УДК 543.544.5.068.7
ВАК 02.00.02
Аналитика 4/2016(29)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ С АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

А.Яшин, к.х.н., "Интерлаб"
yashin@interlab.ru

Хроматография сегодня занимает лидирующие позиции среди аналитических методов. По последним данным более 60% всех химических анализов в мире выполняются хроматографически [1]. Чаще всего применяется ВЭЖХ, например, для контроля загрязнений окружающей среды, пищевых продуктов, в фармацевтике, медицине, биологии, в судмедэкспертизе и др. В кратком обзоре рассмотрены уникальные возможности ВЭЖХ с амперометрическим детектором в медицине для определения специфических биомаркеров заболеваний и окислительного стресса с диагностическими целями.

Амперометрическое (электрохимическое) детектирование в ВЭЖХ благодаря низкому пределу детектирования и высокой селективности наиболее подходит для определения микропримесей маркеров заболеваний и окислительного стресса в биологических жидкостях человека. Кроме того, оно имеет предел обнаружения на порядок ниже, чем спектрофотометрическое. Амперометрический и кулонометрический детекторы при разных потенциалах так же, как и спектрофотометрический на диодной матрице и масс-спектрометрический, могут быть использованы для идентификации неизвестных соединений, то есть в качестве 3D-детекторов. По сравнению с другими (особенно масс-спектрометрическими) детекторами амперометрические значительно дешевле. Исключительные возможности амперометрического детектора позволяют напрямую определять в биологических жидкостях катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин), их предшественников (леводопа и др.) и метаболиты (гомованилиновая и ванилилминдальная кислоты), серотонин, гомоцистеин, цистеин, цистин, глутатионы, убихинол, убихинон, измененные нуклеозиды, липоевую, мочевую кислоты, витамины С, Е, эстрадиол и др.

Амперометрическое детектирование используется в окислительном режиме со стеклоуглеродом в качестве рабочего электрода при постоянном потенциале [2]. Применяется оно и в импульсном режиме, в частности для прямого определения аминокислот и сахаров [2]. А в восстановительном режиме его используют значительно реже. Амперометрический детектор определяет полифенолы, тиолы, ароматические амины, соединения с сопряженными двойными связями.

Перечислим основные достоинства амперометрического детектора [2]:

- низкий предел обнаружения, то есть высокая чувствительность;
- высокая селективность к соединениям, имеющим гидроксильную или аминную группы в бензольном кольце, а также к тиолам;
- возможность превращения амперометрического детектирования в 3D при регистрации при разных потенциалах;
- возможность напрямую (без дериватизации) определять аминокислоты и сахара в импульсном режиме в щелочной среде;
- малый объем ячейки детектора, позволяющий применять его в капиллярном, микро- и даже нанорежимах;
- низкая стоимость.

В последнее десятилетие большой интерес вызывает определение маркеров многих заболеваний с целью их ранней диагностики. Начали выходить специализированные журналы по этим вопросам: Journal

Маркеры, определяемые в биологических жидкостях методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором без концентрирования и дериватизации

Названия маркеров	Цель определения	Ссылки
Катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин)	Рак надпочечников – ферохромацитома, гипертония и др. заболевания	3–7
Предшественники катехоламинов (леводопа, 3-о-метилдопа, кабидопа и др.)	Болезнь Паркинсона	8
Метаболиты катехоламинов – ванилилминдальная, гомованилиновая кислоты	Нейробластома у детей	9
Серотонин, его метаболит	Карциноидный синдром	10–12
Гомоцистеин	Сердечно-сосудистые заболевания	13, 14
Цистеин, цистин и их отношения	Маркеры окислительного стресса	15–20
Глутатион восстановленный, окисленный и их отношение		16, 17, 21–23
Измененные нуклеозиды (8-гидрокси-2´-дезоксигуанозин)	Маркеры окисления ДНК, маркеры онкологических заболеваний	24–27
3-нитротирозин и др.	Маркеры окисления белков	28
Убихинол, убихинон	Маркеры окислительного стресса	29
Липоевая кислота	Эндогенный антиоксидант	30
Мочевая кислота		19, 20
Аскорбиновая кислота	Экзогенный антиоксидант	31
Витамин Е		32
Эстрадиол	Женский половой гормон	33

of Biomarkers, Journal of Molecular Biomarkers and Diagnosis и др. Перечень основных маркеров, определяемых амперометрическим детектором в биологических жидкостях напрямую без концентрирования и дериватизации, приведен в таблице.

Рассмотрим подробнее наиболее важные применения ВЭЖХ с амперометрическим детектором для определения маркеров заболеваний.

Катехоламины выполняют биологическую функцию краткосрочной адаптации и регулируют многие процессы метаболизма, включая реакцию гидродинамического артериального давления, а также передачу нервного сигнала в синапсах симпатической нервной системы. В первом случае катехоламины могут рассматриваться как гормоны, во втором случае – как нейромедиаторы. Клинический интерес к уровню катехоламинов в биологических жидкостях связан с проблемой физиологии адаптивных сигналов стресса (точность оценки заболевания и прогноз).

Типичная реакция на стресс – активация синтеза и повышение содержания в крови катехоламинов. Под влиянием стресса они выделяются в кровь и мобилизуют организм для активной мышечной деятельности, как при внешней, так и внутренней угрозе, связанной с различными болезнями. Определение катехоламинов является тестом дифференциальной диагностики симптоматических форм артериальной гипер-

тонии, особенно при наличии феохромацитомы или нейробластомы.

Важную роль катехоламины играют также в поддержании биологической функции гомеостаза (постоянства состава внутренней среды и устойчивости основных физиологических функций). Для оценки состояния организма определяют содержание катехоламинов (адреналина, норадреналина, дофамина), их предшественников и метаболитов в биологических жидкостях (плазма крови, моча, слюна).

Нейробластома – наиболее часто встречающаяся опухоль у детей, это вторая причина смертности в возрасте до 5 лет. При ранней диагностике нейробластомы на первой стадии возможно полное излечение. Даже при диагностировании второй стадии болезни процент излечения детей составляет около 90%. Очень важно обследовать детей до одного года. В высокоразвитых странах (США, Канаде, Франции, Японии) производится скрининг детей до 5 лет. В нашей стране чаще всего диагностируют нейробластому на 3–4 стадии, когда полное излечение затруднено и требует больших финансовых затрат.

Ранняя диагностика нейробластомы возможна по содержанию ее биохимических маркеров в моче – ванилилминдальной (ВМК) и гомованилиновой (ГВК) кислот: у 90% больных их концентрация возрастает. Достоверность диагноза увеличивается, если одновременно измерять и ванилилактоновую (ВЛ) кислоту. Определение этих маркеров проводят с помощью ВЭЖХ с амперометрическим детектором. Время разделения около 10 мин на колонке в обращенно-фазовом варианте с ион-парными элюентами [9]. Жидкостный хроматограф с амперометрическим детектором в окислительном режиме позволяет надежно определять примеси ВМК, ГВК и ВЛ в моче без дериватизации и концентрирования.

Очень большое диагностическое значение имеет определение серотонина и его метаболита. Серотонин влияет на ритм сердца, сон, секс, терморегуляцию, а также на синтез мелатонина, психические заболевания, такие как депрессия, шизофрения. По метаболиту серотонина 5-гидроксииндол уксусной кислоты (5-HIAA) можно диагностировать карциноидные синдромы (см.: Харт К. Секреты серотонина. Минск, 1998. 315 с.).

Не так давно установлена связь между повышенным содержанием гомоцистеина в крови человека и ростом числа коронарных заболеваний. Кардиологические пациенты с наиболее высоким уровнем гомоцистеина погибают раньше, чем больные с низким содержанием гомоцистеина в плазме. Гомоцистеин – мощный стимул развития атеросклероза, это главный маркер для оценки атерогенного риска. Если уровень циркулирующего в крови гомоцистеина превышает 8–10 мкмоль/л, то высок риск тромбоза и сердечно-сосудистых заболеваний независимо от других показателей. В норме содержание гомоцистеина порядка 9,6 мкмоль/л, с возрастом его содержание увеличивается. При концентрации гомоцистеина 15 мкмоль/л опасность в 100 раз больше, чем при высоком холестерине. Смертельно опасное содержание – свыше 50 мкмоль/л.

Негативное действие гомоцистеина заключается в том, что он поражает сосудистую стенку артерий. При поражении коронарных артерий сердца происходит сужение сосудов, возникает недостаточность кровообращения, что в конечном итоге может привести к инфаркту миокарда. Поражение сосудов головного мозга может вызвать инсульт. Многие исследователи приходят к заключению, что основной виновник сердечно-сосудистых заболеваний в большей мере гомоцистеин, а не холестерин. Поэтому необходим экспрессный, достоверный и сравнительно простой метод анализа гомоцистеина. Для определения гомоцистеина (и сопутствующих цистеина и метионина) применяют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). На сегодняшний момент опубликовано более 600 статей по анализу гомоцистеина методом ВЭЖХ, а в 1997 году вышла книга К.С.МакКалли "Гомоцистеиновая революция". В качестве детектирующих систем используют спектрофотометрические, флуоресцентные и амперометрические. Первые две требуют предварительной дериватизации, а амперометрический детектор определяет гомоцистеин напрямую без дериватизации [14].

В плазме крови гомоцистеин присутствует в виде свободного, симметричного дисульфида и ассиметричных дисульфидов, связанных через дисульфидную связь с белком (80–85%). Следовательно, общее для всех аналитических методик состоит в переводе всех связанных форм гомоцистеина в свободный с помощью восстанавливающих агентов. Находят применение следующие восстановители: боргидриды натрия и калия, водорастворимые фосфины, такие как трибутилфосфин, трис-(2-карбоксилэтилфосфин), трифенилфосфин,

а также дитиотриетол, который работает в широком диапазоне температур. Для приготовления калибровочных растворов можно использовать чистый гомоцистеин фирмы Sigma. Для оценки правильности измерений гомоцистеина в плазме крови применяют контрольные растворы гомоцистеина "Ликвичек гомоцистеин" фирмы Bio-Rad с концентрациями: 10 мкмоль/л (7,5–12,5 мкмоль/л) и 45 мкмоль/л (36–54 мкмоль/л).

Сегодня в нашей стране и за рубежом интенсивно ведутся исследования по разработке методов и приборов для диагностики окислительного стресса. При неблагоприятных условиях (плохая экология, облучение, стресс, загрязненная и некачественная пища, некоторые болезни, курение, алкоголизм, наркомания и пр.) в биологических жидкостях может возрастать концентрация высокореакционных кислородных и азотных соединений, включая и свободные радикалы (супероксидный радикал кислорода, гидроксид-радикал, пероксинитрит и др.). Свободные радикалы в допустимых концентрациях необходимы для некоторых биологических процессов, а также для нормальной функции иммунной системы и ее компонентов. Однако их избыточное содержание приводит к развитию патологических изменений в организме человека. Такое состояние называют окислительным (оксидантным) стрессом. Подавляющее большинство теорий старения также основаны на свободнорадикальном окислении. Многочисленные научные публикации подтверждают, что большинство тяжелых болезней вызывается окислительным стрессом: атеросклероз, онкологические, нарушения мозгового кровообращения, сахарный диабет, воспалительные, ревматоидные, нейродегенеративные (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, шизофрения, аутизм). Поэтому исключительно важно диагностировать начало развития окислительного стресса, пока он не перерос в серьезное заболевание. Окислительный стресс может быть быстро определен путем измерения общего антиоксидантного статуса, то есть суммарного содержания антиоксидантов в организме человека. Для более достоверного детального анализа необходимо оценивать окислительный стресс по специальным маркерам, которые появляются в биологических жидкостях при окислении липидов, белков, углеводов и молекул ДНК.

Современные жидкостные хроматографы с амперометрическим и спектрофотометрическим детекторами с изократическим и градиентным насосами позволяют определять основные маркеры окислительного стресса. Маркеры окисления белков, липидов, молекул ДНК в разных биологических жидкостях (плазма или сыворотка крови, моча, слюна, конденсат выдыхаемого воздуха) детектируются на уровне 10^{-10} – 10^{-9} г/см^3. На жидкостных хроматографах отработаны методические рекомендации по определению наиболее представительных маркеров окислительного стресса: тирозина, 3.4-DOPA, м-тирозина, о-тирозина, 3-хлортирозина, 3-нитротирозина, малонового диальдегида, 8-гидрокси-2´-дезоксигуанозина, цистеина, глутатиона, мочевой кислоты [2, 19, 20]. На таких хроматографах можно измерять окислительно-восстановительный потенциал биологических жидкостей по соотношению восстановленных и окисленных форм биологически активных молекул, в частности, глутатиона (GSH и GSSG), мочевой кислоты, цистеина к цистину, убихинола к убихинону, нитрита к нитрату и др. Это позволит с большой достоверностью оценить состояние здоровья человека, так как практически нет болезней, при которых бы окислительно-восстановительный баланс не нарушался [19, 20].

Массовое внедрение таких хроматографов позволит выявлять начало развития опасных болезней на самой ранней стадии и, используя антиоксидантную терапию, на основании нашего банка данных содержания антиоксидантов в пищевых продуктах, напитках, лекарствах, витаминах, БАДах, экстрактах лекарственных трав (всего более 1400 продуктов), не допустить дальнейшего их развития. Благодаря этому могут значительно сократиться затраты на лечение, увеличиться продолжительность жизни и снизиться смертность населения Российской Федерации.

Обследования по раннему выявлению окислительного стресса можно организовать не только в больницах, диагностических центрах, но и в профилакториях, санаториях, домах отдыха и других оздоровительных учреждениях. Стоимость таких обследований будет доступна большинству населения нашей страны. Выявление окислительного стресса (предшественника болезней) и его устранение – это шаг к новой профилактической медицине.

Кроме приведенных маркеров, амперометрическим детектором можно измерять в биологических жидкостях большинство наркотиков и наркотических средств [34, 35], лекарств [36–38], а также биологически активные соединения: иодид [39], холестерин [40], никотин [41], сорбитол

[42] и др. При исследовании биодоступности природных антиоксидантов определяют содержание флавоноидов и фенольных кислот в плазме человека [43].

***

Таким образом, ВЭЖХ с амперометрическим детектированием имеет большие перспективы в клинических и терапевтических анализах. Определение катехоламинов уже проводят в некоторых медицинских учреждениях. В Нижегородском диагностическом центре в лаборатории, руководимой Т.А.Басалгиной, для диагностики ферохромацитомы – рака надпочечников – регулярно проводят измерения катехоламинов в суточной моче методом ВЭЖХ с амперометрическим детектированием. Проведено более 12 тыс. анализов. Также регулярно проводятся анализы катехоламинов методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором в биохимической лаборатории Российского кардиологического научно-производственного комплекса (зав. лаб., д.м.н. проф. В.Н.Титов).

Гомоцистеин определяется только в некоторых частных медицинских центрах. Клинические анализы маркеров окислительного стресса в медицинских учреждениях не проводятся, некоторые маркеры определяются только в исследовательских целях.

Изучение окислительного стресса и связь его с разными заболеваниями, определение маркеров окислительного стресса, антиоксидантная терапия для подавления окислительного стресса – это актуальные научные медицинские темы. В ближайшие годы следует ожидать новых достижений в этих направлениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Яшин Я., Веденин А., Яшин А.** 60 лет хроматографическому приборостроению // Аналитика. 2016. №2. С. 84–98.
2. **Яшин А.Я.** Амперометрическое детектирование в ВЭЖХ и проточно-инжекционных системах. Обзор // Зав.Лаб. 2012. Т. 78. №2. С. 4–15.
3. **Rozet E., Morello R., Lecomte F., Martin G.B., Chiap P., Crommen J., Boos K.S., Hubert Ph.** Performances of a multidimensional on-line SPE-LC-ECD method for the determination of three major catecholamines in native human urine: Validation, risk and uncertainty assessments // Journal of Chromatography B. 2006. V. 844. P. 251–260.
4. **Jing F.-C., Chen H., Li C.-L.** Rapid Determination of Dopamine and Its Metabolites During in vivo Cerebral Microdialysis by Routine High Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection // Biomedical and Environmental Sciences. 2007. V. 20. P. 317–320.
5. **Głód B.K., Stańczak K.I., Woźniak A., Pakszys W.** Determination of a catecholamines and the total antioxidant potential of blood plasma by use of an improved RPHPLC-ED assay // Acta Chromatographica. 2004. V. 14. P. 142–148.
6. **Patel B.A., Arundell M., Parker K.H., Yeoman M.S., O'Hare D.** Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // Journal of Chromatography B. 2005. V. 818. P. 269–276.
7. **Карцова А.А., Сидорова А.А., Казаков В.А., Бессонова Е.А., Яшин А.Я.** Определение катехоламинов методом капиллярного электрофореза и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией // Журнал аналитической химии. 2004. Т. 59. №8. С. 826–831.
8. **Karimi M., Carl J.L., Loftin S., Perlmutter J.S.** Modified high-performance liquid chromatography with electrochemical detection method for plasma measurement of levodopa, 3-O-methyldopa, dopamine, carbidopa and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid // Journal of Chromatography B. 2006. V. 836. P. 120–123.
9. **Mathien P., Greffe J., Philip T., Chanvin F.** Using HPLC in early detection of neuroblastoma. Mass screening for childhood cancer // Peak. 1991. №3. P. 10–11.
10. **Parrott S., Lambos-Senas L., Sentenac S., Denoroy L., Renaud B.** Highly sensitive assay for the measurement of serotonin in microdialysates using capillary high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // Journal of Chromatography B. 2007. V. 850. P. 303–309.
11. **Hubbard K.E., Wells A., Owens T., Tagen M., Fraga C.H., Stewart C.F.** Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection // Biomedical chromatography. 2010. V. 24. P. 626–631.
12. **Lee M.-S., Cheng F.-C.** Determination of Plasma Serotonin and 5-Hydroxyindoleacetic Acid in Healthy Subjects and Cancer Patients // Clinical Chemistry. 2000. V. 46. P. 422–423.
13. **Agui L., Pena-Farfal C., Yanez-Sedeno P., Pingarron J.M.** Electrochemical determination of homocysteine at a

gold nanoparticle-modified electrode // Talanta. 2007. V. 72. P. 412–420.

14. **Малинка М.К., Полуэктова М.В., Яшин А.Я** Определение гомоцистеина в плазме методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7. Вып. 1. С. 60–65.
15. **Hiraku Y.; Murata M., Kawanishi S.** Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay // Biochim. Biophys. Acta 2002. 1570. 47–52.
16. **White P.C., Lawrence N.S., Davis J., Compton R.G.** Electrochemical determination of thiols-a perspective // Electroanalysis. 2002. V. 14. P. 89–98.
17. **Petrlova J. Mikelova R., Stejskal K., Kleckerova A., Zitka O., Petrek J., Havel L., Zehnalek J., Adam V., Trnkova L.** Simultaneous determination of eight biologically active thiol compounds using gradient elution-liquid chromatography with Coul-Array detection // J. Sep. Sci. 2006. № 29. P. 1166–1173.
18. **Ashfag S., Abramson J. L., Jones D.P., Rhodes S.D.** et al. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults // J. Am. Coll.Cardiol. 2006. V. 47. P. 1005–1007.
19. **Яшин Я.И., Яшин А.Я.** ВЭЖХ маркеров окислительного стресса // Аналитика. 2011. № 1. С. 34–43.
20. **Яшин Я.И., Яшин А.Я., Черноусова Н.И., Федина П.А.** Диагностика окислительного стресса – предшественника опасных болезней и преждевременного старения и антиоксидантная терапия // В кн.: "Anti-age medicine: наука оставаться молодым" / Колл. ав. под ред. А.И.Труханова. М.: Асвомед, 2012. С. 455–489.
21. **Spadaro A., Bousquet E., Santagati N.A., Vittorio F., Ronsisvalle G.** Simple analysis of glutathione in human colon carcinoma cells and epidermoid human larynx carcinoma cells by HPLC with electrochemical detection // Chromatographia. 2005. 62. 11–15.
22. **Park H.J., Mah E., Bruno R.S.** Validation of high-performance liquid chromatography-boron-doped diamond detection for assessing hepatic glutathione redox status // Anal. Biochem. 2010. 407. 151–159.
23. **Forman H.J., Zhang H., Rinna A.** Glutathione. Overview of its protective roles , measurement and biosynthesis // Mol. Aspects Med. 2009. V. 30. P. 1–12.
24. **Revelo I.A., Piedate J.A.P., Oliveira-Brett A.M.** Development of an HPLC method with electrochemical detection of femtomoles of 8-0xo-7,8-dihidroguanine and 8-oxo-7,8-dihidroguanosine in the presence of uric acid // Talanta. 2004. V. 63. P. 323–331.
25. **Kasai H.** A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a HPLC-electrochemical detector system // J. Radiat. Res. (Tokyo). 2003. V. 44. P. 185–189.
26. **Domiyan A.M., Peraica M.** Determination of 8-hydroxi-2-deoxyguanosine in urine using HPLC with electrochemical detection // Archives of industrial hygiene and toxicology. 2008. V. 59. P. 277–282.
27. **Есипов Д.С., Сидоренко Е.В., Есипова О.В., Горбачева Т.А., Невредимова Т.С., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П.** Определение отношения 8-оксо-2-дезоксигуанозина к 2-дезоксигуанозину в ДНК с помощью ВЭЖХ с амперометрической детекцией // Вестник МИТХТ. 2010. Т. 5. С. 62–68.
28. **Williamson K.S., Hensley K., Floyd R.A.** HPLC with electrochemical detection analysis of 3-nitrotyrosine in human plasma. In Methods in biological oxidative stress / Ed. Hensley K. // Humana Press. 2003. P. 151–160.
29. **Acworth I.N., Ullucci P.A., Gamache P.H.** Determination of oxidized and reduced COQ10 and COQ9 in human plasma-serum HPLC-ECD. In Advanced protocols in oxidative stress / Ed. D.Armstrong. N.Y. // Humana press, 2008.
30. **Khan A., Khan M., Igbal Z., Ahmad L., Shah Y., Watson D.S.** Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-ECD using liquid-liquid and solid-phase extraction: Method development, validation and optimization of experimental parameters // Journal of Chromatography B. 2010. V. 878. P. 2782–2788.
31. **Khan A., Khan M.I., Iqbal Z., Shah Y., Ahmad L.** et al. A new HPLC method for the simultaneous determination of ascorbic acid and aminothiols in human plasma and erythrocytes using electrochemical detection // Talanta. 2011. V. 84. P. 789–801.
32. **Roy S., Venojarvi M., Khanna S., Sen C.K.** Simultaneous detection of tocopherols and tocotrienols in biological samples using HPLC-coulometric electrode array // Methods ensymol. 2002. V. 352. P. 326–332.
33. **Yamada H., Yoshizawa H., Hayase T.** Sensitive determination method of estradiol in plasma using HPLC with electrochemical detection // Journal of Chromatography B. 2002. V. 775. P. 209–213.
34. **Mashayekhi S.O., Ghandforoush-Sattari M., Hain R.D.W.** Rapid and sensitive quantitation of morphine using HPLC with electrochemical

detection. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2008. V. 33. P. 419–427.

35. **Backofen U., Matysik F.M., Lunte C.E.** Determination of cannabinoids in hair with electrochemical detection // Journal of Chromatography A. 2002. V. 942. P. 259–269.
36. **Chinami C., Giuliani V., Menarini A.** et al. Electrochemical detection of tobramycin or gentamicin according to the European Pharmacopoeia analytical method // Journal of Chromatography A. 2007. V. 1139. P. 53–56.
37. **Catlow J.T., Barton R.D., Clements M., Gillespie T.A., Goodwin M., Swanson S.P.** Analysis of olanzapine in human plasma utilizing reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1995. V. 668. P. 85–90.
38. **Prabakar B.J.R., Narayanan S.S.** Amperometric determination of paracetomol by a surface modified cobalt hexacyanoferrate graphite wax composite electrode // Talanta. 2007. V. 72. P. 1818–1827.
39. **Blazewicz A., Orlicz-szczesna G., Szczesny P., Prystupa A., Grzywa-Celinska A., Trojnor M.** A comparative analytical assessment of iodides in healthy and pathological human thyroids based on IC-PAD method preceded by microwave digestion // Journal of Chromatography B. 2011. V. 879. P. 573–578.
40. **Hojo K., Hakamata H., Ito A., Kotani A., Furukawa C.** Determination of total cholesterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // Journal of Chromatography A. 2007. V. 1166. P. 135–141.
41. **Chin-Chen M.-L., Rambla-Alegre A., Durgavanshi A., Bose D., Esteve-Romero J.** Rapid and sensitive determination of nicotine in formulations and biological fluid using micellar liquid chromatography with electrochemical detection // Journal of Chromatography B. 2010. V. 878. P. 2397–2402.
42. **Sim H.-J., Jeong J.-S., Kwon H.-J., Kong T.H.** et al. HPLC with pulsed amperometric detection for sorbitol as a biomarker for diabetic neuropathy // Journal of Chromatography B. 2009. V. 877. P. 1607–1611.
43. **Bolarinwa A., Linseisen J.** Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection // Journal of Chromatography B. 2005. V. 823. P. 143–151.