

## Определение гомоцистеина методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией в микрообъемах биологических жидкостей

Наумов А.В., Дорошенко Е.М.

Гродненский государственный медицинский университет, ЦНИЛ, г. Гродно  
[av\\_naumov@mail.ru](mailto:av_naumov@mail.ru)

Нами был оптимизирован метод определения общего гомоцистеина (tHcy) в плазме крови с целью снижения количества материала, требующегося для анализа, и повышения воспроизводимости результатов при работе с малыми объемами, а также снижения себестоимости анализа.

Определение проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ после предколоночной дериватизации тиолов с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом (SBD-F), с изократическим элюированием [1]. Для восстановления тиолов из дисульфидов и высвобождения связанных с белками тиолов использовали трис-(карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР), при этом использовалась модификация процедуры, описанной в работе Gilfix В.М. [2].

К плазме анализируемого образца крови добавляли N-ацетилцистеин до конечной концентрации 100 мкМ в качестве внутреннего стандарта. Разделение осуществляли на колонке Диасорб 130 C<sub>16</sub>T, 3x250 мм, 7 мкм. Подвижная фаза: 0,1 М фосфатный буфер, 17 мМ уксусной кислоты, рН 3,65, 40 мг/л ЭДТА, 3 об.% ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы 0,6 мл/мин, температура колонки 30°C.

Пробы плазмы крови (50 мкл) смешивали с 5 мкл раствора ТСЕР (100 мг/мл), после чего инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Белки осаждали добавлением раствора ТХУ с последующим центрифугированием при 4°C 15 мин при 16000 g. В микропробирку на 200 мкл вносили 2 мкл 1,55 М NaOH, 12,5 мкл 0,125 М Na-боратного буфера (рН 9,5), содержащего 200 мг/л ЭДТА и 5 мкл раствора SBD-F (1 мг/мл) в таком же буфере и 10 мкл полученного безбелкового супернатанта. Инкубировали 1 час при 60°C. В хроматографическую систему вводили 10 мкл полученной реакционной смеси. Детектирование осуществлялось по флуоресценции, 379/510 нм.

Определения проводили на хроматографической системе HPLC Agilent 1200, содержащей 4-канальный градиентный насос, термостат колонок, автосамплер и детектор флуоресценции. Регистрация хроматограмм и их количественная обработка осуществлялись с помощью Agilent ChemStation B03.01.

Модификация метода позволяет в 10-20 раз снизить количество биологического материала для анализа, расход двух ключевых реактивов (ТСЕР и SBD-F), составляющих основную часть себестоимости определения, с сохранением основных аналитических характеристик метода (воспроизводимость, чувствительность, селективность).

1. J.B. Ubbink, W.J.H. Vermask, S. Bissbort // J. Chromatogr. 1991. V. 565. P. 441.
2. В.М. Gilfix, D.W. Blank, D.S. Rosenblatt // Clinical Chemistry. 1997. V. 43. P. 687.