

## МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

---

УДК 542.98:615.322  
©Коллектив авторов

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОМОЦИСТЕИНА И ЦИСТЕИНА В ПЛАЗМЕ/СЫВОРОТКЕ КРОВИ ВЭЖХ МЕТОДОМ С УФ ДЕТЕКЦИЕЙ И ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИЕЙ НА ПОЛИМЕРНОМ СОРБЕНТЕ

*А.А. Дутов<sup>1\*</sup>, Д.А. Никитин<sup>2</sup>, А.А. Федотова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Читинская государственная медицинская академия, ул. Горького, 39а, 672090, Чита;  
тел./факс: 8-3022-32-30-58; эл. почта dutovaa@yandex.ru

<sup>2</sup>Читинский государственный университет.

Предложен ВЭЖХ метод определения гомоцистеина и цистеина в плазме/сыворотке с УФ детекцией при 330 нм и разделением на колонке 150×4,6 мм с октадецилсиликагелем (С18) в изократическом режиме с использованием в качестве элюента ацетонитрил – 0,05 М цитратно-фосфатный буфер с рН 2,4 – изопропанол (15:85:1, v/v/v). Полное разделение цистеина, цистеамина (IS), глутатиона и гомоцистеина занимает менее 10 мин. Восстановление тиолов из дисульфидных связей осуществляли 1,4-дитиоэритритолом, дериватизацию – реагентом Элмана [5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)]. После этого плазму/сыворотку с дериватами тиолов очищали и концентрировали на картридже с 10 мг сверхсшитого полистирола (Purosep-200). Элюирование с картриджа производили как водно-органическим растворителем (без упаривания и концентрирования), так и безводными растворителями (с упариванием и концентрированием). Простота, воспроизводимость в сочетании с высокой чистотой экстрактов и достаточной чувствительностью (0,4 нг для гомоцистеина, 2 нг для глутатиона и 0,2 нг для цистеина и цистеамина при соотношении сигнал/шум > 3), делают метод пригодным для рутинного клинического применения.

**Ключевые слова:** гомоцистеин, тиолы, ВЭЖХ, УФ детекция, твёрдофазная экстракция, сверхсшитый полистирол.

---

\* - адресат для переписки

## МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА И ЦИСТЕИНА

**ВВЕДЕНИЕ.** 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 [1].

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 + связанный с белком ГЦ составляют общий ГЦ [1, 2].

Перед определением ГЦ и цистеина в плазме/сыворотке их необходимо высвободить из дисульфидов и связи с белками. В качестве восстанавливающих веществ из различных дисульфидных связей используют соединения дитиозэритритол, дитиотрейтол, меркаптоэтанол, а также или борогидриды натрия или калия [3].

Для ВЭЖХ анализа тиолов чаще всего их превращают во флуоресцирующие производные путём реакции с биманами [4] или галогеносульфонилбензофуранами [3]. Несмотря на высокую чувствительность определения, технология тиол-специфичной предколоночной дериватизации имеет ряд существенных недостатков: продолжительность реакции варьирует от 10 до 60 мин, образующиеся побочные продукты дают мешающие пики на хроматограмме, а для анализа необходим дорогостоящий флуориметрический детектор [5-8].

ГЦ и другие тиолы можно дериватизировать с помощью ортофталевого альдегида/2-меркаптоэтанола [9-13]. Реакция не является тиол-специфичной и помимо цистеина и ГЦ позволяет определять другие аминокислоты.

Возможно определение ГЦ и цистеина после предколоночной дериватизации тиол-специфическим реагентом Элмана – 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) – с последующей фотометрической (УФ 330 нм) детекцией [14, 15]. Чувствительность при УФ детекции ниже, чем при флуориметрической, однако, вполне достаточная для рутинных клинических исследований. При УФ детекции, которая менее селективна, чем флуориметрическая, предъявляются высокие требования к чистоте экстрактов, что не всегда возможно, поскольку используется много реагентов. Кроме того, последовательное добавление реагентов приводит к разбавлению биопробы и снижению чувствительности определения.

Цель работы – разработка простого и чувствительного ВЭЖХ метода определения цистеина и ГЦ с УФ детекцией не только без разбавления, но и с концентрированием экстракта, а также с одновременным устранением побочных продуктов дериватизационной реакции и других мешающих компонентов плазмы/сыворотки путем твердофазной экстракции на полимерном сорбенте (сверхсшитый полистирол).

### МЕТОДИКА.

*Стандарты.* Базовые растворы стандартов (1 мг/мл) D,L-гомоцистеина (“Sigma-Aldrich”, США), L-цистеина (“Sigma-Aldrich”), восстановленного глутатиона (“ICN Biomedical”, США) и цистеамина (“Fluka”, Швейцария) готовили растворением сухого вещества в 0,01 М HCl и хранили в холодильнике при +4°C (сохраняются до 1 месяца). Рабочие растворы готовили в день исследования разбавлением базовых растворов водой до концентрации 100 нг/мкл.

*Реактивы.* Дериватизационный реагент готовили растворением 0,1 М 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) или DTNB, > 97,5% (Fluka) в 0,5 М фосфатном буфере ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , “Fluka”) с pH 8,0. Хранили в затемнённом месте при комнатной температуре. Сохраняется до 2 месяцев. В качестве восстанавливающего реагента использовали 1,4-дитиозэритритол, >99% (“Fluka”) – 0,0065 М его растворяли в том же 0,5 М фосфатном буфере с pH 8,0 и добавляли 0,001 М ЭДТА (“ХЧ”, “Синтакон”, Санкт-Петербург). Хранили при комнатной температуре. Сохраняется минимум 1 месяц, хотя некоторые

авторы рекомендуют готовить восстанавливающие реагенты непосредственно перед использованием [3]. Ацетонитрил ("Криохром", Санкт-Петербург) и изопропанол ("Лекбиофарм", Москва) квалификации "для ВЭЖХ", метанол LiChrosolv for liquid chromatography ("Merck", Германия),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (puriss), лимонная кислота (puriss) и трифторуксусная кислота (TFA) >99,5% ("Fluka").

**Аппаратура и оборудование.** Спектрофотометрический детектор SPD-10AVP ("Shimadzu"), насос высокого давления LC-10ADVP ("Shimadzu"), ручной инжектор 7725i Rheodyne (USA) с петлей на 100 мкл, компьютер Pentium-4 с хроматографической программой "Мультихром", версия 1,5х ("Амперсанд", Москва). Колонки 50×4 мм с Диасфер C18 5 мкм, около 2500 теоретических тарелок (ТТ, "БиоХимМак", Москва) и 150×4,6 мм Luna C18(2) 5 мкм, более 10,000 ТТ, 150×4,6 мм Synergy Polar-RP 4 мкм, 9500 ТТ и 150×4,6 мм Synergy Hydro-RP 4 мкм 9700 ТТ ("Phenomenex", США) с предколоночными фильтрами ("Supelco", США). Элюенты готовили на основе ацетонитрила – буфера – изопропанола 15:85:1 (по объёму). Буфер готовили по Макилвейну с pH 2,4, путем смешивания 0,1 М лимонной кислоты и 0,2 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и дистиллированной водой разбавляли до концентрации 0,05 М [1]. Экстракционные картриджи на основе 3-мл полипропиленовых шприцов с фторопластовыми фильтрами ("Supelco"), упакованные 10 мг сверхсшитого полистирола Purosep-200 ("Purolite Int.", Англия) по собственной технологии. Экстракцию проводили с помощью манифолда на 12 картриджей ("Merck") и вакуумного микронасоса Mosquito (США). Экстракты упаривали в 5-мл стеклянных стаканчиках Simax в термостате с пассивной конвекцией ("Boekel Scientific", США).

**Биологический материал.** Кровь забирали в "чистые" (сыворотка) или гепаринизированные (плазма) контейнеры (Vacutainer) и центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин (ОПН-3М). Отделенную плазму/сыворотку можно выдерживать при комнатной температуре до 24 часов, при этом концентрация тиолов остается стабильной [7]. Цельную кровь хранить при комнатной температуре не рекомендуется, поскольку при хранении в течение 4 часов концентрация ГЦ может возрастать на 20%, а после 24 часов – на 62% [7]. В замороженном виде плазму/сыворотку можно хранить в течение нескольких месяцев [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

**Восстановление дисульфидов.** Осуществляли по методам [9] и [14] с модификациями: к 0,3 мл плазмы/сыворотки, помещенной в 2-мл полипропиленовую пробирку, добавляли 1000 нг (10 мкл) внутреннего стандарта (IS, цистеамин), 100 мкл 0,0065 М 1,4-дитиозэритритола и помещали в термостат на 10 мин при 60°C. Модификация касалась уменьшения количества 1,4-дитиозэритритола, поскольку избыток его дает пик перед ГЦ, сопоставимый по высоте с самим ГЦ биопробы. Разбавление 1,4-дитиозэритритола с 0,1 М до 0,0065 М, снижало амплитуду интерферирующего пика в 15-20 раз. Парадоксально, но выход тиолов при этом не только не уменьшался, но даже возрастал на 10-25%.

**Дериватизация.** Производили по методам [9] и [14] с минимальными модификациями – количество реагента было уменьшено. После инкубации в термостате к плазме/сыворотке добавляли 50 мкл реагента Элмана (DTNB), осторожно перемешивали, выдерживали 3-5 мин, добавляли 50 мкл концентрированной  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , перемешивали и вводили в картридж. DTNB специфично и быстро (минуты) реагирует с SH-группами при нейтральном pH (7,6–8,6). Образующиеся продукты обладают высоким коэффициентом молярной экстинкции в дальнем УФ спектре (от 300 нм) [6, 11]. В ходе реакции образуется дериват тиола и анион ( $\text{TNB}^{2-}$ ). Этот анион дает на хроматограмме пик, который выходит значительно позже тиолов (рис. 1). Сходная хроматограмма с пиком аниона приведена в работе. [16]. Он не мешает определению тиолов и легко удаляется промывкой колонки 100 мкл ацетонитрила.

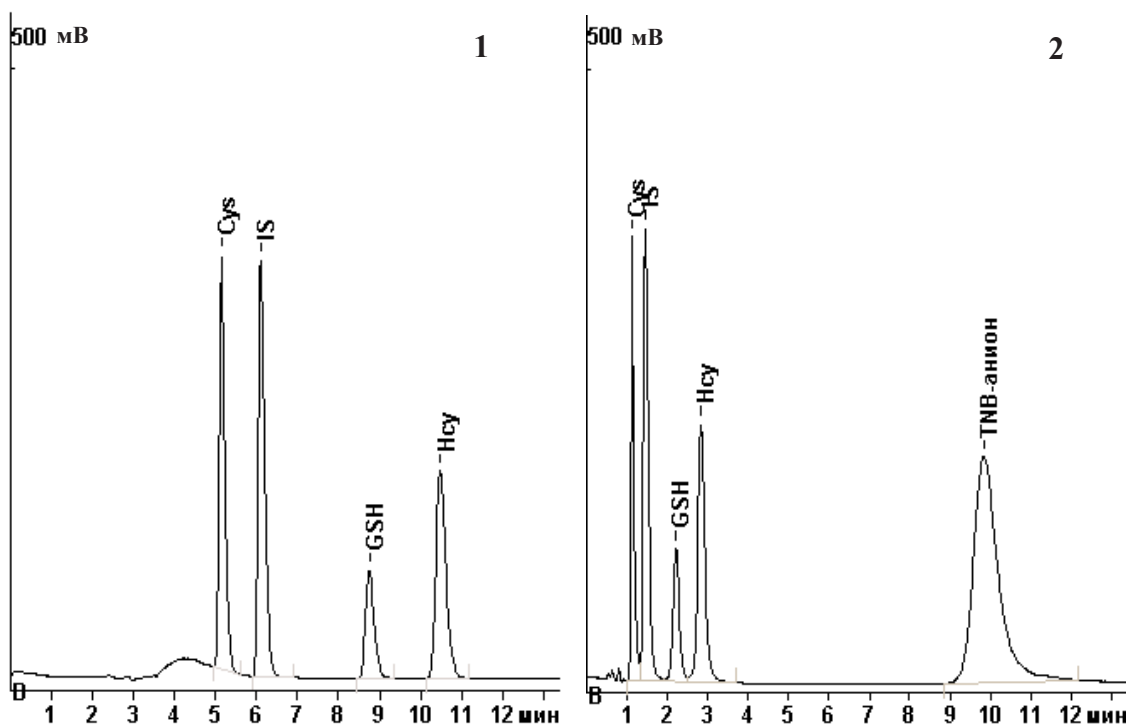


Рисунок 1.

Влияние длины колонок на разделение стандартов тиолов (по 100 нг каждого):

1 - Luna, 150×4,6 мм, C18(2), 5 мкм, более 10000 ТТ, 2 - 50×4 мм, Диасфер C18, 5 мкм, менее 2500 ТТ. УФ 330 нм. Ацетонитрил - 0,05 М цитратно-фосфатный буфер с pH 2,4 - изопропанол (15:85:1, v/v/v), 600/мин, 55 бар (1) и 30 бар (2). Обозначения: Cys - цистеин, IS - внутренний стандарт (цистеамин), GSH - глутатион, Hcy - гомоцистеин.

*Оптимизация разделения дериватов.* Дериваты легко разделяются даже на коротких колонках (рис. 1). Однако, при анализе экстрактов биопроб, разделение лучше проводить на длинных (не менее 100 мм) колонках.

Хроматографическое "поведение" дериватов очень чувствительно к изменению pH. Оптимальное её значение 2,4–2,5.

Разделение можно проводить не только на колонках с октадецилсиликагелем (C18). Возможно успешное разделение на менее гидрофобном сорбенте, например, цианопропильном (CN). В этом случае содержание органического компонента элюента нужно уменьшить до 10%.

Были испытаны также специализированные колонки, предназначенные для разделения высокополярных соединений и стабильно работающие на элюентах с низким (менее 10%) содержанием органического компонента: Synergy Polar-RP и Synergy Hydro-RP (Phenomenex, USA). Заметных преимуществ по сравнению с C18 не выявлено.

*Разработка и оптимизация SPE.* Нативные стандарты тиолов (цистеина, гомоцистеина и цистеамин) плохо удерживаются на сверхсшитом полистироле в силу их высокой полярности. Остался единственный вариант – удержать на сорбенте менее полярные дериватизированные тиолы.

Картриджи с 10 мг сверхсшитого полистирола кондиционировали 0,5 мл метанола, 0,5 мл воды и весь объем (470 мкл) обработанной биопробы вводили в картридж самотёком. Промывали сорбент 0,2 мл воды и высушивали под вакуумом 3 мин. Элюирование можно реализовать в двух вариантах:

1) без упаривания и концентрирования, 0,3 мл смеси ацетонитрил–метанол– вода (1:1:1, по объёму) + 1 капля  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 30 мкл в петлю инжектора.

2) с упариванием и концентрированием, 0,3 мл метанола + 1 капля TFA на 1 мл метанола, упаривание при 60°C, растворение в 100 мкл 0,05 М фосфатного буфера с pH 8,0 или том же объеме элюента, 10 мкл в петлю инжектора.

Типичные хроматограммы представлены на рисунке 2 (вариант с упариванием и концентрированием).

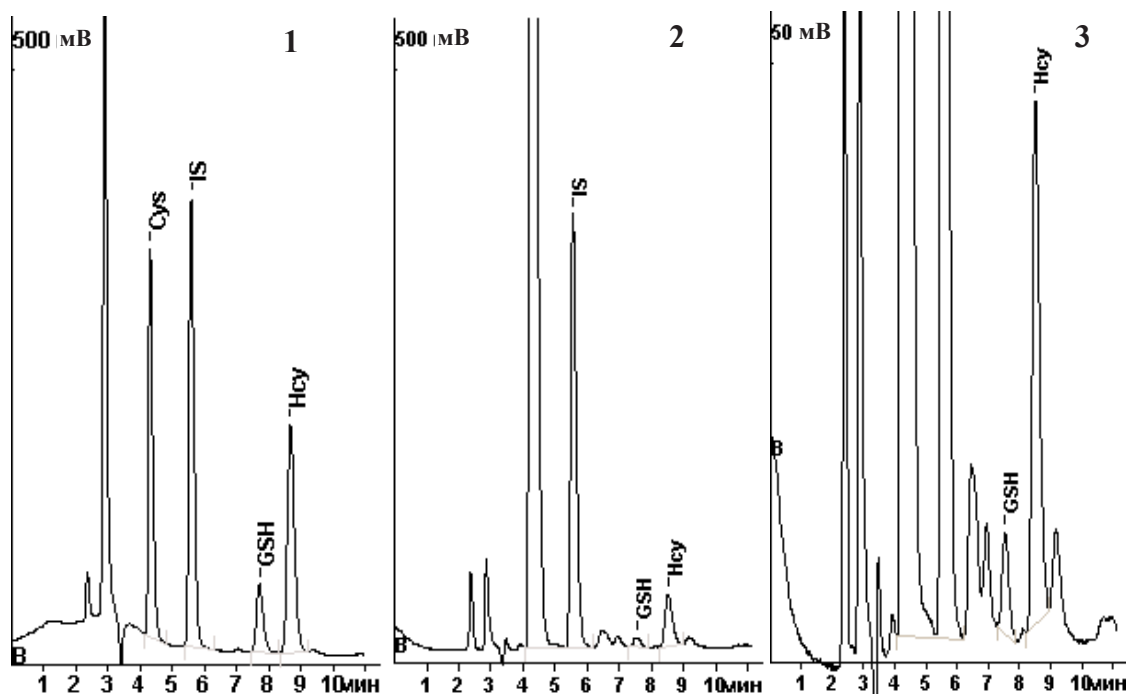


Рисунок 2.

Хроматограммы стандартов тиолов по 100 нг каждого (1) и экстрактов сыворотки крови здорового добровольца (2 и 3). На хроматограмме 3 представлен тот же экстракт, что и на хроматограмме 2, но чувствительность увеличена в 10 раз. На хроматограмме 2 пик цистеина (Cys) "обрезан", т.к. его высота составляет 2120 мВ. Колонка Luna 150×4,6 мм C18(2), 5 мкм, около 10000 ТТ, УФ 330 нм, ацетонитрил - 0,05 М цитратно-фосфатный буфер с pH 2,4 - изопропанол (15:85:1, по объёму), 600/мин, 55 бар. Концентрация цистеина 184, глутатиона 1,7 и гомоцистеина 5,8 микромоль/л. Экстракция 97%. Обозначения как на рисунке 1.

В процессе разработки процедуры SPE последовательно оптимизировали условия загрузки, промывки и элюирования. Установлено, что выход тиолов зависит от pH образца: при загрузке слабощелочной и нейтральной биопробы экстракция составила 25-50%, а после добавления фосфорной кислоты – более 95%. Максимальный объем загружаемого образца не должен превышать 0,5 мл. Для промывки достаточно 0,2 мл воды. После просушивания сорбента можно ввести дополнительную промывку неполярными растворителями, например, 0,3 мл кислого хлороформа или кислого гексана (1 капля трифторуксусной кислоты на 1 мл растворителя) с последующим высушиванием сорбента. Однако такая промывка ничего не улучшает и не ухудшает – чистота экстрактов точно такая же, как после промывки только 0,3 мл воды, а экстракция в пределах 70-80%. Элюирование можно проводить как водными, так и безводными растворителями. В первом случае используется смесь ацетонитрил–метанол–вода (1:1:1, по объёму) + 1 капля H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Экстракция 95-113%. В этом случае сокращается время обработки биопробы, но в то же время может затрудняться идентификация цистеина из-за наложения мешающих пиков. Проблему частично решает



## МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА И ЦИСТЕИНА

уменьшение объема микроинъекции с 30 до 10 мкл. Во втором – кислый метанол (10 мкл трифторуксусной кислоты на 1 мл спирта). Экстракция 96-104%. Упаривание занимает 15-20 мин при 60°C. Дериваты тиолов довольно стойкие (сохраняются более суток) и достаточно термостабильны. Сухой остаток можно растворять в 0,05 М фосфатном буфере с pH 8,0, смеси этого буфера с ацетонитрилом (9:1, v/v) или элюенте.

Преимущества предложенного метода – не только отсутствие разбавления биопробы, но и возможность концентрирования. Из всех цитируемых работ, нам встретилась только одна, в которой анализ тиолов производили без разбавления образца [7]. Во всех остальных исследованиях по ВЭЖХ анализу гомоцистеина с УФ или флуориметрической детекцией, биопробу разбавляли последовательным добавлением реагентов. Подробный анализ многочисленных работ по ВЭЖХ анализу гомоцистеина представлен в обзорах [5, 15].

Разделение лучше проводить на колонках с октадецилсиликагелем (C18). Оптимально использовать сорбент с двойным эндкэппингом – C18(2). После каждой инъекции экстракта биопробы, колонку необходимо промыть 100 мкл ацетонитрила или метанола. Специализированные колонки, стабильно работающие с водными элюентами и предназначенные для разделения ароматических высокополярных соединений (Synergy Polar-RP и Synergy Hydro-RP), не имеют заметных преимуществ при разделении дериватов тиолов в сравнении с C18(2).

Предложенную технологию SPE при желании можно "масштабировать", например, использованием картриджей с 30 мг сорбента. Это позволит проводить экстракцию из 1-2 мл плазмы/сыворотки.

Метод может быть адаптирован для анализа тиолов в других биологических жидкостях – слюне и моче. Процедура дериватизации и экстракции аналогичная, только перед загрузкой в картридж к 0,3 мл слюны или мочи надо добавить не фосфорную, а 10 мкл муравьиной кислоты к 0,3 мл биологической жидкости. Концентрация гомоцистеина в моче примерно в 2-3 раза ниже, чем в плазме/сыворотке, а в слюне – в 10-20 раз.

Высокая чистота экстрактов и достаточная чувствительность (0,4 нг для гомоцистеина, 2 нг для глутатиона, 0,2 нг для цистеина и цистеамина при соотношении сигнал/шум > 3), а также "неприхотливость" в отношении колонок и сорбентов – достаточно 2500 ТТ для разделения – делают метод пригодным для рутинного клинического применения. Картриджи на основе сверхсшитого полистирола можно использовать многократно, до 15-20 раз и единственный повод для замены – забивка верхнего фильтра биоматриком.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шевченко О.П., Олефиренко Г.А. (2002) Лаборатория, № 1, 3-6.
2. Tcherkas Y.V., Denisenko A.D. (2001) J. Chrom. A., **913**, 309-313.
3. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) Справочник биохимика (пер. с англ.), Мир, М.
4. Bald E., Chwatko G., Glowacki R., Kusmierek K. (2004) J. Chrom. A., **1032**, 109-115.
5. Amores-Sanchez M.I., Medina M.A. (2000) Clin. Chem. Lab. Med., **38**(3), 199-204.
6. Ellman's Reagent (2004) Pierce Biotechnology Inc., www.piercenet.com
7. Katrusiak A.E., Paterson P.G., Kamencic H., Shoker A., Lyon A.W. (2001) J. Chrom. B: Biomedical Science and Applications, **758**, 207-212.
8. Lunn G., Hellwig L.C. (1998) Handbook of derivatization reactions for HPLC. John Wiley & Sons, Inc.
9. Andersson A., Isaksson A., Brattstrom L., Hultberg B. (1993) Clin. Chem., **39**, 1590-1597.
10. Pastore A., Massoud R., Motti C., Russo A.L., Fucci G., Cortese C., Federici G. (1998) Clin. Chem., **44**, 825-832.

11. *Fiskerstrand T., Refsum H., Kvalheim G., Ueland P.M.* (1993) Clin. Chem., **39**, 263-271.
12. *Frick B., Schrocksnadel K., Neurauter G., Wirleitner B., Artner-Dworzak E., Fuchs D.* (2003) Clin. Chim. Acta, **331**(1-2), 19-23.
13. *Hyland K., Bottiglieri T.* (1992) J. Chrom. A, **579**, 55-62.
14. *Zhloba A.A., Blashko E.L.* (2004) J. Chrom. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., **800**, 275-280.
15. *Ueland P.M., Refsum H., Stabler S.P., Malinow R.M., Andersson A., Allen R.H.* (1993) Clin. Chem., **39**, 1764-1779.
16. *Pfeiffer C.M., Huff D.L., Gunter E.W.* (1999) Clin. Chem., **45**, 290-292.

Поступила: 18. 11. 2008.

#### HPLC DETERMINATION OF PLASMA/SERUM HOMOCYSTEINE AND CYSTEINE WITH UV DETECTION AND SOLID-PHASE EXTRACTION ON A POLYMERIC SORBENT

*A.A. Dutov<sup>1</sup>, D.A. Nikitin<sup>2</sup>, A.A. Fedotova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Chita State Medical Academy, Gorky st 39a, Chita, 672090 Russia;  
tel./fax: 8-3022-32-30-58; e-mail: dutovaa@yandex.ru

<sup>2</sup>Chita State University, Chita, Russia

Isocratic HPLC determination of plasma/serum homocysteine and cysteine with separation on reversed-phase column and UV detection at 330 nm is proposed. The mobile phase consist of acetonitrile – 0.05 M citrate-phosphate buffer with pH 2.4 – isopropanol (15:85:1, v/v/v). Full separation of cysteine, cysteamine (IS), glutathione and homocysteine was achieved within less than 10 minutes. Reduction of thiols from disulfides was performed by 1,4-dithioerithreitol, and derivatization by with Ellman's reagent [5'5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]. After that plasma/serum, containing derivatives of thiols, is cleared and concentrated on cartridge packed with 10 mg of hypercross-linked polystyrene (Purosep-200). Elution from cartridge is made with water-organic solvent (without evaporation and concentration, but without dilution), as well as waterless solvents (with evaporation and concentration). Simplicity, reproducibility in combination with high cleanliness of extracts and sufficient sensitivity (0.4 ng for homocysteine, 2 ng for glutathione and 0.2 ng for cysteine and cysteamine at a signal/noise ratio > 3), make this method suitable for routine clinical application.

**Key words:** homocysteine, thiols, HPLC, UV detection, SPE, hypercross-linked polystyrene.