

Study on the Fluorescence Properties of Cys/Hcy Based on Formyl Coumarin

Hantao Zhang, Luping Hu, Shengtao Xia, Hongqi Li*, Chunying Xian, Tingting Xia, Hongyu Zhang, Hao Li, Lin Yang

College of Chemistry, Chemical Engineering & Biological Engineering, Donghua University, Shanghai
Email: hantaozhang2170548@163.com, *hongqili@dhu.edu.cn

Received: Jan. 16th, 2020; accepted: Jan. 30th, 2020; published: Feb. 7th, 2020

Abstract

A coumarin fluorescent probe based on formyl recognizing L-cysteine (Cys) and L-homocysteine (Hcy) was designed and synthesized. The probe has good selectivity and high sensitivity to Cys and Hcy in HEPES buffer (EtOH:H₂O = 8:2 (v:v), pH = 7.1). The probe is resistant to acids and alkalis, and still shows good recognizing effect on Cys and Hcy in a wide pH range of 2~10. After adding equivalent Cys or Hcy to the probe solution, the fluorescence intensity of the system enhances 2~3 times, responding time is 30 min, 20 min. 10 equivalents of other common amino acids have no interference on the detection. The lowest detection limits are 5.7×10^{-7} mol/L and 5.2×10^{-7} mol/L.

Keywords

Formyl, Coumarin, Fluorescent Probe, Cys/Hcy

一种基于甲酰基香豆素识别Cys/Hcy的荧光性能研究

张汉涛, 胡路平, 夏胜涛, 李洪启*, 咸春颖, 夏婷婷, 张洪雨, 李 颖, 杨 琳

东华大学化学化工与生物工程学院, 上海
Email: hantaozhang2170548@163.com, *hongqili@dhu.edu.cn

收稿日期: 2020年1月16日; 录用日期: 2020年1月30日; 发布日期: 2020年2月7日

摘 要

设计、合成了一种基于甲酰基识别L-半胱氨酸(Cys)和L-高半胱氨酸(Hcy)的香豆素荧光探针。该探针在

*通讯作者。

HEPES缓冲液(EtOH:H₂O = 8:2 (v:v), pH = 7.1)中,对Cys和Hcy具有良好的选择性和较高的灵敏度。探针耐酸碱,在2~10的广泛pH区域内,对Cys和Hcy仍表现出良好的识别效果。在探针溶液中加入等当量的Cys或Hcy后,体系荧光强度增强2~3倍,响应时间分别为30 min、20 min。10当量其它常见氨基酸对其检测无干扰,对Cys和Hcy的最低检测限分别达到 5.7×10^{-7} mol/L和 5.2×10^{-7} mol/L。

关键词

甲酰基, 香豆素, 荧光探针, Cys/Hcy

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

半胱氨酸(Cysteine, 简称 Cys)、高半胱氨酸(Homocysteine, 简称 Hcy)是生物体内的两种含巯基的重要氨基酸,参与生命代谢过程,对细胞生长和组织分化起着至关重要的作用[1] [2] [3],其在细胞中含量的异常与许多疾病密不可分。Cys 存在于多种蛋白质和多肽中,具有淡化黑色素、延缓衰老、促进体制生长等作用[4] [5],人体缺乏 Cys,会导致生长缓慢[6]、毛发褪色、组织水肿[7]、肝功能损伤[8]、皮肤损伤[9]等。Hcy 与 Cys 分子结构相似,在体内含量较高,同样是生物体中不可或缺的一种氨基酸,血液中 Hcy 含量过高,会导致肾功能受损、认知功能障碍[10],严重时甚至会出现阿尔茨海默病和精神分裂症[11] [12]。此外,Cys 和 Hcy 的含量异常也是诱发心脑血管疾病的重要因素[13] [14]。因此,对这两种氨基酸的分析检测具有重要的生理和病理意义。目前,检测这两种氨基酸的主要分析技术包括高效液相色谱法(HPLC) [15]、毛细管电泳(CE) [16]、电化学检测(ECD) [17]等,但这些分析方法普遍存在实验条件苛刻、操作繁琐、区分不明显、实验成本高等缺点,荧光探针检测法因其操作简单(样品无需预处理)、区分明显、检测快捷有效、成本低等优点,而受到广大研究者的青睐。几种主要检测 Cys/Hcy 的分析技术具体性能对比如表 1 所示。

Table 1. Comparison of several major technologies of Cys/Hcy

表 1. 几种主要检测 Cys/Hcy 技术对比

检测技术	样品是否需要预处理	最低检测限范围(mol/L)	抗干扰	检测效率	成本
荧光探针检测法	—	10^{-9} ~ 10^{-7}	体内检测时光谱背景色干扰	高	低
高效液相色谱(HPLC)	√	10^{-8} ~ 10^{-6}	—	较好	高
毛细管电泳(CE)	√	10^{-9} ~ 10^{-7}	带同种电荷组分易干扰	一般	高
电化学检测(ECD)	√	10^{-6} ~ 10^{-3}	共存组分易干扰	一般	一般

基于荧光探针检测法的以上突出优点,本文设计开发了一种结构简单、可快速检测 Cys 和 Hcy 的香豆素荧光探针(即探针 A),该探针对 Cys 和 Hcy 具有良好的选择性和抗干扰性,响应灵敏。

2. 实验部分

2.1. 实验仪器与试剂

仪器: 85-2A 型磁力搅拌器,分析天平,SHZ-D (III)型真空泵, RV 10 basic V 型蒸发仪, ZF-I 型三

用紫外分析仪, B-4 型 pH 计, 真空隔膜泵, PY-1 型熔点仪, Fluoromax-4 荧光光谱仪, 7600CRT 紫外分光光度仪, Bruker AM400 核磁共振仪。

试剂: 所用试剂均为分析纯, 其中无水乙醇、乙酸乙酯、石油醚、二氯甲烷、间苯二酚、三氟乙酰乙酸乙酯和氘代氯仿购自上海泰坦科技股份有限公司; 甲苯、乌洛托品、浓盐酸、无水硫酸镁和 L-半胱氨酸购自国药集团化学试剂有限公司; HEPES 和 L-同型高胱氨酸购自阿拉丁生化科技股份有限公司。

2.2. 探针 A 的合成

探针 A 的合成路线如图 1 所示, 以间苯二酚和三氟乙酰乙酸乙酯为原料合成 4-三氟甲基-7-羟基香豆素, 再通过 Duff 反应制备 4-三氟甲基-7-羟基-8-甲酰基香豆素, 即探针 A。

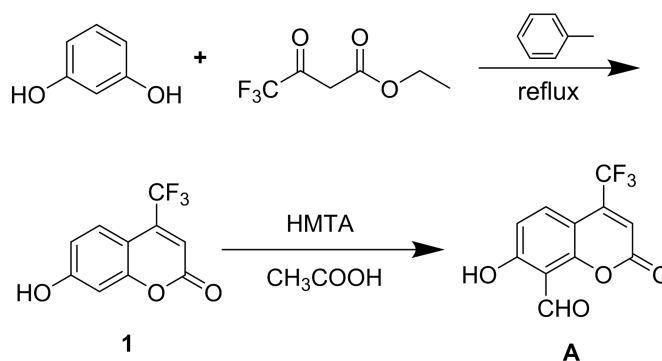


Figure 1. Synthesis route of probe A
图 1. 探针 A 的合成路线

2.2.1. 4-三氟甲基-7-羟基香豆素(化合物 1)的合成

向 100 mL 三口烧瓶中加入甲苯(20 mL)、间苯二酚(2.21 g, 20 mmol)和三氟乙酰乙酸乙酯(3.57 g, 20 mmol), 再加入碘(0.51 g, 2 mmol)作为引发剂以及 2 mL 浓盐酸, 60℃下搅拌溶解, 升温至 85℃, 继续搅拌 6 h。反应完毕后, 加入冰水, 固体析出, 抽滤, 得到产物 4-三氟甲基-7-羟基香豆素 3.64 g (粉色固体), 产率为 79.1%。Mp: 177℃~179℃ (文献值[18]: 178.4℃~179.3℃)。

2.2.2. 4-三氟甲基-7-羟基-8-甲酰基香豆素(探针 A)的合成

在 100 mL 三颈瓶中加入 4-三氟甲基-7-羟基香豆素(2.31 g, 10 mmol)和乌洛托品(7.01 g, 50 mmol), 倒入 20 mL 冰乙酸。升温至 90℃, 继续搅拌 7 h, 之后用质量分数为 10% 的盐酸调节溶液的 pH 至 2~3, 继续反应 40 min。反应结束后冷却至室温, 加入冰水, 之后用二氯甲烷萃取 3 次(20 mL × 3 次), 干燥, 柱层析纯化, 洗脱剂 PE:EA = 12:1, 得到探针 A 的淡黄绿色固体 0.68 g, 产率为 26.4%。Mp: 109℃~112℃。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 12.39 (s, 1H), 10.63 (s, 1H), 7.86 (dd, J = 9.2, 1.6 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 192.82, 166.19, 157.39, 141.78, 133.16, 122.65, 119.91, 115.68, 112.53, 108.96, 105.59。¹⁹F NMR (377 MHz, CDCl₃) δ -64.72。ESI-MS: *m/z* 257.0 (M⁺ - 1)。

3. 结果与讨论

3.1. 探针 A 的结构表征

3.1.1. ¹H NMR 表征

化合物经 Bruker AM400 核磁共振仪测试, 得到 ¹H NMR 图(图 2)。如图 2 所示, 化合物有 5 个 H, 符合探针 A 的结构。δ 12.39 (s, 1H)为香豆素 7 位酚羟基的 H; 10.63 (s, 1H)为香豆素 8 位-CHO 的 H; 7.86

(dd, $J = 9.2, 1.6$ Hz, 1H)为香豆素 5 位苯环的 H, 因受到 6 位 H 和 4 位 $-CF_3$ 的 F 影响, 裂分为四重峰; 7.01 (d, 1H)为香豆素 6 位苯环的 H, 受到 5 位 H 的影响, 裂分为二重峰; 6.73 (s, 1H)为香豆素 3 位上的 H。

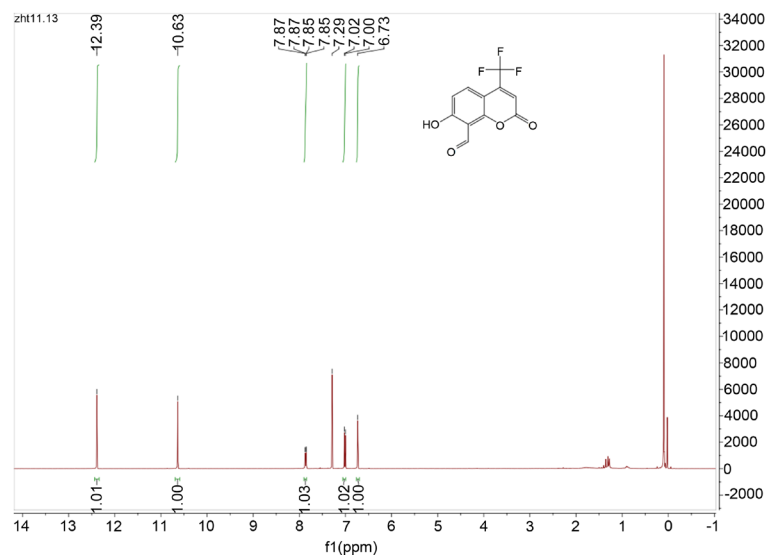


Figure 2. ^1H NMR chart of Compound A
图 2. 化合物 A ^1H NMR 图

3.1.2. ^{13}C NMR 表征

化合物经 Bruker AM400 核磁共振仪测试, 得到 ^{13}C NMR 图(图 3)。如图 3 所示, 化合物有 11 个 C, 符合探针 A 的结构。 δ 192.82 为香豆素 8 位相连-CHO 的 C; 166.19 为香豆素 2 位-C=O 的 C; 157.39 为香豆素 7 位的 C; 141.78 为香豆素 4 位的 C; 133.16 为香豆素 9 位上的 C; 122.65 为香豆素 5 位上的 C; 119.91 为 $-CF_3$ 的 C; 115.68 为香豆素 8 位上的 C; 112.53 为香豆素 10 位上的 C; 108.96 为香豆素 6 位上的 C; 105.59 为香豆素 3 位上的 C。

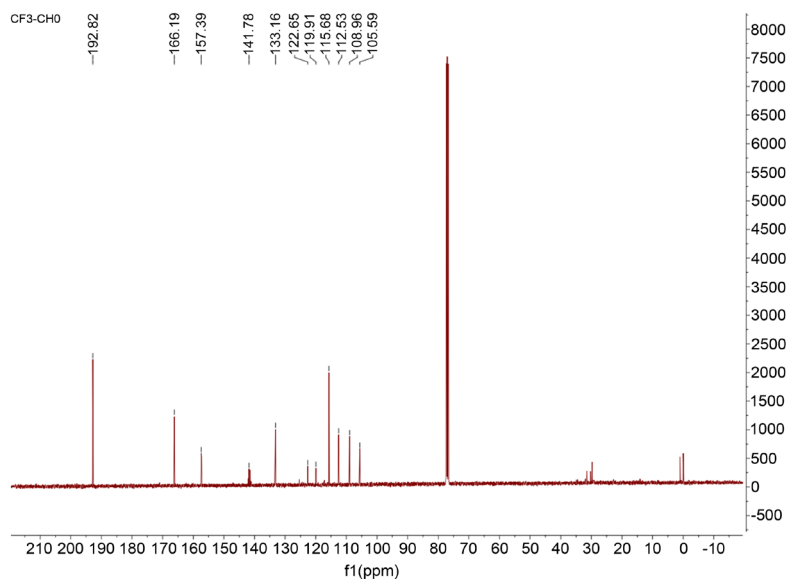


Figure 3. ^{13}C NMR chart of Compound A
图 3. 化合物 A ^{13}C NMR 图

3.1.3. MS 表征

化合物经 HPLC-MS 测试, 得到质谱图(图 4)。如图 4 所示, m/z 257.0 ($M^+ - 1$)。

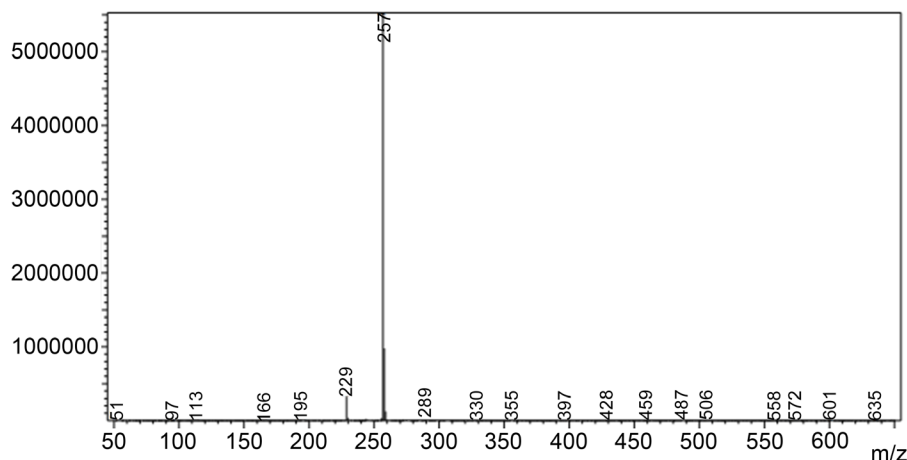


Figure 4. Mass spectrum of Compound A

图 4. 化合物 A 质谱图

3.2. 探针 A 在不同比例的乙醇与水中的荧光性能

如图 5 所示, 当乙醇与水的体积比为 9:1 或 8:2 时, 探针 A 在 502 nm 处荧光最强, 此后随着体系中水含量的升高, 荧光强度逐渐降低, 比例为 1:9 时, 荧光强度最低。因此, 测试溶剂乙醇与水的比例为 8:2 时最合适。

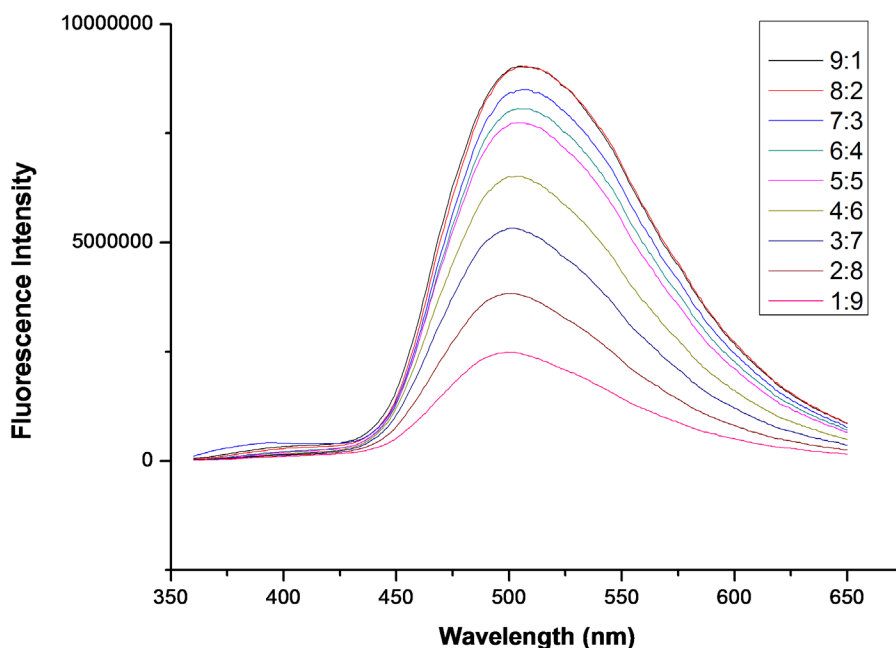


Figure 5. The fluorescence emission spectra of probe A (20 μ M) in different ratios of ethanol and water. The volume ratios of EtOH:H₂O from top to bottom are 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, λ_{ex} = 341 nm

图 5. 探针 A (20 μ M) 在不同比例的乙醇和水中的荧光发射光谱, 从上到下 EtOH:H₂O 体积比分别为 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, λ_{ex} = 341 nm

3.3. 探针 A 对 Cys/Hcy 的有效识别

在探针 A 的 HEPES 缓冲液(EtOH:H₂O = 8:2 (v:v), pH = 7.1, A 浓度为 20 μmol/L)体系中, 分别加入等当量的 Cys 和 Hcy 溶液(浓度为 20 μmol/L), 测试得到紫外吸收光谱图(图 6)和荧光发射波谱图(图 7)。

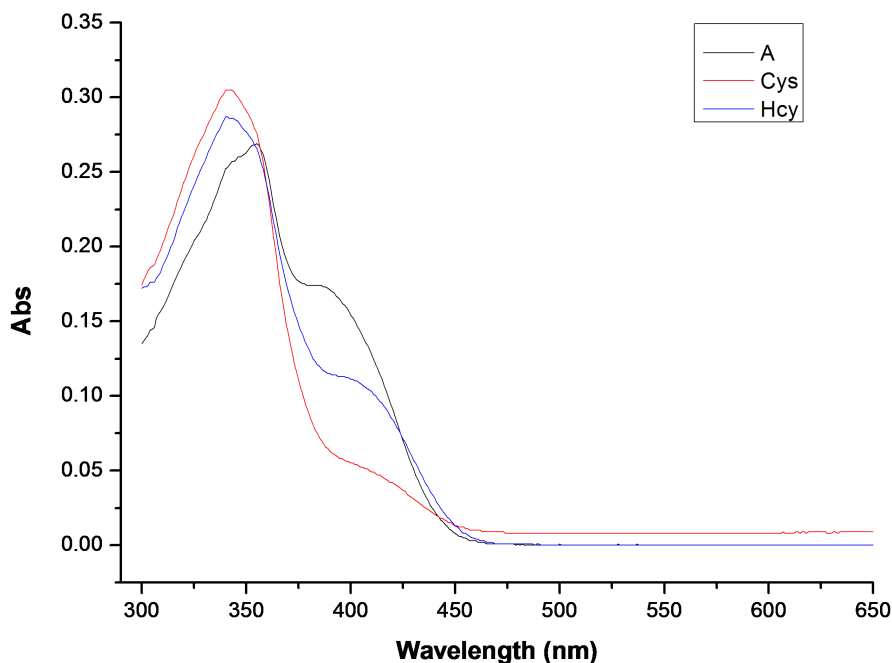


Figure 6. UV absorption spectrum of probe A after adding Cys/Hcy

图 6. 加入 Cys/Hcy 后探针 A 的紫外吸收光谱

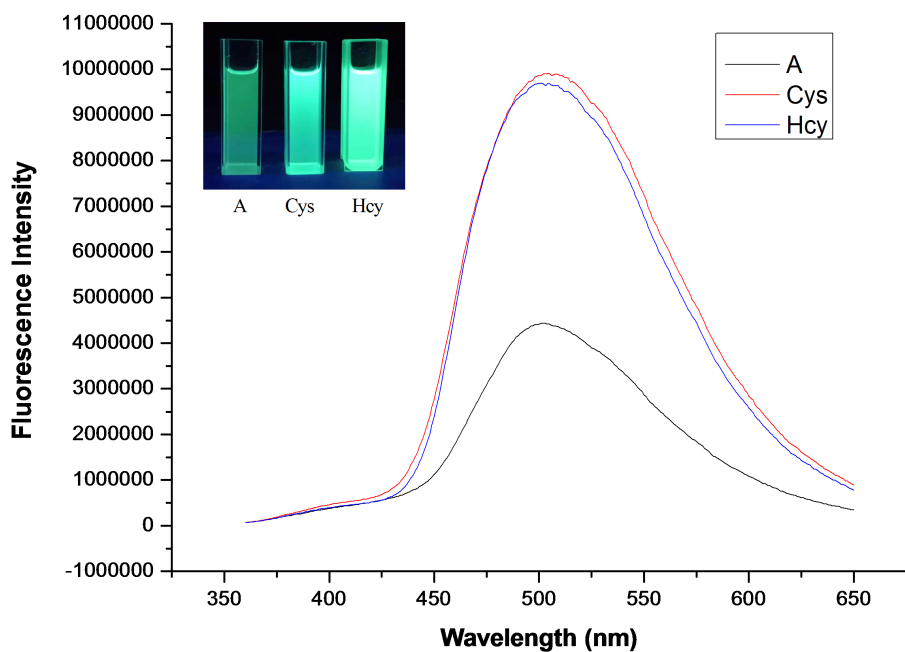


Figure 7. Fluorescence emission spectrum of probe A after adding Cys/Hcy (embedded image is fluorescence change of the system under 365 nm irradiation)

图 7. 加入 Cys/Hcy 后探针 A 的荧光发射光谱(内嵌图为 365 nm 紫外灯下, 加入 Cys/Hcy 后体系荧光变化图)

如图 7 所示, 加入 Cys/Hcy 后, 探针的最大吸收峰从 365 nm 蓝移至 341 nm, 且吸收峰强度有所增强, 在 395 nm 附近吸收峰强度明显减弱。如图 8 所示, 当激发波长 $\lambda_{ex} = 341$ nm, 发射波长 $\lambda_{em} = 502$ nm 时, 加入 Cys 和 Hcy 后体系的荧光强度增强了约 2.5 倍。探针 A 识别 Cys 和 Hcy 效果良好, 可作为检测 Cys 和 Hcy 的荧光探针。

3.4. 探针 A 的选择性测试

在探针 A 的 HEPES 缓冲液(EtOH:H₂O = 8:2 (v:v), pH = 7.1, A 浓度为 20 μ mol/L)体系中, 分别加入等当量(浓度为 20 μ mol/L)的 Cys、Hcy、GSH、Gly、Glu、Val、Tyr、Arg、Try、Lys、His、Leu、Phe、Asp、Met 15 种氨基酸, 测试得到荧光发射波谱图(图 8)。

如图 8 所示, 当激发波长 $\lambda_{ex} = 341$ nm, 发射波长 $\lambda_{em} = 5502$ nm 时, 加入 Cys 和 Hcy 后体系的荧光强度增强了约 2.5 倍, 色氨酸(Try)和赖氨酸(Lys)荧光强度稍有降低, 降低约 30%, 其他氨基酸无变化。

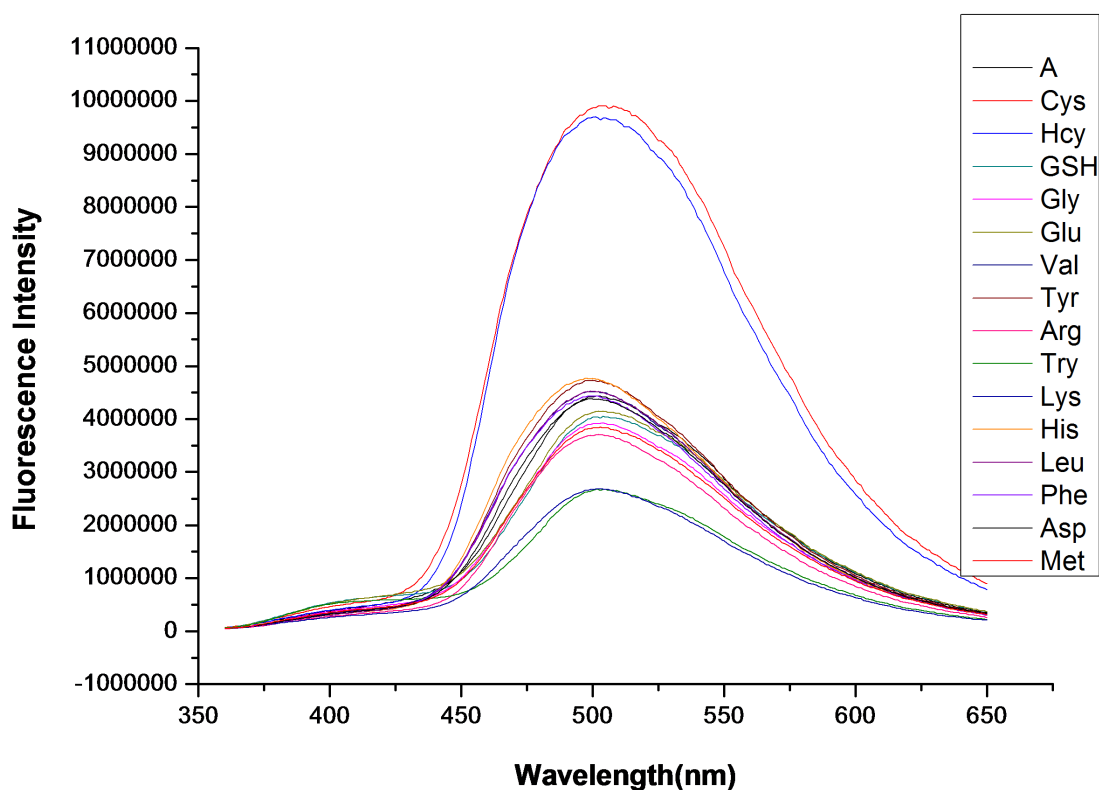


Figure 8. Fluorescence emission spectrum of probe A after adding different amino acids

图 8. 加入不同氨基酸后探针 A 的荧光发射光谱

3.5. 探针 A 检测 Cys/Hcy 的抗干扰性测试

在探针 A 的 HEPES 缓冲液(EtOH:H₂O = 8:2 (v:v), pH = 7.1, A 浓度为 20 μ mol/L)体系中, 加入等当量的 Cys 或 Hcy(浓度均为 20 μ mol/L), 再分别加入 10 当量(浓度为 200 μ mol/L)的 GSH、Gly、Glu、Val、Tyr、Arg、Try、Lys、His、Leu、Phe、Asp、Met 13 种干扰性氨基酸, 测试得到探针 A 检测 Cys/Hcy 的抗干扰性荧光波谱图(图 9、图 10)。如图 9 所示, 其它 13 种氨基酸均不干扰探针 A 对 Cys 的检测, 说明探针 A 检测 Cys 的抗干扰性良好。如图 10 所示, 其它 13 种氨基酸均不干扰探针 A 对 Hcy 的检测, 说明探针 A 检测 Hcy 的抗干扰性也良好。

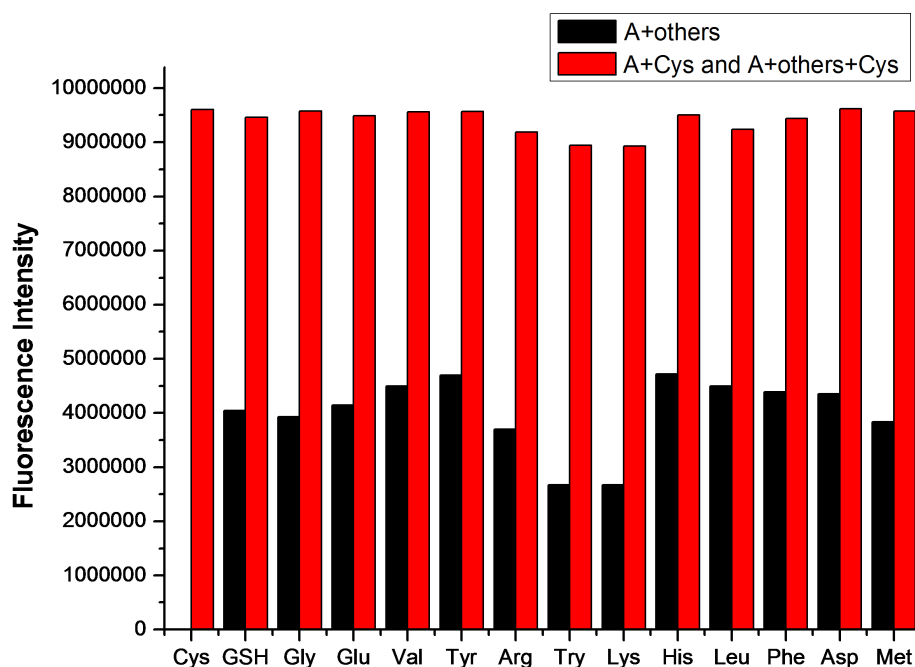


Figure 9. Effect of different amino acids on detection of Cys by probe A

图 9. 不同氨基酸对探针 A 检测 Cys 的影响

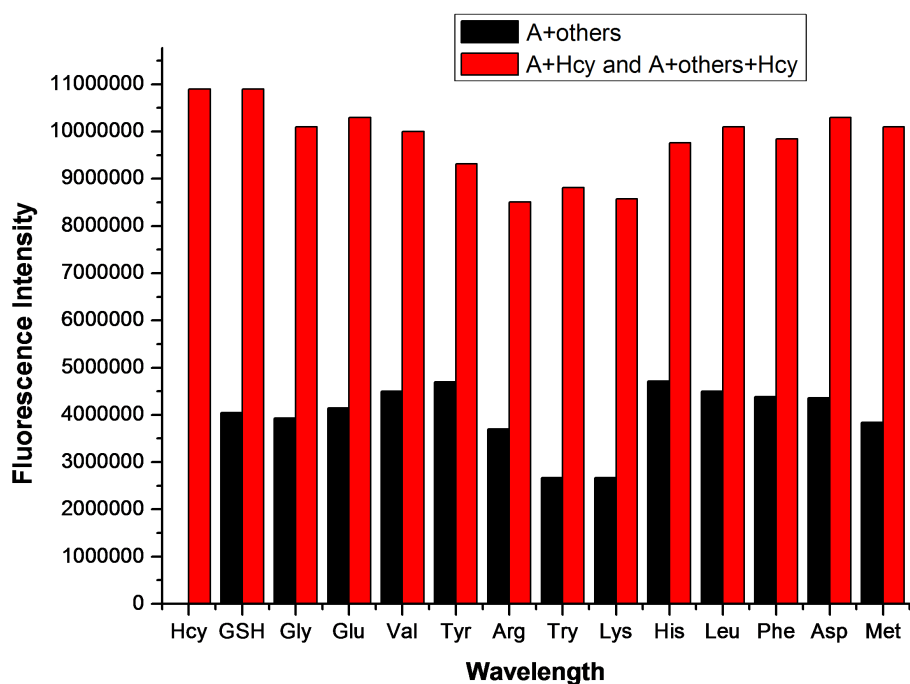


Figure 10. Effect of different amino acids on the detection of Hcy by probe A

图 10. 不同氨基酸对探针 A 检测 Hcy 的影响

3.6. 探针 A 对 Cys/Hcy 的响应时间测试

在探针 A 的 HEPES 缓冲液(EtOH:H₂O = 8:2 (v:v), pH = 7.1, A 浓度为 20 μmol/L)体系中, 加入等当量的 Cys 或 Hcy (浓度为 20 μmol/L), 每隔 3 分钟检测一次体系荧光强度, 得到探针 A 对 Cys/Hcy 的响应

时间曲线图(图 11、图 12)。如图 11 所示, 在加入 Cys 30 min 后, 体系荧光基本达到饱和, 说明等当量探针 A 对 Cys 的响应时间约 30 min。如图 12 所示, 在加入 Hcy 20 min 后, 体系荧光基本达到饱和, 表明等当量探针 A 对 Hcy 的检测较 Cys 更灵敏。

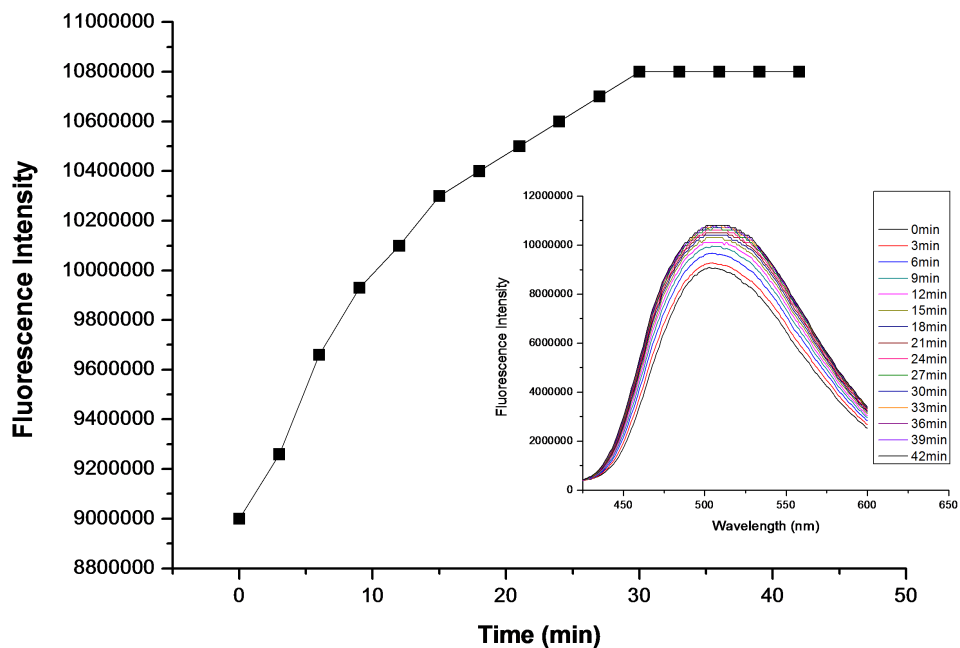


Figure 11. Responding time curve of detection of Cys by probe A (embedded image is the fluorescence emission spectrum of responding time of detection of Cys by probe A, $\lambda_{ex} = 341 \text{ nm}$)

图 11. 探针 A 对 Cys 响应时间曲线(内嵌图为 A 对 Cys 响应时间荧光发射谱图, $\lambda_{ex} = 341 \text{ nm}$)

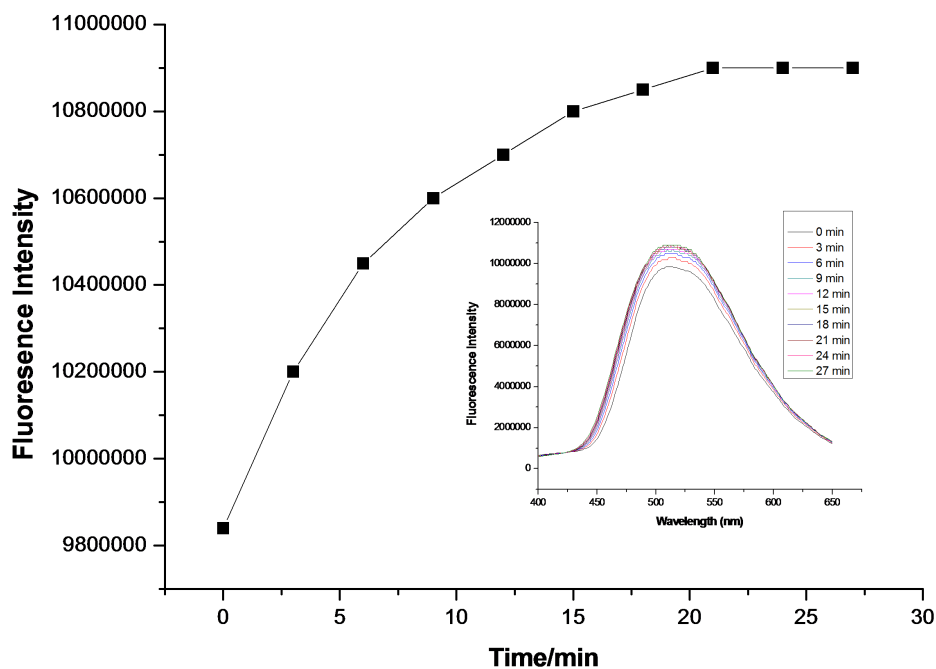


Figure 12. Responding time curve of detection of Hcy by probe A (embedded image is the fluorescence emission spectrum of responding time of detection of Hcy by probe A, $\lambda_{ex} = 341 \text{ nm}$)

图 12. 探针 A 对 Hcy 响应时间曲线(内嵌图为 A 对 Hcy 响应时间荧光发射谱图, $\lambda_{ex} = 341 \text{ nm}$)

3.7. pH 对探针 A 识别 Cys/Hcy 的性能影响

在探针 A 的 HEPES 缓冲液(EtOH:H₂O = 8:2 (v:v), pH = 7.1, A 浓度为 20 μmol/L)体系中, 加入等当量的 Cys 或 Hcy (浓度均为 20 μmol/L), 测定了 pH 从 1~13 时探针 A 对 Cys 或 Hcy 的识别性能影响, 得到 pH 对探针 A 识别 Cys/Hcy 的性能影响图(图 13、图 14)。如图 13 所示, 当 pH = 2~10 时, 探针 A 对 Cys 具有良好的识别效果, 最佳 pH 为 6; 当 pH = 1 或 11 时, 探针 A 对 Cys 基本没有识别效果; 当 pH ≥ 12 时, 荧光猝灭, 推测可能是探针在此条件下分子结构已遭到破坏。如图 14 所示, 当 pH = 2~10 时, 探针 A 对 Hcy 具有良好的识别效果, 最佳 pH 为 5; 当 pH = 1 时, 探针 A 对 Hcy 基本没有识别效果; 当 pH = 11 时, 荧光强度减弱约 50%, 无识别效果; 当 pH ≥ 12 时, 荧光猝灭, 推测可能是探针的分子结构已被破坏。所以, 探针 A 识别 Cys/Hcy 的适宜 pH 范围为 2~10, 在弱酸性体系(pH 约 5~6)下, 测试效果最佳, 探针的耐酸碱能力较强, 稳定性较好。

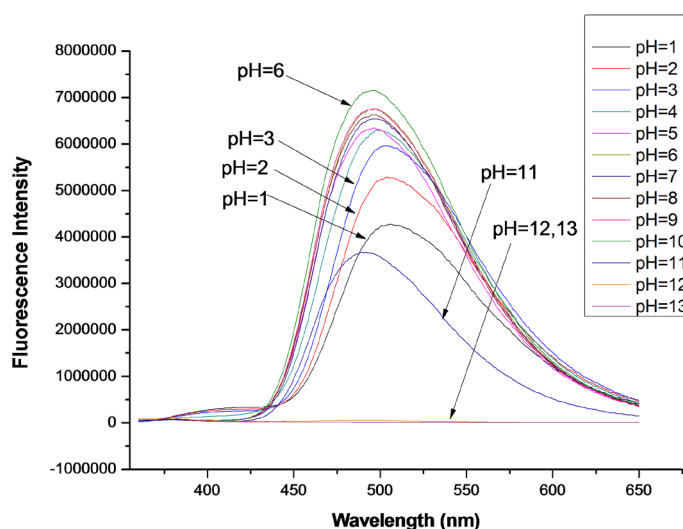


Figure 13. Effect of pH on the performance of probe A in identifying Cys

图 13. pH 对探针 A 识别 Cys 的性能影响

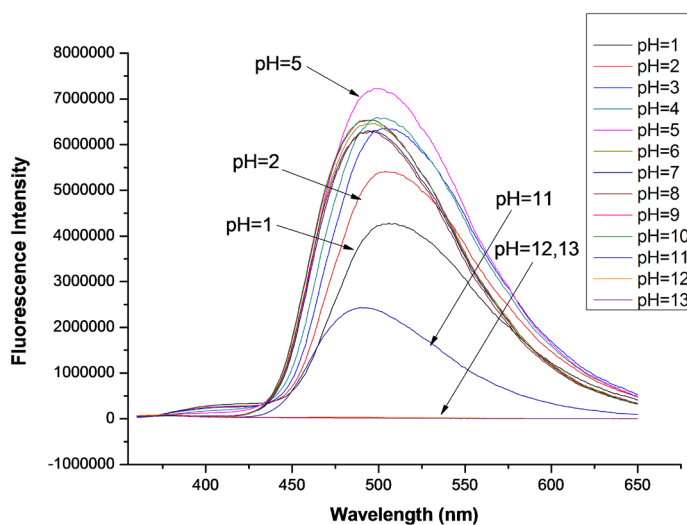


Figure 14. Effect of pH on the performance of probe A in identifying Hcy

图 14. pH 对探针 A 识别 Hcy 的性能影响

3.8. Cys/Hcy 浓度对探针 A 荧光强度的影响

3.8.1. Cys 浓度对探针 A 荧光强度的影响

在探针 A 的 HEPES 缓冲液(EtOH:H₂O = 8:2 (v:v), pH = 7.1, A 浓度为 20 μmol/L)体系中, 加入浓度分别为 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 μmol/L 的 Cys 溶液, 测得 Cys 浓度梯度对探针 A 荧光强度的影响图(图 15)。如图 15 所示, 随着 Cys 浓度的增加, 体系荧光强度逐渐增大。将混合溶液体系在 502 nm 处的荧光强度对 Cys 的浓度作图, 并进行线性拟合, 得探针 A 随 Cys 浓度增大的荧光强度线形图(图 16)。如图 16 所示, 在加入 2~20 μmol/L Cys 后, 荧光强度与浓度呈良好的线性增长关系, 线性方程为 $y = 143272.72727x + 5482000$ (相关系数 $R^2 = 0.99221$)。根据最低检测限浓度计算公式 $C = 3S/K$ 得, 最低检测浓度为 5.7×10^{-7} mol/L, 说明该探针对 Cys 的检测较灵敏。

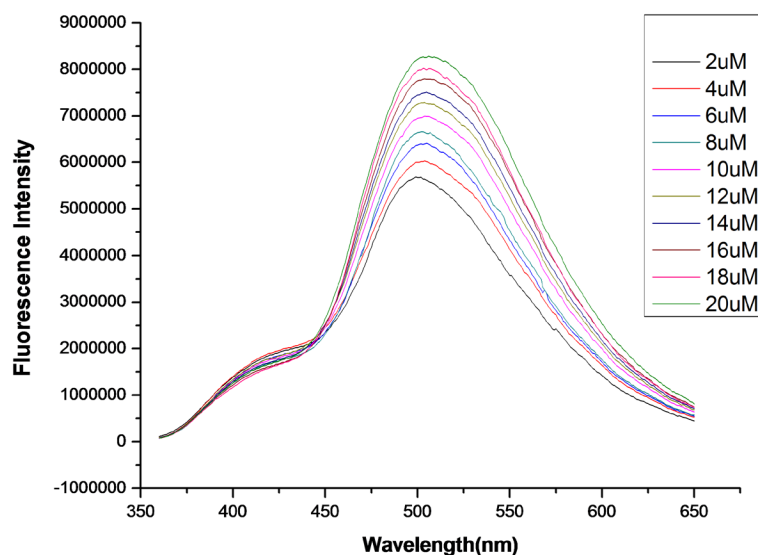


Figure 15. Change of fluorescence intensity of probe A with increasing Cys
图 15. 探针 A 随 Cys 浓度增大的荧光强度变化图

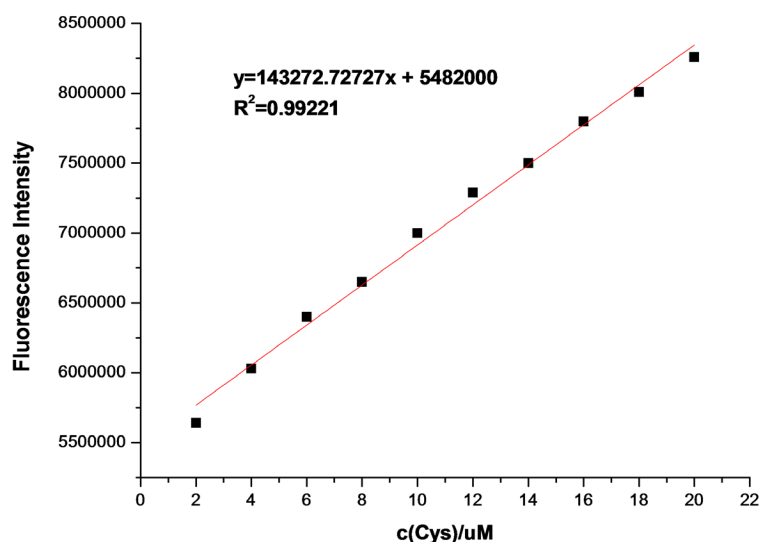


Figure 16. Line graph of fluorescence intensity of probe A with increasing Cys
图 16. 探针 A 随 Cys 浓度增大的荧光强度线形图

3.8.2. Hcy 浓度对探针 A 荧光强度的影响

在探针 A 的 HEPES 缓冲液(EtOH:H₂O = 8:2 (v:v), pH = 7.1, A4 浓度为 20 μmol/L)体系中, 加入浓度分别为 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 μmol/L 的 Hcy 溶液, 测得 Hcy 浓度梯度对探针 A 荧光强度的影响图(图 17)。如图 17 所示, 随着 Hcy 浓度的增加, 体系的荧光强度逐渐增大。将混合溶液体系在 502 nm 处的荧光强度对 Hcy 的浓度作图, 并进行线性拟合, 得探针 A 随 Hcy 浓度增大的荧光强度线性图(图 18)。如图 18 所示, 在加入 2~20 μmol/L Hcy 后, 荧光强度与浓度呈良好的线性增长关系, 线性方程为 $y = 157212.12x + 6150670$ (相关系数 $R^2 = 0.99898$)。根据最低检测限浓度计算公式 $C = 3S/K$ 得, 最低检测浓度为 5.2×10^{-7} mol/L, 说明该探针对 Hcy 的检测较 Cys 更灵敏。

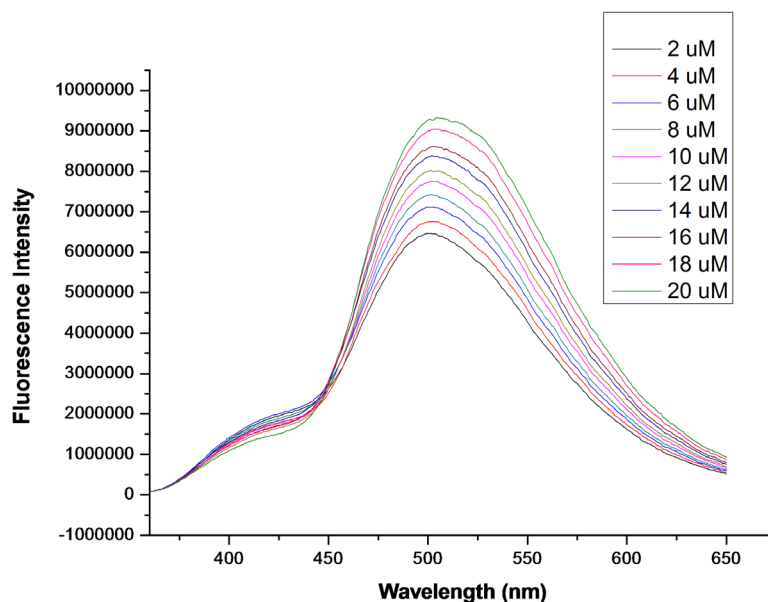


Figure 17. Change of fluorescence intensity of probe A with increasing Hcy

图 17. 探针 A 随 Hcy 浓度增大的荧光强度变化图

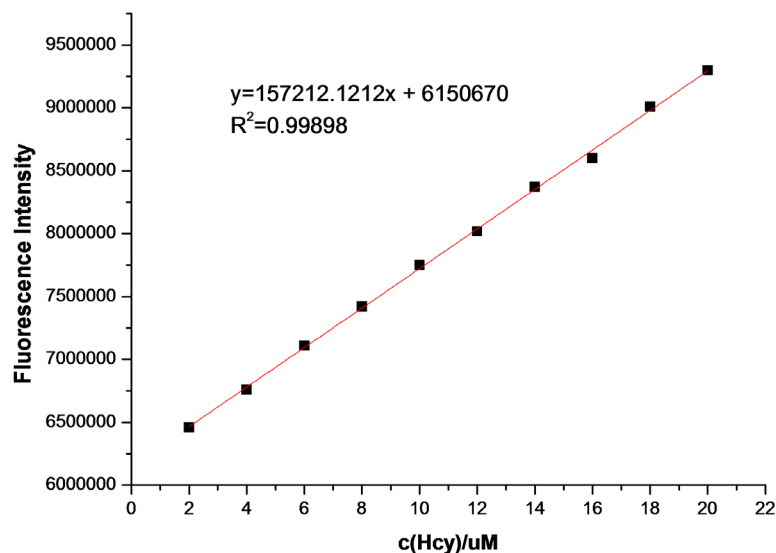


Figure 18. Line graph of fluorescence intensity of probe A with increasing Hcy

图 18. 探针 A 随 Hcy 浓度增大的荧光强度线性图

4. 结论

本文设计并合成了一种基于甲酰基识别 Cys 和 Hcy 的香豆素荧光探针 A。该探针合成路线简捷、结构简单,在 HEPES 缓冲液(EtOH:H₂O =8:2 (v:v), pH = 7.1)中对 Cys 和 Hcy 具有良好的选择性和抗干扰性。探针耐酸碱,在 2~10 的广泛 pH 区域内,对 Cys 和 Hcy 仍表现出良好的识别效果。响应时间分别为 30 min、20 min,且检测限分别为 5.7×10^{-7} mol/L、 5.2×10^{-7} mol/L,可用于快速检测 Cys 和 Hcy。

参考文献

- [1] Kusmirek, K., Chwatko, G., Glowacki, R. and Bald, E. (2009) Determination of Endogenous Thiols and Thiol Drugs in Urine by HPLC with Ultraviolet Detection. *Journal of Chromatography B*, **877**, 3300-3308. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.038>
- [2] Liu, J. and Lu, Y. (2007) A DNA Zyme Catalytic Beacon Sensor for Paramagnetic Cu²⁺ Ions in Aqueous Solution with High Sensitivity and Selectivity. *Journal of American Chemical Society*, **129**, 9838-9839. <https://doi.org/10.1021/ja0717358>
- [3] Persichilli, S., Gervasoni, J., Di Napoli, A., et al. (2015) Plasma Thiols Levels in Alzheimer's Disease Mice under Diet-Induced Hyperhomocysteinemia: Effect of Sad-Enosylmethionine and Superoxide-Dismutase Supplementation. *Journal of Alzheimer's Disease*, **44**, 1323-1331. <https://doi.org/10.3233/JAD-142391>
- [4] Benathan, M., Virador, V., Furumura, M., et al. (1999) Coregulation of Melanin Precursors and Tyrosinase in Human Pigment Cells: Roles of Cysteine and Glutathione. *Cellular & Molecular Biology*, **45**, 981-990.
- [5] Zhang, Z.X., Geng, D.Y., Han, Q., Liang, S.-D. and Guo, H.-R. (2013) The Cterminal Cysteine of Turbot Scophthalmus Maximus Translationally Controlled Tumour Protein Plays a Key Role in Antioxidation and Growth-Promoting Functions. *Journal of Fish Biology*, **83**, 1287-1301. <https://doi.org/10.1111/jfb.12231>
- [6] Uchida, E., Uemura, H., Tanaka, T., et al. (1991) Activity of Artificial Mutant Variants of Human Growth Hormone Deficient in a Disulfide Bond between Cys53 and Cys165. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **39**, 150-153. <https://doi.org/10.1248/cpb.39.150>
- [7] Wang, W., Rusin, O., Xu, X., et al. (2005) Detection of Homocysteine and Cysteine. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 15949-15958. <https://doi.org/10.1021/ja054962n>
- [8] Badawy, A.H., Abdel Aal, S.F. and Samour, S.A. (1989) Liver Injury Associated with N-Acetylcysteine Administration. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **19**, 563-571.
- [9] Shahrokhian, S. (2001) Lead Phthalocyanine as a Selective Carrier for Preparation of a Cysteine-Selective Electrode. *Analytical Chemistry*, **73**, 5972-5978. <https://doi.org/10.1021/ac010541m>
- [10] Tan, B., Venketa, N., Vrooman, H., et al. (2018) Homocysteine and Cerebral Atrophy: The Epidemiology of Dementia in Singapore Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, **62**, 877-885. <https://doi.org/10.3233/JAD-170796>
- [11] Chen, X., Zhou, Y., Peng, X. and Yoon, J. (2010) Fluorescent and Colorimetric Probes for Detection of Thiols. *Chemical Society Reviews*, **39**, 2120-2135. <https://doi.org/10.1039/b925092a>
- [12] Dietrichmuszalska, A., Malinowska, J., Olas, B., et al. (2012) Substance Abuse and Suicide Risk among Adolescents. *European Psychiatry*, **262**, 469-485.
- [13] Elkhairy, L., Ueland, P.M., Refsum, H., et al. (2012) Plasma Total Cysteine as a Risk Factor for Vascular Disease. *The European Concerted Action Project*, **103**, 2544-2549. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.21.2544>
- [14] Watanabe, H.L., David, C.W., Guyn, H.L. and Wong, N.L.M. (1991) Effect of Progesterone Therapy on Arginine Vasopressin and Atrial Natriuretic Factor in Premenstrual Syndrome. *Clinical and Investigative Medicine*, **20**, 211-223.
- [15] Lv, Z., Sun, Z., Song, C., et al. (2016) Sensitive and Background Free Determination of Thiols from Wastewater Samples by MOF-5 Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Using a Novel Fluorescence Probe of Carbazole-9-Ethyl-2-Maleimide. *Talanta*, **161**, 228-237. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.040>
- [16] Zhao, X., Zhu, S., Yang, H., You, J., Song, F., Liu, Z. and Liu, S. (2015) Simultaneous Determination of Amino Acid and Monoamine Neurotransmitters in PC12 Cells and Rats Models of Parkinson's Disease Using a Sensitizing Derivatization Reagent by HPLC-MS/MS. *Biomedical Chromatography*, **995-996**, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.05.017>
- [17] Baron, M. and Sochor, J. (2013) Estimation of Thiol Compounds Cysteine and Homocysteine in Sources of Protein by Means of Electrochemical Techniques. *International Journal of Electrochemical Science*, **8**, 11072-11086.
- [18] Lin, W.Y., Long, L.L. and Tan, W. (2010) A Highly Sensitive Fluorescent Probe for Detection of Benzenethiols in Environmental Samples and Living Cells. *Chemical Communications*, **46**, 1503-1505. <https://doi.org/10.1039/B922478E>