

УДК 543.062;543.422.3;543.64

## СПИРОПИРАНЫ НА ОСНОВЕ БЕНЗОФУРАНОВОГО ФРАГМЕНТА КАК АНАЛИТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ НА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АМИНОТИОЛЫ

© 2023 г. А. А. Щербатых<sup>а, \*</sup>, О. И. Аскалепова<sup>а</sup>, А. О. Буланов<sup>а</sup>, И. Н. Щербаков<sup>а</sup>, С. Т. Нгуен<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Южный федеральный университет, химический факультет  
ул. Р. Зорге, 7, Ростов-на-Дону, 344090 Россия

\*e-mail: sherbatyh@sfedu.ru, asherbatyx@inbox.ru

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 21.06.2022 г.

Принята к публикации 06.07.2022 г.

Задача определения биологически активных низкомолекулярных аминотиолов, таких как цистеин и глутатион, требует разработки новых методов и аналитических реагентов. Среди последних в отдельную группу можно выделить спиропираны – фотохромные органические вещества, в растворах которых существует равновесие между циклической и открытой формами. В настоящей работе рассмотрена возможность применения бензофурановых спиропиранов в качестве аналитических реагентов на аминотиолы. Изучено влияние различных заместителей в структуре спиропиранов на изменение их оптических свойств в присутствии цистеина и глутатиона. Установлено, что равновесие в растворах бензофурановых спиропиранов, содержащих в положении 7 гидроксогруппу, в присутствии аналитов смещается в сторону образования окрашенной раскрытой формы. Рассмотренные спиропираны использованы для создания простой, селективной и чувствительной методики спектрофотометрического и кинетического определения цистеина и глутатиона *in vitro*.

**Ключевые слова:** цистеин, глутатион, аминотиолы, спиропираны.

**DOI:** 10.31857/S0044450223010127, **EDN:** CEFYIX

Низкомолекулярные аминотиолы, такие как цистеин, гомоцистеин и глутатион, играют важную роль в биохимических процессах. Благодаря сильным восстановительным свойствам они являются незаменимыми компонентами защитной системы организма: нейтрализуют действие окислителей (таких как свободные радикалы [1, 2]) в условиях оксидативного стресса, поддерживают постоянство окислительно-восстановительного статуса клетки [3], участвуют в биосинтезе других антиоксидантов и клеточных метаболитов [4]. Концентрация их в клетке достаточно высока (30–200  $\mu\text{M}$  для цистеина, 5–15  $\mu\text{M}$  для гомоцистеина, 10  $\text{mM}$  для глутатиона [5–7]), а в условиях нарушения клеточного гомеостаза (оксидативный стресс, заболевания иммунной системы) может изменяться, что делает их индикаторами для отслеживания нежелательных физиологических процессов [8–10]. Важная роль аминотиолов обуславливает необходимость их точного количественного определения, для чего постоянно разрабатываются новые эффективные методы и синтезируются селективные сенсоры.

Перечень методов определения цистеина, гомоцистеина и глутатиона достаточно широк – к

ним относятся спектрофотометрия [11], флуориметрия [12, 13], высокоэффективная жидкостная хроматография [14], капиллярный зонный электрофорез [15], масс-спектрометрия [16]. Если рассматривать методы, основанные на спектрофотометрическом детектировании, то, поскольку аналиты характеризуются слабым поглощением в диапазоне 200–800 нм, часто в анализе применяют дериватизирующие агенты [17, 18] или селективные химические сенсоры [7, 19]. Среди последних в отдельную группу можно выделить спиропираны.

Спиропираны – фотохромные органические вещества, в растворах которых существует равновесие между двумя формами: спиро-формой (циклической формой, ее раствор бесцветен) и мероцианиновой формой (открытой меро-формой, ее раствор окрашен) [20–22]. На равновесие могут влиять различные факторы: температура, давление, облучение, рН среды, природа растворителя, присутствие субстрата. В аналитических целях особенно интересен последний фактор: субстратами, которые способствуют раскрытию циклической формы и образуют комплекс с мероцианиновой формой, часто служат ионы металлов

[23] и аминокислоты [24] (в частности, содержащие тиольные группы [25, 26]). На изменении спектров поглощения спиропиранов, вызванном стабилизацией мероцианиновой формы под действием аналита, и основаны соответствующие методы анализа.

В работах [19, 25, 26], посвященных определению аминотиолов, отмечается, что тиольная группировка аналитов участвует в дополнительной связывании со спиропираном, чем объясняется селективность определения цистеина и глутатиона на фоне остальных аминокислот. Более того, авторами работы [19] подчеркивается важность учета стерического фактора при подборе структуры спиропирана. Так, наличие заместителей большого размера и протяженной формы, содержащих гетероатомы (например, азот), позволяет добиться селективности действия по отношению к олигопептиду глутатиону на фоне небольших по размеру аминокислот цистеина и гомоцистеина. Кроме этого, все рассмотренные спиропираны содержат индолиновый фрагмент, благодаря которому образующаяся мероцианиновая форма является цвиттер-ионом. С одной стороны, за счет взаимодействия между цвиттер-ионами мероцианина и аминокислоты образуется прочный комплекс, что позволяет разработать чувствительную методику. С другой стороны, поскольку цвиттер-ион мероцианина аналогичным образом связывается и с другими цвиттер-ионами, присутствующими в растворе (например, с другими аминокислотами), а также с протонами и ионами металлов, селективность разработанных методов в ряде случаев [24–26] не всегда удовлетворительна.

В данной работе рассмотрены бензофурановые спиропираны как аналитические реагенты на аминотиолы. Мероцианиновая форма спиропиранов, содержащих бензофурановый фрагмент, представляет собой нейтральную молекулу [27–31]. Изучено влияние структуры предельных спиропиранов на устойчивость мероцианиновой формы и на чувствительность определения цистеина, гомоцистеина и глутатиона. Показано, что аналиты могут смещать равновесие в сторону образования окрашенной формы, что позволило разработать чувствительные и селективные методики их определения *in vitro*.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

L-цистеин (98%, Sigma-Aldrich, США; **Cys**), L-гомоцистеин (98%, Sigma-Aldrich, США; **Hcy**), L-глутатион (97%, Alfa-Aesar, США; **GSH**), L-метионин (98%, Sigma-Aldrich, США; **Met**), L-глицин (97%, Sigma-Aldrich, США; **Gly**) использовали без дополнительной очистки. Спиروпираны SP1-7 синтезировали, как описано ранее [27–31]. Ацетонитрил для ВЭЖХ производства “Криохром” (Россия) применяли без дополнительной

очистки. Использовали реактивы и растворители квалификации не ниже х. ч., если не указано иное.

Точные навески препаратов взвешивали на весах специального класса точности МВ 210-А (“Сартогосм”, Россия) с погрешностью измерения 0.0001 г. Электронные спектры поглощения соединений и значения оптической плотности регистрировали на спектрофотометре Cary 50, снабженном Пельтье-термостатом (Varian, США), в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 1.0 см. Значения рН растворов измеряли иономером рН-150М (Теплоприбор, Россия) с индикаторным стеклянным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения.

Исходные растворы аминокислот ( $5.0 \times 10^{-3}$  М) готовили растворением точной навески в бидистиллированной воде. Рабочие растворы необходимой концентрации готовили последовательным разбавлением исходного раствора бидистиллированной водой. Исходные растворы спиропиранов ( $5.0 \times 10^{-4}$  М) готовили растворением точной навески в ацетонитриле. Рабочие растворы необходимой концентрации готовили последовательным разбавлением исходного раствора ацетонитрилом.

Трис-НСl буферный раствор с рН 7.4 готовили, разбавляя 25 мл 0.2 М раствора трис(гидроксиметил)аминометана до 100 мл 0.1 М НСl, контролируя значение рН с помощью рН-метра.

Для изучения взаимодействия между спиропираном и субстратом раствор субстрата (Cys, Hcy, GSH, Met или Gly, диапазон концентраций  $0-1.0 \times 10^{-3}$  М) добавляли к раствору спиропирана (конечная концентрация  $5.0 \times 10^{-5}$  М; растворитель – смесь ацетонитрил–трис-НСl буферный раствор с рН 7.4 (50 : 50, по объему) [25]). Смесь инкубировали в темноте в течение 25 мин, затем регистрировали электронный спектр поглощения.

Константу связывания для комплекса аминотиола со спиропираном рассчитывали по формуле (1):

$$\frac{1}{A_i} = \frac{1}{\epsilon[\text{SP}]} + \frac{1}{\beta\epsilon[\text{SP}][\text{RSH}]_i}, \quad (1)$$

где  $A_i$  – оптическая плотность при 460 нм (SP3) и при 450 нм (SP7) в присутствии  $i$ -той концентрации аналита [RSH] (GSH в случае SP7 и Cys в случае SP3), М;  $\epsilon$  – молярный коэффициент светопоглощения спиропирана,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ; [SP] – концентрация спиропирана, М;  $\beta$  – константа связывания между спиропираном и аналитом,  $\text{M}^{-1}$ .

Для получения градуировочных зависимостей для спектрофотометрического определения Cys (SP3) и GSH (SP7) смешивали растворы спиропирана (конечные концентрации  $2.0 \times 10^{-5}$  М для SP3 и  $1.0 \times 10^{-4}$  М для SP7) и аминотиола (диапазон концентраций  $1.7 \times 10^{-6}-2.0 \times 10^{-5}$  М для Cys

и  $5.0 \times 10^{-7}$ – $1.0 \times 10^{-4}$  М для GSH), в смеси ацетонитрил–трис-НCl буферный раствор с pH 7.4 (50 : 50, по объему) и после выдерживания в темноте в течение 25 мин регистрировали спектр поглощения.

Для определения Cys (SP3) и GSH (SP7) кинетическим методом смешивали растворы спиропирана (конечные концентрации  $2.0 \times 10^{-5}$  М для SP3 и  $1.0 \times 10^{-4}$  М для SP7) и аминотиола (диапазон концентраций  $1.7 \times 10^{-6}$ – $1.0 \times 10^{-5}$  М для Cys и  $5.0 \times 10^{-7}$ – $5.0 \times 10^{-5}$  М для GSH), в смеси ацетонитрил–трис-НCl буферный раствор с pH 7.4 (50 : 50, по объему) и в течение 25 мин регистрировали спектры поглощения с интервалом 2 мин. Кинетика взаимодействия спиропирана с аминотиолом при избыточной концентрации спиропирана описывается уравнением реакции псевдопервого порядка по реагирующим компонентам:

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

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Концепция выбора структуры спиропиранов.

Определение аминокислот при помощи спиропиранов основано на образовании комплекса между мероцианиновой формой спиропирана и аминокислотой. Это взаимодействие смещает равновесие между спироциклической (раствор бесцветен) и мероцианиновой (раствор окрашен и поглощает свет в длинноволновой области) формами в сторону последней.

В работах [19, 24–26], посвященных определению аминокислот, в основном рассмотрены спиропираны, содержащие индолиновый фрагмент. При раскрытии спиро-формы таких спиропиранов образуется полярная цвиттер-ионная меро-

цианиновая форма (схема 1а). Она образует комплекс с цвиттер-ионной формой серосодержащей аминокислоты главным образом за счет сил электростатического притяжения, хотя возможно образование дополнительных координационных связей с атомом серы тиольной группы определяемой аминокислоты. При этом молекулы аналита также могут активно участвовать в процессе раскрытия циклической формы за счет нуклеофильной атаки тиолат-аниона серосодержащей аминокислоты [25]. Очевидно, что в случае спиропиранов на основе индолинового фрагмента при выборе структуры и природы заместителей следует руководствоваться следующими принципами: заместители должны стабилизировать циклическую форму, что повышает контрастность аналитической реакции; должен быть учтен стерический фактор – размер и положение заместителей спиропирана влияет на селективность по отношению к аминотиолам, отличающимся по размеру, например глутатиону и цистеину.

В случае спиропиранов на основе бензофуранового фрагмента при раскрытии спиро-формы не образуется цвиттер-иона [27–31] (схема 1б), они более устойчивы к влиянию растворителя и внешнего облучения, т.е. процесс раскрытия циклической формы затруднен. Поскольку мероцианиновая форма бензофуранового спиропирана не является биполярным ионом, связывание с аминокислотой происходит за счет координационных связей. Нами изучена целесообразность аналитического применения ряда бензофурановых спиропиранов, имеющих различные заместители, которые могут стабилизировать как циклическую, так и раскрытую форму. Кроме того, заместители, отличающиеся размерами и наличием гетероатомов, как и в случае индолиновых спиропиранов могут влиять на эффективность анализа, поскольку их структура может определять селективность по отношению к различным анализатам.

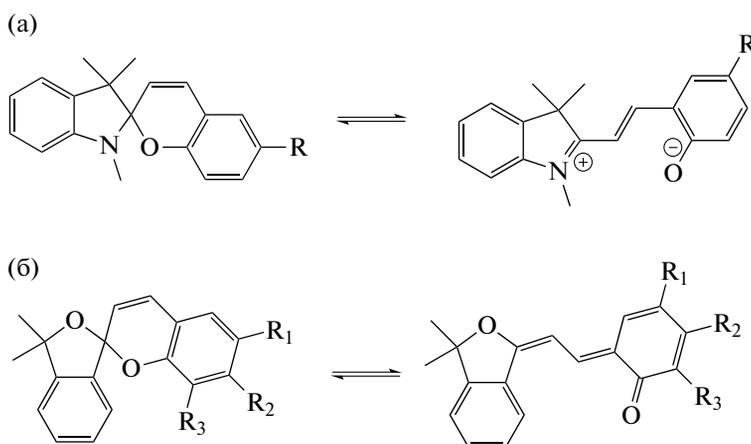


Схема 1. Равновесие между циклической и открытой формами спиропирана на основе индолинового (а) и бензофуранового (б) фрагмента.

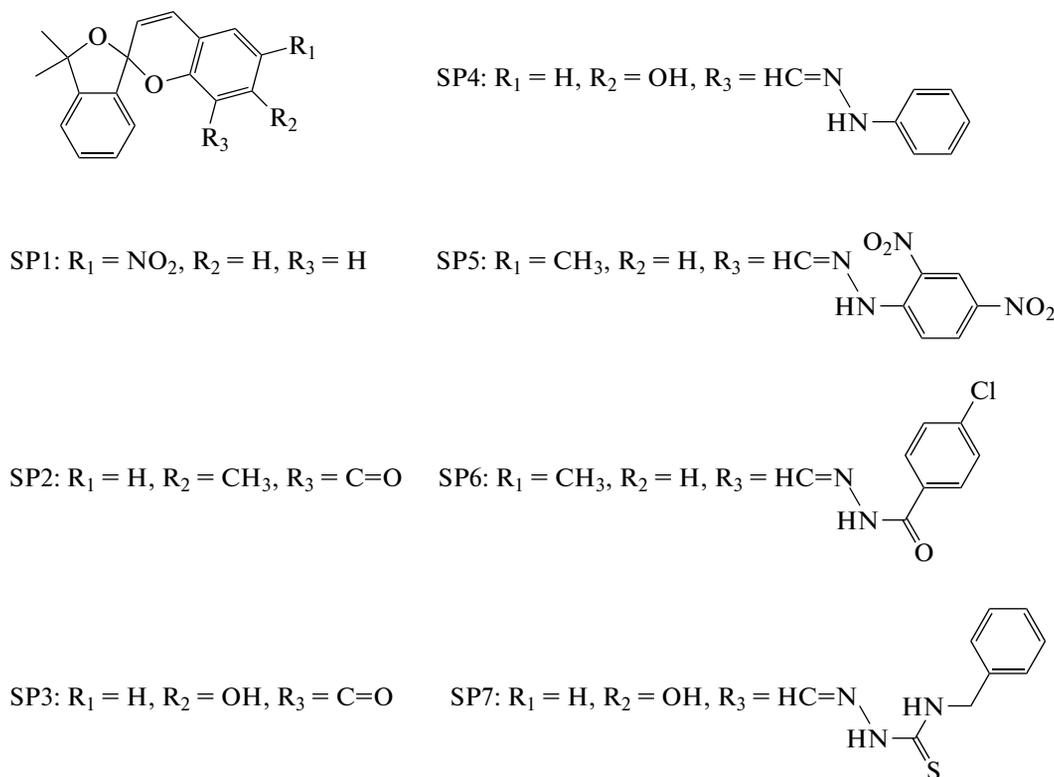


Рис. 1. Бензофурановые спиропираны SP1-7, рассмотренные в настоящей работе.

Предложенные спиропираны имеют различные заместители в положениях 6, 7 или 8 (рис. 1). Например, показано [25], что нитрогруппа в положении 6 у индолинового спиропирана приводит к стабилизации мероцианиновой формы и падению чувствительности по отношению к глутатиону и цистеину. Мы, в свою очередь, исследовали свойства бензофуранового спиропирана с аналогичным заместителем в положении 6 (SP1). Ранее показано [27], что присутствие в положении 7 гидроксигруппы с подвижным атомом водорода стабилизирует открытую форму. В связи с этим мы проанализировали соединения SP3, SP4, и SP7, содержащие OH-заместители в положении 7, а также заместители различного размера в положении 8. Кроме того, рассмотрены спиропираны с различными заместителями в положении 8, но не содержащие гидроксигруппы в положении 7 (SP2, SP5, SP6).

**Фотохимические свойства соединений SP1-7 в присутствии различных субстратов.** Спиропираны SP1-7 хорошо растворимы в метаноле, ацетонитриле, диметилсульфоксиде, но нерастворимы в воде. При этом цистеин, гомоцистеин и глутатион являются водорастворимыми аминотиолами и практически не растворяются в органических растворителях. Для дальнейшего анализа мы использовали в качестве растворителя смесь ацетонитрил–трис-НСl буферный раствор с рН 7.4

(50 : 50, по объему), в которой одинаково хорошо растворимы и аналиты, и спиропираны. Чтобы исключить влияние компонентов буферного раствора на равновесие между изомерными формами спиропиранов (например, за счет возможного комплексообразования мероцианиновой формы с ионами калия) при исследовании их фотохимических свойств использовали трис-НСl буферный раствор. Поскольку в диапазоне рН 7.2–9.0 значительных различий в оптических свойствах для каждого спиропирана не наблюдали, для дальнейших исследований выбрали значение рН 7.4 как близкое к физиологическому.

Изучили электронные спектры поглощения спиропиранов в присутствии различных субстратов: GSH, Cys, Hcy, Gly и Met (рис. 2). Для SP1, SP2, SP5, SP6 не наблюдали изменения оптических свойств как в присутствии аминотиолов, так и в присутствии аминокислот, не содержащих тиольной группы. Оптическая плотность в длинноволновой области спектра увеличивается в присутствии субстратов в случае спиропиранов, содержащих гидроксигруппу в положении 7 (SP3, SP4, SP7). При этом соединения SP3, SP4, SP7 характеризуются стабильностью мероцианиновой формы. Во-первых, открытую форму стабилизирует переход протона с гидроксигруппы на атом азота [27]. Во-вторых, у этих спиропиранов относительно велика длина связи  $\text{C}_{\text{спиро}}-\text{O}$ , которая

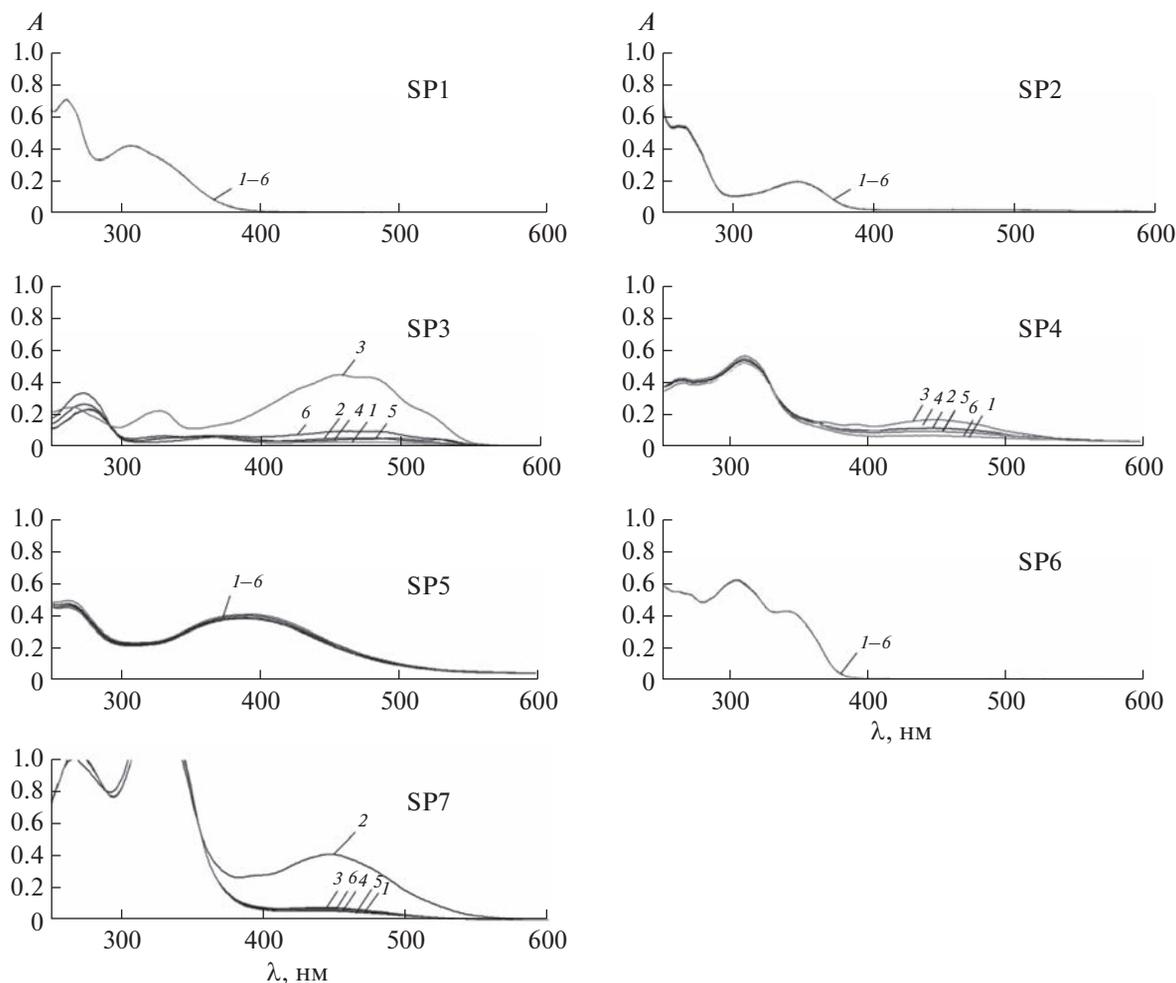


Рис. 2. Электронные спектры поглощения спиропиранов SP1-7 ( $5.0 \times 10^{-5}$  M) в отсутствие субстратов (1) и в присутствии  $1.0 \times 10^{-3}$  M GSH (2), Cys (3), Hcy (4), Gly (5) и Met (6).

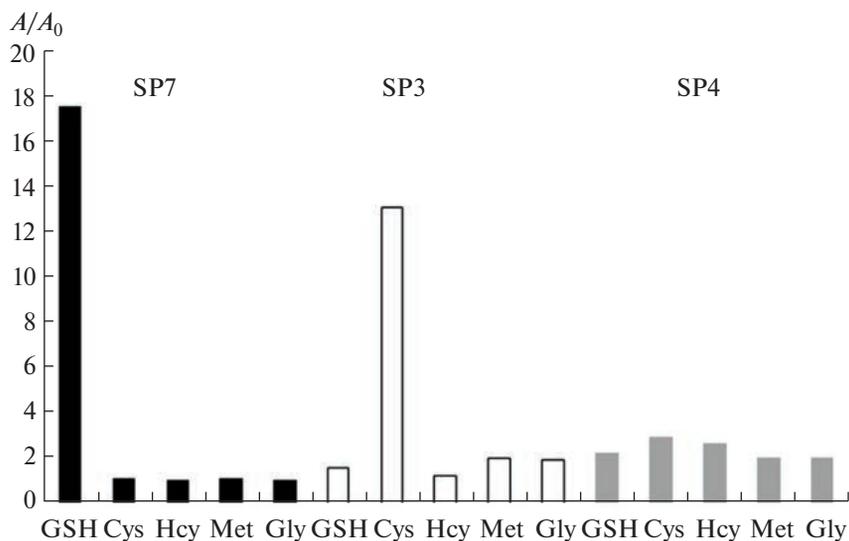
разрывается при раскрытии циклической формы [30, 31]. К примеру, у SP7 и SP4 она значительно длиннее, чем у SP1 [31].

Показано [25], что нитрогруппа в положении 6 стабилизирует мероцианиновую форму спиропирана на основе индолинового фрагмента. Тем не менее в спектре аналогичного бензофуранового спиропирана SP1 аналитический сигнал в присутствии аминокислот не наблюдается. Вероятно, в сравнении со спиропираном индолинового типа именно бензофурановый фрагмент оказывает решающее влияние на стабильность циклической формы.

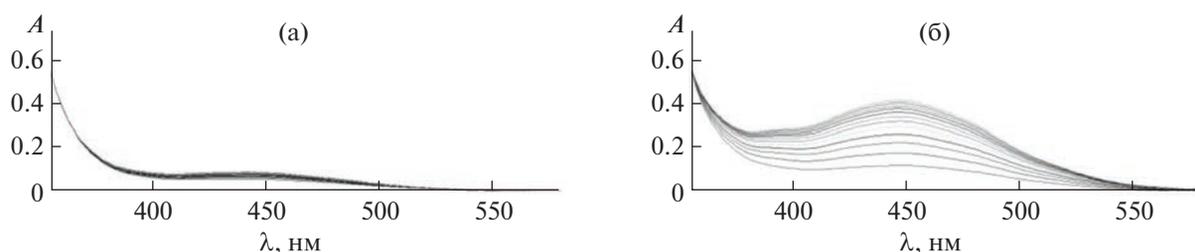
В случаях SP7 и SP3 изменения спектра в присутствии метионина и глицина незначительны. Наоборот, отклик на присутствие аминокислот цистеина и глутатиона явно выражен. При этом соединения SP7, SP4, SP3 демонстрируют различную селективность по отношению к анализам (рис. 2, 3).

Во всех случаях, где наблюдается аналитический сигнал, увеличение оптической плотности при длине волны 450 нм для SP7, SP4 и при 460 нм для SP3 происходит пропорционально увеличению концентрации субстрата. Это позволяет оценить константу связывания и возможность количественного анализа. Для расчета константы связывания использовали уравнение (1). Для комплекса SP3 с цистеином константа составила  $4.46 \times 10^4$  M<sup>-1</sup>, для SP7 с глутатионом —  $1.05 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>. Значения констант превосходят аналогичные данные для некоторых индолиновых спиропиранов [25] и позволяют использовать спектрофотометрический метод для количественного определения цистеина и глутатиона.

Получены градуировочные зависимости вида  $(A - A_0)/A_0 = c(RSH)K + b$ , где  $A_0$  и  $A$  — значения оптической плотности при 460 нм (SP3) или 450 нм (SP7) в отсутствие и в присутствии Cys или GSH соответственно. Параметры градуировочных функций представлены в табл. 1.



**Рис. 3.** Селективность спиропиранов SP7 (черный), SP3 (белый) и SP4 (серый) по отношению к аминокислотам, где  $A_0$  и  $A$  – поглощение спиропирана при 450 нм для SP7, SP4 и при 460 нм для SP3 в отсутствие и присутствии изомольного количества аминокислоты соответственно.



**Рис. 4.** Увеличение оптической плотности при 450 нм в спектре SP7 ( $1.0 \times 10^{-4}$  М) в отсутствие (а) и в присутствии  $4.0 \times 10^{-5}$  М GSH (б) в смеси ацетонитрил–трис-НСI буферный раствор с рН 7.4 (50 : 50, по объему); спектры регистрировали с интервалом 2 мин.

**Кинетический анализ.** Увеличение оптической плотности в растворе спиропирана в длинноволновой области свидетельствует о переходе соединения в мероцианиновую форму. При этом изомеризация спиропирана в присутствии аминокислоты происходит быстрее, чем в его отсутствие (рис. 4).

Анализ кинетики перехода соединений SP7 и SP3 из циклической формы в открытую показал, что скорость процесса изомеризации напрямую

зависит от концентрации присутствующего аминокислоты. Кинетика процесса позволяет использовать константы псевдопервого порядка для разработки методики количественного определения [26] цистеина и глутатиона.

Рассчитаны константы псевдопервого порядка при взаимодействии избытка спиропирана с аминокислотой. Коэффициенты градуировочных зависимостей вида  $k = c(RSH)K + b$  (где  $k$  – константа псевдопервого порядка, рассчитанная по

**Таблица 1.** Параметры градуировочных функций для спектрофотометрического определения цистеина и глутатиона

Аналит	Спиропиран	Коэффициенты градуировочных зависимостей			$c_{\text{мин}}, \text{ М}$
		$K$	$b$	$R$	
Cys	SP3	$2.7 \times 10^4$	0.7	0.964	$8.8 \times 10^{-7}$
GSH	SP7	$3.9 \times 10^4$	1.2	0.956	$1.2 \times 10^{-7}$

*Примечание:*  $R$  – коэффициент корреляции,  $c_{\text{мин}}$  – предел обнаружения.

**Таблица 2.** Параметры градуировочных функций для определения цистеина и глутатиона кинетическим методом

Аналит	Спиропиран	Коэффициенты градуировочных зависимостей			$c_{\text{мин}}$ , М
		K	b	R	
Cys	SP3	$7.5 \times 10^5$	17.6	0.962	$9.5 \times 10^{-7}$
GSH	SP7	$1.0 \times 10^5$	5.7	0.959	$2.9 \times 10^{-7}$

Примечание: R – коэффициент корреляции,  $c_{\text{мин}}$  – предел обнаружения.

формуле (2), для реакции аминотиола RSH (Cys или GSH) с избытком SP3 или SP7 соответственно) представлены в табл. 2.

Таким образом, каталитические свойства цистеина и глутатиона могут быть использованы для разработки методики их чувствительного кинетического определения.

Разработанные методики спектрофотометрического (табл. 1) и кинетического (табл. 2) определения цистеина и глутатиона являются простыми, чувствительными и селективными.

\*\*\*

Спиропираны бензофуранового ряда SP1, SP2, SP5, SP6, стабильные в циклической форме, не продемонстрировали аналитического сигнала по отношению к определяемым веществам. Соединения, имеющие в положении 7 гидроксогруппу, стабилизирующую мероцианиновую форму, можно использовать при спектрофотометрическом и кинетическом определении цистеина и глутатиона. Рассмотренные методики характеризуются высокой чувствительностью и селективностью. При этом спектрофотометрическое определение менее трудоемко, поскольку не требует получения серии значений оптической плотности в фиксированные моменты времени и расчета констант скорости. Спектрофотометрическая методика в целом является более перспективной для дальнейшего применения для определения аминотиолов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-53-54007 Вьет\_а.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin F., Sancheti H., Cadenas E. Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways // *Antioxid. Redox Signaling*. 2012. V. 17. № 12. P. 1714.
2. Щербатых А.А., Черновьянц М.С. Исследование антигипероксидантных свойств цистеина, глутатиона и метионина методами спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Журн. аналит. химии*. 2021. Т. 76. № 4. С. 313. (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. V. 76. № 4. P. 476.)
3. Jones D.P., Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo // *Free Radical Biol. Med.* 2009. V. 47. № 10. P. 1329.
4. Dröge W., Hack V., Breitkreutz R., Holm E., Shubinsky G., Schmid E., Galter D. Role of cysteine and glutathione in signal transduction, immunopathology and cachexia // *BioFactors (Oxford, England)*. 1998. V. 8. № 1–2. P. 97.
5. Yang Y., Feng Y., Qiu F., Iqbal K., Wang Y., Song X., Wang Y., Zhang G., Liu W. Dual-site and dual-excitation fluorescent probe that can be tuned for discriminative detection of cysteine, homocystein, and thiophenols // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 23. P. 14048.
6. Głowacki R., Borowczyk K., Bald E. Fast analysis of wine for total homocysteine content by high-performance liquid chromatography // *Amino Acids*. 2012. V. 42. № 1. P. 247.
7. Yue Y., Huo F., Ning P., Zhang Y., Chao J., Meng X., Yin C. Dual-site fluorescent probe for visualizing the metabolism of CYS in living cells // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 8. P. 3181.
8. Zhang S., Ong C.-N., Shen H.-M. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells // *Cancer Lett.* 2004. V. 208. № 2. P. 143.
9. Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., D'Agostino R.B., Wilson P.W.F., Wolf P.A. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease // *The New England J. Med.* 2002. V. 346. № 7. P. 476.
10. 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. V. 89. № 8. P. 4517.
11. Zhang Q., Ding S., Zhai Q., Feng G. Highly sensitive and selective detection of biothiols by a new low dose colorimetric and fluorescent probe // *RSC Adv.* 2015. V. 5. № 77. P. 62325.
12. Jia L., Niu L.-Y., Yang Q.-Z. Fluorescent probe for simultaneous discrimination of GSH, Cys, and SO<sub>2</sub> derivatives // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 15. P. 10800.
13. Zhang M., Wang L., Zhao Y., Wang F., Wu J., Liang G. Using bioluminescence turn-on to detect cysteine in vitro and in vivo // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 8. P. 4951.
14. 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. V. 381. № 5. P. 1095.

15. 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.
16. Yuan W., Edwards J.L. Thiol metabolomics of endothelial cells using capillary liquid chromatography mass spectrometry with isotope coded affinity tags // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. № 18. P. 2561.
17. Głowacki R., Stachniuk J., Borowczyk K., Jakubowski H. Quantification of homocysteine and cysteine by derivatization with pyridoxal 5'-phosphate and hydrophilic interaction liquid chromatography // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 7. P. 1935.
18. 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.
19. Shao N., Jin J., Wang H., Zheng J., Yang R., Chan W., Abliz Z. Design of bis-spiropyran ligands as dipolar molecule receptors and application to in vivo glutathione fluorescent probes // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 2. P. 725.
20. Волошин Н.А., Чернышев А.В., Безуглый С.О., Метелица А.В., Волошина Е.Н., Минкин В.И. Spiropyrans and spirooxazines // *Russ. Chem. Bull.* 2008. V. 57. № 1. P. 151.)
21. Распопова Е.А., Морозов А.Н., Буланов А.О., Попов Л.Д., Щербаков И.Н., Левченков С.И., Коган В.А. Новая лигандная система на основе ферроценил-гидразона 7'-гидроксид-3-метил-8'-формил-3,4-дигидро-2Н-1,3-бензоксазин-2-спиро-2(Н)-хромена // *Журн. общ. химии*. 2012. Т. 82. № 8. С. 1396. (Распопова Е.А., Морозов А.Н., Буланов А.О., Попов Л.Д., Шчербаков И.Н., Левченков С.И., Коган В.А. A new ligand system based on 7'-hydroxy-3-methyl-8'-formyl-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazine-2-spiro-2(H)-chromene Ferrocenoylhydrazone // *Russ. J. Gen. Chem.* 2012. V. 82. № 8. P. 1457.)
22. Chernyshev A.V., Rostovtseva I.A., Burov O.N., Popov L.D., Morozov A.N., Kletskii M.E., Bulanov A.O., Gaeva E.B., Metelitsa A.V. Hydrogen bond effect of the photoswitching of a spirocyan dyad // *J. Photochem. Photobiol. A*. 2020. V. 398. Article 112611.
23. Feuerstein T.J., Müller R., Barner-Kowollik C., Roesky P.W. Investigating the photochemistry of spirocyan metal complexes with online LED-NMR // *Inorg. Chem.* 2019. V. 58. № 22. P. 15479.
24. Liu Y., Fan M., Zhang S., Sheng X., Yao J. Basic amino acid induced isomerization of a spirocyan: Towards visual recognition of basic amino acids in water // *New J. Chem.* 2007. V. 31. № 11. P. 1878.
25. Garcia J., Addison J.B., Liu S.Z., Lu S., Faulkner A.L., Hodur B.M., Balmond E.I., Or V.W., Yun J.H., Trevino K., Shen B., Shaw J.T., Frank N.L., Louie A.Y. Antioxidant sensing by spirocyans: Substituent effects and NMR spectroscopic studies // *J. Phys. Chem. B*. 2019. V. 123. № 31. P. 6799.
26. Li Y., Duan Y., Li J., Zheng J., Yu H., Yang R. Simultaneous nucleophilic-substituted and electrostatic interactions for thermal switching of spirocyan: A new approach for rapid and selective colorimetric detection of thiol-containing amino acids // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 11. P. 4732.
27. Shcherbakov I.N., Bulanov A.O., Revinskii Y.V., Popov L.D. Conjugated prototropic and ring opening rearrangements in Schiff base derivatives of formyl functionalized 2-oxaindane series spirocyan: Synthesis, NMR, IR, UV/Vis, and DFT study // *Struct. Chem.* 2019. V. 30. № 4. P. 1381.
28. Попов Л.Д., Буланов А.О., Распопова Е.А., Морозов А.Н., Щербаков И.Н., Кобелева О.И., Валова Т.М., Барачевский В.А. Синтез новых спироцианов и исследование влияния природы заместителей на их фотохромизм и комплексообразование // *Журн. общ. химии*. 2013. Т. 83. № 6. С. 980. (Popov L.D., Bulanov A.O., Raspopova E.A., Morozov A.N., Shcherbakov I.N., Kobeleva O.I., Valova T.M., Barachevskii V.A. Synthesis of new spirocyans and study of the effect of the nature of substituents on their photochromism and complexation // *Russ. J. Gen. Chem.* 2013. V. 83. № 6. P. 1111.)
29. Попов Л.Д., Щербаков И.Н., Буланов А.О., Шашева Е.Ю., Ткаченко Ю.Н., Кобелева О.И., Валова Т.М., Барачевский В.А. Синтез, фотохромные свойства и комплексообразование с ионами металлов гидразонов на основе спироциана оксаинданового ряда // *Журн. общ. химии*. 2012. Т. 82. № 8. С. 1362. (Popov L.D., Shcherbakov I.A., Bulanov A.O., Shasheva E.Y., Tkachenko Y.N., Kobeleva O.I., Vyalova T.M., Barachevskii V.A. Synthesis, photochromic properties, and complex formation with metal ions of hydrazones based on a spirocyan of oxaindane series // *Russ. J. Gen. Chem.* 2012. V. 82. № 8. P. 1432.)
30. Bulanov A.O., Shcherbakov I.N., Popov L.D., Shasheva E.Y., Belikov P.A., Starikova Z.A. Novel hydrazone derivatives of 7-hydroxy-3',3'-dimethyl-3'H-spirochromene-2,1'-isobenzofuran-8-carbaldehyde // *Acta Crystallogr. C: Struct. Chem.* 2011. V. C67. Pt 3. P. o85.
31. Bulanov A.O., Shcherbakov I.N., Tupolova Y.P., Popov L.D., Lukov V.V., Kogan V.A., Belikov P.A. A novel chelator functionalized spirocyan of the 2-oxaindane series // *Acta Crystallogr. C: Struct. Chem.* 2009. V. C65. Pt 12. P. o618.