

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич

2015 г.

Регистрационный № 132-1114



**МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ
ЖЕЛУДОЧКОВЫХ НАРУШЕНИЙ РИТМА У ПАЦИЕНТОВ С ИБС
И ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА
СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

к.б.н., доцент Е.М.Дорошенко, д.м.н., профессор В.А.Снежицкий,

д.м.н., профессор В.М.Пырочкин, к.м.н. М.С.Дешко, к.м.н. Е.М.Сурмач,

к.б.н. В.Ю.Смирнов, к.м.н., доцент А.В.Наумов

Гродно, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

07.05.2015

Регистрационный № 132-1114

**МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ЖЕЛУДОЧКОВЫХ НАРУШЕНИЙ
РИТМА У ПАЦИЕНТОВ С ИБС И ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ОБМЕНА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гродненский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. биол. наук, доц. Е.М. Дорошенко, д-р мед. наук, проф.
В.А. Снежицкий, д-р мед. наук, проф. В.М. Пырочкин, канд. мед. наук М.С. Дешко,
канд. мед. наук Е.М. Сурмач, канд. биол. наук В.Ю. Смирнов, канд. мед. наук, доц.
А.В. Наумов

Гродно 2014

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) разработана с целью улучшения результатов лечения пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) с проявлениями хронической сердечной недостаточности (ХСН). Поставленная цель достигается благодаря оценке риска развития желудочковых нарушений ритма (ЖНР) по показателям фонда свободных аминокислот, в т. ч. уровня общего гомоцистеина, в плазме крови.

В инструкции изложены методы определения показателей аминокислотного фонда, триптофана и его производных и серосодержащих соединений, имеющих свободную сульфгидрильную группу, соответствующие методы пробоподготовки, метод оценки и интерпретации результатов.

Инструкция предназначена для врачей-кардиологов стационарных лечебных учреждений, а также специалистов клиничко-лабораторной службы биохимического профиля.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Высокоэффективный жидкостный хроматограф с 4-канальной градиентной системой подачи растворителей и детектором флуоресценции.

2. Лабораторная центрифуга для микропробирок Эппендорфа 1,6 мл с охлаждением, развивающая не менее 13000 g.

3. Термостатируемая водяная баня до 60°C.

4. Лабораторное оборудование: весы аналитические с точностью взвешивания до 0,1 мг, магнитная мешалка, рН-метр, набор автоматических дозаторов от 2 до 1000 мкл.

5. Реактивы:

натрия дигидрофосфат;

натрия ацетат 7-водный;

кислота уксусная ледяная;

о-фталевый альдегид;

3-меркаптопропионовая кислота;

метанол для градиентной ВЭЖХ;

ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ;

натрия октилсульфонат;

аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-

диазола-4-сульфонат (SBD-F);

ЭДТА динатриевая соль;

натрия борат 10-водный;

хлорная кислота;

трихлоруксусная кислота;

дельта-аминовалериановая кислота;

ванилиновая кислота;

N-ацетилцистеин;

натрия метабисульфит;

трис-(карбоксиэтил)фосфин

гидрохлорид (ТСЕР).

6. Стандарты для хроматографических определений следующих веществ: триптофан, 5-оксииндолуксусная кислота, серотонин, 5-окситриптофан; смесь стандартов физиологических аминокислот (основных, кислых и нейтральных), глутамин, аспарагин, цистеин, гомоцистеин, глутатион.

7. Колонки для ВЭЖХ размером 2,1×150 мм с неподвижной фазой типа C₁₈ (диметил-п-октадецилсилан) с двойным эндкэпированием, стабильной в диапазоне рН 2–9, размер частиц 3,5 мкм (2 шт.) и предколонки размером 2,1×12,5 мм с тем же сорбентом, размер частиц 5 мкм.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

ИБС с признаками хронической сердечной недостаточности I ст. (по классификации NYHA), ФК II и выше, либо имеющие уровень мозгового натрийуретического пептида (BNP) выше 50 пг/мл.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Применение метода возможно у всех пациентов с ИБС, у которых клинически или лабораторными методами доказана ХСН.

Необходимые исследования перед применением метода: общий и биохимический анализ крови (белок, уровни мочевины и креатинина, активности трансаминаз).

После стандартного клинического и лабораторного обследования, включающего вышеуказанные анализы, определяют индекс соотношения концентраций аминокислот и родственных им соединений в плазме крови пациента. Величина этого индекса имеет связь с наличием желудочковых нарушений ритма (ЖНР).

Забор материала

Для выполнения метода производится забор венозной крови по общепринятым правилам как для лабораторных биохимических исследований. Кровь забирают в гепаринизированные пробирки и немедленно получают плазму центрифугированием при 3000 об./мин в течение 10 мин. Плазму крови осторожно отделяют аспирацией в две отдельные пробирки, которые могут храниться до исследования до 14 сут при -18°C или неограниченное время при -78°C . Одна из проб используется для определения свободных аминокислот, другая — для определения общего гомоцистеина.

Время от момента отделения плазмы до замораживания или начала пробоподготовки должно быть как можно короче; при стоянии плазмы при комнатной температуре более 30 мин содержание в пробе глутамата будет завышено, а глутамина и 5-оксииндолуксусной кислоты — занижено.

Для исследования пригодна венозная кровь через 14 ч после последнего приема пищи.

Пробоподготовка

Пробы плазмы крови для определения свободных аминокислот и метаболитов триптофана депротенинизируют раствором хлорной кислоты. Для этого образец смешивают с 1 М раствором хлорной кислоты, содержащим 0,2 мМ S-аминовалериановой кислоты (dAVA), а также 50 мг/л ЭДТА, 50 мг/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ и 1 мкМ ванилиновой кислоты в соотношении 1:1. После тщательного перемешивания пробы центрифугируют при 4°C в течение 15 мин при 16000g, после чего супернатант (хлорнокислый экстракт) немедленно отделяют аспирацией и хранят до исследования при -18°C не более 15 сут. После размораживания экстракты повторно центрифугируют, при выпадении осадка супернатант отделяют. Полученные хлорнокислые экстракты используют для анализа. Растворы стандартов, используемые для отработки разделения и

калибровки хроматографической системы, обрабатывают аналогичным способом.

Определение метаболитов триптофана

Метод определения основан на ион-парной ВЭЖХ хлорнокислых экстрактов плазмы крови с детектированием по природной флуоресценции.

Разделение триптофана и его производных в плазме проводят с помощью ион-парной ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции. Колонку 2,1×150 мм термостатируют при 28°C. Подвижная фаза: 0,1 М NaH₂PO₄, 0,029 М CH₃COOH, pH 3,5; 110 мг/л октилсульфоната натрия, 50 мг/л ЭДТА, 4,3% (об.) ацетонитрила. Скорость потока — 0,2 мл/мин. Детектирование по флуоресценции при длинах волн: возбуждения — 280 нм, излучения — 340 нм. Объем ввода проб (хлорнокислых экстрактов) — 20 мкл. Идентификацию определяемых соединений и количественную обработку хроматограмм проводят с использованием метода внутреннего стандарта. Смесь стандартов должна включать тирозин (Tyr), 5-окситриптофан (5-НТР), 5-оксииндолуксусную кислоту (5-НИАА), триптофан (Trp) и серотонин (5-НТ) в концентрациях 1 мкмоль/л, которую готовят из запасных растворов отдельных соединений (10 ммоль/л). Данную смесь стандартов обрабатывают как пробы плазмы, начиная с этапа депротеинизации (см. **Пробоподготовка**). Типичная хроматограмма приведена на рисунках 1 (стандарты), 2 (хлорнокислый экстракт плазмы крови). На хроматограмме стандартов также имеются пики следующих веществ: 3,4-диоксифенилаланина (ДОРА), норадреналина (пик после пика тирозина), 3-метокси-4-оксифенилэтиленгликоля (МНPG), адреналина (Е), норматанефрина (NM), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (DOPAC), дофамина (DA), сальсолинола (Sal), гомованилиновой кислоты (HVA), 3-метокситирамина (3-МТ).

Для определения величины диагностического индекса необходимо количественное определение триптофана. Другие вещества, перечисленные выше, необходимы в смеси стандартов для контроля качества хроматографического разделения. Критически важным является разрешение пиков 5-оксииндолуксусной кислоты и внутреннего стандарта, а также внутреннего стандарта и триптофана. Это разрешение может ухудшаться при погрешностях в приготовлении подвижной фазы (неправильная величина pH или концентрация ацетонитрила).

Определение свободных аминокислот и их производных

Для определения используют те же хлорнокислые экстракты, что и для определения триптофана и его метаболитов. Определение проводят с помощью градиентной обращенно-фазной ВЭЖХ после предколоночной дериватизации аминокислот с *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой.

Предколоночную дериватизацию проводят непосредственно перед вводом проб в хроматограф путем смешивания пробы (0,2–0,5 мкл) с 5-кратным объемом 0,4% *o*-фталеевого альдегида и 0,3% 3-меркаптопропионовой кислоты в 0,4М Na-боратном буфере, pH 9,4, затем пробы нейтрализуют смешиванием с 0,2 М раствором HClO₄ до слабокислой среды и немедленно вводят в колонку.

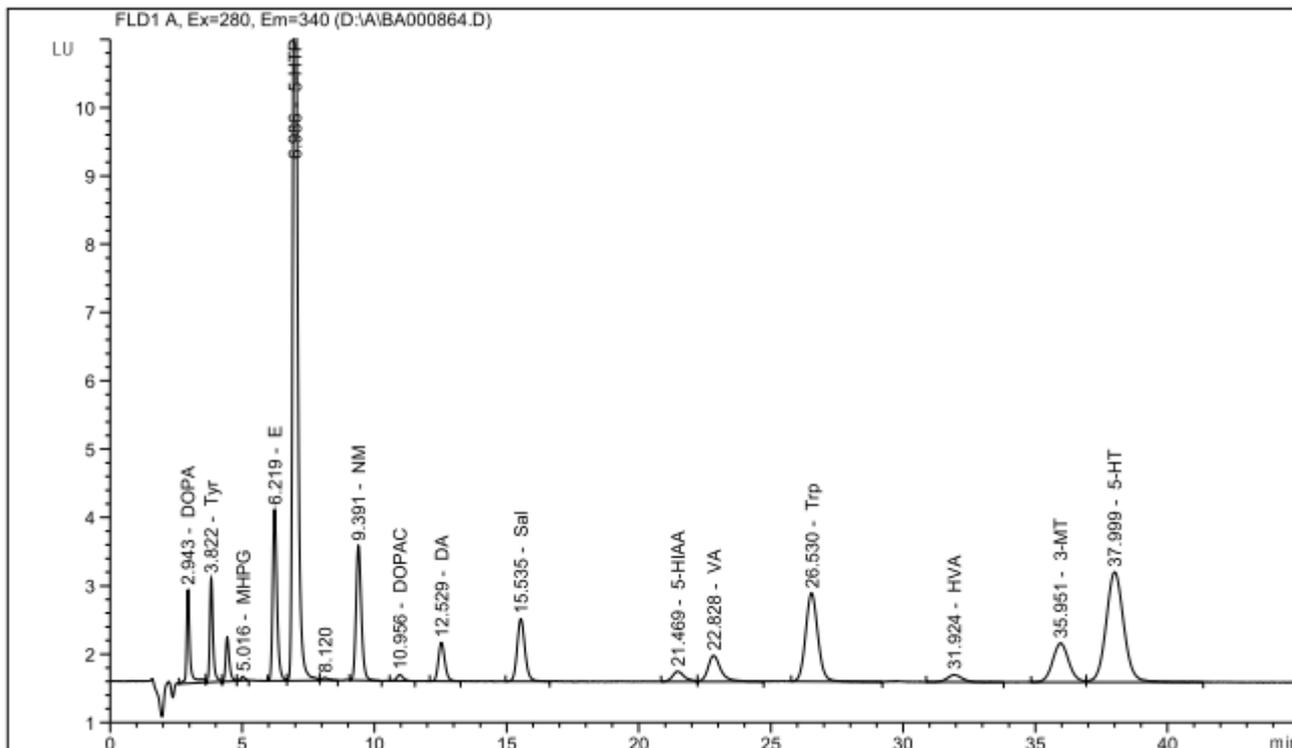


Рисунок 1. — Хроматограмма стандартной смеси биогенных аминов, их предшественников и метаболитов, 100 мкмоль/л. Обозначения пиков в тексте

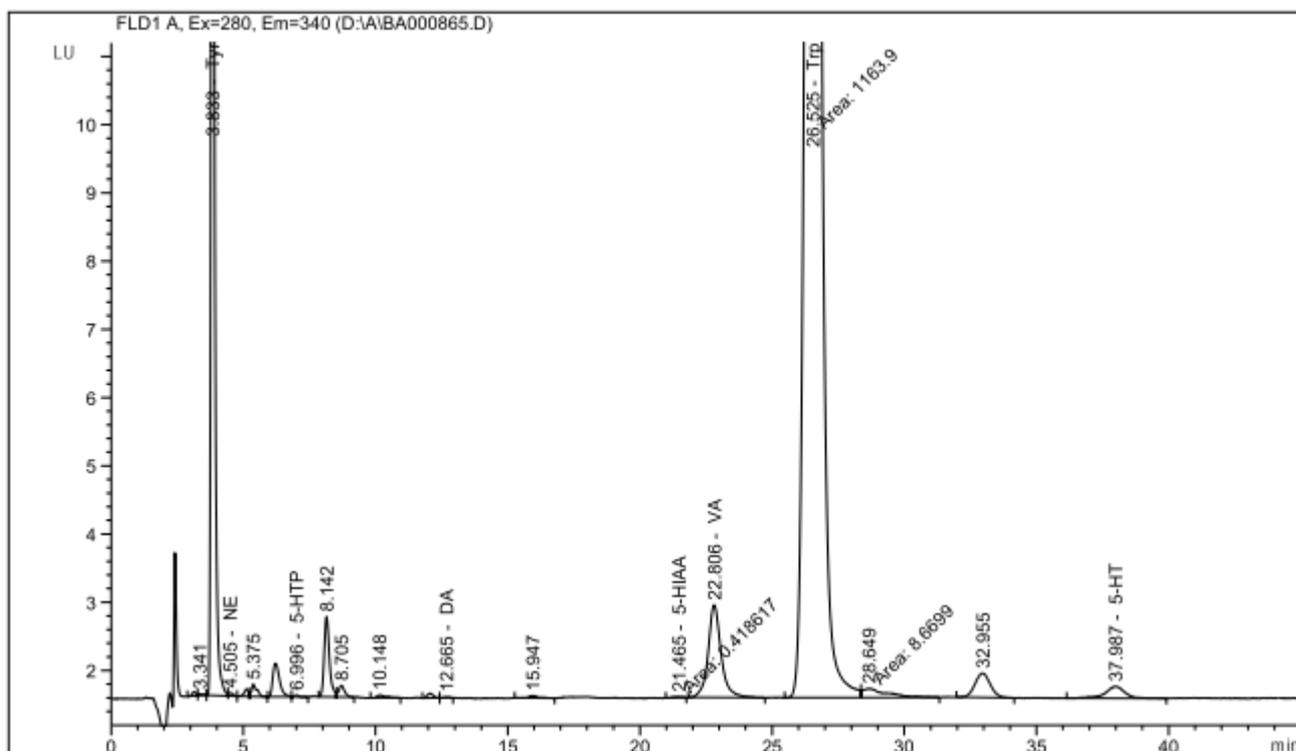


Рисунок 2. — Типичная хроматограмма хлорнокислого экстракта плазмы крови

Подвижная фаза: 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 7,05, содержащий 20 мг/л ЭДТА (А); ацетонитрил/вода 7/3 (об./об.) (В), метанол/вода 7/3 (об./об.) (С), 0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 5,85, содержащий 20 мг/л ЭДТА (D). Градиентное

элюирование от 2 до 100% В, с изменением соотношения В/С и А/Д в ходе анализа, за 74 мин; температура колонки — 35°С. Соотношение компонентов подвижной фазы в процентах приведено в таблице.

Таблица — Профиль градиентного элюирования

Время, мин	%А	%В	%С	%D
0	89,3	2,0	0,0	8,7
3	82,0	10,0	0,0	8,0
16	80,6	11,5	0,0	7,9
17	24,7	5,5	13,5	56,3
23	22,8	5,5	19,5	52,2
26	22,4	8,3	18,0	51,3
27	71,6	12,0	13,0	3,4
39	67,3	17,0	12,5	3,2
43	65,7	24,0	7,2	3,1
55	46,4	40,0	9,0	4,6
65	44,6	49,0	2,0	4,4
70	27,4	70,0	0,0	2,6
74	0,0	100,0	0,0	0,0
82	0,0	100,0	0,0	0,0
85	89,3	2,0	0,0	8,7

Порядок элюирования: О-фосфосерин (PSer), аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu), аспарагин (Asn), серин (Ser), α-аминоадипиновая кислота (α-AAA), глутамин (Gln), гистидин (His), глицин (Gly), 3-метилгистидин (3MHis), треонин (Thr), 1-метилгистидин (1MHis), цитруллин (Citr), аргинин (Arg), аланин (Ala), таурин (Tau), γ-аминомасляная кислота (GABA), тирозин (Tyr), α-аминомасляная кислота (α-ABA), этаноламин (EA), dAVA (внутренний стандарт), валин (Val), метионин (Met), цистатионин (Ctn), триптофан (Trp), фенилаланин (Phe), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), орнитин (Orn), лизин (Lys).

Детектирование по флуоресценции (231/445 нм). Возможно использование длины волны возбуждения 338 нм, что может давать лучшую стабильность базовой линии при использовании некоторых партий ацетонитрила и метанола.

Обработка хроматограмм по методу внутреннего стандарта. Смесь аминокислот для калибровки должна содержать равные количества определяемых соединений 100–500 мкмоль/л и обрабатывается так же, как соответствующие пробы плазмы крови. Используют концентрат стандартной смеси физиологических аминокислот (кислых, нейтральных и основных), в которую дополнительно вносят L-глутамин и L-аспарагин. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот для калибровки представлена на рисунке 3, хлорнокислого экстракта плазмы крови — на рисунке 4.

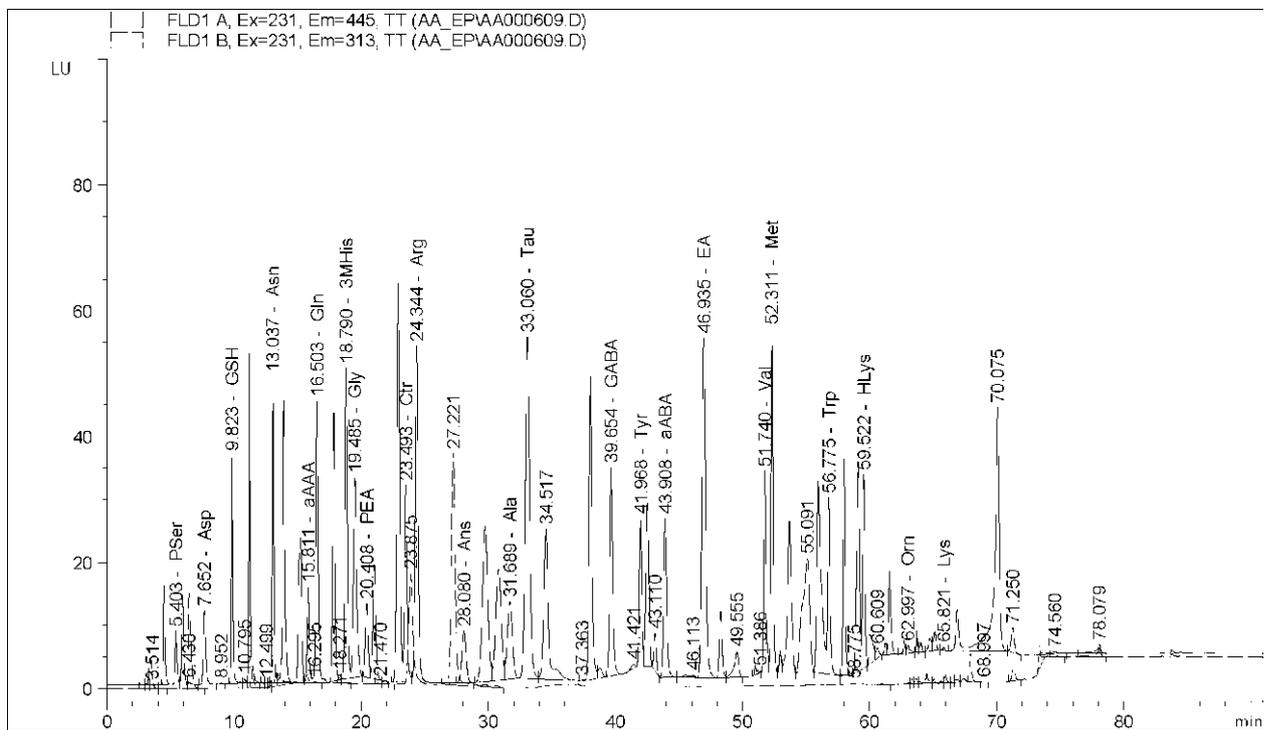


Рисунок 3. — Хроматограмма стандартной смеси аминокислот их производных. Каждый пик соответствует концентрации 467 мкмоль/л. Обозначения пиков в тексте

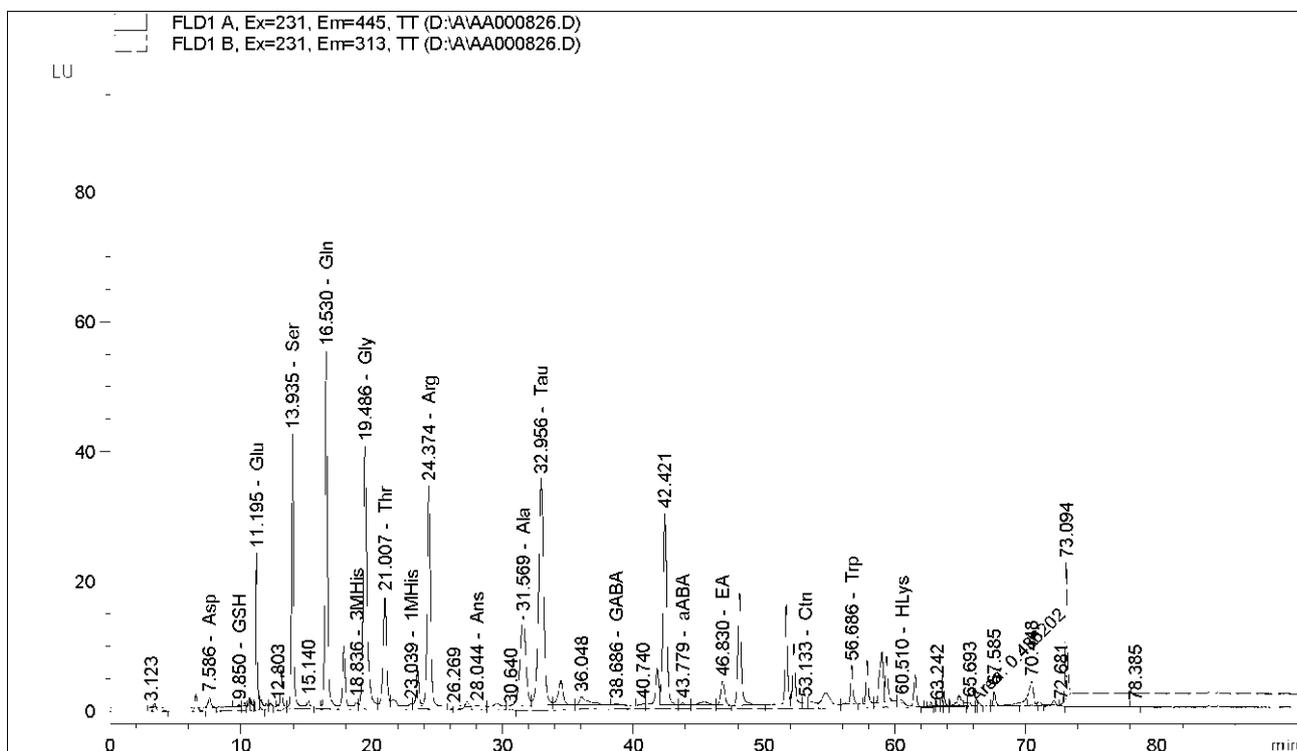


Рисунок 4. — Типичная хроматограмма свободных аминокислот и их производных плазмы крови

Для вычисления диагностического индекса необходимо количественное определение концентраций следующих аминокислот: глицин, гистидин и аспарагин. Однако все вышеперечисленные компоненты (см. порядок элюирования...) должны входить в смесь стандартов для контроля качества хроматографического разделения. Если не используется процедура определения

триптофана и его метаболитов, концентрацию триптофана допустимо брать из анализа свободных аминокислот и их производных, в этом случае необходимо обращать особое внимание на разрешение пика триптофана в пробах и его концентрацию в стандарте.

Определение общего гомоцистеина в плазме крови

Определение проводят в плазме крови (для этого используют отдельные образцы плазмы).

Метод основан на предколоночной дериватизации SH-содержащих соединений (цистеина, гомоцистеина, цистеинилглицина и глутатиона) с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом (SBD-F) с последующим разделением полученных производных методом обращенно-фазной ВЭЖХ с изократическим элюированием. В качестве внутреннего стандарта используют N-ацетилцистеин, который добавляют в плазму до конечной концентрации 50–100 мкмоль/л. Для восстановления тиолов из дисульфидов и высвобождения связанных с белками тиолов используют трис-(карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР).

Пробы плазмы крови (50 мкл) смешивают с 10 мкл 0,5 ммоль/л раствора N-ацетилцистеина и 5 мкл раствора ТСЕР (100 мг/мл), оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем осаждают белки добавлением 50 мкл 10%-го раствора ТХУ и центрифугируют при 4°C 15 мин при 16000 g.

В микропробирку на 200 мкл, содержащую 2 мкл 1,55 М NaOH, 12,5 мкл 0,125 М Na-боратного буфера, содержащего 200 мг/л ЭДТА, pH 9,5, и 5 мкл раствора SBD-F (1 мг/мл) в таком же буфере, вносят 10 мкл супернатанта и инкубируют 1 ч при 60°C.

В хроматографическую систему вводят 10 мкл реакционной смеси.

Подвижная фаза: 0,05 М NaH_2PO_4 , 8,5 мМ CH_3COOH , pH 3,65, 40 мг/л ЭДТА, 1,8% ацетонитрила. Скорость потока 0,2 мл/мин, температура колонки 25°C. Детектирование по флуоресценции, 379/510 нм.

Калибровка системы: смесь растворов цистеина, гомоцистеина и глутатиона по 10–100 мкмоль/л каждого в 0,1 М хлорной кислоты обрабатывают как пробы плазмы крови. Обработка хроматограмм по методу внутреннего стандарта.

Использование N-ацетилцистеина в качестве внутреннего стандарта при определении L-гомоцистеина приводит к реальному улучшению воспроизводимости результатов, а также позволяет выявить аналитические ошибки на этапе пробоподготовки, когда осуществляется предколоночная дериватизация (при инкубации проб при 60°C в течение 60 мин в случае негерметичности микропробирок возможно существенное завышение результатов определения). При расчете по внешнему стандарту такие ошибки практически не поддаются обнаружению, в то время как применение внутреннего стандарта позволяет их автоматически учесть. Пик цистеинилглицина на хроматограммах идентифицируют как наиболее высокий пик на хроматограммах плазмы крови, следующий за пиком гомоцистеина. Хроматограмма смеси стандартов приведена на рисунке 5, типичная хроматограмма плазмы крови человека — на рисунке 6.

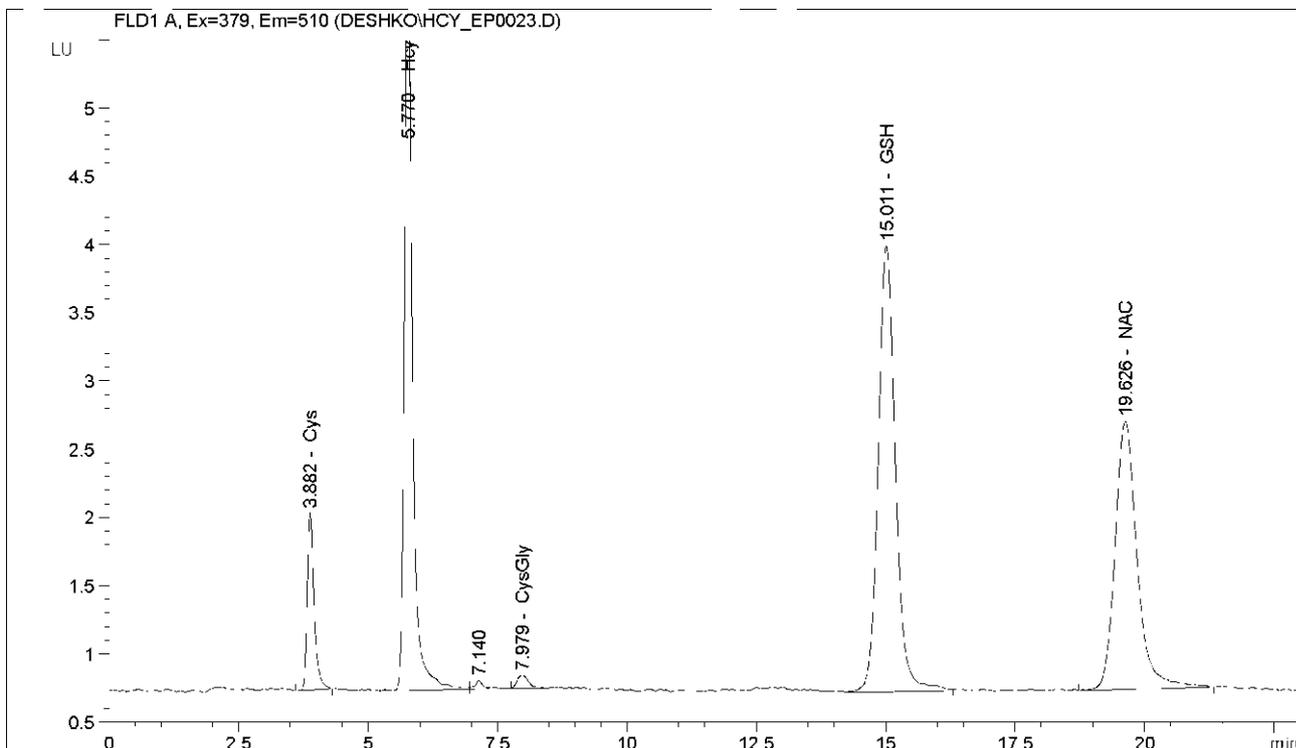


Рисунок 5. — Хроматограмма стандартов гомоцистеина, цистеина и глутатиона. Пики Cys, Hcy и GSH соответствуют концентрации в плазме 100 мкМ. Обозначения пиков в тексте

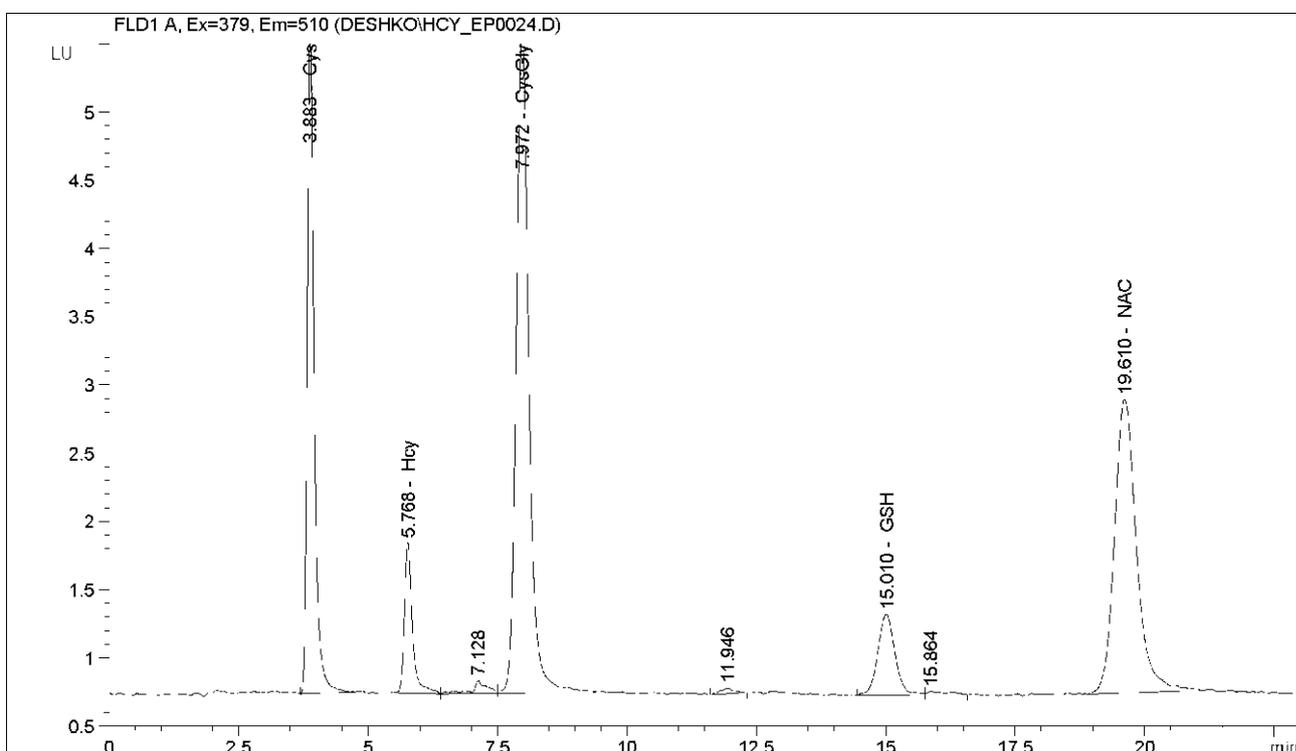


Рисунок 6. — Хроматограмма общего гомоцистеина, цистеина и глутатиона плазмы крови при разделении их методом обращенно-фазной хроматографии с пред колоночной дериватизацией и детектированием по флуоресценции

Коэффициент чувствительности для него условно принимают равным такому же для гомоцистеина.

В описанных хроматографических определениях необходимо использовать реактивы для приготовления подвижных фаз квалификации не ниже хч, трижды

дистиллированную воду (или воду, подготовленную в соответствии со спецификацией «для ВЭЖХ»).

При обработке хроматограмм требуется проверка и ручная коррекция базовой линии, т. к. полностью автоматическая обработка хроматограмм такой сложности (особенно при определении свободных аминокислот) приводит к ненадежным результатам. При рутинном применении описанных методов возможно использование одноуровневой калибровки.

Результаты всех определений выражают в мкмоль/л.

Обработка и интерпретация результатов

На основании определения показателей обмена свободных аминокислот рассчитывают индекс соотношения их концентраций в плазме крови:

$$\text{Индекс} = \frac{0,4 \times \text{Gly} + 0,5 \times \text{GSH} + 0,7 \times \text{His}}{0,6 \times \text{Hcy} + 0,8 \times \text{Asn} + 0,5 \times \text{Trp}}$$

где Gly — концентрация глицина;

Arg — концентрация аргинина;

Trp — концентрация триптофана;

Asn — концентрация аспарагина;

Hcy — концентрация общего гомоцистеина;

His — концентрация гистидина;

GSH — концентрация общего глутатиона.

Величина GSH должна быть взята из результатов определения общего гомоцистеина. Концентрация глутатиона, определяемая в анализе свободных аминокислот и их производных, является концентрацией восстановленного глутатиона и ее использование для расчета индекса недопустимо.

Значение индекса ниже 1,42 при уровне гомоцистеина ниже 12,8 мкмоль/л или уровень гомоцистеина в крови выше 12,8 мкмоль/л расценивают как наличие существенного риска развития ЖНР.

Прогностически благоприятным является факт повышения величины данного индекса в процессе лечения.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений, связанных с применением метода, не существует. Однако возможны затруднения с интерпретацией результатов оценки риска ЖНР (диагностического индекса), которые могут возникать в следующих случаях:

1. Прием триптофана пациентом в дозе 2,0 в сут и более в течение 3 сут до забора крови для исследования.

2. Выраженные проявления печеночной недостаточности с гиперферментемией, стойкое повышение активности гамма-глутамилтранспептидазы.

3. Заболевания почек с выраженной протеинурией, аминоацидурией, нарушением выделительной функции почек.

4. Цистинурия, гомоцистинурия.

5. Наличие гематологических признаков В₁₂-фолиеводефицитной анемии.
6. Заболевания органов пищеварения с мальабсорбцией, состояние после операций на органах брюшной полости.
7. Кардиохирургическое или интервенционное лечение в анамнезе.
8. Введение препаратов аминокислот (в т. ч. энтеральное), полное и частичное парентеральное питание за 7 сут до исследования.

Приготовление среды для депротеинизации плазмы крови

217,5 мл H₂O + 25 мл 57% хлорной кислоты + 10 мг динатриевой соли ЭДТА + 10 мг метабисульфита натрия + 500 мкл раствора ванилиновой кислоты (2 мг/мл в воде, готовится непосредственно перед приготовлением среды) + 6 мг дельта-аминовалериановой кислоты.

Приготовление стандартов

Навески веществ: триптофана 20,4 мг, 5-оксииндолуксусной кислоты 19,1 мг, серотонина креатинин сульфата 38,7 мг, 5-окситриптофана 22 мг растворяют каждую в 10 мл 0,1 М хлорной кислоте; по 10 мкл полученных растворов смешивают с 0,96 мл воды, смесь разбавляют водой в 100 раз (1 мкмоль/л). Водные растворы глутамина (14,6 мг в 10 мл), аспарагина (13,2 мг в 10 мл) добавляют в смесь стандартов физиологических аминокислот 0,5 ммоль/л (основных, кислых и нейтральных) по 50 мкл на 1 мл смеси, концентрация всех веществ в растворе — 476 мкмоль.

Приготовление реагента для дериватизации аминокислот

3 мг *o*-фталевого альдегида растворить в 60 мкл метанола, добавить 0,65 мл 0,4 М Na-боратного буфера pH 9,5, затем добавить 2,5 мкл 3-меркаптопропионовой кислоты. Готовится непосредственно перед использованием, должен быть защищен от света, контакта с кислородом, хранить при 4°C не более 14 дней.

Приготовление подвижной фазы для определения триптофана

6 г NaH₂PO₄, 0,8 мл ледяной уксусной кислоты, 55 мг октилсульфоната натрия, 25 мг ЭДТА, 24,5 мл ацетонитрила на 500 мл H₂O.

Приготовление подвижных фаз для определения аминокислот

A: 12,48 г ацетата натрия 7-водного, 0,16 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 мл H₂O (A);

B: 700 мл ацетонитрила для градиентной ВЭЖХ + 300 мл H₂O;

C: 700 мл метанола для ВЭЖХ + 300 мл H₂O;

D: 12,48 г ацетата натрия (7-водного), 0,6 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 мл H₂O.

Приготовление подвижной фазы для определения гомоцистеина

6 г NaH₂PO₄, 0,4 мл ледяной уксусной кислоты, 25 мг ЭДТА, 19 мл ацетонитрила для ВЭЖХ на 1000 мл H₂O.

Приготовление реактивов для определения гомоцистеина

Внутренний стандарт: 4 мг N-ацетилцистеина + 0,98 мл H₂O, затем 0,1 мл полученного раствора + 0,9 мл H₂O (400 мкг/мл).

Раствор ТСЕР: 100 мг в 1 мл H₂O (используется свежеприготовленным).

10% раствора ТХУ: 10 г ТХУ на 100 мл H₂O + 30 мг Ш₂ЭДТА 1,55 М.

NaOH: 6,2 г NaOH, до 100 мл H₂O.

0,125 М Na-боратный буфер: 788 мг борной кислоты + 50 мл H₂O, оттитровать 5М (200 г/л) NaOH до pH 9,5 + 120 мг №₂ЭДТА, довести до 100 мл.

Раствор SBD-F (1 мг/мл) 1 мг в 1 мл боратного буфера (используется свежеприготовленным).

Стандарты: цистеин 1,22 мг + 1 мл H₂O, гомоцистеин 1,35 мг + 1 мл H₂O, глутатион (восстановленный) 3,07 мг + 1 мл H₂O.