

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГОМОЦИСТЕЇНУ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

О.О. Пентюк, О.В. Ільченко, С.В. Шевчук, І.І. Андрушко, О.П. Данченко
ВІННИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

Наведено порівняльний аналіз апаратури та реагентів, які застосовують при визначенні концентрації гомоцистеїну в біологічних рідинах методом вискоєфективної рідинної хроматографії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гомоцистеїн, вискоєфективна рідинна хроматографія, ішемія, інфаркт міокарда.

Той факт, що концентрація гомоцистеїну в крові є важливим та незалежним маркером ризику появи серцево-судинних захворювань, уже став загальновідомим. Визначення концентрації гомоцистеїну також дозволяє виявити дефіцит фолатів та вітаміну B_{12} .

Існує велика кількість методів визначення концентрації гомоцистеїну в крові, однак питання полягає у виборі найбільш придатного для конкретних умов. Найчастіше загальну кількість гомоцистеїну визначають методами вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), які є найлегшими для автоматизації.

Слід вказати, що в клінічній біохімії вираз "рівень гомоцистеїну", або "рівень загальної кількості гомоцистеїну", відносно біологічних зразків типу плазми завжди належить до суми концентрацій усього пулу гомоцистеїну та включає як вільний, так і зв'язаний по дисульфідних містках.

Нижню межу концентрацій для гомоцистеїну практично не визначено і значення концентрацій нижче середніх меж не досліджено. Можливо, низькі концентрації гомоцистеїну не мають жодних клінічних проявів. Тому аналітична чутливість методу не є проблемою. Найнижча концентрація, що визначається тим або іншим методом, повинна приблизно дорівнювати 2 мкмоль/л, причому всі методи, які обговорено нижче, цього досягають.

Визначення концентрації тіолів у сироватці (плазмі) крові є непростим завданням, що зумовлено низкою обставин.

По-перше, речовини, що досліджуються, є сильними відновниками і присутні в організмі

© О.О. Пентюк – д.м.н., проф., О.В. Ільченко – к.х.н., С.В. Шевчук, І.І. Андрушко, О.П. Данченко, 2001.

у вигляді окислених похідних: дисульфідів, білкових кон'югатів тощо. Це вимагає попереднього їх відновлення. Але відновлені форми (тіоли) знову швидко окиснюються. За [31], втрата 75 % доданого до сироватки GSH спостерігається за 30 хв та пояснюється формуванням дисульфідів GSSG (24 %) та CSSG (74 %). Такі ж зміни відбуваються і стосовно інших типів тіолів, які додають до плазми.

По-друге, базальні концентрації гомоцистеїну досить низькі. За [23], концентрація вільного гомоцистеїну в плазмі дорівнює 1,57 мкмоль/л, що становить 10-15 % від середньої повної концентрації гомоцистеїну.

По-третє, речовини типу цистеїну, гомоцистеїну слабо поглинають випромінювання у середньому та ближньому ультрафіолеті, що ускладнює їх безпосереднє оптичне визначення й спонукає дослідника проводити перед- або післяколонкову дериватизацію – прививання флуоресцентної мітки або функціональної групи, яка має оптичну активність.

Можливе пряме визначення в 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, його чутливість не перевищує чутливості спектрофотометричних методів, що ґрунтується на одержанні оптично активних похідних.

З іншого боку, в справі визначення концентрації гомоцистеїну є і позитивні моменти. Виявлено [55], що міжіндивідуальні розбіжності в рівнях гомоцистеїну є досить великими, але протягом місяця для кожного індивідуума концентрація гомоцистеїну залишається практич-

но незмінною (коефіцієнт надійності (R) становить 0,94). Довготривалий (30 місяців) коефіцієнт надійності, який знаходиться під значним зовнішнім впливом, дорівнює 0,65, однак виключення зовнішнього впливу дало значення 0,82. Тому вважають, що концентрація плазмового гомоцистеїну є відносною константою, незмінною протягом не менше 1 місяця, і що єдине визначення досить добре характеризує середню концентрацію. За деяких умов достатню діагностичну точність має й одичне визначення через 30 місяців.

Практично в усіх роботах концентрації гомоцистеїну визначали в плазмі. В цереброспинальній рідині вони приблизно дорівнюють або нижчі звичайної межі чутливості (0,2 мкмоль/л) [51], й нам відома лише одна праця [48], де повідомляється про високу концентрацію гомоцистеїну в цереброспинальній рідині 11 пацієнтів з фіброміалгією 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 гомоцистеїну в плазмі.

Практично не проводять визначення концентрації гомоцистеїну в сечі, тому що він майже повністю реабсорбується в нирках.

Типова обробка

Стандартизація процедур пробопідготовки при визначенні концентрації гомоцистеїну, порівняно з такою для, наприклад, холестерину, практично відсутня.

Вибір протикоагуляційного засобу залежить від подальшого ходу аналізу, але більшість методів базуються на стабілізації стандартними концентраціями ЕДТА або гепарину. Помірний гемоліз не впливає на концентрацію гомоцистеїну в плазмі [19].

Після відбору крові її клітини продукують гомоцистеїн та вивільняють його в плазму, що призводить до збільшення концентрації гомоцистеїну в плазмі при кімнатній температурі приблизно на 10 % за годину [3, 56]. Це є основною причиною того, чому не слід визначати концентрацію гомоцистеїну в сироватці: вона підвищиться на 5-10 % за проміжок часу, потрібний для завершення коагуляції перед центрифугуванням.

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

Якщо нагальне центрифугування стабілізованої крові провести неможливо, мінімізують підвищення концентрації гомоцистеїну збері-

ганням крові на льоду з відокремленням плазми за проміжок часу, що не перевищує 1 год [3]. Якщо і це зробити неможливо, кров збирають у гепаринізовані пробірки, що містять від 2 до 4 мг фториду натрію на 1 мл крові, – це запобігає суттєвому збільшенню концентрації гомоцистеїну терміном до 2 годин [39].

Багатообіцяючою альтернативою є застосування 3-деазоаденозину, специфічного інгібітора перетворення 5-аденозилгомоцистеїну в гомоцистеїн [2]. Оскільки 3-деазоаденозин інгібує початкове перетворення гомоцистеїну в 5'-аденозилгомоцистеїн в імуноферментних методах, дану добавку не можна використовувати із зразками для цих наборів [58].

Умови зберігання

Після відокремлення плазми від клітин гомоцистеїн стабільний щонайменше протягом 4 днів при кімнатній температурі [20], що дозволяє транспортування незаморожених зразків лабораторії. Крім того, він стійкий кілька тижнів при 0-2 °C [54], а в замороженому стані – при температурі -20 °C упродовж кількох місяців, а, можливо, і років [8, 47, 56]. Повторні заморожування і розморожування не впливають на концентрацію гомоцистеїну в плазмі [56]. Немає різниці між кров'ю гепаринізованою та обробленою ЕДТА [12].

Потрібний об'єм

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

Відновлення окисленого гомоцистеїну плазми

Усі аналітичні методи для визначення концентрації загального гомоцистеїну включають стадію відновлення перед розділенням та визначенням. Найбільш поширеними відновниками є реактиви, що містять сульфгідрильні групи, наприклад дитіотреїтол (DTT), дитіоеритріол (DTE), меркаптоетанол, борогідрид натрію або калію, трибутилфосфін (TBP). Їх застосування ретельно розглянуто в [54]. Стандарними є такі твердження. Відновлення достатньо проводити з 10-кратним молярним надлишком відновника типу DTT або TCEP, бажано в безкисневому середовищі. Модифікуючі розчини належить готувати безпосередньо перед використанням, максимально захищаючи їх від світла. Реакція відновлення при застосуванні DTT завершується за 2 год при кімнатній температурі, при використанні TBP – за 30 хв.

Але кожен із цих відновників має свої недоліки. Сульфгідрилвмісні відновники можуть

конкурувати з гомоцистеїном за реактиви на подальших етапах одержання похідних, борогідриди не практичні в автоматизованих процедурах внаслідок утворення газів. Крім того, відновлення борогідридом натрію потребує великих затрат часу [49] та дає найбільшу похибку.

На думку [46], сильний неприємний запах трибутилфосфіну (ТБФ) та необхідність розчиняти його в диметилформаміді (внаслідок слабкої розчинності у воді) перешкоджають використанню ТБФ у клінічній лабораторії. Але ми не можемо погодитися з цим. Вважаємо, що запах діетилового ефіру сильніший і більш неприємний. У будь-якому випадку застосування найпростішої витяжної шафи повністю вирішує всі проблеми.

З 1997 року найсучаснішим відновником є трис-(2-карбоксіетил) фосфін (ТСЕР) [24, 43]. Цей реагент нелеткий, легко розчиняється у воді, його розчини порівняно стійкі.

Час відновлення за допомогою ТСЕР не перевищує 1 хв, тоді, як відновлення борогідридом натрію за 30 хв є неповним. Крім того, коефіцієнт варіації між визначеннями із застосуванням ТСЕР у декілька разів нижчий порівняно з методами, що виникли на основі борогідриду натрію [24].

Додаткову інформацію щодо потрібної кількості відновника можна одержати в [28], де показано, що загальний гомоцистеїн плазми має приблизно 4 % відновлювальної здатності плазми за борогідридом.

Окислення гомоцистеїну під час аналізу

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

Одержання похідних гомоцистеїну

Три активних групи гомоцистеїну (карбонова, аміно й тіо-групи) легко вступають у реакцію з флуоресцентними мітками або хромофорами, які використовують для визначення у ВЕРХ-аналізі із застосуванням УФ або флуоресцентного детектора. Єдиний тип аналізу без дериватизації функціональних груп гомоцистеїну – ВЕРХ-аналіз з електрохімічною детекцією.

Флуоресцентна детекція

Хоча ВЕРХ-методи визначення концентрації гомоцистеїну все ще розвиваються, більшість їх засновано на визначенні флуоресцентних похідних гомоцистеїну [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, гомоцистеїну, цистеїну були зовсім нестійкими на світлі, а в 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 хв, 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 хв при температурі 50 °C і pH 8. При pH₂ деривати стійкі не менше 5 діб.

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

13 років тому було синтезовано 4-(N,N-Dimethylaminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F), здатний замінити собою ABD-F [52]. DBD-F більш реакційноздатний (кількісно реагував із тіолами за 10 хв) та тіол-специфічний, порівняно з ABD-F, ступінь флуоресценції в нього вищий.

Одним із традиційних та поширених флуоресцентних міток є монобромбіман. Ще в 1989 році його застосовували для визначення концентрації гомоцистеїну [28], а чутливість методу складала 4,4 пмоль. Подальшим розвитком використання монобромбіману в ВЕРХ аналізі був метод [36], що дозволяв визначати відновлені, окислені й білокзв'язані форми цистеїну, цистеїнілгліцину, гомоцистеїну і глютаміну в плазмі. Присутність 50 мкМ дитіоеритріолу забезпечує лінійність стандартних кривих при дуже низьких концентраціях тіолів. Метод досить швидкий [42], дає можливість за 6 хв визначити загальну концентрацію найважливіших тіолів плазми, за добу провести до 100 визначень, що є достатньо високим показником. Оскільки для аналізу необхідно лише 10 мкл плазми, то цей метод широко використовують у педіатрії. Межа чутливості складає 50 нмоль/л для всіх тіолів.

У [22] розглянуто новий флуоресцентний маркер – метиловий ефір 4-(6-methoxy-

naphthalen-2-yl)-4-oxo-2-butenoic кислоти. Речовина реагує з тіолами селективно та швидко (10 хв при кімнатній температурі й рН 7,5). При визначенні довжина світла збудження складає 310 nm, емісії – 450 nm. Але в подальшому робіт, виконаних із цим маркером, практично не було. Можливо, він має деякі вади, які ускладнюють його застосування.

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

Унікальну стабільність похідних має новий модифікатор тіолів N-(1-pyrenyl)maleimide (NPM) – до 2 місяців при температурі 4 °С. Метод з його використанням дозволяє розділити та визначити глутатіон, цистеїн, гомоцистеїн, цистеїнілгліцин, похідні γ -глутамілцистеїну. Межа чутливості за глутатіоном – приблизно 50 пмоль. Порівняно з монобромбімановим методом, помітні підвищені селективність, швидкість, чутливість і легкість використання [57].

Застосовують й інші флуоресцентні модифікатори тіолів у комплексі із зворотнофазним ВЕРХ-розділенням продуктів дериватизації: 9-fluorenylmethylchloroformate [15], phenylisothiocyanate (PITC) [6, 18] dimethylaminonaphthalene-sulfonyl хлорид [33].

УФ-детекція

У зв'язку з відносно слабкою чутливістю, методів, заснованих на основі УФ-детекції, є порівняно мало.

Післяколонкова дериватизація

Одним із перших ВЕРХ-методів визначення біологічних тіолів у наномольних кількостях з оптичною детекцією був метод [41], який базувався на післяколонковій дериватизації 6,6'-дитіодінікотиновою кислотою. При цьому, з використанням як елюенту 33 мМ калій-фосфатного буфера (рН 2,2), одночасно визначали концентрацію цистеїну, цистеаміну, гомоцистеїну, глутаміну та пеніциламіну з чутливістю до 0,1 нмоль у колонці.

Набагато нижчу межу чутливості має метод [4], придатний для визначення концентрації гомоцистеїну та інших сульфгідрилів плазми. Плазма відновлюється дитіотреїолом, білки осаджуються сульфосаліциловою кислотою. При ізократичному елююванні методом іон-парної хроматографії при рН 2,4 і післяколонкової дериватизації 4,4'-дитіодипіридином можливим стає визначення при 324 nm. Межа чутливості за гомоцистеїном – 50 нмоль/л плазми. Усе це занадто гарно, щоб бути правдою.

Ще один відносно простий метод базується на післяколонковій дериватизації ціанонітропрусидним реагентом та детектуванням при 521 nm (цистин) і 524 nm (гомоцистин). Важливим є те, що за присутності нітрату срібла дериватизація проходить лише для гомоцистину. З іншого боку, оптично активні комплекси, що утворюються, стійкі протягом не більше 3 хв для цистину та десятків секунд для гомоцистину [59].

З метою автоматизації методу, розроблено автоматичний аналізатор, в якому забезпечено on-line підмішування нінгідрину в елюент, що виходить із 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 складає 15 доларів США. Недоліком є те, що загальний час, потрібний для проведення одного аналізу, становить 149 хв.

До речі, нінгідрин є найбільш поширеним модифікатором внаслідок властивих йому технологічних переваг, проте він має один недолік: 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 повинні відповідати низці суворих вимог, в тому числі мати високу спорідненість із тіолами та надзвичайно малий час реакції. Усе це робить метод дорогим. Тому ширше застосовували методи з передколонковою дериватизацією. У роботах [10, 16] використовували традиційний хромофор – о-фталевий діальдегід. Чутливість методу становила 1 пмоль у колонці, тобто в перерахунку на концентрацію в плазмі – 0,05 мМ.

В автоматичному методі для визначення концентрації амінокислот у сечі [9] використовували о-фталальдегідо-3-меркаптопропіонову кислоту і 9-fluorenylmethyl chloroformate. Повний спектр амінокислот (40 шт.) одержано за 92 хв.

Дериватизацію цистеїну та гомоцистеїну сечі 2-chloro-1-methyl pyridinium йодидом описано в [30]. Результати експерименту показали, що середня концентрація загального цистеїну та гомоцистеїну сечі в нормі склала 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.

Можливим є й визначення концентрації гомоцистеїну за допомогою п-хлормеркурибензоату натрію (ПХМБ) (власне дослідження).

Метод розробляли на основі максимальної дешевизни. Він дає можливість визначати одночасно цистеїн, гомоцистеїн і глутатіон, час виходу яких із колонки складає, відповідно, 5, 6, 9 хв.

Внутрішні стандарти

Майже всі дослідники вважають, що використання внутрішнього стандарту, який має хімічну структуру, подібну до будови гомоцистеїну, поліпшує точність методу [37, 45, 54, 56].

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

Найкращим внутрішнім стандартом є, мабуть, цистеамін [45], який було запропоновано замість меркаптопропіонілгліцину і N-ацетилцистеїну [21, 56]. На відміну від цистеаміну, ці речовини виходять із колонки після гомоцистеїну, що збільшує час аналізу. Цистеамін ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$) хімічно подібний до гомоцистеїну, його вміст у крові надзвичайно низький (менше 0,1 мкмоль/л) [49], що надає йому необхідні властивості внутрішнього стандарту. Цистеамін не впливає на процес відновлення та визначення концентрації гомоцистеїну в плазмі, а його додавання компенсує вплив розчинника на величину піку гомоцистеїну, що підвищує точність визначення [32].

Електрохімічна детекція

Присутність тіолової групи в гомоцистеїні дає можливість проводити електрохімічну детекцію, засновану на основі реакцій окис-

лення-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 є великими недоліком електрохімічних детекторів. Взагалі, роботи з їх застосуванням є низкою робіт про усунення тих чи інших суто технічних проблем [11, 13, 34, 35, 37, 38]. Ці методи дозволяють проводити до 30 аналізів на день із нижньою межею визначення 2 пмоль, (за концентрацією – 1,0 мкмоль/л)

Вартісна оцінка методологій

Визначення концентрації гомоцистеїну плазми – це лабораторна процедура, що в 10-20 разів дорожча, ніж більшість стандартних біохімічних процедур типу кількісного визначення холестерину в плазмі. Наведемо наявні на момент написання статті ціни на деякі реактиви, які застосовують при ВЕРХ-визначенні гомоцистеїну. Так, флуоресцентні модифікатори SBD-F, ABD-F, NDB, DBD-F, монобромбіман або йодацетамідофлуоресцеїн коштують 2-5 тис. доларів США за 1 г, УФ-модифікатори ортофталевого альдегіду – 10-15 доларів США за 1 г, ПХМБ – 5 доларів за 1 г. Витрата модифікаторів складає приблизно 0,01-0,02 г на 100 аналізів.

Вартість відновників становить: ТСЕР – 40-45 доларів США за 1 г, дитіеритріолу та дитіотреїтолу – 10-12 доларів США за 1 г, тетрагідроборату натрію – 1 долар США за 1 г, трибутилфосфіну – 0,15-0,18 долара США за 1 г. 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. – **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. – **35**. – P. 780-782.
3. Andersson A., Isaksson A., Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling // *Clin. Chem.* – 1992. – **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. – **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. – **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. – **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: performan-

- ce of Hitachi L-8500A // Clin. Chem. – 1997. – **43**. – P. 1421-1428.
8. Brattstrom L.E., Israelsson B., Jeppsson J.O., Hultberg B.L. Folic acidan innocuous means to reduce plasma homocysteine. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1988. – **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. – **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. – **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 // Clin. Chem. – 1998. – **44**. – P. 188-190.
12. Daskalakis I., Luccock 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. – № 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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **39**. – P. 263-271.
21. Fortin L.J., Genest J. Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis // Clin. Biochem. – 1995. – **28**. – P. 155-162.
22. Gatti R., Cavrini V., Roveri P., Pinzauti S. High-performance liquid chromatographic determination of aliphatic thiols with aroylacrylic acids as fluorogenic precolumn derivatization reagents // J. Chromatogr. – 1990. – **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. – **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. – **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. – **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. – **579**, № 1. – P. 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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **60**, № 1. – P. 19-29.
32. Kuo K., Still R., Cale S., McDowell I. Standardization (External and Internal) of HPLC Assay for Plasma Homocysteine // Clin. Chem. – 1997. – **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. – **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. – **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. – **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. – **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. – **10**. – P. 490-497.
39. Moller J., Rasmussen K. Homocysteine in plasma: stabilization of blood samples with fluoride // *Clin. Chem.* – 1995. – **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. – **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. – **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-mercaptopropionyl-glycine in plasma and urine // *Clin. Chem.* – 1998. – **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. – **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. – **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. – **32**. – P. 218-220.
46. Rasmussen K., Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice // *Ann. Clin. Biochem.* – 2000. – **37**. – P. 627-648.
47. Refsum H., Fiskerstrand T., Guttormsen A.B., Ueland P.M. Assessment of homocysteine status // *J. Inher. Metab. Dis.* – 1997. – **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. – **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. – **168**. – P. 374-379.
50. Stabler S.P., Marcell P.D., Podell E.R., Allen R.H. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry // *Anal. Biochem.* – 1987. – **162**. – P. 185-196.
51. Stabler S.P., Allen R.H., Barrett R.E. et al. Cerebrospinal fluid methylmalonic acid levels in normal subjects and patients with cobalamin deficiency // *Neurology*. – 1991. – **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. – **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. – **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. – **39**. – P. 1764-1779.
55. Utam C.G., Zheng Zhi-Jie, Folsom A.R. et al. Short-term and long-term variability of plasma homocysteine measurement // *Clin. Chem.* – 1997. – **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. – **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. – **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. – **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 homocysteine // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 1992. – **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

Резюме

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

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

DETERMINATION OF HOMOCYSTEINE CONCENTRATION IN BIOLOGICAL FLUIDS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A.A. Pentiuk, A.V. Ilchenko, S.V. Shevchuk, I.I. Andrushko, O.P. Danchenko
VINNYTSIA STATE MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

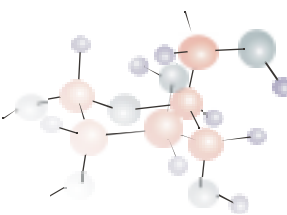
Summary

The comparative review of instrumentation and reagents used at determination of homocysteine concentration in biological fluids by means of high performance liquid chromatography is given.

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

Отримано 19.024.2001 р.

Адреса для листування: О.В. Ильченко, вул. 600-річчя, 32, кв. 27, 21021, Вінниця, Україна; e-mail: ilch@vsmu.vinnica.ua.



Видавництво “УКРМЕДКНИГА”
Підручник “Біохімія людини”
Автори: д.м.н., проф. Я.І. Гонський, к.м.н., доц. Т.П. Максимчук

У підручнику на основі сучасних досягнень науки викладено головні поняття з усіх розділів біохімії людини відповідно до програми для студентів медичних та фармацевтичних факультетів вищих навчальних закладів. Розглянуто структуру та метаболізм білків, вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот та інших органічних і неорганічних речовин. Наведено сучасні дані з біохімії крові, нервової та сполучної тканин, м'язів, печінки, нирок, висвітлено механізми функціонування імунної системи та структуру і функції мембранних утворень у клітинах. Наведено матеріали з клінічної біохімії та молекулярної біології. Велику роль відведено висвітленню регуляції метаболічних процесів і їх порушень при найпоширеніших патологічних станах печінки, нирок, серцево-судинної системи, ендокринних органів, спадкових захворюваннях.

З метою полегшення засвоєння матеріалу в підручник введено типові тестові завдання з різних розділів біохімії та відповіді на них, а також тлумачний словник найпоширеніших біохімічних термінів.

Підручник буде корисний для аспірантів, лікарів та біологів, які цікавляться біологічними процесами, що перебігають у живому організмі на молекулярному рівні.

Підручник можна замовити за адресою:
Видавництво “Укрмедкнига”, майдан Волі, 1, м.Тернопіль, 46001
тел./факс (0352)22-80-09; тел. 22-97-29