
ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ

А. Ф. Рябуха, Л. А. Смирнова, К. А. Кузнецов, Е. А. Сучков, В. Н. Перфилова

Волгоградский государственный медицинский университет,
лаборатория фармакокинетики НИИ фармакологии,
кафедра фармакологии и биофармации ФУВ, ГУ ВМНЦ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДЕРИВАТИЗИРУЮЩИХ АГЕНТОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ГОМОЦИСТЕИНА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 615:547.466

Проведен сравнительный анализ методик определения гомоцистеина в плазме крови. Воспроизведены две методики определения – количественное определение методом ВЭЖХ после дериватизации с SBD-F и ортофталевым альдегидом.

Ключевые слова: гомоцистеин, ВЭЖХ, дериватизация, OPA/2ME, SBD-F.

A. F. Riabuha, L. A. Smirnova, K. A. Kuznetsov, E. A. Suchkov, V. N. Perfilova

DERIVATIZATION AGENTS USED IN HPLC METHOD OF HOMOCYSTEIN DETERMINATION

Analysis of different methods of homocystein determination in the plasma was performed. Two methods of determination were reproduced – HPLC methods of quantitative determination after derivatization with SBD-F and orthophthalic aldehyde.

Key words: homocystein, HPLC, derivatization, OPA/2ME, SBD-F.

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, которая может катаболизироваться в цистеин или реметилироваться в метионин. Избыток гомоцистеина (гипергомоцистеинемия) повышает риск раннего развития атеросклероза и тромбоза артерий и является прогностическим маркером летального исхода. В плазме крови гомоцистеин (ГЦ) присутствует в трех молекулярных формах: свободный ГЦ, дисульфид ГЦ (гомоцистин) и дисульфид ГЦ с цистеином. Большая часть (около 70 %) ГЦ связана с белками. Свободный и связанный с белком ГЦ составляют общий ГЦ [1].

Перед определением ГЦ и цистеина в плазме/сыворотке крови их необходимо высвободить из дисульфидов и связи с белками. В качестве восстанавливающих веществ из различных дисульфидных связей используют соединения дитиоэритритол, дитиотрейтол, меркаптоэтанол, а также борогидриды натрия или калия.

Для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) анализа тиолов чаще всего их превращают во флуоресцирующие производные путем реакции с биманами или галоген-

сульфонилбензофуранами [аммоний-7-фторбензо-2-окса-1,3-диазол-4-сульфонат (SBD-F), 4-амино-сульфонил-7-фторбензо-2-окса-1,3-диазол (ABD-F)]. Эти методы имеют высокую чувствительность определения, но ряд недостатков – продолжительность реакции варьирует от 10 до 60 мин, а для анализа необходим флуориметрический детектор. Недостатком последних двух методов является также использование в ряде методик токсичного восстанавливающего реагента (три-*n*-бутил-фосфин) [4].

ГЦ и другие тиолы можно дериватизировать с помощью ортофталевого альдегида/2-меркаптоэтанола (ОФА-2МЕ). Реакция не является тиолспецифичной и помимо цистеина и ГЦ позволяет определять другие аминокислоты [2].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выбрать наиболее чувствительную, селективную и воспроизводимую методику для определения содержания гомоцистеина в плазме крови крыс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание вещества определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Shimadzu (Япония) с флуоресцентным детектором RF-10AxI, колонка SUPELCOSIL LC-18 (5 мкм; 150 мм x 4,6 мм). В работе использовали дериватизирующие агенты: ОФА-2МЭ (метод 1) и SBD-F (метод 2).

Метод 1

Подвижная фаза состояла из ацетонитрила (16 %), Na_2HPO_4 (0,01 М), NaH_2PO_4 (0,01 М), $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ (0,002 М), pH 7,0. Скорость потока элюента 1 мл/мин, $t = 26^\circ\text{C}$. Детектирование проводили при длине волны возбуждения 340 нм, испускания – 450 нм.

Для восстановления дисульфидных связей в плазме крови использовали 2-меркаптоэтанол (2-МЭ). Образующиеся сульфгидрильные группы алкилировали при помощи йодуксусной кислоты (0,8 М).

Ортофталевый/2-МЭ (ОФА/2-МЭ) реагент получали следующим образом: 27 мг ОФА растворяли в 0,5 мл метанола [раствор (1)]. Раствор (1) хранился при -20°C . Раствор (2), используемый для получения деривата гомоцистеина, готовили непосредственно перед использованием, смешивая 20 мкл раствора (1) с 40 мкл 2-МЭ и 140 мкл 0,1 М раствора $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH = 12,5).

Перед реакцией модификации проводили депротеинизацию образцов плазмы метанолом.

Для перевода гомоцистеина в производное к 20 мкл супернатанта добавляли 20 мкл 0,8 М йодуксусной кислоты (для защиты сульфгидрильных групп), 20 мкл реагента (2) и 140 мкл 0,1 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, перемешивали в течение 5 мин, после чего 10 мкл смеси вводили в хроматографическую систему.

Метод 2

Для дериватизации гомоцистеина этим методом использовали аммоний-7-фторбензо-2-окса-1,3-диазол-4-сульфонат (SBD-F). Подвижная фаза включала ацетонитрил (10 %), 0,1 М KH_2PO_4 (90 %), pH 2,1. Скорость потока элюента 1 мл/мин, $t = 30^\circ\text{C}$. Детектирование проводили при длине волны возбуждения 385 нм, испускания – 515 нм [3].

В качестве восстанавливающего агента мы использовали ТСЕР [трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин], менее токсичный и более стабильный по сравнению с другими восстановителями.

Кровь откручивали, получали плазму. К 90 мкл супернатанта добавляли 10 мкл внутреннего стандарта (монопропионилглицин, в концентрации 10 мкг/мл) затем добавляли 10 мкл 10%-го ТСЕР, 30 минут инкубировали при температуре 4°C , добавляли 100 мкл холодной 10%-й ТХУ с 1 мМ ЭДТА, центрифугировали 5 мин при 21000 g. Супернатант (100 мкл) переносили в эппендорф, к нему добавляли 20 мкл 1,55 М NaOH, 250 мкл 0,125 М боратного буфера (pH 9,5) с 4 мМ ЭДТА и 50 мкл SBD-F (1 г/л) в 0,125 М боратном буфере, pH 9,5, инкубировали при 60°C 60 мин и охлаждали во льду для последующего хроматографического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Чувствительность методики ОФА/2-МЕ составила 1 мкг/мл, но средняя ошибка измерения была выше 20 % по всем концентрациям (табл. 1, рис. 1).

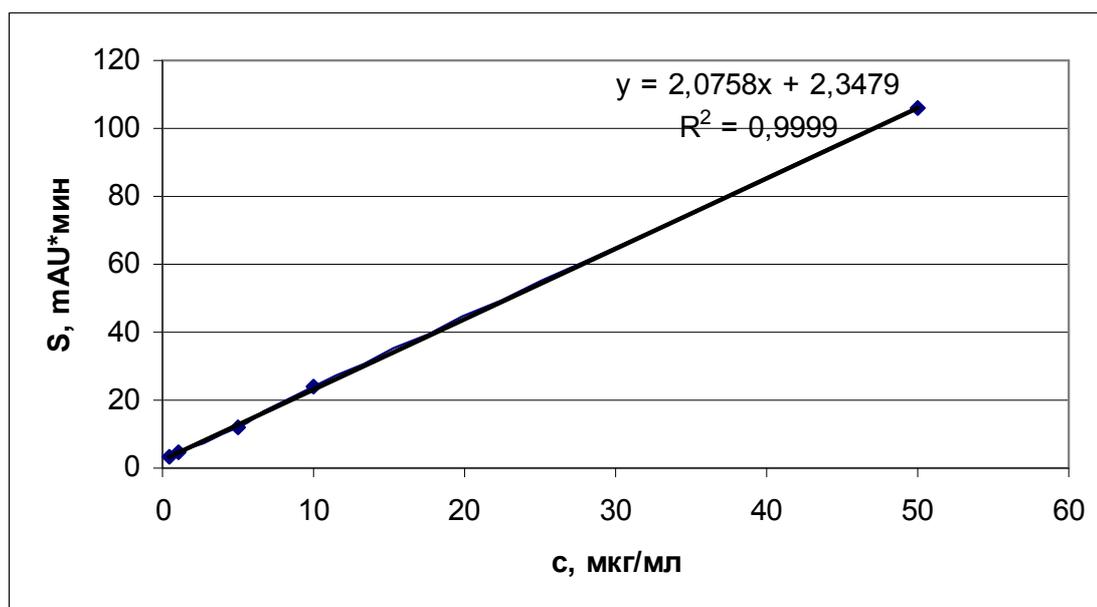


Рис. 1. График зависимости площади пика от концентрации гомоцистеина при дериватизации ОФА-2МЭ

Таблица 1

**Статистические параметры определения гомоцистеина
после дериватизации с ОФА-2МЭ**

С добавл., мкг/мл	С получ., мкг/мл	С ср.	Ст. откл.	Ошибка, %
0,5	0,379902	0,402544	0,114064	28,3359
	0,301498			
	0,526231			
1	1,042562	0,970951	0,12318	12,68648
	1,041574			
	0,828717			
5	5,262598	4,76279	1,652619	34,69854
	6,107814			
	2,917959			
10	14,36897	10,41362	3,497936	33,59
	9,144474			
	7,72743			
50	67,37311	49,94609	18,85754	37,75579
	29,92634			
	52,53883			

Полученные дериваты были крайне нестабильны и для получения воспроизводимых результатов необходимо было каждую пробу дериватизировать отдельно.

Это существенно увеличивает время анализа и делает невозможным использование дан-

ной методики в рутинной клинической практике. Чувствительность методики дериватизации SBD-F составила 500 нг/мл. Средняя ошибка измерения была ниже 10 % в диапазоне изученных концентраций, дериваты стабильны в течение суток (рис. 2, табл. 2).

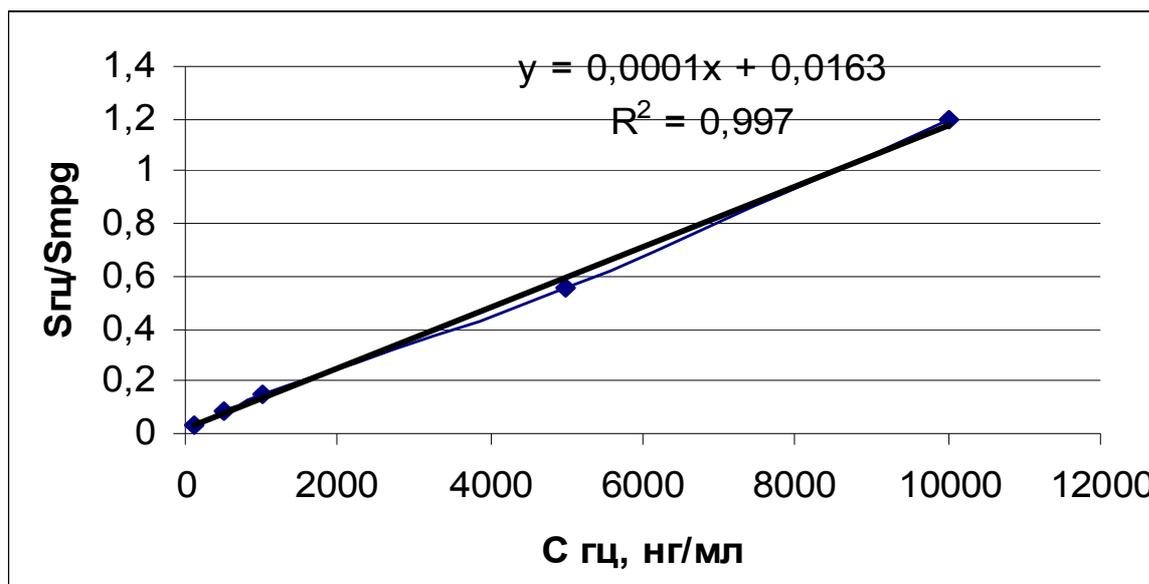


Рис. 2. График зависимости площади пика от концентрации гомоцистеина при дериватизации SBD-F

**Статистические параметры определения гомоцистеина
после дериватизации с SBD-F**

С добавл. нг/мл	С получ., нг/мл	С ср.	Ст. откл.	Ошибка, %
100	33,5807	125,5013	79,98326	63,731
	179,225			
	163,6983			
500	617,5297	664,2774	40,4864	6,094803
	687,2823			
	688,0203			
1000	1191,229	1333,91	126,6325	9,493326
	1377,553			
	1432,95			
5000	5426,054	5348,75	209,0908	3,909152
	5508,181			
	5112,014			
10000	11199,24	11830,22	618,2811	5,226287
	12434,97			
	11856,44			

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методика дериватизации гомоцистеина с SBD-F имеет высокую воспроизводимость, чувствительность и селективность, что позволяет использовать ее в клинической и лабораторной диагностике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дутов А. А., Никитин Д. А., Федотова А. А. // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, вып. 5. – С. 609–615.

2. Черкас Ю. В., Денисенко А. Д. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 5. – С. 35–37.

3. Pfeiffer C. M., Huff D. L., Gunter E. W. / Clinical Chemistry. – 1999. – Vol. 45. – P. 290–292.

4. Ueland M., Refsum H., Stabler S. P., et al. // Clinical chemistry. – 1993. – Vol. 39. – № 9. – P. 1464–1779.

5. Tyurenkov I. N., Perfilova V. N., Smirnova L. A., et al. / Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2010. – № 44 (12). – P. 702–704.