

**DETERMINATION OF METHIONINE, CYSTEINE AND
HOMOCYSTEINE IN PLASMA BY GAS CHROMATOGRAPHY**

KITTIPORN LAOSANGTHUM

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

**ISBN 974-04-4593-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การวิเคราะห์ปริมาณเมไทโอนีน ซิสเทอีน และ โฮโมซิสเทอีน ในพลาสมาโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (DETERMINATION OF METHIONINE, CYSTEINE AND HOMOCYSTEINE IN PLASMA BY GAS CHROMATOGRAPHY)

กิตติพร เหล่าแสงธรรม 4336714 SCAI/M

วท.ม. (เคมีวิเคราะห์และเคมีอินทรีย์ประยุกต์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประพิน วิไลรัตน์, Ph.D. (Physical Chemistry), ยุวดี เชี่ยววัฒนา, Ph.D. (Analytical Chemistry), ดวงใจ นาคะปรีชา, Ph.D. (Analytical Chemistry)

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาและพัฒนาเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี โดยใช้เฟลมไออินเซชันดีเทคเตอร์เป็นตัวตรวจวัดสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ methionine cysteine และ homocysteine ในพลาสมา โดยการรีดิวซ์พันธะซัลเฟอร์-ซัลเฟอร์ ในตัวอย่างพลาสมาด้วย dithiothreitol (DTT) เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบไธออลอิสระ (free thiols) แล้วเติมกรดเกลือ (hydrochloric acid) เพื่อป้องกันการเกิด autoxidation ของหมู่ไธออล จากนั้นจึงทำการแยกโปรตีนออกจากกรดอะมิโนที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยวิธี การกรองผ่านเมมเบรน (ultrafiltration) ทำการเตรียมอนุพันธ์ของกรดอะมิโน โดยให้กรดอะมิโนทำปฏิกิริยากับ N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide (MSTFA) เกิดเป็นอนุพันธ์ชนิด N(O,S)-trimethylsilyl นอกจากนี้ได้ใช้ norleucine เป็น internal standard

ข้อดีของวิธีนี้คือไม่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก และไม่ต้องใช้ตัวทำลายอินทรีย์ในการสกัดอนุพันธ์ของกรดอะมิโนก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID ในการแยกกรดอะมิโนใช้คอลัมน์ชนิด HP-5

จากการทดลองพบว่ากราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 15-73 μM สำหรับ Met, 154-770 μM สำหรับ Cys และ 6-107 μM สำหรับ Hcy ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ มีค่าเท่ากับ 0.7 μM , 1.9 μM และ 1.9 μM สำหรับ Met, Cys และ Hcy ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 97-100 สำหรับ Met, 109-110 สำหรับ Cys และ 90-103 สำหรับ Hcy

วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ ได้นำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Met, Cys และ Hcy ในพลาสมาจำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าวิธีนี้มีความไว ความจำเพาะ และเหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา

83 หน้า. ISBN 974-04-4593-4

DETERMINATION OF METHIONINE, CYSTEINE AND HOMOCYSTEINE IN PLASMA BY GAS CHROMATOGRAPHY**KITTIPORN LAOSANGTHUM 4336714 SCAI/M****M.Sc. (APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY)****THESIS ADVISOR: PRAPIN WILAIRAT, Ph.D. (PHYSICAL CHEMISTRY), JUWADEE SHIOWATANA, Ph.D. (ANALYTICAL CHEMISTRY), DUANGJAI NACAPRICHA, Ph.D. (ANALYTICAL CHEMISTRY)****ABSTRACT**

In this study, an analytical method for determination of methionine (Met) Cysteine (Cys) and homocysteine (Hcy) in plasma samples by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) was developed. Plasma was initially treated with dithiothreitol (DTT) to reduce the disulfide bonds. Liberated thiols were protected against autoxidation with dilute hydrochloric acid and protein removal was achieved by ultrafiltration through Microcon-30 membrane. Amino acids in ultrafiltrate were derivatized with N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide (MSTFA) to yield N(O,S)-trimethylsilyl derivatives. Norleucine was used as an internal standard. The advantage of this method is that no tedious clean-up step is required during sample preparation and no extraction step is required for GC analysis. The trimethylsilyl derivative of amino acid was directly measured by GC-FID using HP-5 column. The calibration curves were linear over the range of 15-73 μM for Met, 154-770 μM for Cys and 6-107 μM for Hcy. The detection limits were 0.7 μM , 1.9 μM and 1.9 μM for Met, Cys and Hcy respectively. The percent recoveries of Met Cys and Hcy added to plasma samples were 97-100% for Met, 109-110% for Cys and 90-103% for Hcy.

The method was applied for the determination of Met, Cys and Hcy in human plasma samples from twenty healthy adults.

**KEY WORDS: METHIONINE/CYSTEINE/HOMOCYSTEINE/DITHIOTHREITOL/
N-METHYL-N-TRIMETHYLSILY TRIFLUOROACETAMIDE/GC**

83 P. ISBN 974-04-4593-4