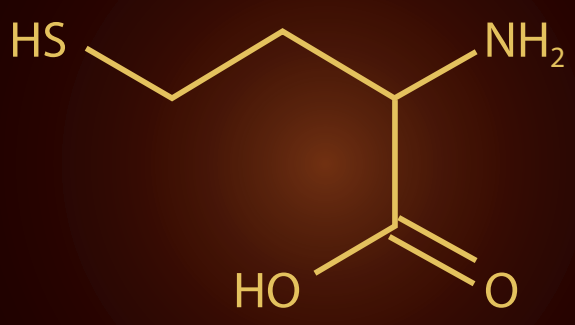
А.А. КУБАТИЕВ
А.В. ИВАНОВ
Б.П. ЛУЗЯНИН

АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА



НАУКА

Ц ЧЧЧ

ηqddγeγ bƎ dəqƎbγsə ɹ ɛɔɹɑɓɔγ ɟqddγqγè

УДК 616
ББК 28.707
К88

Рецензенты:
член-корреспондент РАН В.С. РЕПИН
академик РАН В.А. ЮРКИВ

Кубатиев А.А., Иванов А.В., Лузянин Б.П.

Аналитические методы исследования гомоцистеина / ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии М. : Наука, 2016. – 172 с. – ISBN 978-5-02-039214-4.

В монографии наряду с описанием метаболизма гомоцистеина, «редокс-статуса» тиолов, вопросов подготовки и хранения проб представлен материал по количественному определению гомоцистеина и других аминотиолов. Обсуждаются возможности применения различных реагентов с целью повышения чувствительности детектирования аминотиолов и оптимизации процесса их разделения. Работа содержит обзор опубликованных за последние десятилетия отечественных и зарубежных исследований по инструментальным методам анализа аминотиолов с использованием капиллярного электрофореза, высокоэффективной жидкостной хроматографии и применением различных видов детектирования, включая масс-спектрометрическое, флуорометрическое и УФ-детектирование.

Для биохимиков, токсикологов, врачей санитарно-эпидемиологической службы и специалистов клинических лабораторий.

ISBN 978-5-02-039214-4

© Кубатиев А.А., Иванов А.В., Лузянин Б.П., 2016
© ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 2016
© ФГУП Издательство «Наука», 2016

ηqddγeγ bƎ dəqƎbγsə ɹ ɛɔɹɑɓɔγ ɟqddγqγè

ɳqddɣɐʏ bƑ dɐdƑbʏɜɒ ɟ ɛɔɑbɔʏ ɟqddʏɑɣè

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2MEA	2-меркаптоэтиламин
2MC	2-метилцистеин
4-MSA	4-малеимидилсалициловая кислота
ANM	анилиннафтилмалеимид
ARM	анилинфенилмалеимид
ABD-F	4-аминосульфонил-7-фтор-2,1,3-бензоксидиазол
AcABD-F	4-(N-ацетиламиносульфонил)-7-фтор-2,1,3-бензоксидиазол
BIPM	N-[4-(2-бензимидазолил)фенил]-малеимид
bHcy	связанный гомоцистеин
CMQTB	2-хлоро-1-метилхинолинтетрафторборат
CMPI	2-хлор-1-метилпиридин иодид
CSF	спинномозговая жидкость
Cys	цистеин
Cysta	цистатионин
Cys-Gly	цистеинилглицин
CV	коэффициент вариации
DTTI	дитиотреитол
DTE	дитиоэритриол
DTDNA	6,6’-дитиодиникотиновая кислота
DTNBA	5,5’-дитио-бис(2-нитробензойная кислота)
DMANSC	5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорид
DAM	диметиламинофенилмалеимид
dPA	d-пеницилламин
DBPM	N-[4-(6-диметиламино-2-бензофуранил)фенил] малеимид
DTDP	4,4’-дитиодипиридин
DACM	N-(7-диметиламино-4-метил-2-оксо-3-хрометил) малеимид
DBD-F	4’-(N,N-диметиламиносульфонил)-7-фтор-2,1,3-бензоксидиазол
EDTA	калиевая/натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

ɳqddɣɐʏ bƑ dɐdƑbʏɜɒ ɟ ɛɔɑbɔʏ ɟqddʏɑɣè

EOF	электро-осмотический поток (ЭОП)
FITC	флуоресцеинизотиоцианат
FM	флуоресцеин-5-малеимид
FPIA	флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ
GC	газовая хроматография (ГХ)
GITC	2,3,4,6-тетра-О-ацето-β-D-глюкопиранозил изотиоцианат
GSH	глутатион
Glu-Cys	глутамилцистеин
Hcy	гомоцистеин
ITC	изотиоцианат
IAF	иодоацетаминофлуоресцеин
MAT	метионинаденозинтрансфераза
MCE	меркаптоэтанол
MeCys	метилцистеин
MEKC	мицеллярный капиллярный электрофорез
Met	метионин
mBrB	монобромбиман
mBrTMAB	монобромтриметиламинобиман
MPA	3-меркаптопропионовая кислота
MPG	N-(2-меркаптопропионил)глицин
MS	метионинсинтаза
MT	метилтрансфераза
MTBSTFA	N-метил-N-(трет-бутил-диметилсилил)трифтор-ацетамид
MTHFR	метилентетрагидрофолатредуктаза
NA-Cys	N-ацетилцистеин
NDA	2,3-нафталиндикарбоксиальдегид
NEM	N-этилмалеимид
NAM	N-(9-акридинил)малеимид
NSHBA	2-нитро-5-сульфгидрилбензойная кислота
NMDG	N-метил-D-глюкамин (меглумин)
NPM	N-(1-пиринил)малеимид
NG	нингидрин
OPA	О-фталальдегид
oxHcy	окисленный гомоцистеин
PBS	фосфатно-солевой буфер
rHcy	восстановленный гомоцистеин
SAH	S-аденозилгомоцистеин
SAM	S-аденозилметионин
SSA	сульфосалициловая кислота

SBD-F	аммониум – 7-фтор-2,1,3-бензоксидиазол-4-сульфонат
SAMSA	флуоресцеин-5((2-(и 3)-S-(ацетилмеркапто)сукцноил) амино)флуоресцеин
TBP	три-n-бутилфосфин
TCEP	трис-(2-карбоксиэтил)фосфин
TEA	триэтиламин
TFA	трифторуксусная кислота
TPP	трифенилфосфин
TcAcABD	4(N-трихлорацетиламиносульфонил)-7-фтор-2,1,3-бензоксадиазол
TCAA	трихлоруксусная кислота
TCDI	1,1-тиокарбонилдиимидазол
tHcy	общий гомоцистеин
АТФ	аденозинтрифосфат
АФК	активные формы кислорода
БГМТ	бетаин-гомоцистеин метилтрансфераза
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГГЦ	гипергомоцистеинемия
ГМК	гладкомышечные клетки
ДГФК	дигидрофолиевая кислота
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
ЛПНП	липопротеины низкой плотности
К(З)Э	капиллярный (зонный) электрофорез
(Л)ФД	(лазерный) флюоресцентный детектор
МС	масс-спектрометрия
НАДФ	никотинамиддинуклеотидфосфат
ТГФ	тетрагидрофолат
ТЛ	тиолактон гомоцистеина
УФ	ультрафиолет(овый)
ФК	фолиевая кислота
ХПН	хроническая почечная недостаточность
ЭХД	электрохимический детектор

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений 3

ВВЕДЕНИЕ 6

Часть I
АМИНОТИОЛЫ В ОРГАНИЗМЕ

Глава 1
БИОХИМИЯ АМИНОТИОЛОВ

1.1. Метаболизм гомоцистеина и его регуляция..... 8
1.2. Химические свойства SH-групп тиолов..... 15
1.3. Аминотиолы и антиоксидантная защита организма 16
1.4. Гомоцистеин в плазме крови 18

Глава 2
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ АНАЛИЗА АМИНОТИОЛОВ

2.1. Общее содержание аминотиолов..... 23
2.2. Свободные и связанные формы аминотиолов 28
2.3. Оценка «редокс-статуса» аминотиолов..... 30

Глава 3
ФРАКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ АМИНОТИОЛОВ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

3.1. Фракции аминотиолов в нормальной плазме 31
3.2. Аминотиолы плазмы при гипергомоцистеинемии 31
3.3. «Редокс-статус» тиолов плазмы при сердечно-сосудистых заболеваниях 33
3.4. «Редокс-статус» тиолов плазмы при других заболеваниях (почечная недостаточность, СПИД) 37

ɳqddɣɐʎ bƐ dɐdƐbʎɜɐ ɟ ɛɔɑbɔʎ Jqddʎqɣè

Часть II
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОТИОЛОВ

Глава 4
МЕТОДЫ ПРЯМОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА И ДРУГИХ АМИНОТИОЛОВ
4.1. Масс-спектрометрия 46
4.2. Электрохимическое детектирование 54

Глава 5
МЕТОДЫ НЕПРЯМОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОТИОЛОВ С РАЗДЕЛЕНИЕМ АНАЛИТОВ В ЖИДКОЙ ФАЗЕ 58
5.1. Основные цели дериватизации и возможности ее осуществления 58
5.2. Реагенты для УФ-детектирования 59
5.2.1. Дисульфиды (DTNBA, DTDP) 59
5.2.2. Тиокарбонилдиимидазол (TCDI) 68
5.2.3. Галогениды (CMQTB, CMPI, BCPB) 73
5.3. Реагенты для флуоресцентного детектирования 77
5.3.1. N-замещенные малеимиды 77
5.3.2. Биманы 81
5.3.3. Дансилазиридин 91
5.3.4. Галогеносульфонилбензофуразаны 91
5.3.5. О-фталевый (OPA) и нафталеновый (NDA) диальдегиды 104
5.3.6. Производные флуоресцеина 105
5.4. Дериватизация для электрохимического детектирования 111
5.5. Реагенты для МС-детектирования 112
5.6. Аминокислотный анализатор 117

Глава 6
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОТИОЛОВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ 119

Глава 7
МЕТОДЫ НЕПРЯМОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОТИОЛОВ БЕЗ РАЗДЕЛЕНИЯ 125
7.1. Колориметрическое детектирование 125
7.2. Иммуноферментный анализ 128

Глава 8
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА И S-АДЕНОЗИЛГОМОЦИСТЕИНА 130

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 140

ЛИТЕРАТУРА 142

ɳqddɣɐʎ bƐ dɐdƐbʎɜɐ ɟ ɛɔɑbɔʎ Jqddʎqɣè

ЦЧФЧЬЭЧ ЬЕ ФЭЦЕЬУЗЭ Ф ЭСЧЬСЧ ЖЧФФЧЧЖЭ

Научное издание

Кубатиев Аслан Амирханович
Иванов Александр Владимирович
Лузянин Борис Петрович

АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА

Утверждено к печати
Ученым советом ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»

Редактор *Л.В. Филиппова*
Художник *Ю.И. Духовская*
Художественный редактор *В.Ю. Яковлев*
Технический редактор *З.Б. Павлюк*
Корректоры *Р.В. Молоканова, Е.Л. Сысоева,*
Т.А. Печко

ЦЧФЧЬЭЧ ЬЕ ФЭЦЕЬУЗЭ Ф ЭСЧЬСЧ ЖЧФФЧЧЖЭ

Подписано к печати 20.02.2016.
Формат 60 × 90$^{1}/_{16}$. Гарнитура Таймс.
Печать офсетная
Усл.печ.л. 11,0. Усл.кр.-отт. 11,5. Уч.-изд.л. 12,6
Тираж 1000 экз. Тип. зак.

ФГУП Издательство «Наука»
117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

E-mail: secret@naukaran.ru
www.naukaran.ru

ФГУП Издательство «Наука»
(Типография «Наука»)
121099, Москва, Шубинский пер., 6

ɥʇqdqʌɐʎ bƐ ɗɐdƐgƐʞɐs ɟ ɛsʌqƐʇɐɔɔʎ ɾɟqddʌɐʎè

ɥʇqdqʌɐʎ bƐ ɗɐdƐgƐʞɐs ɟ ɛsʌqƐʇɐɔɔʎ ɾɟqddʌɐʎè