

# ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ РИФАМПИЦИНА К МЯГКИМ НУКЛЕОФИЛАМ ЦИСТЕИНУ И ГЛУТАТИОНУ МЕТОДАМИ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ, ИК-СПЕКТРОСКОПИИ С ПРЕОБРАЗОВАНИЕМ ФУРЬЕ И ТЕРМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

© 2020 г. Э. Бичер<sup>а</sup>, \* В. Пехливан<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Университет Ондокуз Майис, Атакум-самсун, 55139 Турция

\*e-mail: ebicer@omu.edu.tr

Поступила в редакцию 08.07.2019 г.

После доработки 14.10.2019 г.

Принята к публикации 10.12.2019 г.

Равновесия образования продуктов присоединения рифампицина к цистеину и глутатиону при различных рН исследованы методами циклической и квадратно-волновой вольтамперометрии. С ростом концентрации рифампицина резко снижаются токи восстановления тиолатов ртути(I)  $[Hg_2(RS)_2]$  – основных продуктов восстановления цистеина и глутатиона на Hg-электрод, а потенциалы их восстановления сдвигаются в сторону менее отрицательных значений благодаря межмолекулярному взаимодействию. В то же время вольтамперометрические сигналы (и прежде всего значения  $E_{pa}$  и  $E_{pc}$  обратимого окислительно-восстановительного процесса с участием  $\alpha$ -гидроуглонового остатка) рифампицина в присутствии цистеина или глутатиона сдвигаются в сторону положительных значений. Предложен правдоподобный механизм, объясняющий образование продуктов присоединения (аддуктов) в данном процессе взаимодействия. Именно, цистеин и глутатион ведут себя, как нуклеофилы, и участвуют в реакции присоединения с рифампицином. Это образование продуктов присоединения подтверждено также методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье и может быть прослежено через исчезновение полосы валентных колебаний свободной тиольной группы. Стехиометрическое отношение для этой реакции составляет 1 : 1; оценка констант связывания была проведена на основе экспериментальных данных квадратно-волновой вольтамперометрии. Влияние величины рН на константы связывания исследовано при варьировании рН (4.5, 7.4, 9.0). Показано, что на данную реакцию оказывает сильное влияние величина рН. Эта реакция нуклеофильного присоединения наиболее эффективна при рН 9. Константа реакции присоединения глутатиона выше, чем константа реакции присоединения цистеина, при всех изученных значениях рН. Термическое поведение этих продуктов присоединения охарактеризовано методом термического анализа (термогравиметрический анализ/дифференциальный термогравиметрический анализ/дифференциальный термический анализ). Термограммы, записанные для продуктов присоединения, не накладываются на термические кривые исходных материалов, и такое поведение можно рассматривать как дополнительное подтверждение образования аддуктов.

**Ключевые слова:** тиольные продукты присоединения, цистеин, глутатион, рифампицин, вольтамперометрия, ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье, термический анализ

DOI: 10.31857/S0424857020070026

## ВВЕДЕНИЕ

Глутатион ( $\gamma$ -глутамил цистеинил глицин), обычно обозначаемый как GSH (схема 1) – трипептид, присутствующий почти во всех эукариотических и прокариотических клетках [1]. Глутатион связывается с электрофильными [1–3], эндогенными и экзогенными химическими реактивами [1, 3–5], благодаря имеющемуся в нем цистеиновому остатку. Этот остаток также отвечает за такие свойства, как устойчивость против окислительного разру-

шения, сохранение структуры белка и обезвреживание токсичных реактивов [1, 6].

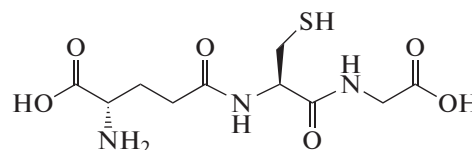


Схема 1. Молекулярное строение глутатиона.

Цистеин ( $\text{C}_2\text{SH}_3$ , схема 2) — это тиолсодержащая аминокислота, которая играет существенную роль в антиоксидантной защите и клеточном метаболизме [7–9]. Известно, что изменения в уровне цистеина биологически важны, так как могут служить указанием на ряд болезней [7–9]. Более того, для поддержания здоровья важна способность цистеина и глутатиона захватывать свободные радикалы [8, 9].

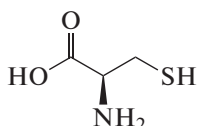


Схема 2. Молекулярное строение цистеина.

Рифампицин (RIF, схема 3) — это лекарство, которое используется главным образом при лечении туберкулеза [10, 11]. Взаимодействия между лекарствами очень важны для биологических процессов [12]. В то же время эти взаимодействия отражают действие лекарства на организм [12]. Поэтому изучение взаимодействий между лекарствами привлекает внимание в связи с выявлением механизма физиологического воздействия лекарств. О трансмембранных белках известно, что это молекулы-рецепторы для лекарств [12]. Однако, изучать взаимодействия белок–лекарство затруднительно из-за сложного строения молекул белков [12]. Поэтому во многих исследованиях часто используют аминокислоты или небольшие белки в качестве модельных соединений белков для более полного понимания взаимодействий белок–лекарство [12–15].

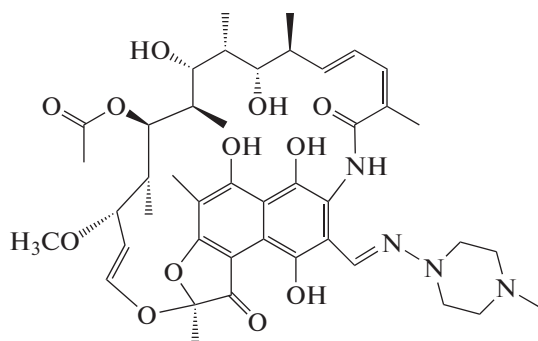


Схема 3. Молекулярное строение рифампицина.

Хотя в литературе были опубликованы результаты ряда исследований взаимодействия рифампицина с бовином [16–19] и сывороточным альбумином человека [20–23], с аминокислотными остатками фермента РНК полимераза [24], рецептора Pregnapne X (PXR) [25] и основной белка изоцитрат-лиаза [26], но до сих пор не было сделано попыток исследовать его взаимодействие с тиолированными аминокислотами, цистеином или трипептидом, глутатионом. Для исследования взаимодействий тиольных соединений были

с успехом применены электрохимические методы [27–32]. В настоящей работе вольтамперметрическими методами впервые исследован механизм реакций связывания при взаимодействии рифампицина с цистеином или глутатионом. Главная цель настоящей работы — определить стехиометрические коэффициенты, константы связывания и процесс взаимодействия рифампицина с этими тиольными соединениями. Рифампицин в настоящей работе был использован в качестве биомаркера при идентифицировании тиольных соединений. Полученные результаты могут дать вклад в развитие новых датчиков и механизмов воздействия лекарств в клинических и молекулярных биологических исследованиях.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы и растворы

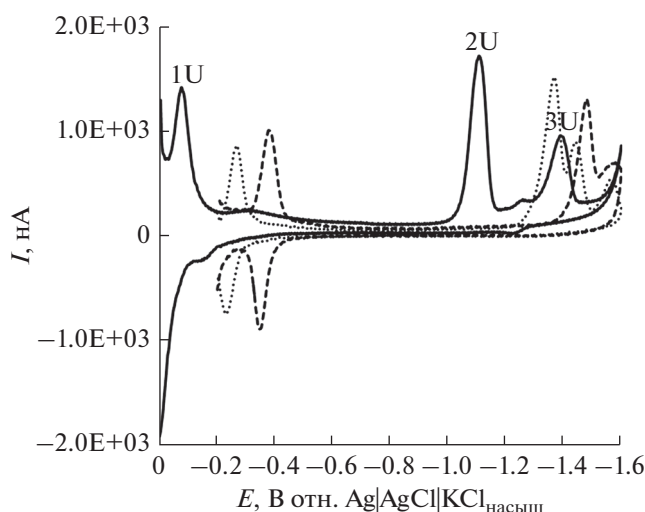
L-глутатион получен от фирмы Sigma. L-цистеин был приобретен у компании Merck. Рифампицин был приобретен у компании Fluka. Исходный раствор рифампицина готовили, растворяя необходимое количество в этаноле. Другие исходные растворы готовили на особо чистой воде (удельная электропроводность: 18.2 МΩ см). Однако, для солюбилизации нужного количества рифампицина в воде потребовалось добавить несколько капель раствора NaOH. Буферный раствор Бриттона–Робинсона получали, растворяя необходимые количества  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и  $\text{H}_3\text{PO}_4$  в особо чистой воде и устанавливая нужное значение pH с помощью 0.2 М раствора NaOH.

### Оборудование

В электрохимических экспериментах использовали полярографический анализатор EG&G PAR 384В в комбинации с ячейкой PARC 303A SMDE. Вольтамперметрическая ячейка имела три электрода: ртутный электрод в виде висящей капли (рабочий электрод), электрод сравнения  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{насыщ}}$  и платиновый противэлектрод. Электрохимические эксперименты проводили с использованием программного пакета ECDSOFT [33], установленного на ноутбук, управлявший полярографическим анализатором. Значение pH буферного раствора измеряли pH-метром Jenway 3010, укомплектованным стеклянным электродом.

ИК-спектры с преобразованием Фурье образцов снимали на рамановском модульном спектрометре Thermo Scientific Nicolet 6700/NXR FT. Измерения охватывали интервал волновых чисел от 4000 до  $400\text{ см}^{-1}$ .

Термоаналитические измерения (динамики потери массы (TGA) при нагревании, изменения температуры в зоне реакции (DTA) и скорости разложения образца (DrTGA) в единицу времени)



**Рис. 1.** Циклические вольтамперограммы  $4.98 \times 10^{-6}$  М раствора рифампицина при pH 4.5 (сплошные линии), 7.4 (точечные линии) и 9.0 (пунктир). 1U: пик восстановления остатка юглона до гидроюглона; 2U и 3U: пики необратимого восстановления различных карбонильных групп.

проводили на анализаторе Shimadzu DTG-60 Simultaneous TG-DTA. Образцы нагревали в области температур 24–700°C со скоростью 10°C мин<sup>-1</sup>. Измерения вели в подвижной атмосфере с расходом газа 40 мл мин<sup>-1</sup>, используя приблизительно 5 мг образца, который взвешивали в открытом платиновом тигле.

### Методика

Вначале записывали вольтамперограммы цистеина, глутатиона и рифампицина в буферных растворах Бриттона–Робинсона. Затем получали вольтамперограммы цистеина или глутатиона при возрастающей концентрации рифампицина. Перед снятием вольтамперограмм растворы освобождали от растворенного воздуха (в течение приблизительно 5 мин), пропуская через них газ N<sub>2</sub> (который во время измерений пропускали над поверхностью раствора). Если не указано иное, использовали следующие условия: при циклической вольтамперометрии – скорость развертки потенциала 500 мВ/с, при квадратно-волновой вольтамперометрии – высота импульса 25 мВ, частота 100 Гц, время установления равновесия 5 с, средний размер ртутной капли, шаг развертки 4 мВ. Вольтамперометрические измерения выполнялись при комнатной температуре. Константы образования продуктов присоединения цистеин–рифампицин или глутатион–рифампицин вычисляли по снижению высоты главного пика тока цистеина или глутатиона с ростом концентрации рифампицина.

### Синтез продуктов присоединения

Горячий раствор рифампицина (1 ммоль, 0.823 г) в этаноле (25 мл) медленно, по каплям добавляли к раствору цистеина (1 ммоль, 0.121 г) или глутатиона (1 ммоль, 0.307 г) в воде (25 мл). Смесь нагревали в стеклянном стакане при непрерывном помешивании до тех пор, пока раствор не выпарился наполовину. После этого раствор охлаждали до комнатной температуры и ждали, пока не получался твердый продукт. Полученный продукт присоединения отфильтровывали и сушили на воздухе.

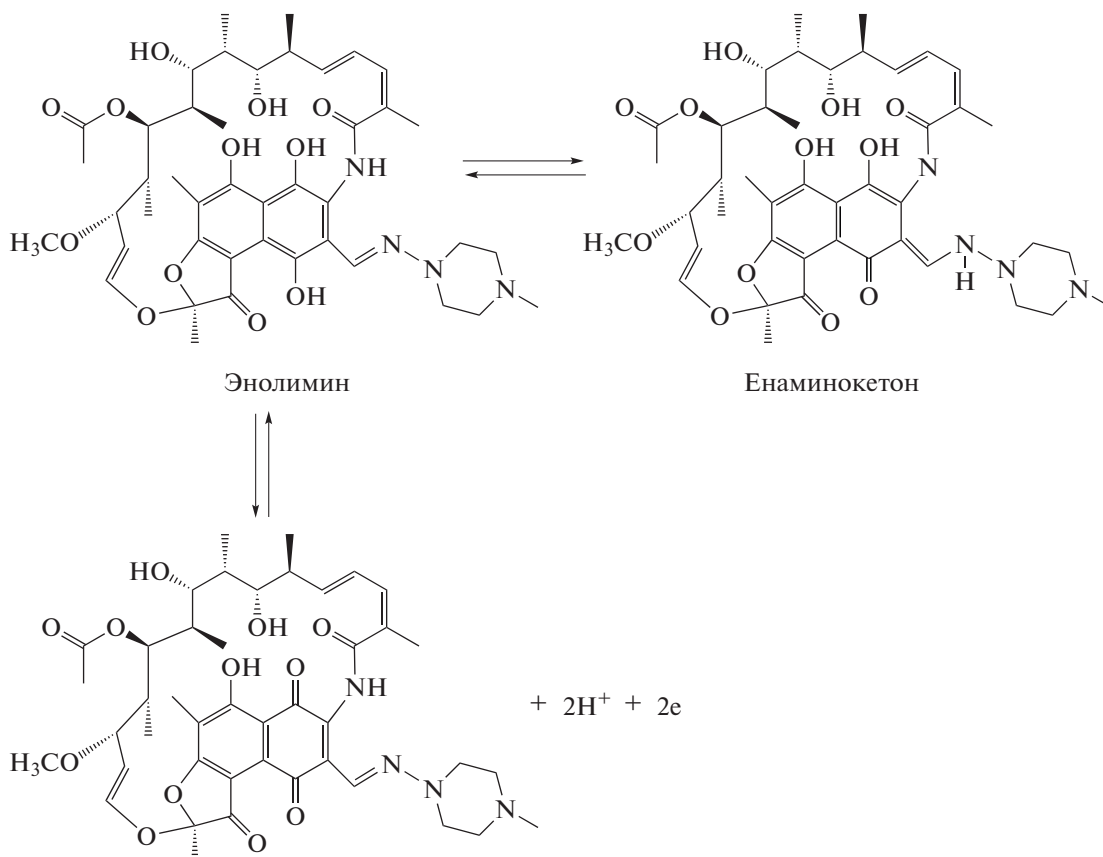
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Вольтамперометрия

На рис. 1 приведены циклические вольтамперограммы рифампицина, снятые при pH 4.5, 7.4 и 9.0. Из рис. 1 видно, что необратимые пики тока при относительно отрицательных потенциалах и обратимый пик при менее отрицательном потенциале (близком к 0 В) относятся к электродной реакции с участием рифампицина. Полярографическое и вольтамперометрическое поведение рифампицина на ртутном электроде уже изучалось ранее рядом авторов [34–37].

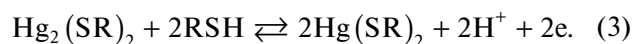
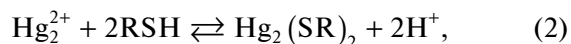
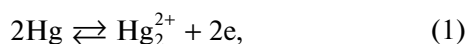
Необратимые пики тока (рис. 1, 2U и 3U) можно приписать восстановлению различных карбонильных групп [бетенолид (фуранон) и амид] [34, 35, 38, 39]. В предшествующей работе [35] утверждалось, что на квадратно-волновой вольтамперограмме рифампицина, снятой в буферном растворе Бриттона–Робинсона (pH 7.0), имеется два пика тока при –0.674 и –1.354 В, относящихся, соответственно, к восстановлению азометина и карбонильных групп. Однако, как видно из циклических вольтамперограмм рифампицина (рис. 1), исчезновение небольшого пика тока восстановления иминной группы при –0.674 В можно объяснить на основе таутометрического равновесия энолимин–кетозамин (рис. 2) [40]. Также сообщалось, что кетозамин – преобладающее вещество в воде [41]. С другой стороны, циклическая вольтамперометрия – менее чувствительный метод, чем квадратно-волновая вольтамперометрия [42–44]. Поэтому на циклических вольтамперограммах пик тока восстановления иминной группы может и не проявляться достаточно ясно.

Разность потенциалов ( $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ ) анодного и катодного обратимых пиков тока рифампицина (рис. 1, 1U) составляет около 34 мВ, что близко к теоретическому значению (около 30 мВ) для двухэлектронной обратимой волны. С другой стороны, в опубликованных работах [34–37] обратимый пик тока не был обнаружен. Однако, этот обратимый двухэлектронный процесс можно приписать окислению  $\alpha$ -гидроюглонового остатка до юглона (рис. 2) [45–51].



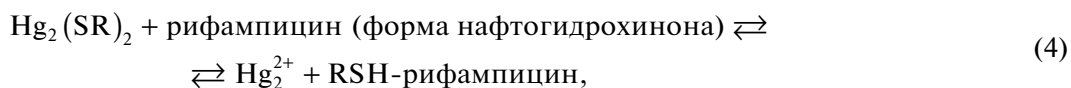
**Рис. 2.** Таутомерные формы рифампицина и окислительно-восстановительный процесс с участием его  $\alpha$ -гидроюглового остатка.

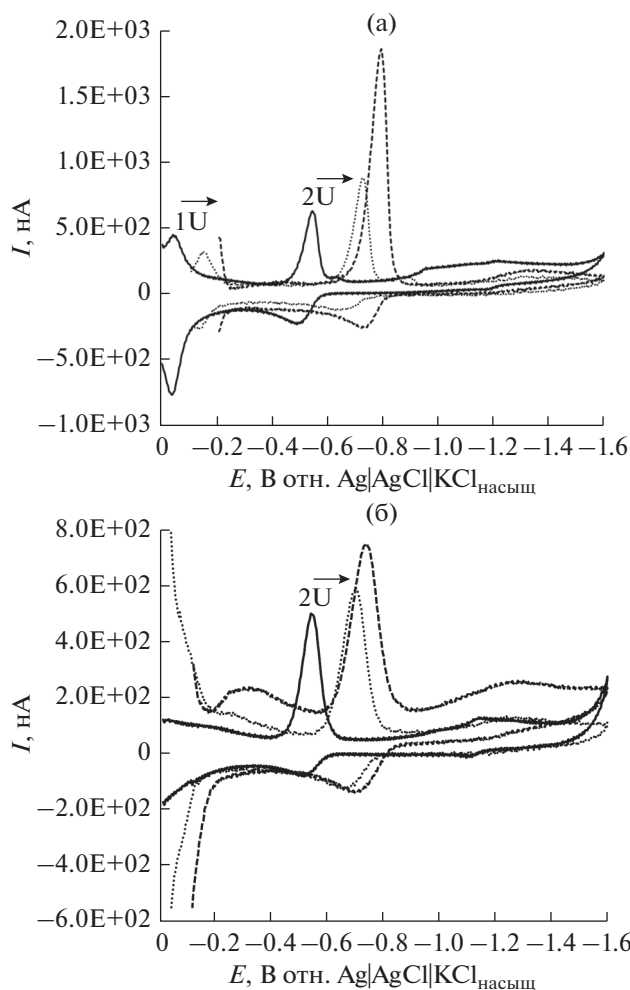
Циклические вольтамперограммы цистеина и глутатиона, записанные при различных значениях pH, представлены на рис. 3. Обычно на этих циклических вольтамперограммах имеется только один пик тока, но в некоторых случаях (высокая концентрация или высокая скорость развертки потенциала) при более положительных потенциалах наряду с основным пиком (2U) может появляться второстепенный пик (1U). При низких концентрациях тиола этот второстепенный пик едва заметен [52, 53]. В литературе имеются многочисленные статьи об электрохимическом поведении цистеина и глутатиона [42–45]. Таким образом, эти окислительно-восстановительные пики можно приписать образованию и восстановлению тиолатов ртути(I) и (II) [52–55]. Это образование тиолатов ртути(I) и (II) в результате анодных реакций можно представить следующим образом [52–55]:



Для того, чтобы проследить взаимодействие рифампицина с цистеином и глутатионом, был выбран пик тока восстановления тиолата ртути(I) потому, что это основной сигнал. После добавления рифампицина к растворам тиола потенциал пика тиолата ртути(I) сдвигается в сторону положительных значений, а ток в пике снижается (рис. 4 и 5).

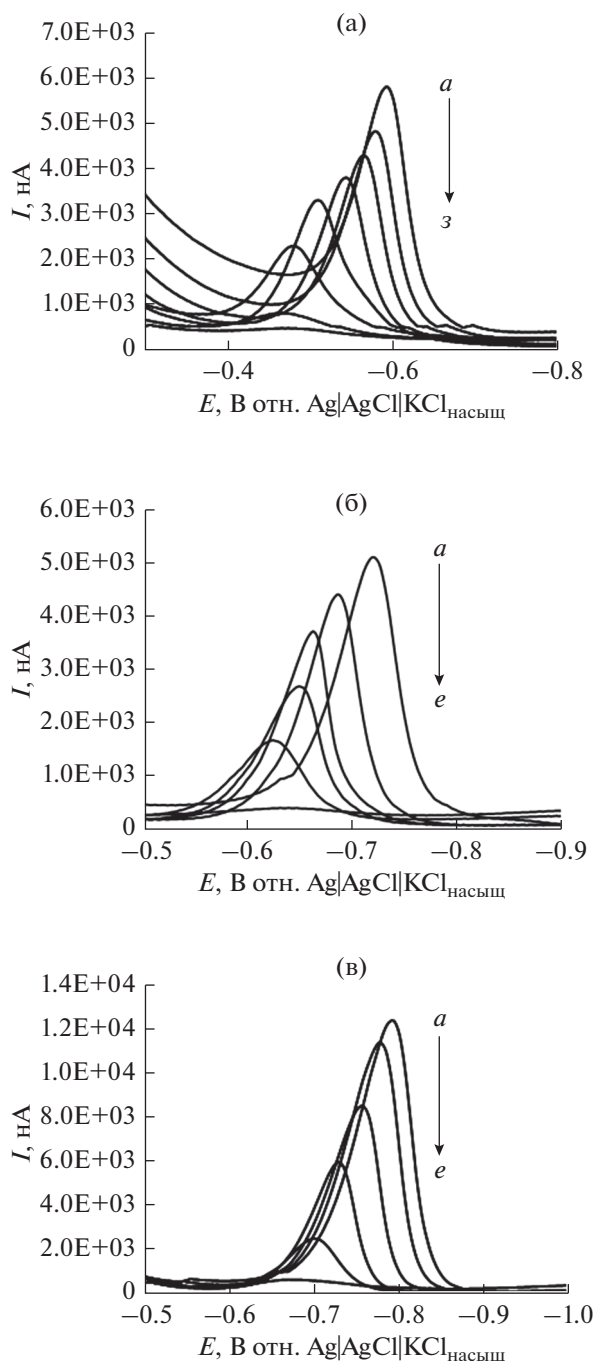
Хорошо известно, что добавленное вещество, способное к адсорбции, обычно играет роль ингибитора по отношению к электродной реакции и сдвигает процесс восстановления к отрицательным потенциалам [56, 57]. Однако как “положительный” сдвиг потенциала восстановления тиолата ртути(I), так и уменьшение пикового тока его восстановления в присутствии рифампицина имеют источником равновесие, установившееся вблизи Hg-электрода, а именно:





**Рис. 3.** (а) Циклические вольтамперограммы  $4.98 \times 10^{-6}$  М раствора цистеина при pH 4.5 (сплошные линии),  $4.98 \times 10^{-6}$  М раствора цистеина при pH 7.4 (точечные линии) и  $1.96 \times 10^{-5}$  М раствора цистеина при pH 9.0 (пунктир). 1U: восстановление тиолата ртути(II) до тиолата ртути(I); 2U: восстановление тиолата ртути(I) до металлической ртути и тиола.

где RSH-рифампицин является аддуктом – продуктом присоединения. Количество тиолатов ртути, электрохимически генерируемых в процессе в присутствии цистеина, зависит от концентрации свободного цистеина в среде (см. уравнения (2) и (3)). С другой стороны, при постепенном увеличении концентрации рифампицина в присутствии тиолов катодный пик тока тиолата ртути(I) уменьшается благодаря образованию аддукта (уравнение (4)). Другими словами, связывание тиолов с рифампицином понижает концентрацию свободного цистеина.



**Рис. 4.** Квадратно-волновые вольтамперограммы (а)  $4.98 \times 10^{-6}$  М раствора цистеина в присутствии а – 0, б –  $4.95 \times 10^{-6}$ , в –  $9.85 \times 10^{-6}$ , г –  $1.47 \times 10^{-5}$ , д –  $1.95 \times 10^{-5}$ , е –  $2.43 \times 10^{-5}$ , ж –  $2.89 \times 10^{-5}$ , з –  $3.82 \times 10^{-5}$  М рифампицина при pH 4.5; (б)  $4.98 \times 10^{-6}$  М цистеина в присутствии а – 0, б –  $4.95 \times 10^{-6}$ , в –  $9.85 \times 10^{-6}$ , г –  $1.47 \times 10^{-5}$ , д –  $1.95 \times 10^{-5}$ , е –  $2.43 \times 10^{-5}$  М рифампицина при pH 7.4; (в)  $1.96 \times 10^{-5}$  М цистеина в присутствии а – 0, б –  $4.88 \times 10^{-6}$ , в –  $9.71 \times 10^{-6}$ , г –  $1.45 \times 10^{-5}$ , д –  $1.92 \times 10^{-5}$ , е –  $2.39 \times 10^{-5}$  М рифампицина при pH 9.0.



С другой стороны, присоединение тиолов к рифампицину облегчает восстановление электроактивных групп на молекуле рифампицина, но затрудняет окисление гидроюглоновой группы. Быстрая необратимая химическая реакция, следующая за обратимой электродной реакцией, позволяет сдвинуть электровосстановление к положительным потенциалам [56, 57]. Для очень быстрых последующих реакций потенциал пика

тока может сдвинуться даже на 120 мВ при постоянной скорости развертки потенциала [56, 57]. К тому же образование аддукта между рифампицином и тиолами приводит к уменьшению концентрации свободных тиолов в реакционной среде. Это приводит к снижению пикового тока. Для аддукта можно предположить, на основе других реакций присоединения тиолов, существование в двух формах (схема 4) [58, 59]:

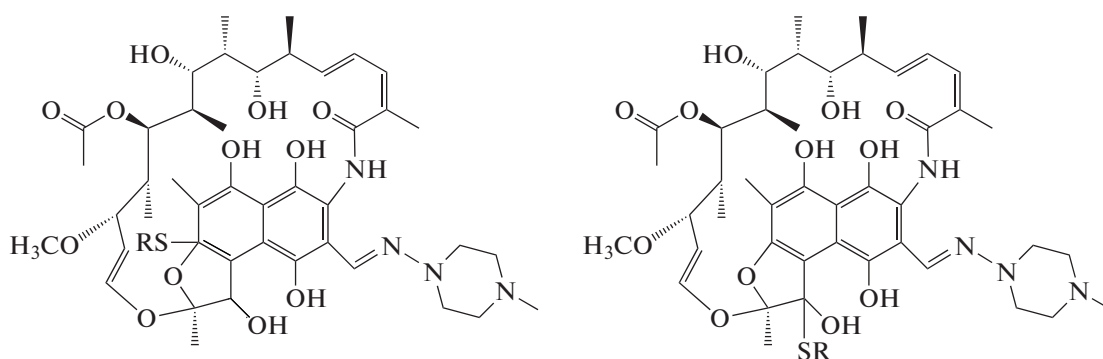


Схема 4. Предлагаемое строение аддукта (цистеин–рифампицин).

#### ИК-спектроскопический анализ

Образование аддуктов между рассматриваемыми в настоящей работе тиольными соединениями и рифампицином подтверждается ИК-спектроскопическим анализом с преобразованием Фурье. На рис. 6 приведены ИК-спектры с преобразованием Фурье аддуктов и исходных соединений. Как видно из рис. 6, при 2550 и 2522 см<sup>-1</sup> наблюдаются характерные пики –SH-валентных колебаний, соответственно, цистеина и глутатиона [60–62].

При сравнении ИК-спектров с преобразованием Фурье аддуктов со спектрами цистеина и глутатиона мы видим полное исчезновение валентных колебаний S–H-групп (рис. 6). Эту ситуацию можно объяснить расщеплением связей S–H при нуклеофильном замещении тиольных групп рифампицином, что подтверждает образование аддуктов [63, 64].

Более того, в спектрах аддуктов исчезают цвиттерсионные N–H-валентные колебания цистеина и глутатиона при 2075 см<sup>-1</sup> (рис. 6). Это наблюдение можно объяснить превращением –NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-остатка тиольных соединений в –NH<sub>2</sub>-остаток в аддуктах [63].

#### Термический анализ

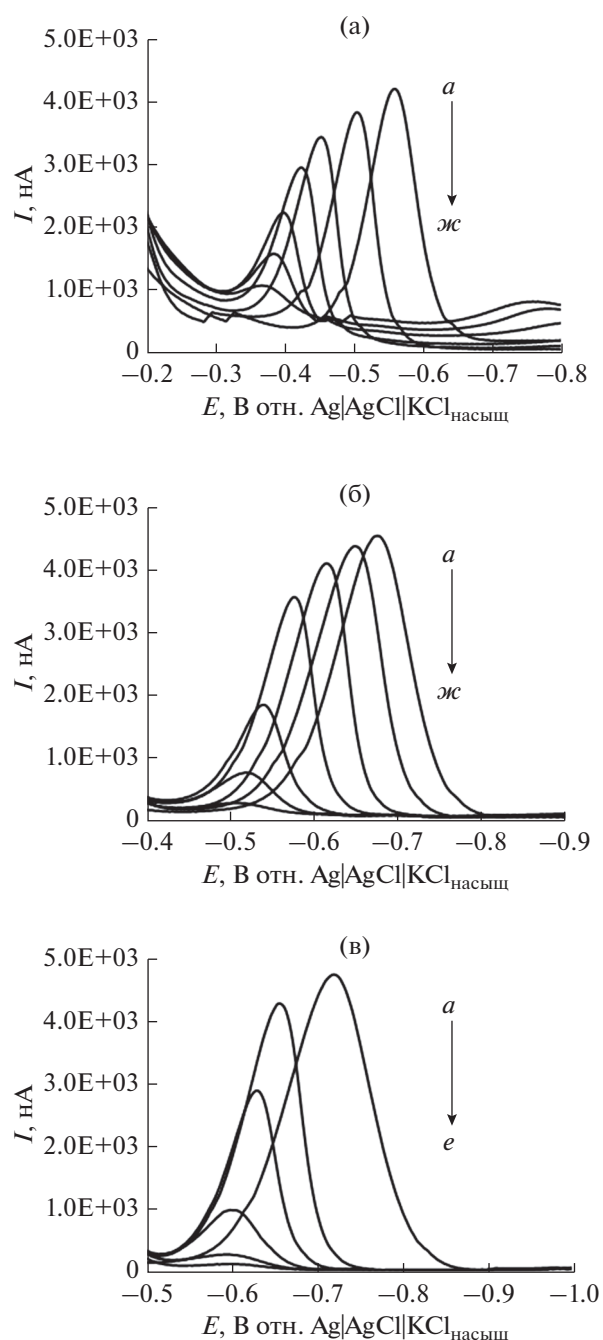
На рис. 7 и 8 даны термограммы цистеина, глутатиона, рифампицина, рифампицин–цистеина и рифампицин–глутатиона. Кривые термографи-

метрического анализа L-CysH (рис. 7) представляют термическое разрушение, происходящее в две стадии, включающее общую потерю массы 97.3% в температурном интервале 177.6–663.4°C. Главный процесс термического разрушения отмечен в интервале температур 177.6–420.3°C с потерей массы 87.8% (табл. 1). Эндотермический пик при 230°C соответствует плавлению цистеина [61, 65–67].

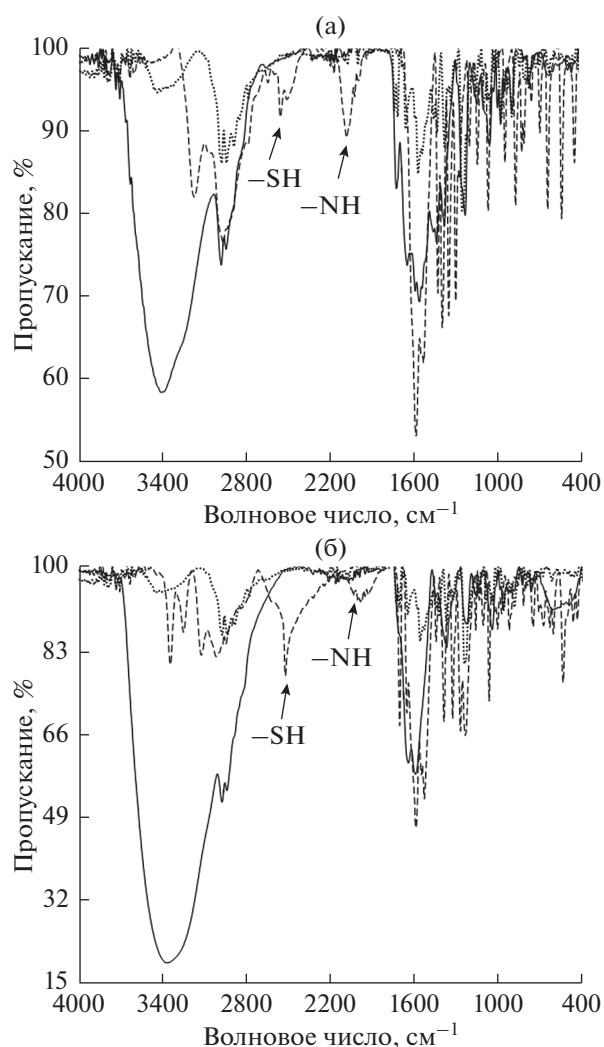
Как видно из рис. 7, чистый глутатион дает эндотермический пик при 204°C. Этот пик отвечает процессу плавления, связанному с термическим разрушением [68–71]. Вторая стадия разрушения глутатиона происходит в интервале температур 455.9–700.0°C с потерей массы 35.0% (табл. 1).

Кривая дифференциального термогравиметрического анализа рифампицина (рис. 7) содержит эндотермический пик при 193°C, связанный с процессом плавления. Дополнительно видны экзотермические пики при 209 и 257°C, связанные, соответственно, с рекристаллизацией и фазовым переходом [72–75]. Термограмма рифампицина содержит две главных стадии разрушения. Первая потеря веса 42.9% происходит в интервале температур 173.1–465.7°C. Вторая, главная потеря веса 53.2% имеет место в интервале 465.7–700.0°C (табл. 1).

Термогравиметрические кривые образовавшихся аддуктов отличаются от кривых чистых CysH, глутатиона и рифампицина температурными интервалами процессов, связанных с потеря-

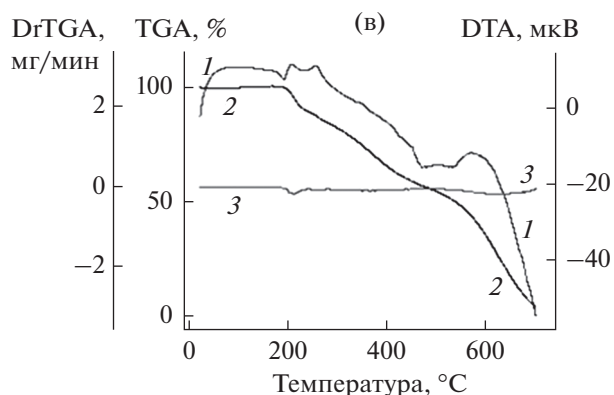
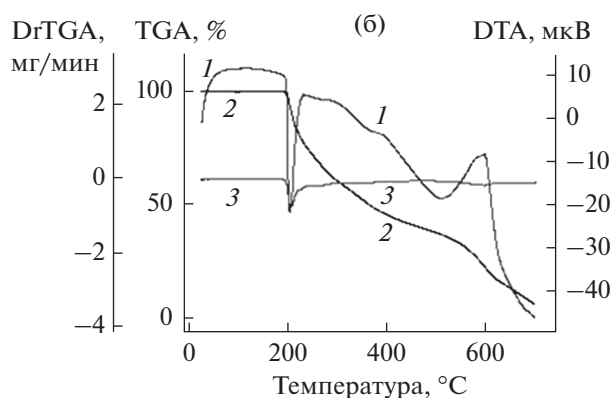
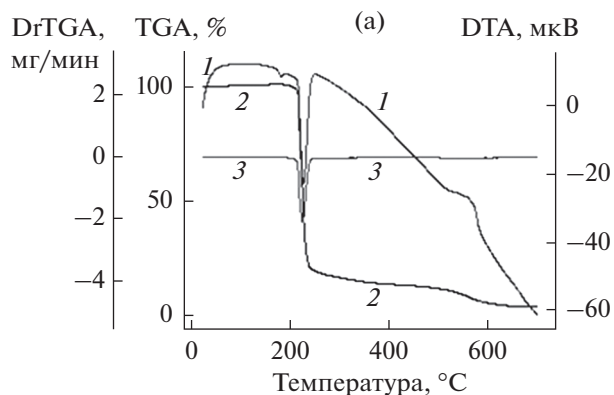


**Рис. 5.** Квадратно-волновые вольтамперограммы (а)  $4.98 \times 10^{-6}$  М раствора глутатиона в присутствии а – 0, б –  $4.74 \times 10^{-6}$ , в –  $9.05 \times 10^{-6}$ , г –  $1.30 \times 10^{-5}$ , д –  $1.66 \times 10^{-5}$ , е –  $1.83 \times 10^{-5}$ , ж –  $1.99 \times 10^{-5}$  М рифампицина при pH 4.5; (б)  $9.90 \times 10^{-6}$  М раствора глутатиона в присутствии а – 0, б –  $2.42 \times 10^{-6}$ , в –  $4.72 \times 10^{-6}$ , г –  $6.91 \times 10^{-6}$ , д –  $9.01 \times 10^{-6}$ , е –  $1.10 \times 10^{-5}$ , ж –  $1.29 \times 10^{-5}$  М рифампицина при pH 7.4; (в)  $1.48 \times 10^{-5}$  М раствора глутатиона в присутствии а – 0, б –  $4.69 \times 10^{-6}$ , в –  $6.88 \times 10^{-6}$ , г –  $8.97 \times 10^{-6}$ , д –  $1.10 \times 10^{-5}$ , е –  $1.29 \times 10^{-5}$  М рифампицина при pH 9.0.



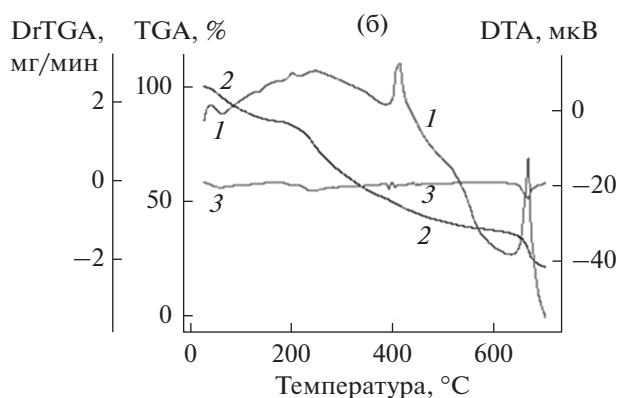
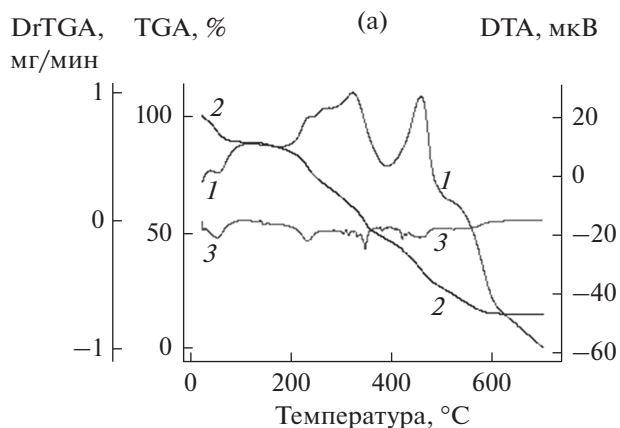
**Рис. 6.** (а) ИК-спектры с преобразованием Фурье цистеина (пунктир), рифампицина (точечные линии) и аддукта CuSH–рифампицин (сплошные линии). (б) ИК-спектры с преобразованием Фурье глутатиона (пунктир), рифампицина (точечные линии) и аддукта глутатион–рифампицин (сплошные линии).

ми массы (рис. 8). Как видно из табл. 1, термическое разрушение аддуктов рифампицина – это сложные процессы, состоящие из трех стадий. В случае аддуктов кривые указывают на то, что между рифампицином и тиольными соединениями происходит химическая реакция, поскольку не наблюдается пиков при температурах, близких к тем, что определяют чистыми цистеином, глутатионом и рифампицином. На термограммах цистеин–рифампицина и глутатион–рифампицина имеется только один широкий пик с центром у  $60^\circ\text{C}$ , связанный с высвобождением физически адсорбированной воды из образца [76, 77]. Таким образом, можно утверждать, что эти аддукты имеют средство к воде.



**Рис. 7.** Кривые дифференциального термического анализа (DTA) (1), термогравиметрического анализа (TGA) (2) и дифференциального термогравиметрического анализа (DfTGA) (3) (а) цистеина, (б) глутатиона, (в) рифампицина.

Для этих тиольных аддуктов наблюдается исчезновение эндотермических пиков плавления чистых CysH и глутатиона (рис. 8). Это указывает на то, что цистеин и глутатион связаны с молекулой рифампицина ковалентной связью. Однако, хорошо известно, что термический анализ физической смеси с глутатионом выявляет пик плавления глутатиона благодаря свободному глутатиону с несколькими степенями сдвига [69].



**Рис. 8.** Кривые дифференциального термического анализа (DTA) (1), термогравиметрического анализа (TGA) (2) и дифференциального термогравиметрического анализа (DfTGA) (3) аддуктов (а) цистеин–рифампицин и (б) глутатион–рифампицин.

#### Константы связывания и стехиометрия

Равновесие образования аддуктов дается уравнением (4). В принципе, хорошо выраженный катодный сигнал рифампицина приблизительно при  $-1.1$  В (рис. 1) должен быть чувствительным к образованию аддуктов, за исключением осложнений, связанных с образованием Hg-тиолатных комплексов. Но этот катодный сигнал не использовался для оценки константы образовавшегося равновесия. Причина этого в том, что изменения этого токового отклика с ростом концентрации цистеина непригодны для определения константы образования аддуктов цистеин–рифампицин. Однако, в соответствии с этими вольтамперметрическими измерениями, определение константы образования аддуктов цистеин–рифампицин основано на уменьшении катодного пикового тока восстановления комплекса  $Hg_2(SR)_2$  в присутствии возрастающей концентрации рифампицина в растворе цистеина. Стехиометрия и константы



**Таблица 1.** Термоаналитические данные для исследованных соединений

Соединение	Процесс	$T_{\text{start}}, ^\circ\text{C}$	$T_{\text{end}}, ^\circ\text{C}$	$\Delta m, \%$
Цистеин	I	177.6	420.3	87.8
	II	420.3	663.4	9.5
Глутатион	I	189.2	455.9	59.0
	II	455.9	700.0	35.0
Рифампицин	I	173.1	465.7	42.9
	II	465.7	700.0	53.2
Цистеин–рифампицин	I	24.2	115.5	11.4
	II	115.5	265.9	18.0
	III	265.9	664.4	56.2
Глутатион–рифампицин	I	24.0	169.2	15.1
	II	169.2	565.5	46.2
	III	565.5	700.0	16.7

**Таблица 2.** Логарифм констант образования аддуктов рифампицина с цистеином и глутатионом при различных pH

Аддукт	$\lg \beta [M^{-1}]$		
	pH 4.5	pH 7.4	pH 9.0
Цистеин–рифампицин	$3.84 \pm 0.04$	$4.18 \pm 0.07$	$4.33 \pm 0.05$
Глутатион–рифампицин	$4.52 \pm 0.10$	$5.53 \pm 0.09$	$6.06 \pm 0.12$

образования аддуктов определяются следующим уравнением [78–84]:

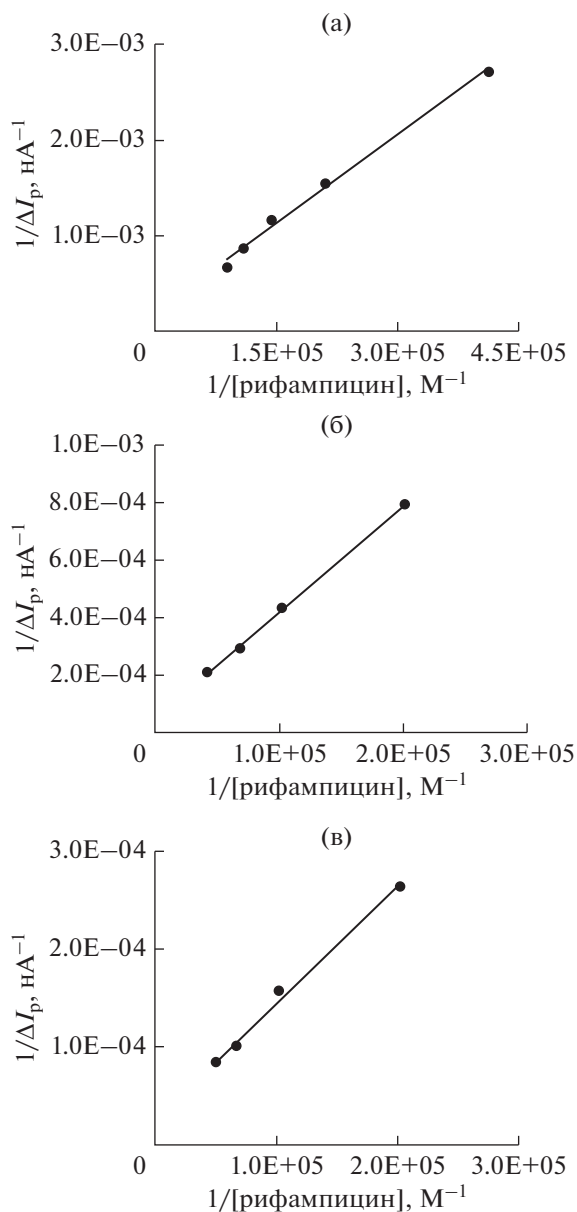
$$\frac{1}{\Delta I_p} = \frac{1}{\Delta I_{p,\text{max}}} + \frac{1}{\beta \Delta I_{p,\text{max}}} \times \left( \frac{1}{[\text{рифампицин}]^n} \right), \quad (5)$$

где  $\Delta I_p$  – разница пиковых токов восстановления  $\text{Hg}_2(\text{SR})_2$  в присутствии рифампицина,  $\Delta I_{p,\text{max}}$  – максимальная разница пиковых токов восстановления  $\text{Hg}_2(\text{SR})_2$  в случае полного потребления цистеина в реакции присоединения,  $[\text{рифампицин}]$  – концентрация добавленного рифампицина, а  $\beta$  (л моль<sup>-1</sup>) – условная константа образования и константа взаимодействия,  $n$  – число связывания. В настоящей работе при  $n = 1$  получается хорошая линейная связь между величинами  $1/\Delta I_p$  и  $(1/[\text{рифампицин}])$ , как показано на рис. 9. Вычисленные значения  $\beta$  аддуктов даны в табл. 2.

В то же время пики тока восстановления рифампицина в присутствии цистеина и глутатиона сдвинулись к менее отрицательным потенциалам. Это касается в особенности окислительно-восстановительной пары гидроюглон–юглон, которая оказалась вблизи потенциала 0 В (рис. 10). Уменьшение пиковых токов, принадлежащих электроактивным группам рифампицина, можно объяснить меньшим коэффициентом диффузии аддукта, чем свободного рифампицина. Это заставляет говорить о более медленной диффузии аддукта из объема раствора к поверхности ртути [85].

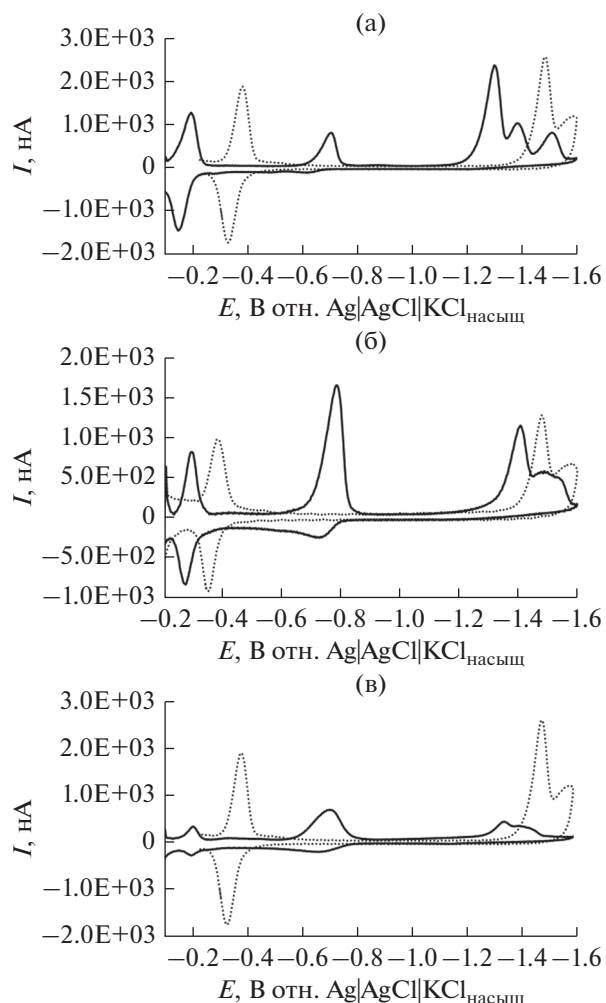
Так как и анодный, и катодный токи обратной электродной реакции рифампицина уменьшаются в присутствии цистеина и глутатиона, мы сравнили отношения токов в присутствии и в отсутствие этих тиолов, с целью прояснить процесс присоединения. Ожидалось, что первоначальный электродный продукт рифампицин (юглоновая форма) расходуется в последующей химической реакции с образованием новых электроактивных аддуктов с цистеином и глутатионом (схема 5), и потому отношение катодного и анодного токов ( $I_{\text{pc}}/I_{\text{pa}}$ ) этого обратимого процесса для аддуктов превысит отношение для окислительно-восстановительной пары гидроюглон–юглон со свободным рифампицином (табл. 3).





**Рис. 9.** Графики зависимости  $1/\Delta I_p$  ( $\text{нА}^{-1}$ ) от  $1/[\text{рифампицин}]$  ( $\text{М}^{-1}$ ) для (а)  $3.98 \times 10^{-6}$  М раствора глутатиона при pH 4.5, (б)  $4.78 \times 10^{-6}$  М раствора цистеина при pH 7.4, (в)  $4.78 \times 10^{-6}$  М раствора цистеина при pH 9.

Полученные на основе вышеупомянутого процесса значения формального потенциала ( $E^0$ ) обратимого окислительно-восстановительного процесса с участием рифампицина в присутствии и в отсутствие цистеина и глутатиона даны в табл. 3. Величина  $E^0$  определена из  $(E_{pa} + E_{pc})/2$  [86]. Более того, отношение ( $K_{ox}/K_{red}$ ) констант связывания рифампицина в окисленной ( $K_{ox}$ ) и восста-



**Рис. 10.** Циклические вольтамперограммы (а)  $9.85 \times 10^{-6}$  М раствора рифампицина в отсутствие (точечные линии) и в присутствии (сплошные линии)  $4.98 \times 10^{-6}$  М раствора цистеина при pH 7.4; (б)  $4.95 \times 10^{-6}$  М раствора рифампицина в отсутствие (точечные линии) и в присутствии (сплошные линии)  $4.98 \times 10^{-6}$  М раствора цистеина при pH 9; (в)  $9.76 \times 10^{-6}$  М раствора рифампицина в отсутствие (точечные линии) и в присутствии (сплошные линии)  $1.48 \times 10^{-5}$  М раствора глутатиона при pH 9.

новленной ( $K_{red}$ ) формах можно получить из следующего уравнения [87]:

$$\Delta E^0 = E_b^0 - E_f^0 = RT/(nF) \ln(K_{ox}/K_{red}), \quad (6)$$

где  $\Delta E^0$  – сдвиг формального потенциала обратимого пика рифампицина, а  $E_f^0$  и  $E_b^0$  – формальные потенциалы, соответственно, свободного и связанного с цистеином рифампицина.

Из табл. 3 видно, что окисленная форма рифампицина (структура юглона) сильнее взаимодействует с цистеином и глутатионом, чем его

**Таблица 3.** Изменения отношения катодного тока к анодному току ( $I_{pc}/I_{pa}$ ) и формальный потенциал ( $E^0$ ) окислительно-восстановительного процесса гидроюглон–юглон в присутствии цистеина и глутатиона при pH 7.4 и 9

Добавленное соединение	$E^0$ , В		$I_{pc}/I_{pa}$		$K_{ox}/K_{red}$	
	pH 7.4	pH 9.0	pH 7.4	pH 9.0	pH 7.4	pH 9.0
–	–0.254	–0.362	1.122	1.081	–	–
Цистеин	–0.178	–0.282	1.235	1.298	$4.10 \times 10^2$	$5.63 \times 10^2$
Глутатион	–0.130	–0.204	1.511	2.241	$1.84 \times 10^4$	$2.71 \times 10^5$

восстановленная форма (структура гидроюглона). Если принять, что значения  $pK_a$  сульфгидрильной группы цистеина и глутатиона в воде равны, соответственно, 8.10 и 8.72 [88, 89], то константа образования аддукта глутатион–рифампицин больше, чем аддукта цистеин–рифампицин, при всех значениях pH (табл. 2). Подобно другим реакциям нуклеофильного замещения тиолов цистеина и глутатиона [90], можно утверждать, что константа образования аддукта здесь также возрастает с ростом основности функциональной группы SH-тиольного соединения. Такой результат можно объяснить ростом электронной плотности на атоме серы [90]. С другой стороны, рост констант образования с ростом pH может быть следствием роста относительного процента депротонированного тиолат-аниона. Как результат, тиолатная форма более реакционноспособна, чем тиольная [91].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе с помощью вольтамперометрических методов подробно исследованы взаимодействия цистеина и глутатиона с рифампицином при различных pH (4.5, 7.4 и 9.0). Интересно, что константа реакции аддукта глутатиона с рифампицином больше, чем аддукта цистеина с рифампицином, при всех исследованных значениях pH. Этот результат можно прояснить через основность сульфгидрильных групп. С другой стороны, константы образования аддуктов, как цистеин–рифампицина, так и глутатион–рифампицина, растут с ростом pH. По изменениям формального потенциала обратимой реакции рифампицина с системой гидроюглон–юглон в присутствии цистеина и глутатиона установлено, что окисленная форма рифампицина сильнее реагирует как с цистеином, так и с глутатионом, чем его восстановленная форма.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование было частично представлено в форме постера на Международной евроазиатской научной конференции по биологии и химии (Eurasian-BioChem 2018), 26–27 апреля 2018 г., Анкара, Турция, Тезисы, стр. 902. Авторы благодарят проф. Й. Топчу

(Университет Ондокуз Майиз) за предоставление данных термического анализа и д-ра М. Чинарли (Университет Ахи Евран) за получение ИК-спектров.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Basu, S., Majumder, S., Chatterjee, S., Ganguly, A., Efferth, T., and Choudhuri, S.K., Detection and characterization of a glutathione conjugate of a novel copper complex, *In Vivo*, 2009, vol. 23, p. 401.
- Meister, A. and Anderson, M.E., Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.*, 1983, vol. 52, p. 711. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Tew, K.D., Glutathione-associated enzymes in anti-cancer drug resistance, *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, p. 4313.
- Sharma, R., Awasthi, S., Zimniak, P., and Awasthi, Y.C., Transport of glutathione-conjugates in human erythrocytes, *Acta Biochim. Pol.*, 2000, vol. 47, p. 751.
- Létourneau, I.J., Nakajima, A., Deeley, R.G., and Cole, S.P.C., Role of proline 1150 in functional interactions between the membrane spanning domains and nucleotide binding domains of the MRP1 (ABCC1) transporter, *Biochem. Pharmacol.*, 2008, vol. 75, p. 1659. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.01.009>
- Kosower, N.S. and Kosower, E.M., The glutathione status of cells, *Int. Rev. Cytol.*, 1978, vol. 54, p. 109. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60166-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60166-7)
- Lee, P.T., Thomson, J.E., Karina, A., Salter, C., Johnston, C., Davies, S.G., and Compton, R.G., Selective electrochemical determination of cysteine with a cyclotricatechylene modified carbon electrode, *Analyst*, 2015, vol. 140, p. 236. <https://doi.org/10.1039/C4AN01835D>
- White, P.C., Lawrence, N.S., Davis, J., and Compton, R.G., Electrochemical determination of thiols: A perspective, *Electroanalysis*, 2002, vol. 14, p. 89. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200201\)14:2<89::AID-ELAN89>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200201)14:2<89::AID-ELAN89>3.0.CO;2-Y)
- White, P.C., Lawrence, N.S., Davis, J., and Compton, R.G., Electrochemically initiated 1,4 additions: A versatile route to the determination of thiols, *Anal. Chim. Acta*, 2001, vol. 447, p. 1. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01297-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01297-1)

10. Nadejde, C., Ursu, L., Creanga, D., and Dorohoi, D., Solvatochromic behaviour of rifampicin in diluted solutions, *Rev. Chim. (Bucharest)*, 2015, vol. 66, p. 360.
11. Ferreira, D.A., Ferreira, A.G., Vizzotto, L., Neto, A.F., and Oliveira, A.G., Analysis of the molecular association of rifampicin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 2004, vol. 40, p. 43.  
<https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000100008>
12. Chauhan, S., Singh, K., Kumar, K., Neelakantan, S.C., and Kumar, G., Drug–amino acid interactions in aqueous medium: Volumetric, compressibility, and viscometric studies, *J. Chem. Eng. Data*, 2016, vol. 61, p. 788.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jced.5b00549>
13. Chauhan, S., Chaudhary, P., Sharma, K., Kumar, K., and Kiran, Temperature-dependent volumetric and viscometric properties of amino acids in aqueous solutions of an antibiotic drug, *Chem. Pap.*, 2013, vol. 67, p. 1442.  
<https://doi.org/10.2478/s11696-013-0404-y>
14. Pal, A. and Chauhan, N., Interactions of amino acids and peptides with the drug pentoxifylline in aqueous solution at various temperatures: A volumetric approach, *J. Chem. Thermodyn.*, 2012, vol. 54, p. 288.  
<https://doi.org/10.1016/j.jct.2012.05.009>
15. Kumar, H. and Kaur, K., Interaction of antibacterial drug ampicillin with glycine and its dipeptides analyzed by volumetric and acoustic methods at different temperatures, *Thermochim. Acta*, 2013, vol. 551, p. 40.  
<https://doi.org/10.1016/j.tca.2012.10.018>
16. Kamat, B.P. and Seetharamappa, J., Mechanism of interaction of vincristine sulphate and rifampicin with bovine serum albumin: A spectroscopic study, *J. Chem. Sci.*, 2005, vol. 117, p. 649.  
<https://doi.org/10.1007/BF02708294>
17. Yu, O.-Y., Cheng, Y.-F., Huang, S.-Y., Bai, A.-M., and Hu, Y.-J., Probing the binding of rifampicin to bovine serum albumin in aqueous solution, *J. Solution Chem.*, 2011, vol. 40, p. 1711.  
<https://doi.org/10.1007/s10953-011-9747-6>
18. Sharifi, M., Dolatabadi, J.E.N., Fathi, F., Rashidi, M., Jafari, B., Tajalli, H., and Rashidi, M.-R., Kinetic and thermodynamic study of bovine serum albumin interaction with rifampicin using surface plasmon resonance and molecular docking methods, *J. Biomed. Opt.*, 2017, vol. 22, 037002.  
<https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.3.037002>
19. Assandri A. and Semenza G., Protein binding of rifampicin to bovine serum albumin as measured by gel filtration, *J. Chromatogr.*, 1977, vol. 135, p. 25.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)86298-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)86298-6)
20. Boman, G. and Ringberger, V.-A., Binding of rifampicin by human plasma proteins, *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 1974, vol. 7, p. 369.  
<https://doi.org/10.1007/BF00558209>
21. Polasa, K. and Krishnaswamy, K., In vitro studies on protein binding of rifampicin, *Indian J. Pharmac.*, 1987, vol. 19, p. 225.
22. Chen, X.-B., Kang, D.-G., Li, S., Zhao, C.-Y., Chen, X.-S., and Ding, H.-P., Fluorescence spectroscopy study of human serum albumin quenched by rifampicin capsules, *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi / Spectrosc. Spect. Anal.*, 2006, vol. 26, p. 674.
23. Lachau, S., Rochas, M.A., Tufenkji, A.E., Martin, N., Levillain, P., and Houin, G., First-derivative spectroscopic determination of binding characteristics of rifampicin to human albumin and serum, *J. Pharm. Sci.*, 1992, vol. 81, p. 287.  
<https://doi.org/10.1002/jps.2600810319>
24. Scotti, L., de Oliveira Lima, E., da Silva, M.S., Ishiki, H., de Oliveira Lima, I., de Oliveira Pereira, F., Junior, F.J.B.M., and Scotti, M.T., Docking and PLS studies on a set of thiophenes RNA polymerase inhibitors against *Staphylococcus aureus*, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2014, vol. 14, p. 64.  
<https://doi.org/10.2174/1568026613666131113151347>
25. Selvaraj, S., Ramanathan, R., Vasudevaraja, V., Rajan, K.S., Krishnaswamy, S., Pemiah, B., Sethuraman, S., Ramakrishnan, V., and Krishnan, U.M., Transcriptional regulation of the pregnane-X receptor by the Ayurvedic formulation Chandraprabha Vati, *RSC Adv.*, 2014, vol. 4, p. 64967.  
<https://doi.org/10.1039/C4RA13553A>
26. Murthy, N.V.S.V., Sastry, V.G., and Basha, S.H., 3,5-dinitrophenyl clubbed azoles against latent tuberculosis- a theoretical mechanistic study, *J. PeerScientist*, 2018, vol. 1, e1000001.  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3371841>
27. Lawrence, N.S., Davis, J., and Compton, R.G., Electrochemical detection of thiols in biological media, *Talanta*, 2001, vol. 53, p. 1089.  
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00579-8](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00579-8)
28. White, P.C., Lawrence, N.S., Tsai, Y.C., Davis, J., and Compton, R.G., Electrochemically driven derivatisation-detection of cysteine, *Microchim. Acta*, 2001, vol. 137, p. 87.  
<https://doi.org/10.1007/s006040170033>
29. Hignett, G., Threlfell, S., Wain, A.J., Lawrence, N.S., Wilkins, S.J., Davis, J., Compton, R.G., and Cardoso, M.F., Electroanalytical exploitation of quinone–thiol interactions: Application to the selective determination of cysteine, *Analyst*, 2001, vol. 126, p. 353.  
<https://doi.org/10.1039/b008616i>
30. Biçer, E. and Özdemir, N., In vitro study of the interaction of cysteine with a thiazide diuretic (hydrochlorothiazide) at different pH by voltammetric and spectroscopic techniques, *Russ. J. Electrochem.*, 2013, vol. 49, p. 948.  
<https://doi.org/10.1134/S1023193513100042>
31. Biçer, E. and Çınar, E., Voltammetric and spectroscopic studies on the interaction of pentoxifylline with cysteine in the presence and absence of UV irradiation, *Z. Phys. Chem.*, 2005, vol. 219, p. 817.  
<https://doi.org/10.1524/zpch.219.6.817.65709>
32. Biçer, E. and Çetinkaya, P., A voltammetric study on the interaction of novobiocin with cysteine: pH effect, *J. Chil. Chem. Soc.*, 2009, vol. 54, p. 46.  
<https://doi.org/10.4067/S0717-97072009000100011>
33. Omanović, D. and Branica, M., Automation of voltammetric measurements by polarographic analyser PAR 384B, *Croat. Chem. Acta*, 1998, vol. 71, p. 421.
34. Hahn, Y. and Shin, S., Electrochemical behavior and differential pulse polarographic determination of ri-

- fampicin in the pharmaceutical preparations, *Arch. Pharm. Res.*, 2001, vol. 24, p. 100.  
<https://doi.org/10.1007/BF02976475>
35. Biçer, E. and Özdemir, S., Voltammetric and spectroscopic studies on the interaction of anti-cancer herbal drug rutin with an anti-tuberculosis agent rifampicin, *Russ. J. Electrochem.*, 2010, vol. 46, p. 896.  
<https://doi.org/10.1134/S1023193510080069>
  36. Leandro, K.C., de Carvalho, J.M., Giovanelli, L.F., and Moreira, J.C., Development and validation of an electroanalytical methodology for determination of isoniazid and rifampicin content in pharmaceutical formulations, *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2009, vol. 45, p. 331.  
<https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000200019>
  37. Asadpour-Zeynali, K. and Soheili-Azad, P., Simultaneous polarographic determination of isoniazid and rifampicin by differential pulse polarography method and support vector regression, *Electrochim. Acta*, 2010, vol. 55, p. 6570.  
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.06.018>
  38. Latypova, L.Z., Yanilkin, V.V., Kurbangalieva, A.R., Berdnikov, E.A., and Chmutova, G.A., Electrochemical reduction of mucochloric acid and its 5-alkoxy derivatives, *Russ. Chem. Bull.*, 2012, vol. 61, p. 568.  
<https://doi.org/10.1007/s11172-012-0083-9>
  39. Sulaiman, S.T. and Razzak, F.H.A., Differential-pulse polarographic determination of doxycycline in serum and urine, *Raf. Jour. Sci.*, 2008, vol. 19, p. 52.
  40. Zbačnik, M. and Kaitner, B., Supramolecular influence on keto-enol tautomerism and thermochromic properties of o-hydroxy Schiff bases, *Croat. Chem. Acta*, 2016, vol. 89, p. 125.  
<https://doi.org/10.5562/cca2881>
  41. Jovanović, Lj.S., Electrochemistry of vitamin b6 vitamers, their derivatives and metal complexes, in: *Physical Chemistry 2006: Proceedings of the 8th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*. Antić-Jovanović, A. (Ed.), E–2–SL, p. 292.
  42. Xu, L., Xiao, Y., Xu, Q., van Sandwijk, A., Li, J., Zhao, Z., Song, Q., and Yang, Y., Electrochemical behavior of zirconium in molten LiF–KF–ZrF<sub>4</sub> at 600°C, *RSC Adv.*, 2016, vol. 6, p. 84472.  
<https://doi.org/10.1039/C6RA17102H>
  43. Noori, J.S., Dimaki, M., Mortensen, J., and Svendsen, W.E., Detection of glyphosate in drinking water: A fast and direct detection method without sample pretreatment, *Sensors*, 2018, vol. 18, p. 2961.
  44. Jain, R., Tiwari, D.C., and Karolia, P., Highly sensitive and selective polyaniline–zinc oxide nanocomposite sensor for betahistine hydrochloride in solubilized system, *J. Mol. Liq.*, 2014, vol. 196, p. 308.  
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.03.048>
  45. Amidi, S., Hosseinzadeh Ardakani, Y., Amiri-Aref, M., Ranjbari, E., Sepehri, Z., and Bagheri, H., Sensitive electrochemical determination of rifampicin using gold nanoparticles/poly-melamine nanocomposite, *RSC Adv.*, 2017, vol. 7, p. 40111.  
<https://doi.org/10.1039/C7RA04865C>
  46. Kawde, A.-N., Temerk, Y., and Farhan, N., Adsorptive stripping voltammetry of antibiotics rifampicin SV and rifampicin at renewable pencil electrodes, *Acta Chim. Slov.*, 2014, vol. 61, p. 398.
  47. Tokunaga, T., Takada, N., and Ueda, M., Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defense in carnivorous plant, *Tetrahedron Lett.*, 2004, vol. 45, p. 7115.  
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.07.094>
  48. Michelitsch, A., Wurglics, M., Schubert-Zsilavec M., and Likussar, W., Determination of 5-hydroxynaphthoquinones in phytotherapeutic drosera preparations by differential pulse polarography, *Phytochem. Anal.*, 1999, vol. 10, p. 64.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199903/04\)10:2<64::AID-PCA434>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199903/04)10:2<64::AID-PCA434>3.0.CO;2-T)
  49. Perrin, C.L., Mechanisms of organic polarography, in: *Organic polarography*, Zuman, P. and Perrin, C.L. (Eds.), New York: Wiley, 1969, p. 197–198.
  50. Munir, S., Shah, A., Rauf, A., Badshah, A., Hussain, H., Zia-ur-Rehman, and Ahmad, Z., Redox behavior of juglone in buffered aq.: Ethanol media, *C.R. Chimie*, 2013, vol. 16, p. 1140.  
<https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.04.011>
  51. Pietrzykowski, A.D., Oxidation-reduction couples bearing chelating groups, Ph.D. Thesis, Iowa State University of Science and Technology, Iowa, 1963, p. 77.
  52. Heyrovský, M. and Vavříčka, S., Adsorption effects of electroactive species in d.c. polarography demonstrated in the case of the anodic waves of cysteine, *J. Electroanal. Chem.*, 1997, vol. 423, p. 125.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(96\)04691-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(96)04691-8)
  53. Heyrovský, M., Mader, P., Vavříčka, S., Veselá, V., and Fedurco, M., The anodic reactions at mercury electrodes due to cysteine, *J. Electroanal. Chem.*, 1997, vol. 430, p. 103.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(97\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(97)00103-4)
  54. Jin, W., Zhao, X., and Xiao, L., Mechanism of the electrochemical reaction of glutathione at a mercury electrode, *Electroanalysis*, 2000, vol. 12, p. 858.  
[https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200007\)12:11<858::AID-ELAN858>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200007)12:11<858::AID-ELAN858>3.0.CO;2-1)
  55. Fang, C. and Zhou, X., Electrochemical properties of glutathione monolayer on mercury surface, *Electroanalysis*, 2002, vol. 14, p. 711.  
[https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200205\)14:10<711::AID-ELAN711>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200205)14:10<711::AID-ELAN711>3.0.CO;2-7)
  56. Heyrovský, M. and Proková, B., Heterogeneous physico-chemical interactions following electrode reaction: Interaction of folates with thiols, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1997, vol. 62, p. 172.  
<https://doi.org/10.1135/cccc19970172>
  57. Proková, B. and Heyrovský, M., Voltammetric evidence of interfacial interactions between folates and thiols, *Bioelectroch. Bioener.*, 1996, vol. 41, p. 209.  
[https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(96\)05099-4](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05099-4)
  58. Oliveira-Brett, A.M., Goulart, M.O.F., and Abreu, F.C., Reduction of lapachones and their reaction with L-cysteine and mercaptoethanol on glassy carbon electrodes, *Bioelectrochemistry*, 2002, vol. 56, p. 53.  
[https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(02\)00011-7](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(02)00011-7)
  59. Esterbauer, H., Zöllner, H., and Scholz, N., Reaction of glutathione with conjugated carbonyls, *Z. Natur-*



- forsch. C*, 1975, vol. 30, p. 466.  
<https://doi.org/10.1515/znc-1975-7-808>
60. Demetrescu, I., Dumitriu, C., Totea, G., Nica, C.I., Dinischiotu, A., and Ionita, D., Zwitterionic cysteine drug coating influence in functionalization of implantable Ti50Zr alloy for antibacterial, biocompatibility and stability properties, *Pharmaceutics*, 2018, vol. 10, p. 220.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040220>
  61. Biçer, E. and Nuertayi, P., Voltammetric, spectroscopic and thermal investigations of the interaction of levofloxacin with cysteine at physiological pH, *Russ. J. Electrochem.*, 2017, vol. 53, p. 469.  
<https://doi.org/10.1134/S1023193517050044>
  62. Singh, B.K., Mishra, P., and Garg, B.S., Nickel(II) complexes of biologically active glutathione: Spectroscopic, kinetics of thermal decomposition and XRPD studies, *Spectrochim. Acta A*, 2007, vol. 67, p. 719.  
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.08.024>
  63. Li, L., Liao, L., Ding, Y., and Zeng, H., Dithizone-etched CdTe nanoparticles-based fluorescence sensor for the off-on detection of cadmium ion in aqueous media, *RSC Adv.*, 2017, vol. 7, p. 10361.  
<https://doi.org/10.1039/C6RA24971J>
  64. Nagarjuna, R., Saifullah, M.S.M., and Ganesan, R., Oxygen insensitive thiol-ene photo-click chemistry for direct imprint lithography of oxides, *RSC Adv.*, 2018, vol. 8, p. 11403.  
<https://doi.org/10.1039/C8RA01688G>
  65. Fuliş, A., Vlase, G., Ledeti, I., and Şuta, L.-M., Ketoprofen-cysteine equimolar salt: Synthesis, thermal analysis, PXRD and FTIR spectroscopy investigation, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2015, vol. 121, p. 1087.  
<https://doi.org/10.1007/s10973-015-4516-1>
  66. Paukov, I.E., Kovalevskaya, Y.A., and Boldyreva, E.V., Low-temperature thermodynamic properties of DL-cysteine, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2010, vol. 100, p. 295.  
<https://doi.org/10.1007/s10973-009-0457-x>
  67. Kamble, S.R., Molecular interactions in pharmaceutical preformulation and supramolecular complexes, *PhD Thesis*, University of Bradford, 2018.
  68. Montenegro, L., Trapani, A., Fini, P., Mandracchia, D., Latrofa, A., Cioffi, N., Chiarantini, L., Picceri, G.G., Brundu, S., and Puglisi, G., Chitosan nanoparticles for topical co-administration of the antioxidants glutathione and idebenone: characterization and in vitro release, *Br. J. Pharm. Res.*, 2014, vol. 4, p. 2387.  
<https://doi.org/10.9734/bjpr/2014/8641>
  69. Alobaidy, Z.A., Enhancing oral delivery of glutathione using chitosan nanoparticles, *MSc Thesis*, University of Petra, Amman, Jordan, 2013, p. 36.
  70. Alanazi, A.M., Mostafa, G.A.E., and Al-Badr, A.A., Glutathione, in: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Brittain, H.G. (Ed.), vol. 40, Ch. 2, 1st Edition, Oxford: Academic, 2015, p. 43.
  71. Wonisch, W. and Schaur, R.J., Chemistry of glutathione, in: *Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment*, Grill, D., Tausz, M.M., and de Kok, L.J. (Eds.), Dordrecht: Springer, Ch. 2, 2001, p. 14.
  72. Henwood, S.Q., Liebenberg, W., Tiedt, L.R., Lötter, A.P., and de Villiers, M.M., Characterization of the solubility and dissolution properties of several new rifampicin polymorphs, solvates, and hydrates, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2001, vol. 27, p. 1017.  
<https://doi.org/10.1081/DDC-100108364>
  73. Bhise, S.B., More, A.B., and Malayandi, R., Formulation and in vitro evaluation of rifampicin loaded porous microspheres, *Sci. Pharm.*, 2010, vol. 78, p. 291.  
<https://doi.org/10.3797/scipharm.0910-09>
  74. Alves, R., da Silva Reis, T.V., da Silva, L.C.C., Storpirtis, S., Mercuri, L.P., do Rosário Matos, J., Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions, *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2010, vol. 46, p. 343.  
<https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000200022>
  75. Freire, F.D., Aragão, C.F.S., de Lima e Moura, T.F.A., and Raffin, F.N., Thermal studies of isoniazid and mixtures with rifampicin, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 2009, vol. 97, p. 333.  
<https://doi.org/10.1007/s10973-009-0084-6>
  76. Manna, B.R., Dey, S., Debnath, S., and Ghosh, U.C., Removal of arsenic from groundwater using crystalline hydrous ferric oxide (CHFO), *Water Qual. Res. J. Canada*, 2003, vol. 38, p. 193.  
<https://doi.org/10.2166/wqrj.2003.013>
  77. Maldonado, C.S., De la Rosa, J.R., Lucio-Ortiz, C.J., Hernández-Ramírez, A., Barraza F.F.C., and Valente, J.S., Low concentration Fe-doped alumina catalysts using sol-gel and impregnation methods: The synthesis, characterization and catalytic performance during the combustion of trichloroethylene, *Materials*, 2014, vol. 7, p. 2062.  
<https://doi.org/10.3390/ma7032062>
  78. Yao, X.R. and Zhang, L.Q., *Polarographic Catalytic Wave Atlas*, Beijing: Geology Publishing House, 1988, p. 16–20.
  79. Li, N.Q. and Gao, X.X., fan ji pu cui hua bo de yan jiu. fan – lin suan yan ti xi zhong guo yang hua qing ji pu cui hua bo de yan jiu, *Chinese J. Anal. Chem.*, 1973, vol. 2, p. 40.
  80. Gao, X.X. and Yao, X.R., *Polarographic Catalytic Wave of the Element of Group Pt*, Beijing: Science Press, 1977, p. 120–127.
  81. Li, Y.-Q., Guo, Y.-J., Li, X.-F., and Pan, J.-H., Electrochemical studies of determination of Basic Brown G and its interaction with cyclodextrins, *Dyes Pigments*, 2007, vol. 74, p. 67.  
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.01.012>
  82. Mohandoss, S. and Stalin, T., Study on inclusion complex behaviours of L-tyrosine and β-cyclodextrin by cyclic voltammetric technique using glassy carbon electrode, *Int. J. Advanced Res.*, 2013, vol. 1, p. 381.
  83. Mohandoss, S. and Stalin, T., Photochemical and computational studies of inclusion complexes between β-cyclodextrin and 1,2-dihydroxyanthraquinones, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2017, vol. 16, p. 476.  
<https://doi.org/10.1039/C6PP00285D>
  84. Shehata, I.S. and Ibrahim, M.S., Binding of anti-inflammatory drug indomethacin with cyclodextrin and DNA: Solubility, spectroscopic, and voltammetric studies, *Can. J. Chem.*, 2001, vol. 79, p. 1431.  
<https://doi.org/10.1139/v01-105>

85. Ragazzon, G., Baroncini, M., Ceroni, P., Credi, A., and Venturi, M., Electrochemically controlled supramolecular switches and machines: in *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*, Atwood, J.L., Gokel, G.W., and Barbour, L., (Eds.), London: Elsevier, 2017, vol. 2, p. 351.
86. Rezaei-Zarchi, S., Javed, A., Mirjalili, H., Abarghouei, H.B., and Hashemizadeh, S.A., Characterization and electrochemical study of nano-composition based methylene blue- and riboflavin-nafion on the surface of gold electrode, *Turk. J. Chem.*, 2009, vol. 33, p. 411.
87. Arguelho, M.L.P.M., Alves, J.P.H., Stradiotto, N.R., Júnior, V.L., Pires, J.M., and Beatriz, A., Electrochemical and theoretical evaluation of the interaction between DNA and amodiaquine. Evidence of the guanine adduct formation, *Quim. Nova*, 2010, vol. 33, p. 1291. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600014>
88. García-Beltrán, O., Santos, J.G., Fuentealba, S., De la Torre, P., Pavez, P., Mena, N., Nuñez, M.T., and Aliaga, M.E., Mechanism study of the thiol-addition reaction to benzothiazole derivative for sensing endogenous thiols, *Tetrahedron Lett.*, 2015, vol. 56, p. 2437. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.03.083>
89. Andrade-Acuña, D., Santos, J.G., Tiznado, W., Cañete, Á., and Aliaga, M.E., Kinetic study on the aromatic nucleophilic substitution reaction of 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazine by biothiols, *J. Phys. Org. Chem.*, 2014, vol. 27, p. 670. <https://doi.org/10.1002/poc.3316>
90. Bianchi, D.H.A. and Haenen, G.R.M.M., The paradoxical influence of the pKa on the reactivity of thiols and its biological relevance, *Maastricht Research Based Learning Project (MaRBL) Research Papers: Biomedical and Health Sciences Research*, 2014, vol. 2, p. 222. <https://doi.org/10.26481/marble.2014.v2.316>
91. Wall, S.B., Oh, J.-Y., Diers, A.R., and Landar, A., Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling, *Front. Physiol.*, 2012, vol. 3, article 369, 9 pages. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00369>