

اندازه گیری هوموسیستئین تام پلاسما به روش کروماتوگرافی معکوس با کارائی بالا (RP-HPLC) بدون استفاده از استاندارد داخلی

فرامرز دارابی^{۱*} دکتر بمانعلی جلالی^۲ دکتر منصور رفیعی^۳ دکتر علی بابائی^۴ سیدمجید مهدوی^۵

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی ۲- استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی یزد ۳- دانشیار گروه داخلی دانشگاه علوم پزشکی یزد

۴- استادیار گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی یزد ۵- کارشناس ارشد شیمی

سابقه و هدف: هوموسیستئین اسیدآمینه‌ای با گروه آزاد تیولی است و به عنوان یک واسطه طی متابولیسم متیونین به سیستئین تشکیل می‌گردد. اندازه‌گیری هوموسیستئین تام پلاسما ممکن است در شرایط کلینیکی مختلفی از قبیل هوموسیستئین اوری، آترواسکلروز، ترومبوفیلی و کمبود ویتامینهای B₁₂ و اسیدفولیک مفید و ارزشمند باشد. هدف از این مطالعه بررسی قابلیت‌های روش HPLC فاز معکوس با دتکتور فلورسانس جهت سنجش هوموسیستئین بوده است. **مواد و روشها:** هوموسیستئین تام پلاسما بوسیله روش کروماتوگرافی با کارائی بالا (HPLC) با دتکتور فلورسانس بعد از احیاء انواع هوموسیستئین پلاسما بوسیله تریس (۲- کاربوکسی اتیل) فسفین (TCEP) و مشتق سازی با آمونیوم ۷- فلورو بنزو ۲- اکسا ۱ و ۳- دیازول ۴- سولفونات (SBD-F) مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: حساسیت روش HPLC جهت سنجش هوموسیستئین در حد $0.2 \mu\text{mol/L}$ دقت روش (ضریب تغییرات CV) در یک مرحله بین ۲/۶۷ تا ۴/۵۶ درصد و در بین مراحل و روزهای مختلف ۵/۴۳ تا ۸/۱۷ درصد و صحت (بازایی) روش بین ۹۳ تا ۱۰۲/۴ درصد بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده از این مطالعه نشانگر آن است که روش HPLC با دتکتور فلورسانس برای سنجش هوموسیستئین روشی حساس (حد پایین $0.2 \mu\text{mol/L}$) و دقیق (ضریب تغییرات بین ۲/۶۷ تا ۸/۱۷ درصد) است و دارای صحت مناسبی (بازایی بین ۹۳ تا ۱۰۲/۴ درصد) می‌باشد و لذا روشی قابل اطمینان بخصوص در کارهای تحقیقاتی است. با توجه به آنکه هوموسیستئین یک عامل خطرزا برای بیماری عروق کرونر می‌باشد، راهاندازی روش فوق از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد.

واژه های کلیدی: هوموسیستئین، آترواسکلروز، HPLC، پلاسما.

مقدمه

هوموسیستئین نوعی اسیدآمینه است که به عنوان یک ترکیب واسطه در متابولیسم اسیدهای آمینه گوگرددار شرکت دارد (۱). ارتباط بین غلظت پلاسمائی هوموسیستئین و بیماری عروق کرونر اولین بار در سال ۱۹۶۰ میلادی مورد توجه قرار گرفت (۲). در سالهای اخیر مطالعات اپیدمیولوژیکی زیادی در ارتباط با هوموسیستئین تام پلاسما و بروز بیماریهای عروق کرونر صورت گرفته است، که اغلب رابطه

مستقیمی بین افزایش غلظت این ترکیب در پلاسما و بروز بیماریهای قلبی- عروقی را نشان داده‌اند (۳-۵). امروزه غلظت بالای هوموسیستئین در پلاسما (بیشتر از ۱۵ میکرومول بر لیتر)، به عنوان یک عامل خطرزای مهم و مستقل برای بیماریهای قلبی- عروقی مطرح است (۳-۵). روش HPLC با دتکتور فلورسانس توسط محققین مختلف برای سنجش هوموسیستئین بکار رفته است (۶-۹).

ذخیره، محلول کار با غلظتهای مختلف ($\mu\text{mol/L}$ ۹۶، ۴۸، ۲۴، ۱۲، ۶) تهیه شد. محلولها تا زمان استفاده در 4°C نگهداری شد.

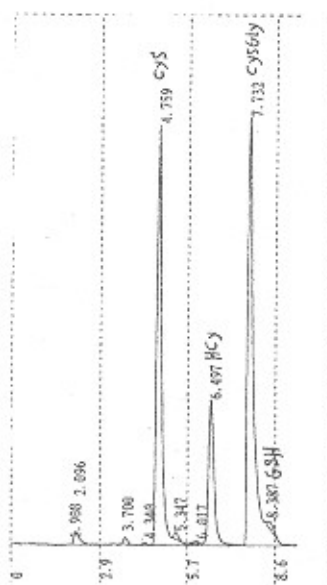
سنجش هوموسیستئین تام پلاسما مطابق روش Gilfix و همکاران (۱۳) با تغییرات اندک به صورت زیر انجام شد. ابتدا $100\mu\text{L}$ از محلول TCEP، 100 گرم بر لیتر در آب مقطر را به $50\mu\text{L}$ پلاسما یا محلول استاندارد و $50\mu\text{L}$ بافر فسفات ($\text{pH}=7.5$) اضافه کردیم و پس از مخلوط کردن اجازه دادیم تا 30 دقیقه در دمای اتاق بماند. این کار باعث می شود که عمل احیاء صورت گیرد (باندهای دی سولفیدی احیاء شوند و هوموسیستئین از پروتئین آزاد شود). سپس $90\mu\text{L}$ از محلول تری کلرواستیک 100 گرم بر لیتر حاوی 1m mol/L EDTA را به آن اضافه نمودیم، بعد از سانتریفیوژ کردن نمونه ها به مدت 10 دقیقه در 13000g ، $50\mu\text{L}$ از محلول روشی آن را به یک لوله حاوی $10\mu\text{L}$ محلول $1/55\text{ mol/L}$ از NaOH ، $125\mu\text{L}$ بافر پورات 0.125mol/L حاوی 4mmol/L EDTA ($\text{pH}=9.5$) و $50\mu\text{L}$ محلول 1g/L از محلول SBD-F حاصل در بافر پورات اضافه کردیم. بعد از مخلوط کردن آنها، محلول حاصل را به مدت 60 دقیقه در 60°C انکوبه کردیم تا عمل مشتق سازی صورت گیرد. سپس اجازه دادیم تا در دمای اتاق سرد شود. هر بار $10\mu\text{L}$ از هر نمونه به ستون تزریق شد. در این مطالعه از دستگاه HPLC، ساخت شرکت Shimadzu مدل SPD-6AV که با یک پمپ مدل LC-6A و یک سیستم کنترل کننده حلال و فاز متحرک با درجه کاهش فشار مدل FCV-3AL و دتکتور فلورسانس (UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC) استفاده شد. دستگاه فوق دارای یک سیستم تزریق کننده از نوع دریچه و حلقه (LOOP VALVE) است که دو حالت بارگیری و تزریق دارد. در حالت بارگیری تمام حجم حلقه از نمونه پر می شود و در حالت تزریق، با انجام کار مکانیکی (چرخش حلقه) نمونه به ستون تزریق می شود. آمینو تیولها و از جمله هوموسیستئین در یک ستون (C:18) ODS-2 به ابعاد $100\times 6\text{mm}$ جداسازی شدند. بافر شوینده شامل بافر استات 0.1mol/L با $\text{pH}=5/5$ حاوی 30mL/L متانل بود. محلول فوق به عنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار گرفت. شستن ستون کروماتوگرافی به روش ایزوکراتیک و با سرعت 0.7mL/min

اما در ایران کمتر مورد توجه بوده است. غلظت هوموسیستئین در پلاسما تحت تأثیر عوامل ژنتیکی، شیوه زندگی، رژیم غذایی و بویژه میزان ویتامینهای B_6 ، B_{12} و اسیدفولیک قرار می گیرد (۱۰). در مناطق مختلف کشور ایران بیماریهای قلبی- عروقی شیوع بالایی دارد (۱۱). شیوع بیماریهای فوق بعضاً با عوامل خطر ساز سنتی نظیر لیپیدها قابل توجه نیست، و دخالت عوامل خطر ساز جدید از جمله هوموسیستئین دور از انتظار نمی باشد. مناطق مختلف ایران از نظر تنوع نژادی، شیوه زندگی، رژیمها و عادات غذایی، با یکدیگر و همچنین با سایر نقاط جهان متفاوت است. اگرچه مطالعات زیادی در ارتباط با عوامل خطر ساز سنتی در نواحی مختلف کشور صورت گرفته است، ولی عوامل خطر ساز جدید از جمله هوموسیستئین کمتر مورد توجه بوده، و این امکان وجود دارد که یکی از دلایل شیوع بالای بیماریهای قلبی- عروقی، افزایش غلظت پلاسمائی این ترکیب در افراد جامعه باشد. شاید یکی از دلایلی که هوموسیستئین کمتر مورد توجه قرار گرفته است، عدم دسترسی به یک روش مطمئن برای اندازه گیری آن باشد. سنجش پلاسمائی این ترکیب به روشهای ایمونوشیمیائی، و کروماتوگرافی با کرائی بالا (HPLC) صورت می گیرد (۱۲، ۱۳). اما روش HPLC دقیقتر بوده و در کارهای تحقیقاتی اهمیت بیشتری دارد. هدف اصلی از انجام این مطالعه، راه اندازی و ارزیابی قابلیت های یک نوع روش HPLC برای تعیین مقدار هوموسیستئین تام در پلاسما بوده است.

مواد و روشها

D و L-هوموسیستئین، تریس (۲- کاربوکسی اتیل) فسفین (TCEP)، آمونیوم ۷- فلورو بنزو ۲- اکسا- ۱ و ۳- دیازول ۴- سولفونات (SBD-F) و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) از شرکت سیگما و متانل، اسیدبوریک و سایر مواد شیمیائی از نوع آنالیتیکال از شرکت مرک خریداری شد. ستون آنالیتیکال (2- ODS $150\times 6\text{mm}$) از شرکت شیمادسو تهیه گردید. برای تهیه محلولها از آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شد. محلول استاندارد ذخیره از D و L-هوموسیستئین ($960\mu\text{mol/L}$) بوسیله حل کردن 0.125 گرم از استاندارد هوموسیستئین (۹۵٪) در 100mL بافر پورات (0.125mol/L) تهیه گردید. با رقیق کردن محلول

هوموسیستین بعد از ۶/۳۲ دقیقه (Retention Time) ظاهر می‌شود. در شکل (۱) کروماتوگرام هوموسیستین در یک فرد با غلظت طبیعی هوموسیستین و در شکل (۲) کروماتوگرام هوموسیستین در یک فرد با غلظت زیاد هوموسیستین نشان داده شده است.

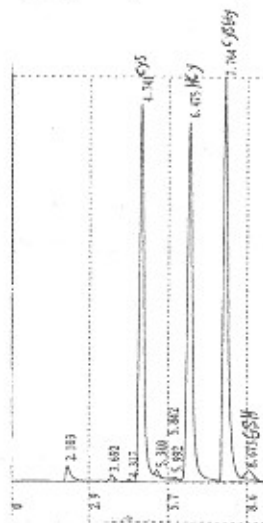


شکل ۱. کروماتوگرام یک نمونه پلاسما با غلظت طبیعی

هوموسیستین ($10 \mu\text{mol/L}$)

cys= cysteine, Hcy=homocysteine, Cys Gly=

cysteinyl glycine, GSH = glutathione



شکل ۲. کروماتوگرام یک نمونه پلاسما با غلظت زیاد

هوموسیستین ($35 \mu\text{mol/L}$)

cys= cysteine, Hcy=homocysteine, Cys Gly=

cysteinyl glycine, GSH = glutathione

انجام گرفت. طول موج تحریکی 385nm و طول موج نشری 515nm برای سنجش با دکتور فلورسانس بود. برای محاسبه غلظت هوموسیستین ما ابتدا غلظت‌های مشخصی (شش غلظت $3, 6, 12, 24, 48, 96 \mu\text{mol/L}$) از استاندارد هوموسیستین را بوسیله دستگاه مورد سنجش قرار دادیم و سطح زیر منحنی را از دستگاه گرفتیم و بوسیله آن یک منحنی استاندارد رسم کردیم، سپس هوموسیستین نمونه‌ها را مورد سنجش قرار دادیم و سطح زیر نمودار را از دستگاه HPLC گرفتیم و در روی نمودار غلظت مربوطه را بدست آوردیم. برای تعیین ضریب تغییرات (CV) در یک مرحله ۲۰ بار سنجش آنالیت مورد نظر (هوموسیستین) در یک روز انجام شد و پس از تعیین میانگین و انحراف معیار جوابها، از فرمول ($100 \times \text{میانگین} / \text{انحراف معیار} = \text{CV}$) ضریب تغییرات محاسبه گردید. برای تعیین ضریب تغییرات (CV) در بین مراحل ۲۰ بار سنجش آنالیت مورد نظر (هوموسیستین) در ۲۰ روز مختلف انجام شد و پس از تعیین میانگین و انحراف معیار جوابها، از فرمول مذکور ضریب تغییرات محاسبه گردید.

در بررسی صحت روش (بازیابی روش) به نمونه‌هایی از پلاسما که مقدار هوموسیستین آنها تعیین شده بود ($12 \mu\text{mol/L}$)، مقدار مشخصی هوموسیستین خالص اضافه شد و سپس مقدار هوموسیستین آنها به روش مورد نظر (روش HPLC) مورد سنجش قرار گرفت و از فرمول زیر درصد بازیابی روش محاسبه گردید ($100 \times \text{غلظت محاسبه شده} / \text{غلظت سنجش شده} = \text{R\%}$).

برای تعیین حد تشخیص روش، غلظت‌های مختلفی از استاندارد هوموسیستین (از صفر تا 200 میکرومول بر لیتر) تهیه شد و سپس با روش HPLC مورد سنجش قرار گرفتند. کمترین مقداری که با روش فوق قابل اندازه‌گیری بود به عنوان حد تشخیص روش در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تحت شرایط کروماتوگرافی که توضیح داده شده، زمان جداسازی برای تمام تیولها خیلی پایدار بود. در $\text{pH}=5/5$ ، هوموسیستین و سیستین به صورت واضح از همدیگر و از سیستینیل گلايسین و گلویتایون جدا شدند. پیک مربوط به

از حوادث مربوط به بیماریهای کرونر قلب را ایجاد می کنند (۱۹-۱۷). پیشنهاد شده است تا میزان هوموسیستین تام پلاسما همراه با سایر عوامل خطرزای بیماریهای قلبی- عروقی در اشخاص مبتلا به آترواسکلروز مورد سنجش قرار گیرد (۵-۳).

ما در این مطالعه روش Gilfix و همکاران را با تغییراتی بکار بردیم، از جمله اینکه ما از استاندارد داخلی استفاده نکردیم. در مطالعه ما حساسیت، دقت و صحت روش مشابه مطالعاتی که از استاندارد داخلی استفاده کرده بودند (۲۰ و ۱۹) بدست آمد و بنابراین استفاده از استاندارد داخلی تأثیر چندانی در دقت و صحت روش ندارد. در مطالعه Accini و همکاران که سنجش هوموسیستین با استفاده از استاندارد داخلی و بدون استفاده از استاندارد داخلی انجام و مورد مقایسه قرار گرفته است نتایجی مشابه نتایج مطالعه ما بدست آمده است، این محققین استفاده از استاندارد داخلی در افزایش دقت و بازیابی روش را بی تأثیر دانسته اند (۲۱). از طرف دیگر Khim kuo و همکاران تأثیر استاندارد داخلی بر صحت و دقت روش را بسیار محسوس دانسته و استفاده از آنرا توصیه نموده اند (۲۲). به هر حال نظرات ضد و نقیضی در این رابطه وجود دارد، اما آنچه مهم است این است که در مطالعه ما دقت، صحت و حساسیت روش در حد بسیار خوبی بدست آمد و لذا نتیجه گیری ما آن است که روش فوق روشی قابل اطمینان است و بکارگیری این روش برای سنجش هوموسیستین بخصوص در کارهای تحقیقاتی توصیه می گردد.

تقدیر و تشکر

از پرسنل مرکز قلب بیمارستان افشار یزد و مسئولین آزمایشگاه تخصصی دانشکده پزشکی، که ما را در این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. Ann Clin Biochem 2000; 37: 627-48.
2. Mc Cully K. Pioneer of the homocysteine theory. Lancet 1998; 352: 9137-8.
3. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocysteine-induced arteriosclerosis: the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. J Clin Invest 1976; 58: 731-41.

منحنی مربوط به نمونه های استاندارد که در PBS آماده شده بودند تا غلظت بیشتر از $200 \mu\text{mol/L}$ خطی بودند ($r=0.999$) و حد پائین سنجش برای هوموسیستین تام پلاسما $0.2 \mu\text{mol/L}$ بود. ضریب تغییرات برای سنجشهای در یک روز (Intra assay CV) بدون استفاده از استاندارد داخلی برای پلاسمای با غلظت کم هوموسیستین ($7 \mu\text{mol/L}$) برابر 4.56% ($n=10$) و برای پلاسمای با غلظت زیاد هوموسیستین ($24 \mu\text{mol/L}$) برابر 2.67% بود. ضریب تغییرات برای سنجشهای در بین روزها (Inter assay CV) بدون استفاده از استاندارد داخلی برای پلاسمای با غلظت کم هوموسیستین ($6 \mu\text{mol/L}$) برابر 5.43% ($n=10$) و برای پلاسمای با غلظت زیاد هوموسیستین ($24 \mu\text{mol/L}$) برابر 5.6% بود. درصد بازیابی روش HPLC برای سنجش هوموسیستین در سه نمونه پلاسما ($24, 14/5, 12 \mu\text{mol/L}$) بعد از افزودن هوموسیستین خالص $94/93.3$ و $103/4$ بدست آمد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که روش HPLC با دکتور فلورسانس، روشی حساس (حد تعیین $0.2 \mu\text{mol/L}$)، دقیق (ضریب تغییرات بین $2/67$ و $8/17\%$) و با صحت بالا (بازیابی روش بین 93 تا $103/4$) برای سنجش هوموسیستین تام پلاسما می باشد.

اهمیت سنجش هوموسیستین در مطالعات مختلف به خوبی روشن شده است. مطالعات مورد- شاهد و آینده نگر نشان می دهند که افزایش غلظت هوموسیستین تام پلاسما یک عامل خطرزای مهم و قوی برای آترواسکلروز و بیماریهای قلبی- عروقی است (۱۶-۱۴). به خوبی مشخص شده است که عوامل خطرزای مهم (از قبیل افزایش غلظت کلسترول، فشار خون، مصرف سیگار) تنها 50%

4. Gibson JB, Carson NAJ, Neill DW. Pathological findings in homocystinuria. *J Clin Pathol* 1964; 17: 427-37.
5. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1989; 79: 1180-8.
6. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; 422: 43- 52.
7. Ubbink JB, Hayward Vermaak WJ, Bissbort S. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *J Chromatogr B* 1995; 664: 421-5.
8. Accini R, Campulu J, Bartesaghi S, et al. High performance liquid chromatographic determination of total plasma homocysteine with or without internal standards. *J Chromatogr A* 1998; 828 (1-2): 397-400.
9. Williams RH, Maggiore JA, Reynolds RD, Helgason CM. Novel Approach for the determination of the redox status of homocysteine and other aminothiols in plasma from healthy subjects and patients with ischemic stroke. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 1031-9.
10. Verhoef P, Kok FJ, Kruyssen DA, et al. Plasma total homocysteine, B vitamins, and risk of coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*; 17: 989-95.
11. Sarraf Zadegan N, Sayed tabatabaei FA, bashardoost N, et al. The prevalence coronary artery disease in an urban population in Isfahan, Iran *Acta Cardiol* 1999; 54: 257-63.
12. Suormala T, Gamse G, Fowler B. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) assay in the forward direction: Residual activity in MTHFR deficiency. *Clinical Chemistry* 2002; 48: 835-43.
13. Gilfix BM, Blank DW, Rosenblatt DS. Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. *Clin Chem* 1997; 43: 687-8.
14. Clark R, Robinson K, Vaughten E, Cahalanc S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1149-55.
15. Arnoson E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *INT J Epidemiol* 1995; 24: 704-9.
16. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk factor of myocardial infarction in united states physicians. *JAMA* 1992; 268: 877-81.
17. Wilcken DEL, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57: 1079-82.
18. Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor occlusive vascular disease. *Anna Rev Nutr* 1992; 12: 279-98.
19. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980; 18: 113-21.

20. Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. Eur J Chem 1992; 29: 549-54.
21. Accini R, Campulu J, Bartesaghi S, et al. High performance liquid chromatographic determination of total plasma homocysteine with or without internal standards. J Chromatoger A 1998; 828 (1-2): 397-400.
22. Kuo K, Still R, Cale S, et al. Standardrization (External and internal) of HPLC assay for plasma homocysteine. Clinical Chemistry 1997; 43: 1653-5.