

Определение гомоцистеина и тиолсодержащих соединений с использованием гетероциклических дисульфидов

***А.А. Щербатых, О.И. Аскалепова¹, И.А. Эстрин²**

¹Южный федеральный университет, химический факультет, Российская Федерация, 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Р. Зорге, 7
²Ростовский государственный университет путей и сообщения, Российская Федерация, 344038, г. Ростов-на-Дону, пл. Ростовского Стрелкового Полка Народного Ополчения, 2

*Адрес для переписки: Щербатых Александр Андреевич, e-mail: sherbatyh@sfnedu.ru

Поступила в редакцию 3 июня 2022 г, после доработки – 13 октября 2022 г.

Биологически активные низкомолекулярные аминотиолы, такие как гомоцистеин, характеризуются малоинтенсивным поглощением в ультрафиолетовом и видимом диапазоне излучения, поэтому для их анализа в большинстве случаев применяют дериватизацию. Дериватирующий агент взаимодействует с тиольной группой аналита с образованием соединения, интенсивно поглощающего в длинноволновой области спектра. В качестве дериватирующих агентов часто применяются гетероциклические дисульфиды. Методики анализа с их использованием, как правило, отличаются простотой и точностью. Однако широко применяемые в аналитической практике дисульфиды, такие как дитиодипиридин и 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), имеют ряд недостатков, к числу которых относятся узкий диапазон значений pH, при которых дисульфиды могут быть использованы, а также низкая контрастность аналитической реакции. Поэтому поиск новых аналитических агентов продолжается. Для определения гомоцистеина использованы дисульфиды 2,2'-дитиобис[бензоксазол] и 8,8'-дитиобис[хинолин]. Изучена кинетика реакции между гомоцистеином и предложенными дисульфидами. Исследовано влияние pH на изменение оптической плотности в процессе протекания аналитической реакции. Разработаны точные и чувствительные методики определения гомоцистеина спектрофотометрическим методом, методами капиллярного электрофореза (КЭ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и кинетическим методом со спектрофотометрическим детектированием (предел обнаружения гомоцистеина $1.1 \cdot 10^{-6}$ - $7.8 \cdot 10^{-6}$ М, относительное стандартное отклонение 1.5-4.6 %). Предложенные дисульфиды также были использованы при определении сульфгидрильных групп в образце человеческой урины. Результаты, полученные при использовании 2,2'-дитиобис[бензоксазола] и 8,8'-дитиобис[хинолина] и при использовании распространенного в аналитической практике 4,4'-дитиодипиридина, оказались близки, что указывает на применимость предложенных реагентов в анализе реальных объектов.

Ключевые слова: гомоцистеин, аминотиолы, 2,2'-дитиобис[бензоксазол], 8,8'-дитиобис[хинолин]

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2022, vol. 26, no. 3, pp. 212-221

DOI: 10.15826/analitika.2022.26.3.005

Analysis of homocysteine and thiol-containing compounds using the heterocyclic disulfides

***A.A. Shcherbatykh¹, O. I. Askalepova¹, I. A. Estrin²**

¹Southern Federal University, Department of Chemistry, Zorge St. 7, Rostov-on-Don, 344090, Russian Federation
²Rostov State Transport University, Rostovskogo Strelkovogo Polka Narodnogo Opolcheniya Sq. 2, Rostov-on-Don, 344038, Russian Federation

*Corresponding author: Aleksandr A. Shcherbatykh, e-mail: sherbatyh@sfnedu.ru

Submitted 3 June 2022, received in revised form 13 October 2022

Biological low-molecular aminothiols, such as homocysteine, are characterized by the weak absorption in the UV – visible range. Therefore, aminothiols analysis requires using thiol-specific chemosensors or derivatization procedure. Heterocyclic disulfides belong to a large group of derivatizing agents. However, the disulfides widely used in the analytical practice, such as 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), have several disadvantages: limited acceptable pH range, low sensitivity, susceptibility to hydrolysis. Hence, the search for the effective derivatizing agents continues. In the current work, 2,2'-dithiobis[benzoxazole] and 8,8'-dithiobis-quinoline disulfides were used for the analysis of homocysteine. Precise and sensitive methods (homocysteine detection limit in the range of $1.1 \cdot 10^{-6}$ – $7.8 \cdot 10^{-6}$ M, relative standard deviation in the range of 1.5–4.6%) for the homocysteine determination have been developed, including spectrophotometric method, capillary electrophoresis (CE), high-performance liquid chromatography (HPLC) and kinetic method with the spectrophotometric detection. The proposed disulfides have also been successfully used in the analysis of sulfhydryl groups content in the sample of human urine.

Keywords: homocysteine, aminothiols, 2,2'-dithiobis[benzoxazole], 8,8'-dithiobis-quinoline.

ВВЕДЕНИЕ

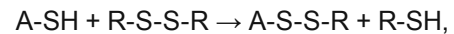
Биологически активные тиолы играют важную роль в физиологических процессах, протекающих в организме человека. К таким соединениям относятся как низкомолекулярные вещества (аминотиолы), так и биополимеры (белки). Например, среди низкомолекулярных аминотиолов можно выделить цистеин, глутатион и гомоцистеин [1–4]. Благодаря наличию свободной сульфгидрильной группы [5] они обладают высокой реакционной активностью, являясь сильными антиоксидантами и незаменимыми компонентами защитной системы организма против оксидативного стресса и патогенных процессов [6]. Повышение уровня концентрации цистеина, глутатиона и гомоцистеина в клетках служит признаком нарушений в протекании биохимических процессов и может свидетельствовать о развитии таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера, рак, болезнь Паркинсона, псориаз и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) [7].

Помимо низкомолекулярных соединений, важную роль в организме играют серосодержащие белки, такие как альбумины, участвующие в поддержании коллоидно-осмотического давления плазмы [8] или карбоксипептидазы, катализирующие гидролиз пептидных связей С-концевых аминокислотных остатков [9]. Их молекулы содержат цистеиновые фрагменты, включающие серосодержащие функциональные группы, как в форме дисульфидных связей, так и в форме свободных сульфгидрильных групп [2, 10].

Разработано большое количество методик, позволяющих определить как концентрацию индивидуальных биотиолов, так и общее содержание сульфгидрильных групп (SH-групп). В первом случае цистеин, глутатион и гомоцистеин определяют методами спектрофотометрии [11], флуориметрии [12], высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [13] и капиллярного электрофореза (КЭ) [14, 15] в таких объектах, как физиологические жидкости и ткани [16, 17], лекарственные препараты и биологические добавки [18], а также *in vitro* [6, 19]. В случае анализа SH-групп, определяют их концентрацию в физиологических жидкостях или тканях [20–22], а также их содержание в молекулах

белков [23–25]. Поскольку аналиты характеризуются малоинтенсивным поглощением в ультрафиолетовом и видимом диапазоне излучения, то в большинстве методов применяется дериватизация с образованием хромогенных производных определяемых веществ.

В особую группу можно выделить методы, основанные на взаимодействии тиолсодержащего вещества с гетероциклическим дисульфидом. Реакция имеет вид:



где A-SH – анализируемый тиол, R-S-S-R – дисульфидный агент, R-SH – образующийся сульфид, A-S-S-R – смешанный дисульфид.

Наиболее распространенными в аналитической практике дисульфидами являются 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойная кислота) (реактив Эллмана), 2,2'-дителиодипиридин и 4,4'-дителиодипиридин (2,2'-ДТДП и 4,4'-ДТДП, соответственно). При этом методики, разработанные для определения цистеина, глутатиона и гомоцистеина, основаны на детектировании смешанного дисульфида (дериватирующий агент – 2,2'-ДТДП): методом КЭ авторы определяют цистеин, глутатион и гомоцистеин в образцах урины и плазмы крови [14, 26]. Наоборот, при определении общего содержания SH-групп, детектируют образующийся сульфид. Так, авторы анализируют наличие сульфгидрильных групп в бычьем сывороточном альбумине, папаине, карбоксипептидазе Y, а также в образцах урины [21, 27] (дериватирующие агенты – реактив Эллмана и 4,4'-ДТДП).

Несмотря на широкую распространенность, рассмотренные дисульфидные агенты имеют ряд недостатков. Например, реактив Эллмана применим в узком диапазоне pH; также из-за относительно низкой интенсивности поглощения образующегося сульфида, методики с использованием реактива Эллмана обладают низкой чувствительностью [23]. Применение 2,2'-ДТДП возможно только в методе капиллярного электрофореза: для разделения смешанных дисульфидов используют он-лайн дериватизацию в капилляре. При этом смешанные дисульфиды поглощают в коротковолновой области (200–250 нм, [14]), поэтому для надежного определения необходим диодно-матричный детектор. С другой стороны, образующийся сульфид (2-тиопи-

ридон) обладает малоинтенсивным поглощением ($\epsilon_{346\text{ нм}} = 7,04 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ [22]), что делает 2,2'-ДТДП неэффективным при определении общего содержания SH-групп, не позволяя применять более простые методы без разделения (такие, например, как кинетический метод со спектрофотометрическим детектированием [6, 28]).

Активно ведется поиск новых эффективных дисульфидных агентов. Например, авторами [29] были предложены гетероциклические дисульфиды 2,2'-дитиобис[бензоксазол] и 8,8'-дитиобис[хинолин], которые были успешно применены при анализе цистеина, глутатиона, а также бычьего сывороточного альбумина.

Целью данной работы было применение 2,2'-дитиобис[бензоксазола] и 8,8'-дитиобис[хинолина] для определения гомоцистеина, а также установления содержания SH-групп в реальном образце (человеческой моче). Разработаны методики определения гомоцистеина методами спектрофотометрии, ВЭЖХ, КЭ и кинетическим методом со спектрофотометрическим детектированием.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4,4'-дитиодипиридин (98 %, Alfa Aesar, США; **4,4'-ДТДП**), 8-хинолинтиол (97 %, Sigma-Aldrich, США; **ХТ**), 2-меркаптобензоксазол (99 %, Acros Organics, США; **МБ**), L-гомоцистеин (98 %, Sigma-Aldrich, США; **Нсу**) были использованы без дополнительной очистки. 2,2'-дитиобис[бензоксазол] (**ДТБ**) и 8,8'-дитиобис[хинолин] (**ДТХ**) были синтезированы, как описано ранее [30, 31]. Ацетонитрил для ВЭЖХ производства «Криохром» (Россия) применяли без дополнительной очистки.

Точные навески препаратов взвешивали на весах МВ 210-А («Сартогосм», Россия) с погрешностью измерения 0.0001 г. Электронные спектры поглощения соединений и значения оптической плотности записывали на спектрофотометре Cary 50, снабженном Пельтье-термостатом (Varian, США) в кварцевых кюветках с толщиной поглощающего слоя 1.0 см в диапазоне длин волн 210–750 нм. Значения pH растворов измеряли при помощи иономера pH-150М («Теплоприбор», Россия) с индикаторным стеклянным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения.

Электрофоретическое определение проводили, используя систему капиллярного зонного электрофореза «Капель-103Р» с переменной полярностью и УФ-детектором. Рабочее напряжение 20 кВ. Разделение проводили на немодифицированном кварцевом капилляре с внутренним диаметром 75 мкм и длиной 60 см (эффективная длина 50 см). Фоновый электролит – додецилсульфат натрия (50 мМ) в 20 мМ фосфатном буферном растворе (pH 7.5). Перед анализом капилляр последовательно промывали по 10 мин 1 М HCl, водой, 0.5 М NaOH, водой и фоновым электролитом. Между экспериментами капилляр промывали 3 мин фоновым

электролитом. Пробу вводили гидродинамическим способом при давлении 30 мбар в течение 5 с.

Анализ методом ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Стайер со спектрофотометрическим детектором UVV 104 М, дегазатором DG 18, термостатом колонок TS 10 и с аналитической колонкой Phenomenex Luna 5 μm C18(2) 100 Å (США) с неподвижной фазой – октадецилсилильными группами (С18), химически связанными с силикагелем (250 x 4.6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза – смесь ацетонитрила с ацетатным буферным раствором (pH 4.8) в объемном соотношении 25 : 75; разделение проводили при скорости потока элюента 1 мл/мин. Режим элюирования – изократический.

Основной раствор Нсу ($5.0 \cdot 10^{-3}$ М) готовили растворением точной навески в бидистиллированной воде. Рабочие растворы необходимой концентрации готовили последовательным разбавлением основного раствора бидистиллированной водой.

Основные растворы ДТБ и ДТХ (0.1 М) готовили растворением точной навески в ацетонитриле. Рабочие растворы необходимой концентрации готовили последовательным разбавлением основного раствора бидистиллированной водой.

Буферные растворы (диапазон pH 3.0–9.0) готовили, добавляя к смеси 40 мМ борной, 40 мМ уксусной и 40 мМ фосфорной кислот раствор 0.20 М NaOH до нужного значения pH.

Для исследования изменения оптической плотности в процессе протекания аналитической реакции смешивали равные объемы растворов дисульфида и Нсу, разбавляли в два раза буферным раствором и через 20 мин регистрировали спектр поглощения. Конечная концентрация ДТБ в анализируемой смеси – $2.0 \cdot 10^{-5}$ М, ДТХ – $5.0 \cdot 10^{-5}$ М, Нсу – $2.0 \cdot 10^{-3}$ М, в контрольном опыте вместо Нсу использовали дистиллированную воду. Наблюдали изменение оптической плотности (ΔA) реакционной смеси относительно контрольного опыта (для ДТБ поглощение измеряли при 296 нм, для ДТХ – при 280 нм и 470 нм).

Для оценки кинетики аналитической реакции смешивали равные объемы растворов дисульфида и Нсу эквимольных концентраций (конечные значения которых составляли $2.0 \cdot 10^{-4}$ М для ДТБ и $5.0 \cdot 10^{-5}$ М для ДТХ), разбавляли в два раза буферным раствором и в течение 20 мин регистрировали спектры поглощения с интервалом 2 мин. О кинетике взаимодействия Нсу с дисульфидом судили по величине константы второго порядка, которую рассчитывали по формуле:

$$\frac{1}{c^0 - x} = kt + \frac{1}{c^0} \quad , \quad (1)$$

где c^0 – начальная концентрация компонентов реакции, М; x – координата реакции, М; t – время, мин; k – константа скорости, $\text{М}^{-1}\text{мин}^{-1}$.

Для получения градуировочных зависимостей при анализе гомоцистеина методами спектрофото-

метрии, а также ВЭЖХ и КЭ со спектрофотометрическим детектированием, смешивали равные объемы растворов дисульфида (конечные концентрации $2.0 \cdot 10^{-4}$ М для ДТБ и $5.0 \cdot 10^{-5}$ М для ДТХ) и Нсу, разбавляли смесь в два раза буферным раствором и через 20 мин регистрировали спектр поглощения, либо фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и вводили в ВЭЖХ хроматограф или установку КЭ.

Для определения Нсу кинетическим методом смешивали равные объемы растворов дисульфида (конечные концентрации $2.0 \cdot 10^{-4}$ М для ДТБ и $5.0 \cdot 10^{-5}$ М для ДТХ) и Нсу, разбавляли в два раза буферным раствором и в течение 20 мин регистрировали спектры поглощения с интервалом 2 мин. Кинетика взаимодействия ДТБ и ДТХ с Нсу при избыточной концентрации дисульфида описывается уравнением реакции псевдопервого порядка по реагирующим компонентам:

$$\ln \frac{C^0}{C^0 - X} = kt, \quad (2)$$

где C^0 – исходная концентрация дисульфида, М; X – координата реакции, t – время, мин; k – константа скорости, мин^{-1} .

Пробоподготовку образца урины проводили в соответствии с описанными методиками [22; 27]. К аликвоте урины (1 мл) добавляли 5 мл 0.02 М фосфатного буфера, затем разбавляли в два раза раствором дисульфида ($2.0 \cdot 10^{-4}$ М для ДТБ и $5.0 \cdot 10^{-5}$ М для ДТХ) и инкубировали в течение 20 мин при 37 °С. Реакционную смесь фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и вводили в ВЭЖХ хроматограф.

Параллельно проводили анализ при помощи 4,4'-ДТДП [22]: к аликвоте урины (1 мл) добавляли 4 мл $1.0 \cdot 10^{-3}$ М 4,4'-ДТДП и инкубировали смесь при 37 °С в течение 20 мин. Реакционную смесь фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и вводили в ВЭЖХ хроматограф.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор оптимальных значений pH для протекания реакции между дисульфидом и гомоцистеином

Взаимодействие между гомоцистеином и дисульфидом протекает согласно схеме.

Реакция сопровождается увеличением оптической плотности при 296 нм в случае ДТБ и при 280 нм и 470 нм в случае ДТХ (рис. 1).

Для эффективного применения дисульфида необходимо, чтобы аналитическая реакция была контрастной и протекала достаточно быстро. Для подбора оптимального значения pH, реакцию дисульфида с гомоцистеином проводили в диапазоне pH 3.0–9.0. В качестве критериев оценки влияния pH использовали два фактора – поглощение образующегося сульфида и скорость протекания реакции (оценивали константу второго порядка по формуле (1)). Результаты эксперимента представлены в табл. 1.

В исследованном диапазоне pH при использовании ДТБ величина ΔA больше, чем в случае ДТХ. Однако, в случае ДТХ детектирование возможно по двум длинам волн: 280 и 470 нм. Поэтому применение ДТХ предполагает наличие дополнительных преимуществ. Во-первых, существует возможность сопоставить результаты, полученные при детектировании при двух длинах волн; во-вторых – возможность в случае анализа *in vitro* выбрать длину волны 280 нм, чтобы обеспечить большую чувствительность, а в случае анализа сложного объекта, например, белка, выбрать более длинноволновую область (470 нм), что обеспечит большую селективность.

Из табл. 1 видно, что при pH 7.5, достигается наибольшее изменение оптической плотности при высокой скорости реакции. При разработке всех методик определения Нсу было использовано значение pH 7.5.

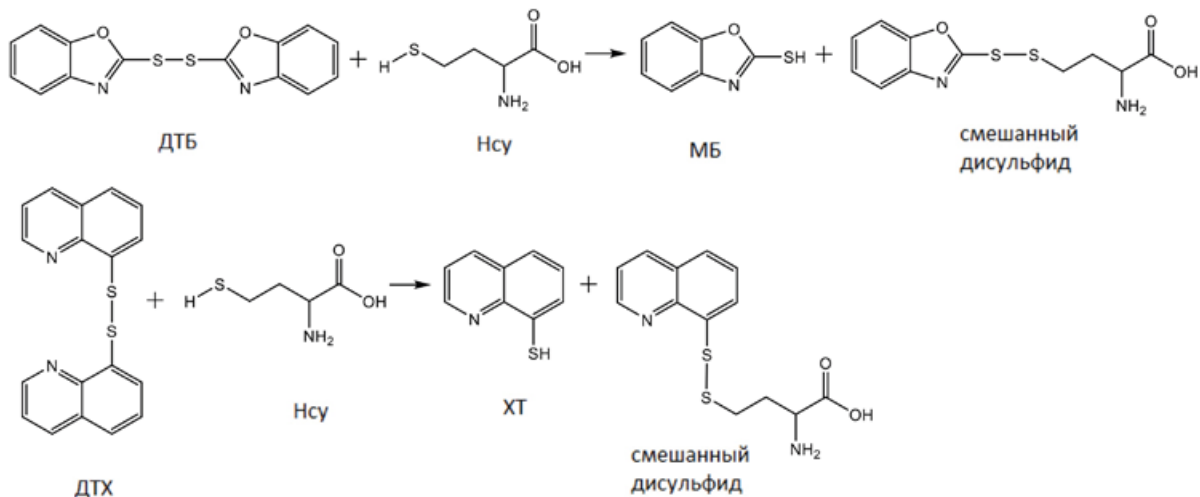


Схема. Реакции Нсу с дисульфидными агентами ДТБ и ДТХ.

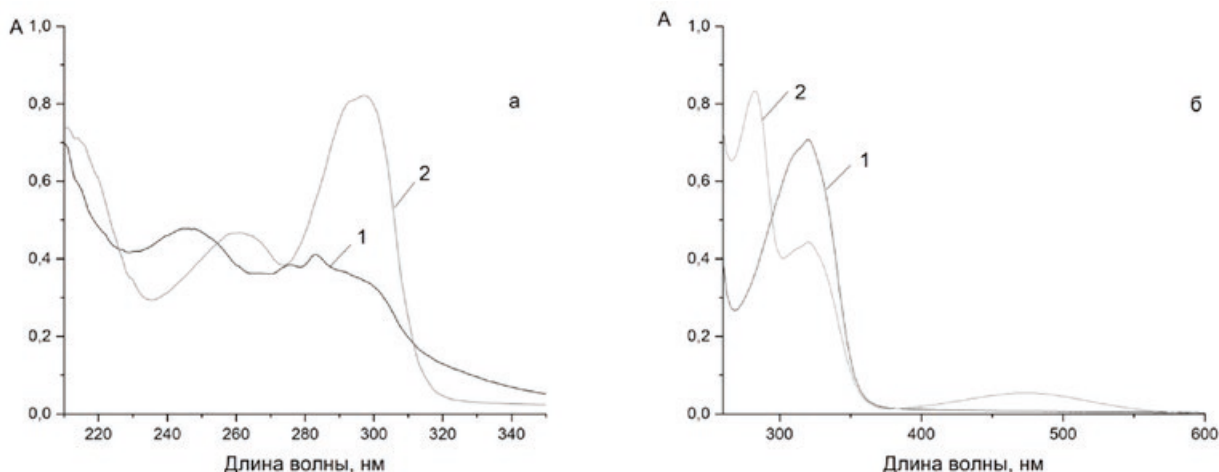


Рис. 1. Электронные спектры поглощения ДТБ ($2.0 \cdot 10^{-5}$ М, а) и ДТХ ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М, б) в отсутствие (1) и в присутствии (2) Нсу ($2.0 \cdot 10^{-3}$ М) при pH 7.5.

Fig. 1. Absorption spectra of 2,2'-dithiobis[benzoxazole] ($2.0 \cdot 10^{-5}$ M, a) and 8,8'-dithiobis-quinoline ($5.0 \cdot 10^{-5}$ M, b) in the absence of (1) and in the presence of (2) Hcy ($2.0 \cdot 10^{-3}$ M) at pH 7.5.

Таблица 1

Влияние pH среды на изменение оптической плотности и кинетику взаимодействия между Нсу и дисульфидом

Table 1

pH effect on the absorbance change and the kinetics of the interaction between Hcy and disulfide

pH	ДТБ		ДТХ		
	$\Delta A(297 \text{ nm})$	$k, \text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$	$\Delta A(280 \text{ nm})$	$\Delta A(470 \text{ nm})$	$k, \text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$
3.0	0.27	$4.52 \cdot 10^2$	0.06	0.04	$1.17 \cdot 10^2$
4.5	0.32	$5.12 \cdot 10^2$	0.16	0.04	$3.51 \cdot 10^2$
6.0	0.55	$5.88 \cdot 10^2$	0.29	0.06	$3.42 \cdot 10^2$
7.5	0.41	$8.41 \cdot 10^2$	0.35	0.27	$4.98 \cdot 10^2$
9.0	0.15	$4.11 \cdot 10^2$	0.05	0.05	$2.66 \cdot 10^2$

Примечание. Расчет константы второго порядка для ДТХ проводили с использованием данных, полученных при 470 нм.

Определение гомоцистеина методами спектрофотометрии, КЭ и ВЭЖХ

С использованием увеличения оптической плотности при 296 нм (ДТБ), 280 нм и 470 нм (ДТХ), которое происходит пропорционально увеличению концентрации гомоцистеина (рис. 2), получены градуировочные зависимости вида $(A - A_0) = kC(\text{Hcy}) + b$ (где A_0 и A – значения оптической плотности при 296 нм (ДТБ), 280 нм и 470 нм (ДТХ) в отсутствие и в присутствии гомоцистеина (в диапазоне концентраций $5.0 \cdot 10^{-6} - 2.0 \cdot 10^{-4}$ М), соответственно).

Однако в величину оптической плотности при 296 нм (ДТБ) и при 280 нм (ДТХ) вносит свой вклад не только образующийся сульфид, но и исходный дисульфид, который в этих областях спектра имеет ненулевое поглощение (см. рис. 1). Только детектирование при 470 нм (ДТХ) можно считать свободным от мешающего влияния поглощения непрореагировавшего дисульфида. Для снижения влияния исходного дисульфида при использовании ДТБ и ДТХ, возможно применение методов разделения – КЭ и ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. В случае ДТХ при 280

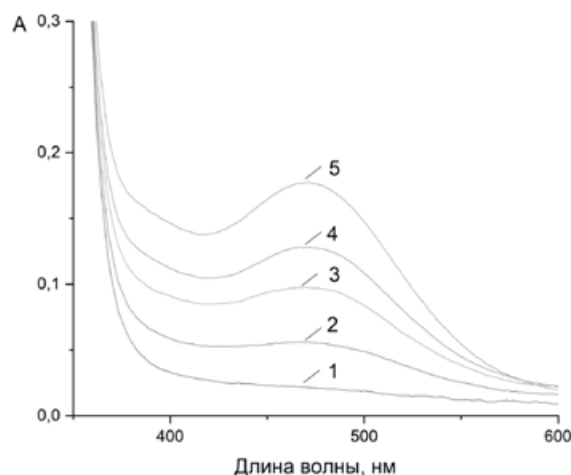


Рис. 2. Увеличение оптической плотности при 470 нм при смешивании ДТХ ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М) с Нсу, взятом в различных концентрациях: 0 (контрольный опыт, 1), $1.2 \cdot 10^{-5}$ (2), $2.5 \cdot 10^{-5}$ (3), $3.5 \cdot 10^{-5}$ (4) и $5.0 \cdot 10^{-5}$ М (5); реакцию проводили при pH 7.5.

Fig. 2. Absorbance increase at 470 nm when mixing 8,8'-dithiobis-quinoline ($5.0 \cdot 10^{-5}$ M) with Hcy (in the concentration range 0 – $5.0 \cdot 10^{-5}$ M) at pH 7.5; the arrow indicates the direction of absorbance change with Hcy concentration increase.

Таблица 2

Параметры градуировочных функций и характеристики методик определения Hcy

Table 2

Calibration functions and characteristics of Hcy determination methods

Метод	Дисульфид	Коэффициенты градуировочных зависимостей			Введено, М	Найдено, М	$\pm\Delta$, М	S_R , %	$C_{мин}$, М
		k	b	r					
Спектрофотометрический	ДТБ	$1.8 \cdot 10^4$	0.15	0.984	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{-6}$	1.5	$1.5 \cdot 10^{-6}$
	ДТХ (280 нм)	$1.3 \cdot 10^3$	0.27	0.991	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$2.2 \cdot 10^{-6}$	2.0	$2.1 \cdot 10^{-6}$
	ДТХ (470 нм)	$5.6 \cdot 10^2$	0.08	0.982	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$9.9 \cdot 10^{-6}$	$2.3 \cdot 10^{-6}$	2.2	$3.5 \cdot 10^{-6}$
КЭ	ДТБ	$9.2 \cdot 10^3$	85	0.971	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^{-6}$	3.0	$4.5 \cdot 10^{-6}$
	ДТХ (254 нм)	$7.1 \cdot 10^4$	0.21	0.969	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^{-5}$	$2.8 \cdot 10^{-6}$	4.6	$7.8 \cdot 10^{-6}$
ВЭЖХ	ДТБ	$1.5 \cdot 10^8$	291	0.995	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$9.8 \cdot 10^{-6}$	$1.7 \cdot 10^{-6}$	1.8	$1.9 \cdot 10^{-6}$
	ДТХ (280 нм)	$5.4 \cdot 10^7$	445	0.986	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$2.0 \cdot 10^{-6}$	1.9	$1.4 \cdot 10^{-6}$
	ДТХ (470 нм)	$1.1 \cdot 10^6$	2.2	0.998	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^{-5}$	$2.1 \cdot 10^{-6}$	2.0	$2.9 \cdot 10^{-6}$

Примечание. r – коэффициент корреляции, $\pm\Delta$ – показатель точности (границы погрешности), S_R – относительное стандартное отклонение, $C_{мин}$ – предел обнаружения; при анализе «Введено-найдено» проводилось по 6 параллельных определений.

нм чувствительность определения выше, чем при 470 нм (табл. 2).

При выбранных условиях разделения и детектирования на хроматограммах присутствует

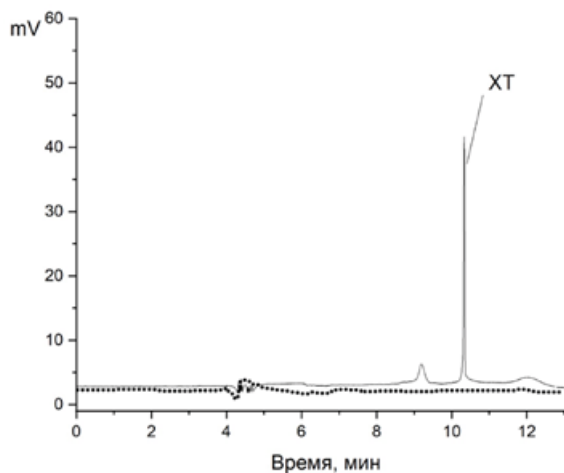


Рис. 3. ВЭЖХ хроматограмма образца урины в контрольном опыте (пунктирная линия) и при обработке $5.0 \cdot 10^{-5}$ М раствором ДТХ (сплошная линия) согласно процедуре, описанной в разделе «Экспериментальная часть»; детектирование проводили при 470 нм.

Fig. 3. HPLC chromatograms of the urine sample in the control experiment (a) and when treated with $5.0 \cdot 10^{-5}$ M 8,8'-dithiobis-quinoline solution (b) according to the procedure described in the "Experimental"; the separations were carried out on the C18 sorbent (250 x 4.6 mm, 5 μ m) at a flow rate of 1 ml/min in mixture acetonitrile – acetate buffer solution at pH 4.8 (25:75, v/v); detection was carried out at 470 nm.

симметричный пик (рис. 3), соответствующий образуемому сульфиду, при этом его площадь возрастает пропорционально росту концентрации Hcy. Получены градуировочные зависимости вида

$$(S - S_0) = kC(\text{Hcy}) + b,$$

(где S_0 и S – значения площади пика (mV·сек), соответствующего сульфиду при 296 нм (МБ), 280 нм и 470 нм (ХТ) на хроматограмме (электрофореграмме) в отсутствие и в присутствии гомоцистеина (в диапазоне концентраций в $5.0 \cdot 10^{-6}$ – $2.0 \cdot 10^{-4}$ М), соответственно).

Кинетическое определение

Поскольку цистеин и глутатион реагируют с ДТБ и ДТХ таким же образом, как и гомоцистеин, то совместное определение низкомолекулярных тиолов описанными методами (табл. 2) невозможно. Об этом свидетельствует также близость угловых коэффициентов градуировочных зависимостей, полученных для Hcy, с аналогичными коэффициентами в случае цистеина и глутатиона [29]. Таким образом, гомоцистеин может успешно применяться как стандарт при определении общего содержания SH-групп в реальных объектах.

С другой стороны, если рассматривать кинетику взаимодействия аминотиолов с ДТБ и ДТХ, то поведение Hcy в системе будет отличаться от поведения цистеина и глутатиона. Рассчитанные кинетические константы псевдопервого порядка для взаимодействия избытка дисульфида с Hcy использованы для построения градуировочных зависимостей вида $k = aC(\text{Hcy}) + b$, где k – кинетиче-

Таблица 3

Параметры градуировочных функций для кинетического метода определения цистеина, глутатиона и гомоцистеина

Table 3

Calibration functions for the kinetic method of cysteine, glutathione, and homocysteine determination

Аналит	Дисульфид	Коэффициенты градуировочных зависимостей			Введено, М	Найдено, М	С _{мин} , М
		a	b	r			
Гомоцистеин	ДТБ	51	$8.1 \cdot 10^{-3}$	0.989	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^{-6}$
	ДТХ	92	$7.5 \cdot 10^{-4}$	0.977	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$9.8 \cdot 10^{-6}$	$2.9 \cdot 10^{-6}$
Цистеин [29]	ДТБ	39	$1.3 \cdot 10^{-3}$	0.948	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$9.8 \cdot 10^{-6}$	$1.6 \cdot 10^{-6}$
	ДТХ	73	$3.0 \cdot 10^{-4}$	0.976	$1.0 \cdot 10^{-5}$	$9.2 \cdot 10^{-6}$	$4.0 \cdot 10^{-6}$
Глутатион [29]	ДТБ	11	$1.4 \cdot 10^{-3}$	0.994	$1.5 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-6}$
	ДТХ	0.68	$9.0 \cdot 10^{-4}$	0.996	$1.5 \cdot 10^{-5}$	$1.6 \cdot 10^{-5}$	$2.2 \cdot 10^{-6}$

Примечание. r – коэффициент корреляции, $C_{\text{мин}}$ – предел обнаружения; при анализе «Введено-найденно» проводилось по 6 параллельных определений.

ская константа псевдопервого порядка, рассчитанная по формуле (2), для реакции Нсу (в диапазоне концентраций $5.0 \cdot 10^{-6}$ – $2.0 \cdot 10^{-4}$ М) с избытком ДТБ или ДТХ). Параметры зависимостей сопоставлены с аналогичными коэффициентами для цистеина и глутатиона, представленными в литературе (табл. 3).

Очевидно, что стерический фактор оказывает влияние на кинетику рассматриваемого взаимодействия: трипептид глутатион реагирует с ДТБ и ДТХ медленнее по сравнению с аминокислотами цистеином и гомоцистеином. Коэффициенты a последних, наоборот, достаточно близки, что можно объяснить сходством в размерах их молекул. Разработанная методика демонстрирует, что кинетический фактор может служить индивидуальной характеристикой глутатиона в условиях аналитической реакции с дисульфидами.

Определение содержания SH-групп в урине

Полученные при анализе гомоцистеина ВЭЖХ методом градуировочные зависимости были использованы при определении содержания SH-групп в урине. В качестве референтной была применена методика с использованием 4,4'-ДТДП [23, 24], т.к. она давно используется при анализе SH-групп в физиологических образцах и достаточно хорошо изучена. Детектирование образующихся сульфидов проводилось при 296 нм для ДТБ, 470 нм для ДТХ

и 323 нм для 4,4'-ДТДП. Результаты определения представлены в табл. 4.

Исследователями отмечалось [23, 24], что методика с 4,4'-ДТДП за счет остатков непрореагировавшего дисульфида может давать завышенные результаты, даже при ВЭЖХ разделении; кроме того, в урине содержатся вещества, поглощающие в области 300–350 нм, что также оказывает мешающее влияние на точность определения [22]. Эти проблемы характерны и для ДТБ, однако поглощение сульфида МБ интенсивнее, чем 4-ТП ($\epsilon(\text{МБ})_{296\text{ нм}} = 4.3 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$, $\epsilon(4\text{-ТП})_{323\text{ нм}} = 2.1 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$), что положительно влияет на чувствительность методики. В случае ДТХ, значение S_R относительно велико, что может быть связано с менее интенсивным поглощением ХТ при 470 нм ($\epsilon = 6.0 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$). Однако хроматограмма контрольного опыта (рис. 3, а) показывает, что в анализируемом образце урины нет веществ, заметно поглощающих при 470 нм; также в этой области не поглощает исходный дисульфид III. Можно заключить, что при использовании соединения III при длинноволновом детектировании мешающее влияние компонентов урины и непрореагировавших остатков дисульфида отсутствует. В целом, методики с использованием ДТБ и ДТХ дают близкие результаты между собой, а также по отношению к референтной методике, поэтому могут быть применены для определения содержания SH-групп в образце урины.

Таблица 4

Результаты анализа содержания SH-групп в образце урины, полученные при использовании ДТБ, ДТХ и 4,4'-ДТДП (референтная методика)

Table 4

Results of the SH-content determination in the urine sample obtained using 2,2'-dithiobis[benzoxazole], 8,8'-dithiobisquinoline and 4,4'-dithiodipyridine (reference method)

Дисульфидный агент	Образующийся сульфид	Содержание SH-групп, М	$S_R, \%$
ДТБ	МБ	0.15 ± 0.01	2.2
ДТХ	ХТ	0.18 ± 0.02	4.2
4,4'-ДТДП	4-ТП	0.21 ± 0.02	2.9

Примечание. Число параллельных измерений $n = 5$; S_R – относительное стандартное отклонение.

ВЫВОДЫ

Исследована возможность применения гетероциклических дисульфидных агентов ДТБ и ДТХ для анализа гомоцистеина *in vitro* и определения содержания SH-групп в образце урины. Стоит отметить, что методики, использующие ДТБ, характеризуются высокой чувствительностью, но требуют использования методов разделения. В случае ДТХ, существует возможность проводить детектирование при двух длинах волн (280 и 470 нм). Разработанные методики характеризуются простотой, точностью и могут быть применены как при анализе *in vitro*, так и при анализе реальных объектов.

ЛИТЕРАТУРА

- Rapid and ratiometric fluorescent detection of cysteine with high selectivity and sensitivity by a simple and readily available probe / Y. Liu [et al.] // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2014. V. 6, № 20. P. 17543–17550.
- Broadly applicable strategy for the fluorescence based detection and differentiation of glutathione and cysteine/homocysteine: demonstration *in vitro* and *in vivo* / W. Chen [et al.] // Anal. Chem. 2016. V. 88, № 7. P. 3638–3646.
- Finkelstein J.D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation // Eur. J. Pediatr. 1998. V. 157, № 2. P. 40–44.
- Hultberg B., Andersson A., Isaksson A. The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress // Toxicology. 1997. V. 123, № 2. P. 33–40.
- Enhanced Doubly activated dual emission fluorescent probes for selective imaging of glutathione or cysteine in living systems / S.V. Mulya [et al.] // Anal. Chem. 2018. V. 90, № 4. P. 2648–2654.
- Щербатых А.А., Черновьянц М.С. Исследование анти-тиреоидных и антиоксидантных свойств цистеина, глутатиона и метионина методами спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76, № 4. С. 313–323.
- Development of a novel lysosome-targeted Ruthenium(II) complex for phosphorescence/time-gated luminescence assay of biothiols / Q. Gao [et al.] // Anal. Chem. 2017. V. 89, № 8. P. 4517–4524.
- Complete amino acid sequence of human vitamin D-binding protein (group-specific component): evidence of a three-fold internal homology as in serum albumin and α -fetoprotein / F. Schoentgen [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 871, № 2. P. 189–198.
- Flynn E. Pharmacokinetic Parameters. Elsevier, 2007. 656 p.
- Peters T., JR. All about albumin: Biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego: Academic Press, 2007. 445 p.
- Simultaneous nucleophilic-substituted and electrostatic interactions for thermal switching of spiropyran: a new approach for rapid and selective colorimetric detection of thiol-containing amino acids / Y. Li [et al.] // Anal. Chem. 2012. V. 84, № 11. P. 4732–4738.
- Real-time visualization of cysteine metabolism in living cells with ratiometric fluorescence probes / B. Xu [et al.] // Anal. Chem. 2018. V. 90, № 4. P. 2686–2691.
- Determination of thiol by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection with 5-methyl-(2-(m-iodoacetylaminophenyl)benzoxazole) / S.-C. Liang [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. 2005. V. 381, № 5. P. 1095–1100.
- Glatz Z., Mašlaňová H. Specific thiol determination by micellar electrokinetic chromatography and on-column detection reaction with 2,2'-dipyridyldisulfide // J. Chromatogr. A. 2000. V. 895, № 2. P. 179–187.
- Ševčíková P., Glatz Z. Specific determination of cysteine in human urine by capillary micellar electrokinetic chromatography // J. Sep. Sci. 2003. V. 26, № 8. P. 734–738.
- Yoosefian J., Alizadeh N. An optical configuration of crossed-beam photothermal lens spectrometer operating at high flow velocities and its application for cysteine determination in human serum and saliva // Anal. Chem. 2018. V. 90, № 13. P. 8227–8233.
- Ngamchuea K., Batchelor-McAuley C., Compton R. G. Rapid method for the quantification of reduced and oxidized glutathione in human plasma and saliva // Anal. Chem. 2017. V. 89, № 5. P. 2901–2908.
- Проточно-инжекционное спектрофотометрическое определение цистеина в биологически активных добавках / А.В. Петрова [и др.] // Журн. аналит. химии. 2016. Т. 71, № 2. С. 178–184.
- 4-(4,5-Diphenyl-1H-imidazole-2-yl)-N,N-dimethylaniline-Cu(II) complex, a highly selective probe for glutathione sensing in water-acetonitrile mixtures / H.E. Okda [et al.] // Dyes and Pigments. 2018. V. 159. P. 45–48.
- A versatile method for analysis of saliva, plasma and urine for total thiols using HPLC with UV detection / J. Stachniuk [et al.] // Talanta. 2016. V. 155. P. 70–77.
- Le Thuy P., Nyhan W.L. A screening method for cystine and homocystine in urine // Clin. Chim. Acta. 1992. V. 211, № 3. P. 175–179.
- Grassetti D.R., Murray J.F. Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine // Arch. Biochem. Biophys. 1967. V. 119. P. 41–49.
- Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine / R.E. Hansen [et al.] // Anal. Biochem. 2007. P. 363, № 1. P. 77–82.
- Riener C.K., Kada G., Gruber H.J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine // Anal. Bioanal. Chem. 2002. V. 373, № 4-5. P. 266–276.
- Robotham A.C., Kelly J.F. Detection and quantification of free sulfhydryls in monoclonal antibodies using maleimide labeling and mass spectrometry // mAbs. 2019. V. 11, № 4. P. 757–766.
- Ševčíková P., Glatz Z., Tomandl J. Determination of homocysteine in human plasma by micellar electrokinetic chromatography and in-capillary detection reaction with 2,2'-dipyridyl disulfide // J. Chromatogr. A. 2003. V. 990, № 1-2. P. 197–204.
- Bellomo G., Thor H., Orrenius S. Modulation of cellular glutathione and protein thiol status during quinone metabolism // Methods Enzymol. V. 186. P. 627–635.
- Chernov'yants M.S., Kolesnikova T.S., Karginova A.O. Thioamides as radical scavenging compounds: Methods for screening antioxidant activity and detection // Talanta. 2016. V. 149. P. 319–325.
- Shcherbatykh A.A., Chernov'yants M.S., Popov L.D. Determination of low molecular thiols and protein sulfhydryl groups using heterocyclic disulfides // Amino acids. 2022. V. 54. P. 469–479.
- Organic redox couples and organic counter electrode for efficient organic dye-sensitized solar cells / H. Tian [et al.] // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133, № 24. P. 9413–9422.
- Hydrazo coupling: the efficient transition-metal-free C–H functionalization of 8-hydroxyquinoline and phenol through base catalysis / P.N. Sol'yev [et al.] // Green Chem. 2019. V. 21, № 23. P. 6381–6389.

REFERENCES

- Liu Y., Yu D., Ding S., Xiao Q., Guo J., Feng G. Rapid and ratiometric fluorescent detection of cysteine with high selectivity and sensitivity by a simple and readily available probe. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2014, vol. 6, no. 20, pp. 17543–17550. <https://doi.org/10.1021/am505501>
- Chen W., Luo H., Liu X., Foley J. W., Song X. Broadly Applicable strategy for the fluorescence based detection and differentiation of glutathione and cysteine/homocysteine: demonstration in vitro and in vivo. *Anal. Chem.*, 2016, vol. 88, no. 7, pp. 3638–3646. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04333>
- Finkelstein J. D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur. J. Pediatr.*, 1998, vol. 157, no. 2, pp. 40–44. <https://doi.org/10.1007/PL00014300>
- Hultberg B., Andersson A., Isaksson A. The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology*, 1997, vol. 123, no. 1, pp. 33–40. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(97\)00105-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(97)00105-4)
- Mulay S.V., Kim Y., Choi M., Lee D.Y., Choi J., Lee Y., Jon S., Churchill D.G. Enhanced doubly activated dual emission fluorescent probes for selective imaging of glutathione or cysteine in living systems. *Anal. Chem.*, 2018, vol. 90, no. 4, pp. 2648–2654. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04375>
- Shcherbatykh A.A., Chernov'yants M.S. [Study of antithyroid and antioxidant properties of cysteine, glutathione, and methionine by spectrophotometry and high performance liquid chromatography]. *J. Anal. Chem.*, 2021, vol. 76, no. 4, pp. 313–323. <https://doi.org/10.31857/S0044450221040125>
- Gao Q., Zhang W., Song B., Zhang R., Guo W., Yuan J. Development of a novel lysosome-targeted ruthenium(II) complex for phosphorescence/time-gated luminescence assay of biothiols. *Anal. Chem.*, 2017, vol. 89, no. 8, pp. 4517–4524. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04925>
- Schoentgen F., Metz-Boutique M.-H., Jollès J., Constans J., Jollès pp. Complete amino acid sequence of human vitamin D-binding protein (group-specific component): evidence of a three-fold internal homology as in serum albumin and α -fetoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1986, vol. 871, no. 2, pp. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(86\)90173-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(86)90173-1)
- Flynn E. Pharmacokinetic Parameters. *Elsevier*, 2007. 656 p.
- Peters T. All about albumin: Biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego, *Academic Press*, 2007. 432 p.
- Li Y., Duan Y., Li J., Zheng J., Yu H., Yang R. Simultaneous nucleophilic-substituted and electrostatic interactions for thermal switching of spiropyran: a new approach for rapid and selective colorimetric detection of thiol-containing amino acids. *Anal. Chem.*, 2012, vol. 84, no. 11, pp. 4732–4738. <https://doi.org/10.1021/ac203494e>
- Xu B., Zhou H., Mei Q., Tang W., Sun Y., Gao M., Zhang C., Deng S., Zhang Y. Real-time visualization of cysteine metabolism in living cells with ratiometric fluorescence probes. *Anal. Chem.*, 2018, vol. 90, no. 4, pp. 2686–2691. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04493>
- Liang S.-C., Wang H., Zhang Z.-M., Zhang H.-S. Determination of thiol by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection with 5-methyl-(2-(m-iodoacetylaminophenyl)benzoxazole). *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, vol. 381, no. 5, pp. 1095–1100. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-3006-2>
- Glatz Z., Mašlaňová H. Specific thiol determination by micellar electrokinetic chromatography and on-column detection reaction with 2,2'-dipyridyldisulfide. *J. Chromatogr. A.*, 2000, vol. 895, no. 1, pp. 179–187. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00475-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00475-1)
- Ševčíková P., Glatz Z. Specific determination of cysteine in human urine by capillary micellar electrokinetic chromatography. *J. Sep. Sci.*, 2003, vol. 26, no. 8, pp. 734–738. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301372>
- Yoosefian J., Alizadeh N. An optical configuration of crossed-beam photothermal lens spectrometer operating at high flow velocities and its application for cysteine determination in human serum and saliva. *Anal. Chem.*, 2018, vol. 90, no. 13, pp. 8227–8233. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01697>
- Ngamchuea K., Batchelor-McAuley C., Compton R.G. Rapid method for the quantification of reduced and oxidized glutathione in human plasma and saliva. *Anal. Chem.*, 2017, vol. 89, no. 5, pp. 2901–2908. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04186>
- Petrova A.V., Moskvina L.N., Bulatov A.V., Ishimatsu R., Nakano K., Imato T., Vishnikin A.B. [Flow-injection spectrophotometric determination of cysteine in biologically active dietary supplements]. *J. Anal. Chem.*, 2016, vol. 71, no. 2, pp. 178–184. <https://doi.org/10.7868/S0044450216020122>
- Okda H.E., El Sayed S., Ferreira R.C., Costa S.P., Raposo M.M., Martínez-Máñez R., Sancenón F. 4-(4,5-Diphenyl-1H-imidazole-2-yl)-N,N-dimethylaniline-Cu(II) complex, a highly selective probe for glutathione sensing in water-acetonitrile mixtures. *Dyes and Pigments*, 2018, vol. 159, pp. 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.05.069>
- Stachniuk J., Kubalczyk P., Furmaniak P., Glowacki R. A versatile method for analysis of saliva, plasma and urine for total thiols using HPLC with UV detection. *Talanta*, 2016, vol. 155, pp. 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.031>
- Le Thuy P., Nyhan W.L. A screening method for cystine and homocystine in urine. *Clin. Chim. Acta.*, 1992, vol. 211, no. 3, pp. 175–179. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(92\)90193-T](https://doi.org/10.1016/0009-8981(92)90193-T)
- Grassetti D.R., Murray J.F. Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, vol. 119, pp. 41–49. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(67\)90426-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(67)90426-2)
- Hansen R.E., Østergaard H., Nørgaard P., Winther J.R. Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Biochem.*, 2007, vol. 363, no. 1, pp. 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.01.02>
- Riener C.K., Kada G., Gruber H.J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, vol. 373, no. 4–5, pp. 266–276. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1347-2>
- Robotham A.C., Kelly J.F. Detection and quantification of free sulfhydryls in monoclonal antibodies using maleimide labeling and mass spectrometry. *mAbs*, 2019, vol. 11, no. 4, pp. 757–766. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1595307>
- Ševčíková P., Glatz Z., Tomandl J. Determination of homocysteine in human plasma by micellar electrokinetic chromatography and in-capillary detection reaction with 2,2'-dipyridyl disulfide. *J. Chromatogr. A.*, 2003, vol. 990, no. 1–2, pp. 197–204. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00048-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00048-7)
- Bellomo G., Thor H., Orrenius S. Modulation of cellular glutathione and protein thiol status during quinone metabolism. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 186, pp. 627–635. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86158-R](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86158-R)
- Chernov'yants M.S., Kolesnikova T.S., Karginova A.O. Thioamides as radical scavenging compounds: Methods for screening antioxidant activity and detection. *Talanta*, 2016, vol. 149, pp. 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.069>

29. Shcherbatykh A.A., Chernov'yants M.S., Popov L.D. Determination of low molecular thiols and protein sulfhydryl groups using heterocyclic disulfides. *Amino acids*, 2022, vol. 54, pp. 469–479. <https://doi.org/10.1007/s00726-022-03132-w>
30. Tian H., Yu Z., Hagfeldt A., Kloo L., Sun L. Organic redox couples and organic counter electrode for efficient organic dye-sensitized solar cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, vol. 133, no. 24, pp. 9413–9422. <https://doi.org/10.1021/ja2030933>
31. Solyev P.N., Sherman D.K., Novikov R.A., Levina E.A., Kochetkov S.N. Hydrazo coupling: the efficient transition-metal-free C–H functionalization of 8-hydroxyquinoline and phenol through base catalysis. *Green Chem.*, 2019, vol. 21, no. 23, pp. 6381–6389. <https://doi.org/10.1039/c9gc02824b>