., Refsum H., Kvalheim G., Ueland P.M. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. // Clin.Chem.- 1993.- V. 39.- P. 263-271.
21. Fortin L.J., Genest J. Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis.// Clin.Biochem.- 1995.- V. 28.- P. 155-162.

22. Gatti R., Cavrini V., Roveri P., Pinzauti S. High-performance liquid chromatographic determination of aliphatic thiols with acryloylchloric acids as fluorogenic precolumn derivatization reagents. // *J.Chromatogr.*- 1990.- May 16; 507.- P. 451-458.
23. Gautier F.C., Berneron C., Douce P.J. Determination of homocysteine in plasma by liquid chromatography with fluorescence detection. // *Biomed.Chromatogr.*- 1999.- May, 13:3.- P. 239-243.
24. Gilfix B.M., Blank D.W., Rosenblatt D.S. Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. // *Clin.Chem.*- 1997.- V. 43.- P. 687-688.
25. Goodman S.I., Elsas L.J., Rosenblatt D.S. ASHG/ACMG statement. Measurement and use of total plasma homocysteine. // *Am.J.Hum. Genet.*- 1998.- V. 63.- P. 1541-1543.
26. Hyland K., Bottiglieri T. Measurement of total plasma and cerebrospinal fluid homocysteine by fluorescence following high-performance liquid chromatography and precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. // *J.Chromatogr.*- 1992.- Aug, 579:1.- V. 55-62.
27. Jacob N., Guillaume L., Garcon L., Foglietti M.J. Determination of total plasma homocysteine and other aminothiols by liquid chromatography coupled to the detection by fluorescence. // *Ann.Biol.Clin.(Paris)*- 1997.- Nov-Dec;55(6).- P. 583-591
28. Jacobsen D.W., Gatautis V.J., Green R. Determination of plasma homocysteine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. // *Anal.Biochem.*-1989.- Apr;178(1).- P. 208-214.
29. Jayatilleke E., Shaw S. A high-performance liquid chromatographic assay for reduced and oxidized glutathione in biological samples // *Anal.Biochem.*- 1993.- Nov 1; 214(2).- P.452-457.
30. Kaniowska E., Chwatko G., Glowacki R. et al. Urinary excretion measurement of cysteine and homocysteine in the form of their S-pyridinium derivatives by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. // *J.Chromatogr.*- 1998 Mar 6; 798(1-2).- P. 27-35.
31. Kleinman W.A., Richie J.P.J. Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. // *Biochem. Pharmacol.*- 2000. -Jul 1;60(1).- P. 19-29.
32. Kuo K., Still R., Cale S., McDowell I. Standardization (External and Internal) of HPLC Assay for Plasma Homocysteine. // *Clinical Chemistry*.- 1997.- V. 43.- P. 1653-1655.
33. MacClung G., Frankenberger W.T. Comparison of reverse-phase high-performance liquid chromatographic methods for precolumn-derivatized amino acids. // *J.Liq.Chromatogr.*- 1988.- 11.- P. 613-646.
34. Malinow M.R., Kang S.S., Taylor L.M. et al. Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. // *Circulation*.- 1989.- V. 79.- P. 1180-1188.
35. Malinow M.R., Nieto F.J., Szklo M. et al. Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocyst(e)ine in asymptomatic adults. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. // *Circulation*.- 1993.- V. 87.- P. 1107-1113.
36. Mansoor M.A., Svardal A.M., Ueland P.M. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. // *Anal.Biochem.*- 1992.- Feb 1;200(2).- P. 218-229.
37. Martin S.C., Tsakas-Ampatzis I., Bartlett W.A., Jones A.F. Measurement of plasma total homocysteine by HPLC with coulometric detection. // *Clin.Chem.*- 1999.- V. 45.- P. 150-152.
38. Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I. et al. A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric electrochemical detection. // *J.Nutr.Biochem.*- 1999.- V. 10.- P. 490-497.
39. Moller J., Rasmussen K. Homocysteine in plasma: stabilization of blood samples with fluoride. // *Clin.Chem.*- 1995.- V. 41.- P. 758-759.
40. Nakashima K., Umekawa C., Yoshida H. et al. High-performance liquid chromatography-fluorometry for the determination of thiols in biological samples using N-[4-(6-dimethylamino-2-benzofuranyl) phenyl]-maleimide. // *J.Chromatogr.*- 1987.- Feb, 414:1.- P. 11-17.
41. Nishiyama J., Kuninori T. Assay of biological thiols by a combination of high-performance liquid chromatography and postcolumn reaction with 6,6'-dithiodinicotinic acid. // *Anal. Biochem.*- 1984.- Apr, 138:1.- P. 95-98.
42. Pastore A., Massoud R., Motti C. et al. Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopyruvate-glycine in plasma and urine. // *Clin.Chem.*- 1998.- V. 44.- P. 825-832.
43. Pfeiffer C.M., Huff D.L., Gunter E.W. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. // *Clin.Chem.*- 1999.- V. 45.- P. 290-292.
44. Pfeiffer C.M., Huff D.L., Smith S.J. et al. Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study. // *Clin.Chem.*- 1999.- V. 45.- P. 1261-1268.
45. te Poele-Pothoff M.T., van den Berg M., Franken D.G. et al. Three different methods for the determination of total homocysteine in plasma. // *Ann.Clin.Biochem.*- 1995.- V. 32.- P. 218-220.
46. Rasmussen K., Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. // *Ann.Clin.Biochem.*- 2000.- V. 37.- P. 627-648.
47. Refsum H., Fiskerstrand T., Guttormsen A.B., Ueland P.M. Assessment of homocysteine status. // *J.Inher.Metab. Dis.*- 1997.- V. 20.- P. 286-294.
48. Regland B., Andersson M., Abrahamsson L. et al. Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. // *Scand.J. Rheumatol.*- 1997.- V. 26.- P. 301-307.

49. Smolin L.A., Schneider J.A. Measurement of total plasma cysteamine using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. // *Anal.Biochem.*- 1988.- V. 168.- P. 374-379.
50. Stabler S.P., Marcell P.D., Podell E.R., Alien R.H. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. // *Anal.Biochem.*- 1987.- V.162.- P. 185-196.
51. Stabler S.P., Alien R.H., Barrett R.E. et al. Cerebrospinal fluid methylmalonic acid levels in normal subjects and patients with cobalamin deficiency. // *Neurology.*- 1991.- V. 41.- P. 1627-1632.
52. Toyooka T., Suzuki T., Saito Y. et al. A novel fluorogenic reagent for thiols: 4-(N,N-dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole. // *Analyst.*- 1989.- Apr, 114:4.- P. 413-419.
53. Ubbink J.B., Hayward-Vermaak W.J., Bissbort S. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. // *J.Chromatogr.*- 1991.- V. 565.- P. 441-446.
54. Ueland P.M., Refsum H., Stabler S.P. et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. // *Clin.Chem.*- 1993.- V. 39.- P. 1764-1779.
55. Uttam C.G., Zheng Zhi-Jie, Folsom A.R. et al. Short-term and long-term variability of plasma homocysteine measurement // *Clinical Chemistry.*- 1997.- V. 43.- P. 141-145.
56. Vester B., Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. // *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.*- 1991.- V. 29.- P. 549-554.
57. Winters R.A., Zukowski J., Ercal N. et al. Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by n-(1-pyrenyl)maleimide. // *Anal.Biochem.*- 1995.- May 1;227(1).- P. 14-21.
58. Woltersdorf W.W., Bowron A., Day A.P. et al. Abbott IMx homocysteine assay: significant interference by 3-deazaadenosine [letter]. // *Ann.Clin.Biochem.*- 1999.- V. 36.- P. 533.
59. Wu J.T., Wilson L.W., Christensen S. Conversion of a qualitative screening test to a quantitative measurement of urinary cystine and homocystine. // *Ann.Clin.Lab.Sci.*- 1992.- Jan, 22:1.- P. 18-29.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГОМОЦИСТЕИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.А.Пентюк, А.В.Ильченко, С.В.Шевчук, И.И.Андрушко, О.П.Данченко

Винницкий государственный медицинский университет им.Н.И.Пирогова

Приведен сравнительный анализ аппаратуры и реагентов, применяющихся при определении концентрации гомоцистеина в биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гомоцистеин, высокоэффективная жидкостная хроматография, ишемия, инфаркт миокарда.

DETERMINATION OF HOMOCYSTEINE IN BIOLOGICAL FLUIDS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

A.A.Pentuyk, A.V.II'chenko, S.V.Shevchuk, I.I.Andrushko, O.P.Danchenko

Vinnica State Medical University Named after N.I.Pirogov

The comparative review of instrumentation and reagents used at HPLC determination of homocysteine concentration in biological fluids is given.

KEY WORDS: homocysteine, high performance liquid chromatography, ischemia, myocardial infarction.