

# Stanovení hladiny celkového homocysteinu v plazmě kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Humplíková S.<sup>1</sup>, Minář J.<sup>1,3</sup>, Kučerová M.<sup>1</sup>, Radina M.<sup>1</sup>, Valík D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Onkologické Centrum J. G. Mendela, Nový Jičín

<sup>2</sup>Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>3</sup>Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Chemie a technologie potravin, Zlín

## SOUHRN

*Cíl studie:* Zavedení nové techniky, kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií do rutinního stanovení hladiny celkového homocysteinu v plazmě.

*Materiál a metoda:* Metodou kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií byly analyzovány vzorky pacientů zasláné do laboratoří Onkologického Centra J. G. Mendela.

*Výsledky:* V pozitivním multiple reaction monitoring módu byl monitorován ion vzniklý rozpadem fragmentu  $m/z$  135,9 → 89,8 pro homocystein a  $m/z$  140 → 90 pro interní standard, homocystein- $d_4$ . Vyvinutá LC/MS/MS metoda má následující parametry: retenční čas homocysteinu i homocysteinu- $d_4$  1,4 minuty, mez stanovitelnosti 0,5  $\mu\text{mol/l}$ , mez detekce 0,1  $\mu\text{mol/l}$ . Opakovatelnost byla stanovena v sérii 20 měření analýzou 2 kontrolních vzorků, na hladině 8,3  $\mu\text{mol/l}$  byl variační koeficient 0,12 %, na hladině 18,2  $\mu\text{mol/l}$  byla hodnota variačního koeficientu 0,71 %.

*Závěr:* Byla zavedena vysoce selektivní, specifická a časově nenáročná technika vhodná pro rutinní stanovení hladiny celkového homocysteinu v plazmě.

*Klíčová slova:* homocystein, kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie.

## SUMMARY

**Humplíková S., Minář J., Kučerová M., Radina M., Valík D.: Determination of total homocysteine level in plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry**

*Objective:* To develop a new LC/MS/MS - based method for routine measurement of total homocysteine in plasma.

*Material and Method:* Patient samples from laboratories of Cancer Centre of J. G. Mendel were analyzed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

*Results:* Ion transitions  $m/z$  135.9 → 89.8 for homocysteine and  $m/z$  140 → 90 for internal standard – homocysteine- $d_4$  were monitored in the positive multiple reaction-monitoring mode. Our newly developed LC/MS/MS method has the following characteristics: retention time of homocysteine and homocysteine- $d_4$  is 1.4 min, limit of quantitation 0.5  $\mu\text{mol/l}$  and limit of detection 0.1  $\mu\text{mol/l}$ . Repeatability was determined by analyzing 2 plasma samples, the variation coefficients obtained were 0.12 % at concentration of 8.3  $\mu\text{mol/l}$  and 0.71 % at concentration of 18.2  $\mu\text{mol/l}$ .

*Conclusion:* The selective, specific and rapid method suitable for routine determination of total homocysteine in plasma was developed.

*Key words:* homocysteine, liquid chromatography, tandem mass spectrometry.

## Úvod

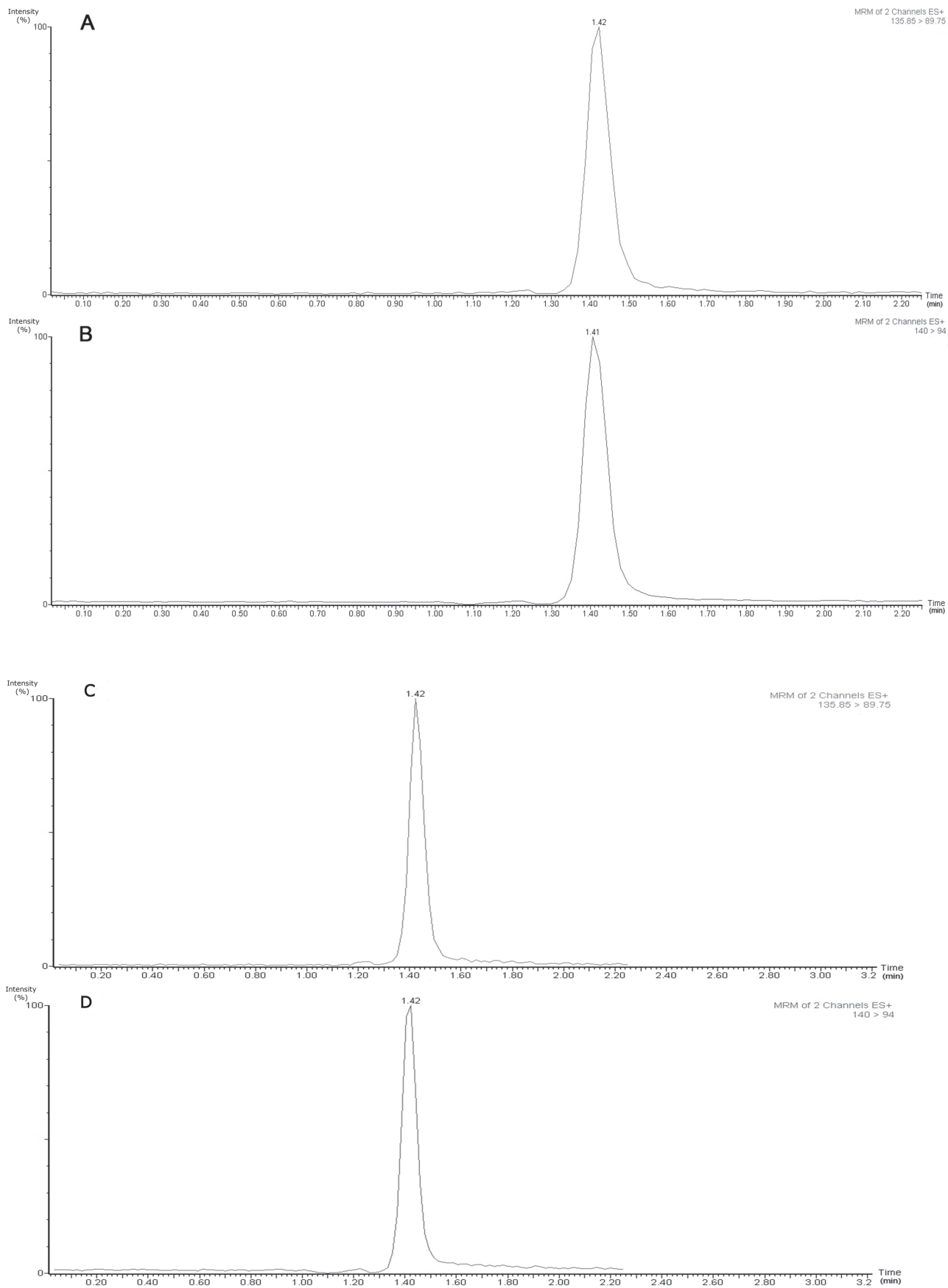
Homocystein je aminokyselina obsahující síru, která je zapojena do metabolismu cysteinu a methioninu [1, 2]. Metabolismu homocysteinu se fyziologicky účastní tři enzymy: methyilentetrahydrofolátreduktáza, methyilentetrahydrofolát-homocystein-methyltransferáza, cystathioninsyntáza; dále tři koenzymy, respektive vitaminy: methyltetrahydrofolát (odvozený od kyseliny listové), pyridoxalfosfát (odvozený od vitamínu B<sub>12</sub>) a methylcyanokobalamin (odvozený od vitamínu B<sub>6</sub>). K poruše metabolismu homocysteinu, která zapříčiňuje jeho hromadění v organismu, může teoreticky vést defekt v syntéze kteréhokoliv z uvedených tří enzymů nebo deficit některého z potřebných koenzymů. Zvýšená koncentrace homocysteinu v plazmě se nazývá hyperhomocysteinémie [3, 4, 5].

Homocystein je považován za významný nezávislý rizikový faktor rozvoje aterosklerózy [5, 6, 7, 8]. Sta-

novení celkového homocysteinu hraje důležitou roli v diagnostice a terapii nedostatku folátu a vitamínu B<sub>12</sub> [4, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

V organismu je asi 70 % homocysteinu vázáno na proteiny, zbývající část se vyskytuje ve volné formě. V průběhu přípravy vzorku před analýzou může docházet ke změnám v rovnováze mezi volným a vázaným homocysteinem, a proto se za informativní považuje stanovení hladiny celkového homocysteinu v organismu [5]. Vzhledem k příbuzné struktuře homocysteinu a cysteinu je kladen velký důraz na analytické metody, které musí být dostatečně specifické pro homocystein.

Cílem naší práce bylo zavedení selektivní a specifické techniky, která nahradí doposud používané metody, tj. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí nebo imunoanalýzu. Vhodnou technikou je kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS), která obchází nevýhody časově náročné derivatizace,



**Fig. 1.** LC/MS/MS chromatogram of homocysteine (A) and homocystine-d<sub>4</sub> (B) in calibration standard of homocysteine (14 μmol/l) and chromatogram of homocysteine (C) and homocystine-d<sub>4</sub> (D) in patient's plasma

kteřá je nezbytná při stanovení hladiny homocysteinu kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí, dovoluje analyzovat větší množství vzorků a má požadovanou analytickou specifitu a selektivitu [15, 16, 17, 18]. Ve srovnání s metodou, kterou publikoval Magera et al. [16] je v této práci použita jiná mobilní fáze za účelem dosažení vyšší analytické účinnosti metody a snížení objemu vzorků a činidel.

## Materiál a metody

### Materiál

DL-Homocysteine (Sigma), DL-Homocystine- $-3,3,3',3',4,4,4',4' - d_8$  (Cambridge Isotope Laboratories), redukční činidlo dithiothreitol (Sigma), precipitační činidlo 0,6 mol/l kyselina trichloroctová s  $K_3EDTA$  (Lachema), voda pro chromatografii (MERCK), koncentrovaná kyselina mravenčí (Lachema), methanol pro chromatografii (Chromservis), Plasma Calibration Standard for HPLC analysis of Homocysteine in Plasma (Chromsystems), Seronorm Human (Sero AS), Seronorm Human High (Sero AS).

### Příprava vzorku

Byly analyzovány vzorky pacientů zasláné do laboratoří Onkologického Centra J. G. Mendela. Plazma byla oddělena od formovaných elementů a zamražena na teplotu  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Před přípravou byly vzorky vytemperovány na laboratorní teplotu. Vlastní postup přípravy vzorku byl následující: smíchání 80  $\mu\text{l}$  plazmy s 20  $\mu\text{l}$  homocystinu- $-d_8$  ve vodě, který byl použit jako interní standard, s 20  $\mu\text{l}$  redukčního roztoku. Po inkubaci 5 minut při laboratorní teplotě bylo přidáno 80  $\mu\text{l}$  precipitačního roztoku a vzorek byl centrifugován při 4500 g. Supernatant byl přepipetován do skleněných vialek určených pro měření na kapalinovém chromatografu.

Kalibrační standardy byly zpracovány identickým způsobem jako vzorky pacientů. S použitím signálů standardů o koncentraci 0,14 a 22  $\mu\text{mol/l}$ , byla sestavena kalibrační závislost. Koncentrace vnitřního standardu v experimentu byla 50  $\mu\text{mol/l}$ .

### Metoda

Analýzy byly prováděny na kapalinovém chromatografu Alliance (Waters) s detekcí tandemovým hmotnostním spektrometrem Quattro Premier (Waters).

Separace probíhala na koloně Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  CN 100A (30 x 4,60 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), která byla vyhřívána na  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , nástřik vzorku na kolonu 20  $\mu\text{l}$ . Mobilní fází byl methanol a kyselina mravenčí ve vodě (1 ml kyseliny mravenčí v 1 litru vody), poměr methanolu a kyseliny mravenčí ve vodě byl 30 : 70, průtok mobilní fáze 0,4 ml/min. Byl sledován dceřinný ion vzniklý rozpadem fragmentu  $m/z$  135,9  $\rightarrow$  89,8 pro homocystein a  $m/z$  140  $\rightarrow$  90 pro interní standard. Retenční čas homocysteinu i interního standardu je 1,4 minuty. Optimalizace MS/MS systému byla provedena s 50  $\mu\text{mol/l}$  roztokem homocysteinu, který byl kontinuálně injektován do toku mobilní fáze. V první fázi optimalizace byl nalezen rodičovský ion a z něj vznikající fragment. Ve druhé fázi optimalizace v pozitivním multiple reaction

monitoring (MRM) módu byly experimentálně nalezeny optimální hodnoty jednotlivých parametrů MS/MS systému – napětí na vstupní kapiláře, kolizní energie, napětí na vstupním kuželu a na extraktoru.

K ionizaci byl použit elektrosprej, napětí na vstupní kapiláře bylo nastaveno na hodnotu 3,5 V, kolizní energie 12 kV, jako kolizní plyn byl použit argon, hodnota na vstupním kuželu byla 18 V, na extraktoru 3 V. Tyto podmínky byly experimentálně nalezeny jako nejvhodnější pro získání signálu o nejvyšší intenzitě pro ion  $m/z$  89,8. Data byla shromažďována a zpracována pomocí softwaru MassLynx v.4.0 SP4.

## Výsledky

Chromatogram získaný analýzou standardního roztoku homocysteinu o koncentraci 14  $\mu\text{mol/l}$  je zobrazen na obrázku 1 A. Tento chromatogram byl získán monitorováním rozpadu protonovaného molekulového iontu homocysteinu  $[M+H]^+$  ( $m/z$  135,9) na fragment  $m/z$  89,8. Chromatogram homocysteinu- $-d_8$  je zobrazen na obrázku 1 B. Ke vzorku přidávaný roztok interního standardu homocystinu- $-d_8$  je po přidání redukčního roztoku redukován a je sledován ion  $m/z$  140  $\rightarrow$  90 homocysteinu- $-d_4$ . Chromatogram získaný analýzou vzorku pacienta je na obrázku 1 C, D. Retenční čas homocysteinu i homocysteinu- $-d_4$  je 1,4 minut. Mez stanovitelnosti a mez detekce metody byly stanoveny měřením vzorku blanku, výpočtem byla získána hodnota meze stanovitelnosti 0,5  $\mu\text{mol/l}$  a mez detekce 0,1  $\mu\text{mol/l}$ . Analýzou 2 vzorků v sérii 20 měření byla stanovena opakovatelnost měření, pro hladinu 8,3  $\mu\text{mol/l}$  byl variační koeficient 0,12 % a pro hladinu 18,2  $\mu\text{mol/l}$  byla jeho hodnota 0,71 %. Reprodukovatelnost byla stanovena statistickým zpracováním dat získaných analýzou kontrolních materiálů po dobu 10 dnů; na hladině 9,4  $\mu\text{mol/l}$  byl variační koeficient 2,8 %, na hladině 23,9  $\mu\text{mol/l}$  5,13 %. Lineární interval metody je 0,5–100  $\mu\text{mol/l}$ . Výtěžnost byla stanovena měřením kontrolních materiálů za podmínek opakovatelnosti; pro hladinu 9,4  $\mu\text{mol/l}$  je výtěžnost 103 %, pro hladinu 23,9  $\mu\text{mol/l}$  98,9 %.

## Závěr

Byla vyvinuta nová technika vhodná pro stanovení hladiny celkového homocysteinu v plazmě na bázi kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. V porovnání s publikovanou metodou [16] je v této práci použita jiná mobilní fáze, čímž byla zvýšena analytická citlivost stanovení a následně snížen objem plazmy použité pro měření. Výhodou našeho postupu je i rychlost a opakovatelnost stanovení.

## Literatura

1. Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. et al. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier Saunders : St. Louis, Missouri 1999, p. 967, 1112.

2. Gellekink, H., Oppenraaij-Emmerzaal, D., Rooij, A., Struys, E. A., Heijer, M., Blom, H. J. Stable-Isotope Dilution Liquid Chromatography-Electrospray Injection Tandem Mass Spectrometry Method for Fast, Selective Measurement of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine in Plasma. *Clinical Chemistry*, 2005, 51, p. 1487–1492.
3. Refsum, H., Grindflek, A. W., Ueland, P. M. et al. Screening for Serum Total Homocysteine in Newborn Children. *Clinical Chemistry*, 2004, 50, 10, p. 1769–1784.
4. Refsum, H., Smith, A. D., Ueland, P. M. et al. Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion. *Clinical Chemistry*, 2004, 50, 1, p. 3–32.
5. Jacobsen, D. W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry*, 1998, 44, 8, p. 1833–1843.
6. El-Khairi, L., Vollset, S. E., Refsum, H., Ueland, P. M. Plasma Total Cysteine, Mortality, and Cardiovascular Disease Hospitalizations: The Hordaland Homocysteine Study. *Clinical Chemistry*, 2003, 49, 6, 895–900.
7. Cavalca, V., Cighetti, G., Bamonti, F. et al. Oxidative Stress and Homocysteine in Coronary Artery Disease. *Clinical Chemistry*, 2001, 47, 5, p. 887–892.
8. Welch, G. N., Loscalzo, J. Homocysteine and Atherothrombosis. *The New England Journal of Medicine*, 1998, 338, p. 1042–1050.
9. Valik, D., Radina, M., Sterba, J., Vojtesek, B. Homocysteine: exploring its potential as a pharmacodynamic biomarker of antifolate chemotherapy. *Pharmacogenomics*, 2004, 5, 8, p. 1151–1162.
10. Midittun, O., Hustad, S., Solheim, E., Schneede, J., Ueland, P. M. Multianalyte Quantification of Vitamin B<sub>6</sub> and B<sub>2</sub> Species in the Nanomolar Range in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 2005, 51, 7, p. 1206–1216.
11. Miller, J. W., Garrod, M. G., Rockwood, A. L. et al. Measurement of Total Vitamin B<sub>12</sub> and holotranscobalamin, Singly and in Combination, in Screening for Metabolic Vitamin B<sub>12</sub> Deficiency. *Clinical Chemistry*, 2006, 52, 2.
12. Jacques, P. F., Selhub, J., Bostom, A. G., Wilson, P. W. F., Rosenberg, I. H. The Effect of Folic Acid Fortification on Plasma Folate and Total Homocysteine Concentrations. *The New England Journal of Medicine*, 1999, 340, p. 1449–1454.
13. Klee, G. G. Cobalamin and Folate Evaluation: Measurement of Methylmalonic Acid and homocysteine vs Vitamin B<sub>12</sub> and Folate. *Clinical Chemistry*, 2000, 46, 8, p. 1277–1283.
14. Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. et al. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier Saunders : St. Louis, Missouri 1999, p. 1100–1105.
15. Racek J. et al. *Klinická biochemie*. Praha : Nakladatelství Karolinum 1999, s.170–171.
16. Magera, M. J., Lacey, J. M., Casetta, B., Rinaldo, P. Method for the Determination of Total Homocysteine in Plasma and Urine by Stable Isotope Dilution and Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 1999, 45, p. 1517–1522.
17. Gempel, K., Gerbitz, K.-D., Casetta, B., Bauer, M. F. Rapid Determination of Total Homocysteine in Blood Spots by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 2000, 46, p. 122–123.
18. Gillingwater, S., Cooper, D., Morris, M., Keevil, B., McCann, S. The Analysis of Total Homocysteine in Plasma Using a Quattro Micro Tandem Mass Spectrometer. *Application Note, Waters*, 2003.

Do redakce došlo 27. 6. 2006.

Adresa pro korespondenci:  
Mgr. Soňa Humplíková  
Onkologické Centrum J. G. Mendela  
Máchova 30  
741 01 Nový Jičín  
e-mail: sona.humplikova@pr-lab.cz

---

## Tematický plán kurzů Katedry klinické biochemie IPVZ pro období září – prosinec 2007 (část 2)

---

### 211005 Specializační kurz v klinické biochemii – 6. část

Určeno pro biochemiky-analyticky ve specializační přípravě, případně lékaře v přípravě k atestaci.

*Program:* Úvod do dědičnosti, struktura nukleových kyselin, replikace DNA, transkripce a translace, struktura genomu, úvod do metodologie molekulární biologie, PCR, sekvenování, Southernova analýza. Struktura a funkce imunitního systému, reakce antigen-protilátka, komplement, autoimunita, průtoková cytometrie, HLA systém, imunogenetika.

*Místo konání:* Praha 4, Budějovická 15

**Termín: 12.–16. 11. 2007**

*Předpokládaná cena:* 1500,- Kč

*Vedoucí kurzu:* doc. RNDr. P. Štern, CSc. (e-mail: petr.stern@vfn.cz)

### 211006 Specializační kurz v klinické biochemii – 8. lékařská část

Určeno pro lékaře před atestací z klinické biochemie.

*Program:* Metodologie vědecké práce. Novinky ve vyšetřování plazmatických proteinů. Validace analytické metody. Molekulární cytogenetika. DNA analýzy. Kontrola kvality v DNA laboratoři, kauzistiky z DNA analýzy. Játra a žlučové cesty. Klinická biochemie trávicího traktu a exokrinní funkce pankreatu. Novinky v analytických postupech. Novinky v klinicko-biochemické diagnostice.

*Místo konání:* Praha 4, Budějovická 15

**Termín: 3.–7. 12. 2007**

*Předpokládaná cena:* 1500,- Kč

*Vedoucí kurzu:* prof. MUDr. A. Jabor, CSc.

(e-mail: antonin.jabor@ikem.cz)