

УДК 57.088

©Коллектив авторов

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОМОЦИСТЕИНА ПОСРЕДСТВОМ ТАНДЕМНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ХИМИЧЕСКОЙ ИОНИЗАЦИЕЙ

И.И. Мирошниченко, А.И. Платова, Т.П. Сафарова, О.Б. Яковлева

ФГБУ Научный Центр Психического Здоровья РАМН, 115522, Москва,
Каширское шоссе, 34, тел.: (499)-6159319; эл. почта: igormir@psychiatry.ru

Гомоцистеин (Нсу) – промежуточный продукт метаболизма метионина. Высокие концентрации Нсу в крови являются фактором риска инсульта, сердечно-сосудистых заболеваний, глубокого тромбоза, коронарной недостаточности и когнитивных дефектов. В работе предложен новый метод экстракции и количественного определения Нсу методом тандемной хроматомасс-спектрометрии с обратно-фазной ВЭЖХ. Детектирование выполняли на тройном квадрупольном масс-спектрометре Agilent 6410-2K в режиме детектирования заданных масс (MRM) (136,0 → 90,0) в условиях положительной химической ионизации при атмосферном давлении (APCI, Positive). Предел обнаружения гомоцистеина составил 0,4 мкМ. Калибровочная кривая линейна для гомоцистеина в диапазоне концентраций от 0,4 мкМ до 40 мкМ имеет линейный характер с коэффициентом достоверности аппроксимации $R^2=0,997$. Метод успешно применен для определения концентраций гомоцистеина в плазме крови человека.

Ключевые слова: гомоцистеин, тандемная хроматомасс-спектрометрия, режим детектирования заданных масс, положительная химическая ионизация.

ВВЕДЕНИЕ. Гомоцистеин, 2-амино-4-меркаптобутановая кислота $C_4H_9NO_2S$ (рис. 1) является предиктором многих патологических изменений в организме человека. Гипергомоцистеинемия трёх степеней тяжести нередко является следствием генетического полиморфизма основных ферментов фолатного цикла. Установлено, что гипергомоцистеинемия является одним из факторов риска возникновения и прогрессирования различного рода сердечно-сосудистых и cerebro-сосудистых заболеваний, канцерогенеза, когнитивных нарушений при деменциях различной этиологии (болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция, деменция при болезни Паркинсона), а также при шизофрении, депрессии и ряде других заболеваний [1-5].

* - адресат для переписки

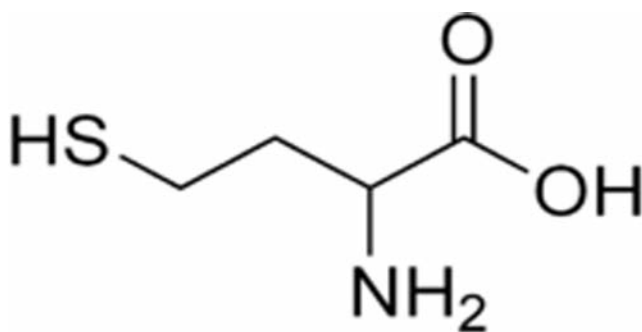


Рисунок 1.

Структурная формула гомоцистеина.

В плазме крови 1–2% Нсу находится в свободном (восстановленном) состоянии. Примерно 20% находится в окисленном состоянии, а около 80% Нсу связывается с белками плазмы крови, в основном с альбумином, образуя дисульфидную связь с цистеином. Нсу образуется из метионина через S-аденозилметионин и S-аденозилгомоцистеин, при этом повышение концентрации Нсу в крови сопровождается ингибированием метилтрансферазных реакций, участвующих в метилировании ДНК, белков и липидов.

Уровень Нсу в крови может повышаться по многим причинам. Самыми частыми причинами повышения содержания Нсу (гипергомоцистеинемии) являются витаминдефицитные состояния. Особенно чувствителен организм к недостатку фолиевой кислоты и витаминов В6, В12 и В1.

Различают несколько форм гипергомоцистеинемии [6]:

- тяжелая форма (>100 мкМ).
- умеренная форма (30-100 мкМ).
- слабая форма (15-30 мкМ).

Следует заметить, что повышение уровня Нсу в крови связано с увлечением смертности в популяции, как вообще, так и от заболеваний сердечно-сосудистой системы, в частности [7]. Считается, что повышение уровня Нсу крови на 5 мкМ приводит к увеличению риска атеросклеротического поражения сосудов на 80% у женщин и на 60% у мужчин, а если бы удалось снизить уровень Нсу на 40%, то это привело бы к сохранению 8 лет жизни на 1000 мужчин и 4 лет жизни на 1000 женщин. Это обстоятельство стимулирует внедрение мониторинга концентрации Нсу в клиническую практику. Для успешного проведения мониторинга прежде всего необходим высокочувствительный и воспроизводимый метод детекции Нсу в биологических жидкостях.

Для количественного определения Нсу используются иммуноферментный анализ и различные аминокислотные анализаторы. Этим методам присущи общие проблемы – неспецифичность и интерференция со стороны других аминокислот. Широкое распространение получили также методы на основе ВЭЖХ с ультрафиолетовой, флуоресцентной и электрохимической детекцией [8, 9]. Однако ВЭЖХ требует дериватизации образцов путем реакции с флуоресцирующими агентами, что неизбежно увеличивает трудоёмкость и время проведения эксперимента.

В последнее время используется также масс-спектрометрическая детекция с ионизацией посредством электрораспыления [10, 11]. Также

разработан быстрый и простой метод одновременного определения Нсу и цистеина (Cys) в плазме крови и моче посредством ВЭЖХ–МС/МС, использующий меченые дейтерием димеры d8 Нсу-Нсу и d4-Cys-Cys, в качестве внутренних стандартов, и не требующий дериватизации [12].

Тем не менее, из-за плохой корреляции между измеренными в разных лабораториях значениями концентраций Нсу [13], по-прежнему актуальна необходимость разработки методов мониторинга Нсу в различных биологических жидкостях.

Целью настоящего исследования являлась разработка высокочувствительной, воспроизводимой методики количественного определения гомоцистеина в биологических образцах, основанной на тандемной ВЭЖХ-МС в режиме детектирования масс при химической ионизации.

МЕТОДИКА. Для целей настоящего исследования была использована плазма крови, полученная от 66 пациентов, госпитализированных с большими депрессивными эпизодами разных нозологических форм (рекуррентное депрессивное расстройство, однократный депрессивный эпизод и депрессивная фаза при биполярном аффективном расстройстве) в возрасте старше 50 лет. Группу составили 16 мужчин и 50 женщин (24,2% и 75,8%, соответственно). 36 человек были пожилого и старческого возраста (старше 60 лет), и 30 человек инволюционного возраста (50-59 лет) представляли группу сравнения.

Заборы крови производили после подписания пациентами информированного согласия на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом (ЛЭК) ФГБУ “НЦПЗ” РАМН (04.02.2010 г).

Для извлечения препарата из плазмы крови и проведения хроматографического анализа экстрактов использовали следующие реактивы и органические растворители: метанол (MeOH) (“Sigma”, Германия); муравьиная кислота (“Sigma”); этанол; деионизированная вода; N₂ особой чистоты.

Используемая субстанция: гомоцистеин. Маточный 10 мМ раствор Нсу готовили в 0,1 н HCl. Маточный раствор стабилен при температуре 4°C в течение 1 мес. Растворы для построения калибровочных графиков готовили в день эксперимента путем соответствующего разбавления маточного раствора MeOH/H₂O (50:50 по объёму).

Центрифугирование образцов (для отделения плазмы, а также в рамках экстракции-после осаждения белков) проводили на центрифуге FP-350 Labsystems Oy (Финляндия). Для равномерного перемешивания проб использовали вибровстряхиватель фирмы “Labomed” (Германия), для экстракции – горизонтальный шейкер IKA® HS 260 basic (Германия), для производства азота особой чистоты – генератор NitroFlow®Lab фирмы “Parker Filtration” (Нидерланды). Деионизированную воду получали с помощью установки Simplicity UV System (“Millipore”, Франция).

Анализ биопроб проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200 Series LC (США), включающем дегазатор, бинарный насос, автоинжектор, термостаты автоинжектора и колонок, спектрофотометрический детектор с переменной длиной волны в диапазоне 190 – 600 нм и совмещённый с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 6410-2K Triple Quad LC-MS(QQQ) (США). В качестве источника ионов в масс-спектрометре использовали мультимодальный модуль, работающий в режиме положительной ионизации, а режим детектирования заданных масс (MRM) фиксировал переход 136 → 90.

Условия хроматографического анализа: стационарная фаза – колонка Zorbax SB-C18; 3,5 мкм, 100×4,6 мм (“Agilent”, США). Предколонка – Zorbax SB-C18; 5 мкм; 12,5×4,6 мм (“Agilent”).

Подвижная фаза – 0,2% раствор муравьиной кислоты в воде/MeOH (50%/50%, по объёму). Скорость подвижной фазы – 0,7 мл/мин; изократический режим работы насоса; объем пробы, вводимой в аналитическую систему – 20 мкл; температура термостата колонки – 20°C, температура термостата автоинжектора – 15°C. В этих условиях время удерживания Hsu составило $1,72 \pm 0,02$ мин. Предел обнаружения целевого вещества в пробах составлял 30 нг/мл.

Для сбора и обработки хроматографических данных использовали программное обеспечение MassHunter B.01.04. (“Agilent”). Статистическую обработку данных проводили с использованием портативного пакета SAS v.9.0.

Пробоподготовка. К 200 мкл плазмы крови добавляли 20 мкл MeOH/H₂O (50%/50% по объёму) и после перемешивания на Vortex, также добавляли 20 мкл водного раствора ТСЕР (Трис(2-карбоксиэтил) фосфин) концентрации 35 мкМ. Полученный раствор выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут. Далее в каждую пробирку добавляли 400 мкл MeOH, содержащий 0,1% (1 мл/л) муравьиной кислоты и 0,025% (0,25 мл/л) трифторуксусной кислоты. После перемешивания и центрифугирования в течение 5 мин при 3000 g полученный после осаждения белков супернатант объемом 200 мкл переносили в аналитические вials и инжестировали в хроматограф в объёме 5 мкл.

Валидацию метода проводили в соответствии с требованиями к биоаналитическим методам, разработанными в Управлении по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (ЕДА), изложенных в соответствующем руководстве [14]. Матричный эффект ионизации искомого вещества оценивали путём сравнения площади пика аналита в образце плазмы с таковой, полученной для Hsu в мобильной фазе. Контрольные образцы плазмы, используемые в этом исследовании – пять различных проб от различных субъектов. Если соотношение было <85 или >115%, то предполагали наличие экзогенного матричного эффекта.

Важными показателями валидности метода является статистическая точность и правильность результатов. Правильность метода считается удовлетворительной, если средняя величина 6 повторов каждой исследованной концентрации находится в пределах 80-120% от номинальной концентрации. Точность метода считается допустимой, если коэффициент вариации (CV) при 6 измерениях каждой концентрации не превышает 15%. Для наглядности правильность метода можно связать с меткостью, а точность метода с кучностью стрельбы [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Детектирование проводилось в режиме положительной химической ионизации при атмосферном давлении (APCI, Positive). При использовании ВЭЖХ-МС наблюдается нежелательный матричный эффект, выражающийся в подавлении хроматографического отклика исследуемого соединения в реальной обработанной биопробе, по сравнению с сигналом, полученным при детектировании стандартного образца в чистом растворителе. Установлено, что матричный эффект при APCI значительно менее выражен, по сравнению с традиционной ионизацией посредством электрораспыления [15].

Для детектирования использовали масс-спектрометрический детектор в режиме детектирования заданных масс (Multiple Reaction Monitoring – MRM). Режим MRM обеспечивает высокую эффективность в отсекании фона и, как следствие, значительно улучшает предел обнаружения при MRM переходе. Массы материнского ($M+H^+$) и дочернего ионов определяли в режиме сканирования масс (рис. 2 и рис. 3, соответственно).

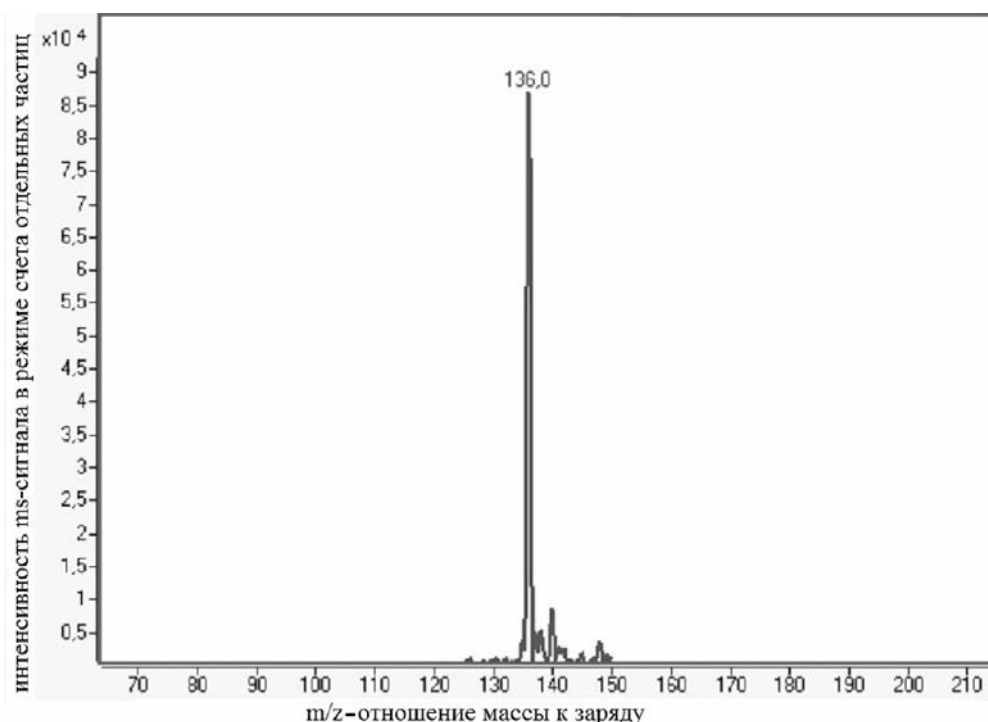


Рисунок 2.

Масс-спектр стандартного раствора Нсу, полученный в режиме сканирования с установленным диапазоном детекции 70-210 m/z . Зарегистрирован максимальный отклик сигнала масс-спектрометрического детектора для $m/z=136,0$, соответствующий родительскому иону Нсу.

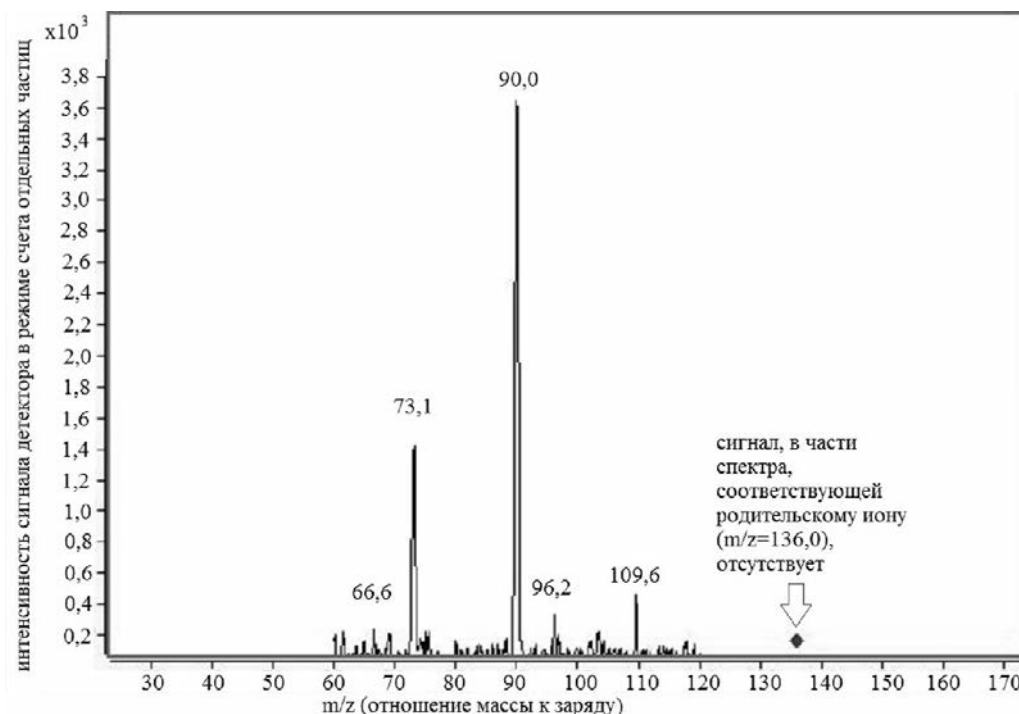


Рисунок 3.

Масс-спектр стандартного раствора Нсу, полученный в режиме сканирования после фрагментации исходного иона Нсу. Отсутствие сигнала в части спектра, соответствующей родительскому иону, свидетельствует о полной фрагментации. В качестве дочернего иона для MRM- детекции выбран ион с $m/z=90$, как демонстрирующий максимальный отклик.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОМОЦИСТЕИНА

Параметры работы детектора подбирали для достижения максимального выхода MRM (136,0 → 90,0). В таблице 1 представлены условия масс-спектрометрического детектирования гомоцистеина.

Таблица 1. Условия масс-спектрометрического детектирования.

Ионизация	APCI (Химическая ионизация при атмосферном давлении)
Режим	Positive (Положительная ионизация)
Тип сканирования	MRM (режим детектирования заданных масс)
Параметры ионизации	Расход газа азота – 5 л/мин, Температура газа – 350 °C, Температура испарителя – 250 °C, Коронный разряд – 4 мкА, Напряжение капилляра – 2000 В, Давление небулайзера – 45 psi.
Параметры фрагментации	Fragmentor (энергия фрагментатора)=80 В, Collision Energy (энергия столкновений)=15 В.
Молекулярный ион (M+H) ⁺	m/z (Гомоцистеин) = 136,0
Дочерний ион	m/z =90,0
Программное обеспечение	MassHunter B.01.04. (Agilent, США).

В этих условиях была достигнута оптимальная чувствительность количественного определения Нсу (0,4 мкМ). Плазменные концентрации Нсу в исследуемой популяции находятся в диапазоне от 3 мкМ до 350 мкМ. Это обуславливает требования к подготовке образцов.

В условиях стационара 5 мл крови отбирали в пробирки VACUETTE, содержащие буферный раствор натрия цитрата / лимонной кислоты (рН = 4,2) для стабилизации Нсу в плазме крови. Благодаря стабилизатору пробы остаются без изменений в течение 6 ч при комнатной температуре и 72 ч при температуре 4°C.

Это обстоятельство обуславливает предпочтение данного антикоагулянта по сравнению с гепарином или ЭДТА [16]. Для получения плазмы кровь центрифугировали при 2200 g в течение 10 мин и хранили до анализа при температуре -20°C.

На следующем этапе для определения общего Нсу в плазме необходимо разрушить дисульфидные связи с белками и димеры. В качестве агентов, способствующих этой реакции, применяют дитиотрейтол, меркаптоэтанол и трибутил-фосфин. Нами отдано предпочтение ТСЕР. Это соединение обладает рядом преимуществ, среди которых следует упомянуть растворимость в воде, нелетучесть, отсутствие неприятного запаха и стабильность реакции [17].

В заключительной стадии подготовки пробы к анализу производится осаждение белков посредством метанола, содержащим в качестве источника ионов муравьиную и трифторуксусную кислоты.

Как правило, для анализа таких полярных соединений как аминокислоты, используется ионизация посредством электрораспыления [18]. Однако в этих условиях наблюдался выраженный матричный эффект >10%, что делало данный метод ионизации неприемлемым.

В то же время в условиях химической ионизации при величине тока коронного разряда, равном 4 мкА, влияние матрицы на величину сигнала было незначительным.

На рисунке 4 представлена типичная MRM масс-хроматограмма образца плазмы, отобранной у пациента №62. Пик Нсу симметричный, отвечает гауссову распределению, без признаков размывания и раздвоения со временем удерживания $1,72 \pm 0,02$ мин.

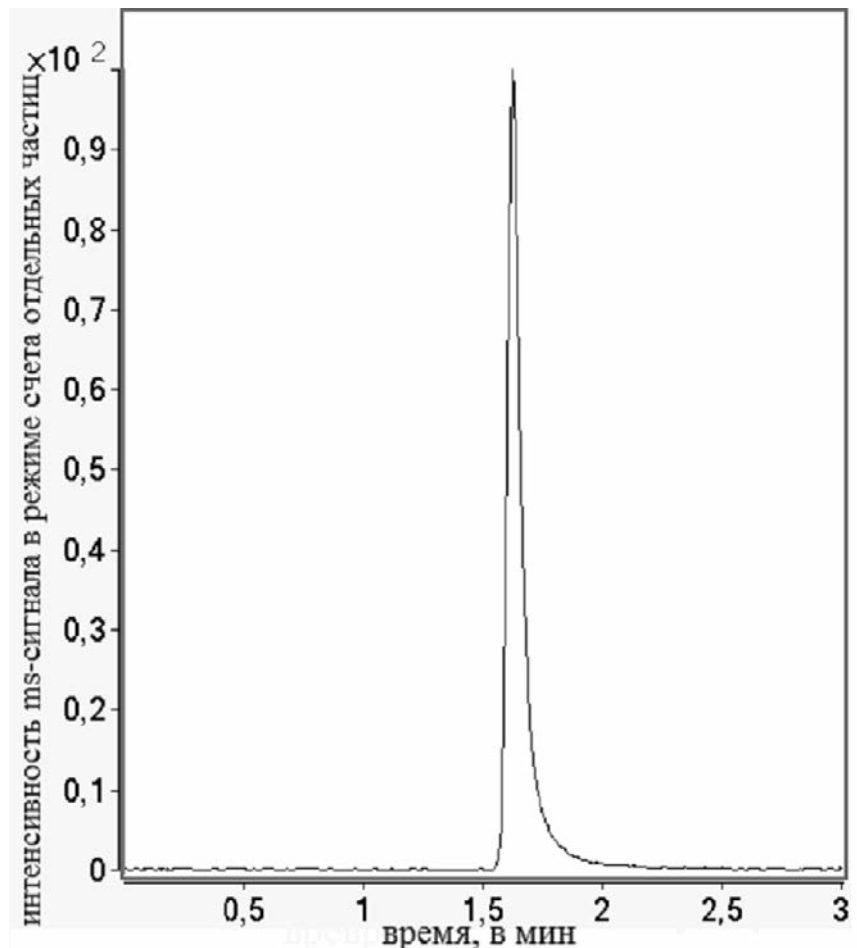


Рисунок 4.

Масс-хроматограмма, полученная в режиме MRM $136,0 \rightarrow 90,0$ при анализе типичного образца плазмы крови пациента, в котором было определено содержание гомоцистеина в концентрации $10,8 \text{ мкМ}$.

Основой для количественного определения (метод абсолютной калибровки) Нсу в плазме крови служили калибровочные зависимости. Для построения калибровочной кривой готовили модельные растворы Нсу в плазме донорской крови с концентрациями: $0,1$; 1 ; $2,5$; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 и 40 мкМ , их дальнейшая процедура экстракции с последующим анализом проводилась, как описано выше. Каждую пробу крови анализировали не менее трёх раз. Калибровочный график строили по результатам ВЭЖХ-МС анализа на основе измерений площади хроматографических пиков с использованием процедуры REG программы SAS (см. рис. 5).

Линейность калибровочной кривой в диапазоне концентраций $1 \div 40 \text{ мкМ}$ Нсу подтверждается коэффициентом достоверности аппроксимации $R^2=0,997$ (см. рис. 5). Калибровочная кривая описывается уравнением: $C=0,34+0,0118 \times S$, (где S – площадь хроматографических пиков; C – концентрация Нсу, мкМ).

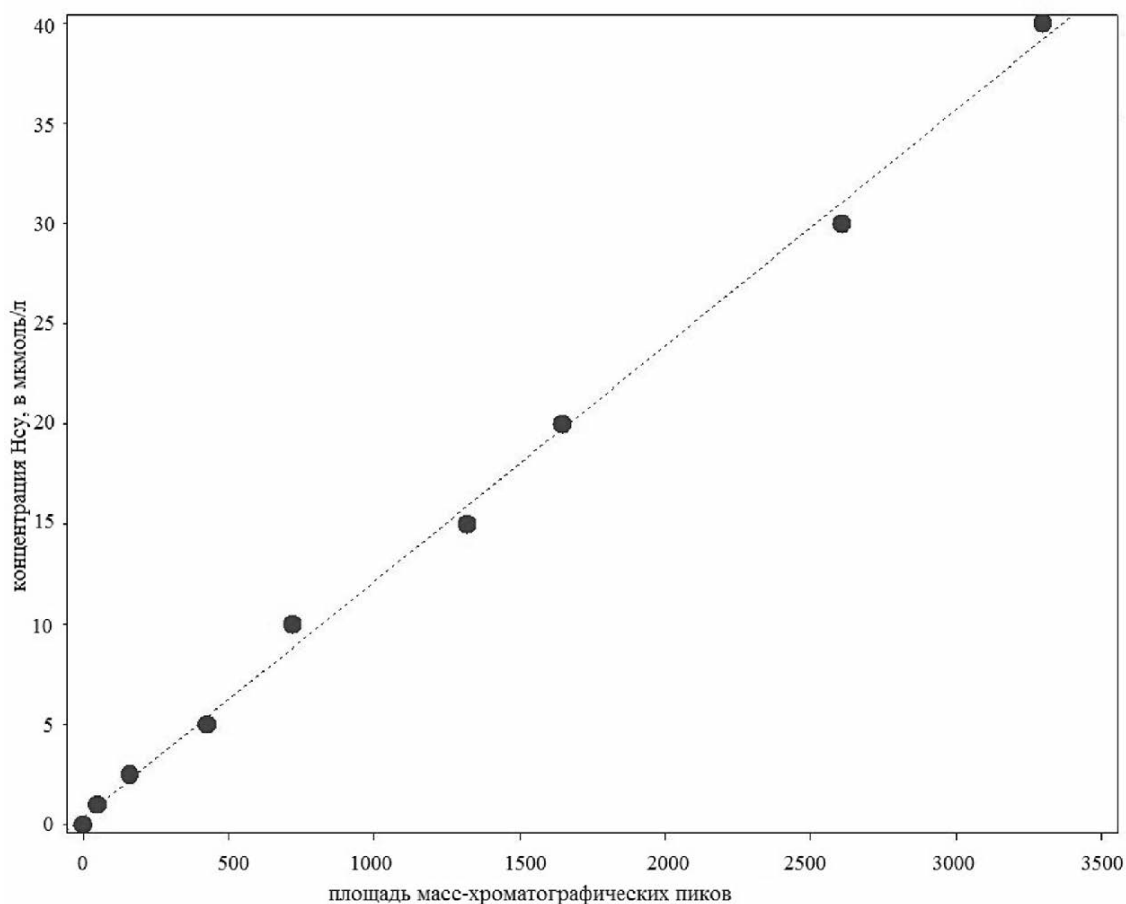


Рисунок 5.

Калибровочная кривая (зависимость концентрации Нсу от величины площади масс-хроматографических пиков). По оси ординат- концентрация Нсу в мкМ, по оси абсцисс- площадь пика (количество импульсов · мин).

Правильность (accuracy) и точность (precision) количественного определения Нсу оценивали для трёх концентраций (4, 11, и 33 мкМ, соответственно). Оба показателя находились в приемлемых диапазонах (правильность: 10,0–1,8% по модулю), точность (14,7–3,2%). Соответствующие данные для точности и правильности представлены в таблице 2.

Таблица 2. Правильность и точность метода определения Нсу в плазме (n =5).

Добавлено к плазме (мкМ)	Измеренная концентрация	Правильность %	Точность CV	Измеренная концентрация	Правильность %	Точность CV
	Внутрисуточная (intra-assay)			Межсуточная (inter-assay)		
4	4,12	3,0	14,7	4,4	10,0	10,9
11	11,2	1,8	11,9	11,7	6,4	3,2
33	31,8	-3,7	8,5	31,2	-5,5	8,9

Предел количественного обнаружения (LOQ) для Нсу равнялся 0,40 мкМ (50 нг/мл) при значениях правильности и точности менее 20%.

Стабильность образцов обеспечивалась использованием термостатированного автоинжектора при температуре 10°C. Специфичность метода показана путём построения калибровочных кривых с использованием нескольких независимых источников донорской плазмы. При этом тангенс угла наклона значимо не различался.

К сожалению, анализ образцов, содержащих искомое вещество эндогенного происхождения, сопровождается рядом методических трудностей. Так для приготовления QS (контрольных образцов), необходимо, по меньшей мере, 2 образца: в один из которых добавляется известное количество аналита, а второй отражает базовый уровень. Эти затруднения можно преодолеть путём повторного анализа экспериментальных образцов (incurred sample reanalysis) [19]. Спустя некоторое время пробы, содержащие Нсу, повторно обрабатывались с повторным измерением содержания аналита (табл. 3). Правильность измерения определяли по формуле: $(\text{Нсу I} - \text{Нсу II}) / \text{GM}$, полученные значения находились в допустимом интервале (<20% по модулю) [20].

Таблица 3. Повторный анализ содержания Нсу в плазме (n =10).

Образец	Первое измерение НсуI	Повторное измерение НсуII	Среднее геометрическое GM	Правильность
1-2	12,9	12,4	12,6	-3,95%
6-1	23,2	25,3	24,2	8,67%
17-2	8,2	9,4	8,8	13,67%
22-1	9,7	9,8	9,7	1,03%
27-2	10,7	10,2	10,4	-4,79%
35-1	14,4	13,2	13,8	-8,70%
41-2	9,5	10,2	9,8	7,11%
49-1	17,3	17	17,1	-1,75%
61-1	11,7	11	11,3	-6,17%
62-1	10,8	11,6	11,2	7,15%

Нами было проведено измерение концентраций Нсу у 66 пациентов двух возрастных групп, находящихся в условиях стационара, страдающих эндогенными депрессиями. Значения концентраций, превосходящие 15 мкмоль/л, классифицировались как мягкая форма гипергомоцистеинемии (табл. 4).

Таблица 4. Уровни содержания Нсу в плазме крови пожилых больных, страдающих депрессией (n =66).

Состояние	Возраст (г, M±SD)	Концентрация Нсу (мкМ, M±SD)
Норма	54,3 ± 2,8	8,9 ± 2,4
	70,5 ± 6,6	10,7 ± 2,3
Гипергомоцистенемия	54,3 ± 2,8	17,9 ± 2,0
	70,5 ± 6,6	18,4 ± 3,2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, разработана высокочувствительная методика определения Нсу в плазме крови. Использование химической ионизации вместо традиционного электрораспыления позволяет устранить влияние матрицы на сигнал. Это выражается в улучшении линейности отклика, что, при сравнимой с литературными данными [12, 13] чувствительностью, позволяет упростить процедуру и избежать добавления дорогостоящих и труднодоступных дейтерированных внутренних стандартов. Разработанная методика отвечает основным требованиям, предъявляемым к аналитическим методам, используемым для изучения распределения лекарственных препаратов в биологических жидкостях. Чувствительность и специфичность представленной методики позволяет применять её для рутинного анализа определения уровня Нсу в образцах плазмы крови пациентов с психическими расстройствами и использовать полученные данные для диагностики и коррекции фармакотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Vasan R.V.* (2006) *Circulation*, **113**, 2335-2362.
2. *Мирошниченко И.И., Птицина С.Н., Кузнецова Н.Н., Калмыков Ю.М.* (2009) *Русс. мед. журн.*, т.17, **4** (343), 224-227.
3. *Мирошниченко И.И., Калмыков Ю.М., Яковлева О.Б., Птицина С.Н.* (2010) *Психиатрия*, **2**, 67-71.
4. *Мирошниченко И.И.* (2011) Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. ООО "Медицинское информационное агентство", 353-371.
5. *Almeida O.P., Flicker L., Yeap B.B., Alfonso H., McCaul K., Hankey G.J.* (2012) *Transl. Psychiatry*, **2**, 1-5.
6. *Lentz S.R., Haynes W.G.* (2004) *Clev. Clin. J. Med.*, **71**, 729-734.
7. *Malinow M.R.* (2001) *Am. J. Clin. Nutr.*, **74**, 3.
8. *Ueland P.M., Refsum H., Stabler S.P., Malinow M.R., Andersson A., Allen R.H.* (1993) *Clin. Chem.*, **39**(9), 1764-1779.
9. *Powers H.J., Moat S.J.* (2000) *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **3**(5), 391-397.
10. *Rafii M., Elango R., Courtney-Martin G., Darling P., House J.D., Fisher L., Paul B., Pencharz P.B.* (2009) *Journal of Chromatography B.*, **877**, 3282-3291.
11. *Tomaiuolo M., Vecchione G., Margaglione M., Pisanelli D., Grandone E.* (2009) *J. Chromatogr. B.*, **877**, 3292-3299.
12. *Rafii M., Elango R., Courtney-Martin G., House J.D., Fisher L., Paul B., Pencharz P.B.* (2007) *Analytical Biochemistry*, **371**, 71-81.
13. *Hanson N.Q., Eckfeldt J.H., Schwichtenberg K., Aras O., Tsai M.Y.* (2002) *Clin. Chem.*, **48**, 1539-1545.
14. *Peters F.T., Drummer O.H., Musshoff F.* (2007) *Forensic Sci. Int.*, **165**, 216-224.
15. *Liang H.R., Foltz R.L., Meng M., Bennett P.* (2003) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**(24), 2815-2821.
16. *Salazar J.F., Herbeth B., Siest G., Leroy P.* (1999) *Clin. Chem.*, **45**, 1539-1545.
17. *Burmeister G.E., Xiao M., Chakrabarty T., Cooke R., Selvin P.R.* (1999) *Anal. Biochem.*, **273**, 73-80.
18. *Piraud M., Vianey-Saban C., Petritis K., Elfakir C., Steghens J.P., Morla A., Bouchu D.* (2003) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**(12), 1297-1311.

-
19. *Kelley M.* (2011) *Bioanalysis*, **3**(9), 931–932.
 20. *Rocci M.L.Jr., Devanarayan V., Haughey D.B., Jardieu P.*(2007) *The AAPS Journal*, **9**(3), E336-E143.

Поступила: 30. 05. 2013.

DETERMINATION OF HOMOCYSTEINE BY LC-MS-MS WITH ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION

I.I. Miroshnichenko, A.I. Platova, T.P. Safarova, O.B. Yakovleva

Mental Health Research Center Russian Academy of Medical Science, Kashirskoe Sh., 34,
Moscow, 115522, Russia; tel.: 7-499-615-93-19; e-mail: igormir@psychiatry.ru.

Homocysteine (Hcy) is an intermediate of methionine metabolism. High plasma Hcy concentrations are an independent risk factor for stroke, peripheral vascular disease, deep venous thrombosis, coronary disease, and cognitive deficiency. Apparently, it is a great importance to measure Hcy levels in human blood. A new method for the quantification of Hcy by means of reversed-phase LC/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry has been developed. The MRM ion transition, m/z 136.0 \rightarrow 90.0 was used for Hcy quantification. The limit of detection was 0.4 μ M, quantification was performed from 1 μ M to 40 μ M with coefficient of determination of $R^2=0,997$. The method was applied successfully to Hcy determination in human blood.

Key words: homocysteine, liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), MRM, APCI.