



Uniwersytet Łódzki Wydział Chemii Katedra Chemii Środowiska

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

# Badanie liponylolizyny i kwasu liponowego w kontekście ich właściwości antyoksydacyjnych

Examination of lipoyllysine and lipoic acid in the context of their antioxidant properties

Adrianna Warkoczewska

### **Promotor:**

dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ

Łódź 2021

Składam serdeczne podziękowania

**Pani Profesor Grażynie Chwatko** za poświęcony czas, przekazaną wiedzę, cenne uwagi merytoryczne, a także nieocenioną pomoc podczas realizacji niniejszej pracy

**Pracownikom** z Katedry Chemii Środowiska i **Doktorantom**, a w szczególności **Patrycji**, **Monice** i **Krystianowi** za stworzenie milej i niezapomnianej atmosfery pracy, życzliwość oraz wszelką pomoc

Narodowemu Centrum Nauki za przyznanie środków finansowych na realizację części badań naukowych finansowanych w ramach grantu PRELUDIUM 12 (2016/23/N/NZ9/00071)

Szczególnie dziękuję

Moim **Rodzicom** i **Siostrze** za niegasnącą wiarę we mnie i moje możliwości, nieustające pokłady cierpliwości oraz ogromne wsparcie

# Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	4
STRESZCZENIE	5
ABSTRACT	7
WPROWADZENIE	9
OSIĄGNIĘTE WYNIKI I ZNACZENIE PRACY	14
PODSUMOWANIE	
BIBLIOGRAFIA	
DOROBEK NAUKOWY	
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	
OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	

# WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

ACN	acetonitryl
BCPB	bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy
Crn	kreatynina
DAD	detektor z matrycą diodową
DHLA	kwas dihydroliponowy
DHLLys	dihydroliponylolizyna
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
EC50	stężenie przeciwutleniacza potrzebne do obniżenia początkowej zawartości
	DPPH o 50%
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
LA	kwas liponowy
LLys	liponylolizyna
LOD	granica wykrywalności
LOQ	granica oznaczalności
MeOH	metanol
n.w.	nie wykryto
PCA	kwas chlorowy(VII)
RFT	reaktywne formy tlenu
<b>RP-HPLC</b>	wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
RSD	względne odchylenie standardowe
ТСЕР	tris(2-karboksyetylo)fosfina
ТНР	tris(hydroksymetylo)fosfina
UV-Vis	spektrofotometria z zakresu promieniowania ultrafioletowego i widzialnego

#### STRESZCZENIE

Na rozprawę doktorską składa się cykl pięciu prac opublikowanych w prestiżowych, specjalistycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i krajowym, poświęconych przygotowaniu "narzędzi", które mogą posłużyć monitorowaniu obecności, ważnych z punktu widzenia medycyny, liponylolizyny (LLys) i kwasu liponowego (LA) w próbkach biologicznych.

Przedmiotem badań mojej dysertacji było opracowanie nowych, nieopisanych dotychczas procedur oraz metod analitycznych do równoczesnego oznaczania (i) całkowitej zawartości LA i formy LA związanej z białkami słabymi wiązaniami wodorowymi (ProtS-LA) w osoczu, (ii) całkowitej zawartości LA i LLys w moczu oraz (iii) całkowitej zawartości LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych. Prowadzone prace nad opracowaniem zasad postępowania analityczego dotyczyły optymalizacji etapów przygotowania próbki, rozdzielania chromatograficznego i oznaczania. Następnie każda z wyżej wymienionych procedur analitycznych została poddana procesowi walidacji, którego celem było określenie zakresu jej przydatności oraz ocena jej wiarygodności. W badaniach wykorzystano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu z detektorem z matrycą diodową (HPLC-DAD). Wszystkie zoptymalizowane i zwalidowane procedury analityczne z powodzeniem zostały zastosowane do terapeutycznego monitorowania ilości LLys i/lub LA w moczu i osoczu potencjalnie zdrowych osób, przyjmujących LA w postaci komercyjnie dostępnego farmaceutyku, jak również do monitorowania stężenia LLys i LA w próbkach mięsa różnego pochodzenia. Do badań zostały wykorzystane tkanki, takie jak: wątroba, serce, nerka i żołądek, pochodzące od krów, cieląt, świń, kurczaków i indyków. Wyniki badań niniejszej pracy wykazały, że opracowane metody pozwalają na równoczesne oznaczanie LLys i/lub LA na niskich poziomach stężeń, co może być niezwykle przydatne zarówno w badaniach farmakokinetycznych, jak i biochemicznych czy biomedycznych. Ponadto opracowane metody są relatywnie tanie, charakteryzują się bardzo dobrą powtarzalnością wyników, prostą procedurą przygotowania próbki i są bezpieczne dla środowiska (małe zużycie próbki i odczynników chemicznych). Co również należy podkreślić, zastosowanie techniki HPLC z wykorzystaniem detektora UV-DAD czyni metody te łatwo dostępne dla większości laboratoriów analitycznych czy klinicznych.

Ponadto, w pracy zbadano właściwości antyoksydacyjne LLys z wykorzystaniem wodno-alkoholowych roztworów standardów LA, LLys, kwasu dihydroliponowego (DHLA) i dihydroliponylolizyny (DHLLys) oraz modelowego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu

5

(DPPH). Zdolność neutralizowania wolnych rodników oznaczano metodą spektrofotometryczną. Stwierdzono, że LA i LLys nie charakteryzują się zdolnością wygaszania rodnika DPPH, podczas gdy zedukowana forma LLys czyli DHLLys wykazuje aktywność przeciwrodnikową. Wyższą zdolność wygaszania rodnika DPPH zaobserwowano jednak dla DHLA niż DHLLys, które swoje antyoksydacyjne właściwości zawdzięczają obecności dwóm wolnym grupom tiolowym w cząsteczce.

Przedmiotem realizowanej rozprawy doktorskiej były także dwie prace przeglądowe, poświęcone zagadnieniom homogenizacji próbek biologicznych i derywatyzacji chemicznej, które stosowane są na szeroką skalę niemal w każdym laboratorium analitycznym w celu ułatwienia etapu przygotowania próbki. Zdobyta podczas pisania tych prac wiedza pomogła w planowaniu doświadczeń niezbędnych do opracowania opisanych w rozprawie metod analitycznych.

#### ABSTRACT

My doctoral dissertation consists of five papers published in prestigious, specialist scientific journals of international and national scope, devoted to the preparation of "tools" that can be used to monitor the presence of important from a medical point of view of lipoyllysine (LLys) and lipoic acid (LA) in biological samples.

The subject of my dissertation research was the elaboration of new, previously undescribed procedures and analytical methods for the simultaneous determination of (i) total LA and weakly protein bound LA by hydrogen bonds (ProtS-LA) in plasma, (ii) total LA and LLys content in urine, and (iii) total LA and LLys content in animal tissue homogenates. The elaboration of the analytical procedures consisted of the steps of sample preparation, chromatographic separation and determination. Each of the above-mentioned analytical procedures was subjected to a validation process, the purpose of which was to determine the extent of their usefulness and to assess their credibility. In research the high-performance liquid chromatography technique with a diode array detector (HPLC-DAD) was used. All optimized and validated analytical procedures have been successfully applied to the therapeutic monitoring of the amount of LLys and/or LA in urine and plasma of apparently healthy volunteers after oral LA supplementation as well as monitoring the concentration of LLys and LA in the meat samples of various origins. Tissues such as liver, heart, kidney and stomach from cows, calves, pigs, chickens and turkeys were used for the research. The results of presented doctoral dissertation showed that the developed methods allow for the simultaneous determination of LLys and/or LA at low concentration levels, which can be useful in pharmacokinetic, biochemical and biomedical studies. Moreover, the elaborated methods are relatively cheap, have a very good repeatability of results, a simple sample preparation procedure and are eco-friendly (low consumption of the sample and chemical reagents). It should also be emphasized that the application of the HPLC technique with the use of the UV-DAD detector makes these methods easily available for most analytical or clinical laboratories.

Additionally, in this research work the antioxidant properties of LA, LLys, dihydrolipoic acid (DHLA) and dihydrolipoyllysine (DHLLys) using the model 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) were examined. The ability to neutralize free radicals was determined by the spectrophotometric method. It was found that LA and LLys are not characterized by the capability to quench the DPPH radical, while the reduced form of LLys i.e. DHLLys possesses antiradical activity. However, a higher DPPH radical quenching

capacity was observed for DHLA than for DHLLys due to the presence of two free thiol (-SH) groups in their molecule.

The subject of the doctoral dissertation was also two reviews concerning homogenization of biological samples and chemical derivatization, which are used on a large scale in almost every analytical laboratory to facilitate the sample preparation step. The knowledge obtained during the writing of these papers helped in planning the experiments necessary to develop the analytical methods being the subject of the doctoral thesis.

#### WPROWADZENIE

Przeprowadzone w ostatnich latach obserwacje i analizy wykazały, iż rosnące koszty opieki lekarskiej wymuszają nieustanną potrzebę poszukiwania i podejmowania działań prewencyjnych, mających na celu zwiększenie osobistego oddziaływania na własne zdrowie oraz zapobieganie różnorodnym chorobom [1]. W społeczeństwach, głównie krajów wysoko rozwiniętych narastają problemy zdrowotne związane z coraz częstszym występowaniem, tzw. chorób cywilizacyjnych, których etiologia jest ściśle powiązana z postępem współczesnej cywilizacji [2].

W organizmie człowieka utrzymywana jest równowaga pomiędzy powstawaniem wolnych rodników a ich usuwaniem z organizmu, tzw. homeostaza peroksydacyjnoantyoksydacyjna [3]. Jej zaburzenie, związane najczęściej z upośledzonym funkcjonowaniem enzymów antyoksydacyjnych i/lub nadmiernym wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT), powoduje stres oksydacyjny, który leży u podstaw rozwoju i przebiegu chorób cywilizacyjnych. Zanieczyszczenie środowiska, obniżona aktywność fizyczna, siedzący tryb życia, niewłaściwy sposób odżywiania się, a także chroniczny stres są jednym z czynników determinujących powstawanie wolnych rodników oraz RFT [4,5]. Doniesienia literaturowe wskazują, że wolne rodniki przyczyniają się do rozwoju wielu chorób m.in. chorób neurodegeneracyjnych (Parkinsona czy Alzheimera), chorób nowotworowych i oczu, a także odpowiadają za przedwczesne starzenie się organizmu [6,7]. Nadmierne spożywanie żywności konserwowanej, wysoko przetworzonej, bogatej w duże ilości antybiotyków i hormonów, a zbyt niskie zawartości witamin i składników mineralnych, dostarczanych w diecie, obniżają zdolności antyoksydacyjne organizmu [3]. W związku z powyższym, odpowiednia podaż produktów bogatych w egzogenne antyoksydanty w codziennej diecie jest niezbędna, by wspomóc endogenny układ ochrony antyoksydacyjnej.

Warunkiem odpowiedniego dostarczenia organizmowi niezbędnych składników odżywczych jest prawidłowo zbilansowana i zróżnicowana dieta, bogata w produkty zbożowe, warzywa i owoce. Literatura światowa dostarcza wiele mocnych dowodów potwierdzających tezę o pozytywnym wpływie regularnego spożywania warzyw i owoców na uzyskanie antyoksydacyjnej homeostazy organizmu [8,9]. Naukowcy jednoznacznie informują, iż dieta bogata w warzywa i owoce może zapobiec lub zmniejszyć ryzyko wystąpienia wielu chorób dietozależnych, w tym nadciśnienia, choroby wieńcowej serca i udaru. Co równie ważne, może zapobiec przyrostowi masy ciała, zmniejszając tym samym ryzyko zachorowania na cukrzycę typu 2, czy też występowania chorób oczu, demencji i osteoporozy [9,10]. Jako przykład

9

pozytywnego oddziaływania owoców i warzyw można wymienić również prawdopodobieństwo zmniejszenia zachorowalności na raka (np. przewodu pokarmowego) [11]. Interesujące wydają się być wyniki badań, które wykazują, że ryzyko przedwczesnego zgonu wskutek chorób dietozależnych (udaru, zawału czy choroby nowotworowej) maleje wśród osób spożywających więcej niż siedem porcji warzyw i owoców w ciągu dnia [12].

Mięso, podobnie jak warzywa i owoce, jest jednym z podstawowych źródeł składników odżywczych w diecie człowieka. Dostarcza wysokiej jakości białka, łatwo przyswajalne żelazo, cynk oraz witaminę B12. Wpływ mięsa na zdrowie stanowi obecnie przedmiot wielu kontrowersji, z uwagi na jego wysoką zawartość cholesterolu, nasyconych kwasów tłuszczowych oraz sodu [13,14]. Tymczasem należy podkreślić, iż mięso jest również cennym źródłem antyoksydantów i związków biologicznie czynnych, a ich biodostępność często jest większa w porównaniu do alternatywnych produktów spożywczych np. pochodzenia roślinnego. Związki bioaktywne występujące w mięsie charakteryzują się właściwościami przeciwutleniającymi i wykazują szerokie spektrum działań prozdrowotnych, m.in. działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, immunomodulujące, działania obniżające poziom lipidów we krwi oraz chroniące organizm przed stresem oksydacyjnym [14,15]. Ostatnie doniesienia literaturowe wykazują, iż spożycie mięsa może być skorelowane z rozwojem niektórych chorób cywilizacyjnych, tj. otyłości, chorób krążenia i raka [14]. Jednak należy mieć na uwadze, że najczęściej informacje te odnoszą się do przetworów mięsnych (często konsumowanych w nadmiarze), a nie samego mięsa, w którym zawartość tłuszczu nie przekracza zazwyczaj 5%. W świetle obecnych dowodów naukowych mięso lepiej zatem spożywać w racjonalnych ilościach, które powinno być składnikiem urozmaiconej oraz prawidłowo zbalansowanej diety. Należy unikać wysoko przetworzonej żywności, gdyż może zawierać nadmiar sodu, niekorzystne dla zdrowia nasycone kwasy tłuszczowe oraz substancje dodatkowe (konserwanty, emulgatory), zwiększające ryzyko zachorowania na miażdżyce czy nowotwory. Istotne jest również, by zwracać większą uwagę na sposób obróbki termicznej, ponieważ smażenie i wędzenie, może generować substancje szkodliwe dla zdrowia.

Aspekt żywienia można zatem uznać jako jeden z kluczowych elementów stylu życia, który wpływa na rozwój i progresję chorób cywilizacyjnych [16–18]. Niestety zdarza się, że nasza dieta czasami odbiega od zaleceń żywieniowych. Wówczas niedobory witamin lub składników mineralnych można uzupełnić, stosując wyspecjalizowane suplementy diety i mitochondrialne substancje odżywcze, które wykazują właściwości neuroprotekcyjne, opóźniając wystąpienie lub progresję zaburzeń funkcji poznawczych i chorób

neurodegeneracyjnych [18]. Te popularne farmaceutyki mogą być również stosowane w warunkach zwiększonego zapotrzebowania na składniki odżywcze i naturalne antyoksydanty bądź, gdy ich biodostępność jest zaburzona.

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat wśród naturalnych antyoksydantów prym w świecie nauki w zakresie badań chemicznych, biochemicznych i klinicznych, wiedzie kwas α-liponowy (LA). W ludzkich komórkach może być syntezowany *de novo* z kwasów tłuszczowych i cysteiny, ale tylko w niewielkich ilościach. Fizjologiczne stężenie LA w osoczu oscyluje w granicach 1-25 ng/mL [18–20]. Dieta jest drugim, oprócz syntezy *de novo* źródłem LA. Zawartość tego związku w spożywanych pokarmach nie jest jednak w stanie dostarczyć odpowiedniej ilości LA, aby móc zaobserwować jego korzystne działanie terapeutyczne, dlatego zaleca się jego suplementację [D1,D2,18,20]. Jak wynika z doniesień literaturowych, na obniżenie biodostępności LA wpływa przyjmowanie suplementów tego kwasu wraz z pożywieniem, podobnie jego szybki metabolizm oraz problemy ze stabilnością, gdyż jak wiadomo, LA może ulegać polimeryzacji [18,21,22]. Zatem ulepszone preparaty farmaceutyczne, które mogą zwiększyć wchłanianie LA, znacznie poprawią dostępność biologiczną tego związku, ostatecznie prowadząc do lepszej skuteczności terapeutycznej.

LA z uwagi na swoje właściwości antyoksydacyjne jest neutralizatorem RFT i może być stosowany jako środek zapobiegawczy, bądź terapeutyczny wielu patologicznych zmian, w których pośredniczy stres oksydacyjny [20,23]. Należą do nich, m.in. otyłość [21,24,25], cukrzyca [24,26], choroby sercowo-naczyniowe [27,28], stwardnienie rozsiane [21,29] oraz choroba Alzheimera [21,22,29]. Zarówno LA, jak i jego zredukowana postać - kwas dihydroliponowy (DHLA), odpowiadają za regenerację innych utlenionych przeciwutleniaczy, tj. witamin C i E oraz glutationu [30,31]. Dzięki możliwości zwiększania poziomu glutationu, LA stosuje się także w leczeniu nadciśnienia tętniczego. Jest to bardzo istotne z punktu widzenia medycyny, ponieważ choroba ta może być czynnikiem wpływającym na wystąpienie udaru mózgu, zawału serca, tętniaka czy przyczyną przewlekłej niewydolności nerek. Ponadto w połączeniu z acetylo-L-karnityną, LA wpływa na obniżenie ciśnienia skurczowego u pacjentów z nadciśnieniem oraz u osób cierpiących na zespół metaboliczny [32]. LA i DHLA mają zdolność chelatowania metali, takich jak żelazo, miedź, mangan i cynk, zarówno w warunkach in vitro jak i in vivo. Wymienione metale katalizują reakcje, w wyniku których generowane są wysoce reaktywne wolne rodniki, wpływając jednocześnie na wystąpienie niepożądanych zmian spowodowanych stresem oksydacyjnym. Jak wykazały badania in vitro, LA preferencyjnie wiąże się z jonami  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Pb^{2+}$ , ale nie chelatuje jonu  $Fe^{3+}$ . Podczas, gdy DHLA tworzy kompleksy, zarówno z jonami Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> jak i Fe<sup>3+</sup>, a także zapobiega utlenianiu askorbinianu katalizowanego przez Cu<sup>2+</sup>. DHLA pośrednicząc również w chelatacji jonów żelaza i miedzi w mózgu, obniża ilość wolnych rodników pozytywnie wpływając na patofizjologie choroby Alzheimera [19,20,23,32]. Wyniki badań aktywności antyproliferacyjnej LA na komórkach rakowych sugerują, że może on hamować ich rozrost oraz prowadzić do apoptozy [19,20,33]. Dlatego też badacze wiążą duże nadzieje z suplementami diety zawierającymi LA, które w przyszłości będą stosowane w profilaktyce raka.

Zalety terapeutyczne LA sprawiają, iż wzrasta zainteresowanie jego zawartością w produktach spożywczych, a także określeniem ilości tego kwasu w próbkach klinicznych niezbędnych do celów diagnostycznych. LA w układach biologicznych występuje głównie w postaci związanej z białkami jako liponylolizyna (LLys) [31,34]. Dotychczas jeszcze nie przeprowadzono badań, które wyjaśniłyby, czy LLys posiada właściwości antyoksydacyjne, czy jest źródłem wolnego LA [23]. Stąd, opracowanie precyzyjnej metody oznaczania LLys w tkankach i płynach biologicznych stanowi istotny problem dla poznania jej fizjologicznej roli w ochronie przed stresem oksydacyjnym oraz w metabolizmie energetycznym. Z punktu widzenia profilaktyki wobec rosnącej liczby zachorowań na choroby cywilizacyjne, istotne również wydaje się być, określenie właściwości przeciwutleniających LLys.

Do oznaczania LLys i/lub LA w próbkach biologicznych zostało opracowanych wiele metod analitycznych, wśród których przeważają metody oparte na wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z różnymi sposobami elektrochemiczna, spektrofotometryczną (UV-Vis), fluorymetryczną i/lub detekcji: spektrometrią mas. Mimo, iż metody te wydają się być odpowiednie do wykrywania LA lub LLys, konieczne jest udoskonalanie oraz opracowywanie coraz to nowych procedur analitycznych, zgodnych z zasadami zielonej chemii analitycznej, zapewniających jednocześnie: zmniejszenie praco- i czasochłonności etapu przygotowania próbki, możliwość oznaczania szerszej gamy analitów na niskich poziomach stężeń oraz eliminowanie zużycia, w toku procedury analitycznej, drogich i nieobojętnych dla środowiska rozpuszczalników i odczynników chemicznych. Doniesienia literaturowe wykazały, iż analiza próbek biologicznych, takich jak mocz, osocze, czy tkanki zwierzęce pod kątem LA i LLys jest trudnym zadaniem analitycznym ze względu na złożoność materiału próbki (matrycy) zawierającej śladowe ilości analitów przy jednoczesnej obecności substancji przeszkadzających. W związku z powyższym, istotnym elementem badań jest opracowanie i zoptymalizowanie odpowiedniej procedury przygotowania próbki, a także oznaczeń końcowych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej. Opracowanie nowych procedur postępowania analitycznego, stosując technikę HPLC wyposażoną w uniwersalny detektor UV-Vis umożliwi prowadzenie szybkich i rutynowych analiz w każdym laboratorium analitycznym i klinicznym, co jest istotne z punktu widzenia badań reakcji biochemicznych, badań żywieniowych i farmakodynamicznych, a także w profilaktyce i diagnostyce chorób cywilizacyjnych.

Celem niniejszej pracy było **opracowanie i walidacja możliwie prostych**, **selektywnych i tanich procedur analitycznych umożliwiających monitorowanie ilości LLys i/lub LA** w próbkach moczu, osocza i tkankach zwierzęcych za pomocą techniki HPLC-UV-Vis oraz zbadanie zdolności antyoksydacyjnej LLys.

Cel ten został podzielony na kilka zadań badawczych, do których należało:

- opracowanie procedur przygotowania próbek do badań,
- aplikacja opracowanych metod do określenia ilości wydalanych z moczem LA i LLys oraz całkowitej zawartości LA i formy LA związanej z białkami słabymi wiązaniami wodorowymi (ProtS-LA) w osoczu osób, które przyjmowały LA w postaci komercyjnie dostępnego farmaceutyku,
- wyznaczenie zdolności antyoksydacyjnej LLys metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar zdolności wygaszania wolnych rodników 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH).

### OSIĄGNIĘTE WYNIKI I ZNACZENIE PRACY

Wszechstronne występowanie i działanie terapeutyczne LA budzi powszechne zainteresowanie wielu ośrodków badawczych z całego świata i skłania do opracowywania metod jego oznaczania w próbkach biologicznych, co jest niezwykle istotne do kontroli jego zawartości oraz poznania przemian metabolicznych [20,28,35].

Próbki biologiczne (mocz, osocze, tkanki zwierzęce) zawierają śladowe ilości analitu przy jednocześnie dużej zawartości substancji utrudniających analizy, w tym substancji endogennych i metabolitów. Analiza LLys i/lub LA w skomplikowanych matrycach próbek rzeczywistych przysparza wiele trudności ze względu na wieloetapowe przygotowanie próbki, które może być czaso- i pracochłonne, a w konsekwencji charakteryzować się niskim odzyskiem i precyzją. Dla potrzeb oznaczania wyżej wspomnianych związków w złożonej matrycy, jaką stanowią mocz, osocze i tkanki zwierzęce zastosowane muszą być metody analityczne o odpowiedniej czułości, dokładności, powtarzalności i selektywności. Dlatego też podjęto próbę opracowania nowych procedur analitycznych, w których dąży się do zredukowania ilości etapów podczas przygotowania próbek, aby ograniczyć czasochłonność i pracochłonność procedury, zminimalizować źródła błędów i kosztów oraz zużycie toksycznych odczynników. Prowadzone badania wykonywane były z wykorzystaniem techniki HPLC w połączeniu z detektorem UV-Vis.

#### Przygotowanie próbek do analizy

Etap przygotowania próbki jest kluczowym zadaniem analitycznym, niezwykle czasochłonnym i żmudnym, ale i jednocześnie najbardziej kłopotliwym aspektem całego procesu separacji i analizy próbek [36]. Właściwy i poprawny sposób przygotowania próbki decydująco wpływa na wynik końcowej analizy i miarodajność uzyskanych wyników. Niestety nie ma jednej, odpowiedniej procedury, która byłaby uniwersalna dla każdego rodzaju materiału biologicznego. W przypadku oznaczania LA, podczas pobierania i przetwarzania próbek (hydroliza enzymatyczna, derywatyzacja, deproteinizacja, ekstrakcja i odparowanie możliwość rozpuszczalnika) istnieje popełnienia błędów przypadkowych, iak i systematycznych, które wiążą się ze stratą analitu. Wszystkie te etapy zależą od rodzaju badanego materiału biologicznego, techniki analitycznej oraz w znacznym stopniu od stanu skupienia próbki biologicznej [37]. Próbki stałe, takie jak tkanki czy narządy nie są preferowane ze względu na konieczność skomplikowanej, pracochłonnej oraz czasochłonnej obróbki materiału oraz skomplikowanych procedur pobierania ich wycinków w przypadku żywych osobników. Dlatego też najczęściej do badań stosuje się płyny ustrojowe (krew, osocze i mocz), które są cennym źródłem informacji na temat kondycji żywych organizmów. W przeciwieństwie do osocza, pobieranie próbek moczu jest nieinwazyjne i niestresogenne, co decyduje o wyborze tej matrycy podczas badań analitycznych.

Tkanki umownie można podzielić na miękkie i twarde. Tkanki miękkie, takie jak wątroba czy nerki, można łatwo homogenizować, podczas gdy tkanki twarde, takie jak mięśnie, serce, żołądek są bardziej włókniste, mają mniej płynnej zawartości i wymagają odpowiedniego procesu przygotowania [38]. Stąd też, przystępując do pracy ze stałym materiałem biologicznym, niezbędne jest jego dokładne umycie i osuszenie. Czynności te są bardzo istotne, gdyż niedokładne ich wykonanie może doprowadzić do dodatkowych zanieczyszczeń próbki badanej. Tak wstępnie przygotowaną próbkę następnie poddaje się procesowi homogenizacji w środowisku odpowiedniego buforu, aby ewentualnie zahamować działanie niektórych enzymów, naturalnie występujących w próbce i ułatwić dalsze etapy analizy. Dobierając pH buforu należy pamiętać, by dostosować go do rodzaju oznaczanego związku [D3]. Zagadnienie homogenizacji i różne odmiany technik homogenizacji zostały, z moim współudziałem, szczegółowo omówione w pracy przeglądowej [D3]. Należy podkreślić, iż tematyka przedstawiona w tej pracy jest wciąż aktualna, a technika stosowana na szeroką skalę niemal w każdym laboratorium i w różnych gałęziach przemysłu. Jedna z opracowanych przeze mnie procedur oznaczania LA i LLys w tkankach zwierzęcych wymagała wprowadzenia etapu, mającego na celu upłynnienie próbki. W związku z tym w badaniach tych optymalizowałam parametry homogenizacji tkanek nerek, serca, wątroby i żołądków kurzych, indyczych, wieprzowych, cielęcych oraz wołowych. Homogenaty wszystkich badanych tkanek przygotowywałam w 0,1 mol/L buforze boranowym o pH 8 [D4], co zapewniło odpowiednie środowisko do dalszych reakcji (hydroliza enzymatyczna, redukcja i derywatyzacja).

LA jest ośmiowęglowym nasyconym kwasem tłuszczowym, w którym atomy węgla 6, 7 i 8 wraz z dwoma atomami siarki tworzą pierścień ditiolowy, który u ssaków łatwo ulega redukcji do DHLA [35]. W układach biologicznych LA może występować w trzech formach: wolnego kwasu, kwasu związanego z białkami, za pomocą słabych wiązań wodorowych (ProtS-LA) oraz mocnych wiązań kowalencyjnych (LLys). W obrębie formy wolnej można go podzielić na zredukowany i utleniony. Można również wyznaczyć całkowitą zawartość LA, czyli kombinację form wolnej oraz związanej z białkami. Zawartość LA mierzy się w odpowiednio przygotowanej próbce, do której na samym początku dodawany jest odczynnik redukujący w celu rozerwania wiązań disiarczkowych. W opracowanych procedurach oznaczałam całkowitą zawartość LA, wolną formę LA, LLys i ProtS-LA. Podczas przygotowania próbek stosowałam dwa dobrze znane odczynniki redukujące, tris(2-karboksyetylo)fosfinę (TCEP) do redukcji wiązań disiarczkowych podczas oznaczania całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu [D1] oraz całkowitej zawartości LA i LLys w moczu [D2], a także tris(hydroksymetylo)fosfinę (THP) w celu redukcji wiązań -S-S-podczas oznaczania LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych [D4]. TCEP jest powszechnie stosowanym odczynnikiem do redukcji wiązania disiarczkowego w cząsteczkach LA. Jego głównymi zaletami są wysoka efektywność reakcji w temperaturze pokojowej, dobra rozpuszczalność w wodzie i stabilność w roztworach wodnych, a także brak charakterystycznego dla reduktorów tiolowych przykrego zapachu [37]. Związkiem o podobnych właściwościach do TCEP, który stanowi jego doskonałą alternatywę jest THP. W przypadku homogenatów tkanek zwierzęcych, oznaczanie LA i LLys [D4] prowadziłam z wykorzystaniem THP jako odczynnika redukującego, aby uniknąć niepożądanych strat analitu. Zaobserwowałam, że w odróżnieniu do TCEP w temperaturze pokojowej reakcja redukcji przebiegała szybciej i charakteryzowała się wyższą wydajnością.

Jak już wcześniej wspomniałam, w próbkach biologicznych LA występuje w formie wolnej i białek wiążących kwas słabymi wiązaniami wodorowymi oraz mocnymi wiązaniami kowalencyjnymi w LLys. Jego oznaczanie przysparza wiele trudności i wymaga zastosowania odpowiedniego sposobu przygotowania próbki. Opisane w literaturze specjalistycznej metody uwalniania LA z próbek biologicznych i żywności wykorzystywały bezpośrednią ekstrakcję i ekstrakcję rozpuszczalnikiem z hydrolizatu po zastosowaniu silnie kwasowej lub zasadowej hydrolizy. Jedna z procedur polegała na ekstrakcji słabo związanego LA z białkiem z mąki i zarodków pszenicy, mieszaniną chloroformu/metanolu/wody i końcowej analizie techniką chromatografii cienkowarstwowej [39]. W przypadku innych metod, aby rozszczepić wiązanie amidowe utworzone pomiędzy grupą ε-NH<sub>2</sub> lizyny łańcucha polipeptydowego a grupą karboksylową kwasu, próbki traktowane były HCl lub H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o stężeniu w zakresie od 1 do 12 mol/L i temperaturą 100-125°C [40-45] lub roztworem NaOH o stężeniu 3 mol/L i temperaturą 110°C z dodatkiem albuminy surowicy wołowej, która zapobiegała utlenianiu LA [46]. Powyższe procedury pozwalały na określenie sumy wolnego i związanego z białkami LA, prowadząc jednocześnie do degradacji kwasu i ostatecznie do strat wolnego LA. Natomiast do oznaczania LA związanego z białkiem w formie LLys stosowano łagodną hydrolizę enzymatyczną, poddając komercyjnie dostępne enzymy [47] lub tkanki zwierzęce [34,48] działaniu enzymów proteolitycznych. W przypadku próbek roślinnych, dodatkowo stosowano celulazę, której zadaniem było zniszczenie ścian komórkowych zawierających celulozę. Wspomniane powyżej metody mimo, iż wydają się być odpowiednie do oznaczania LA związanego z białkiem w próbkach biologicznych, są mało dokładne, precyzyjne i selektywne.

Albumina jest niewielkim hydrofilowym białkiem globularnym, stanowiącym ponad 50-60% wszystkich białek osocza [49]. Ludzka albumina (ang. human serum albumin, HSA) jest białkiem modelowym, stosowanym często w badaniach ze względu na jej niski koszt, dostępność, stabilność i właściwości wiążące. Istnieje zarówno w postaci zredukowanej, jak i utlenionej. Zredukowana forma albuminy zawiera wolną grupę sulfhydrylową przy Cys34, która jest zdolna do tworzenia mieszanych disiarczków z niskocząsteczkowymi tiolami [49,50]. Ponieważ DHLA posiada grupy tiolowe można go również skutecznie związać z albuminą. W związku z powyższym zdecydowano się opracować procedurę umożliwiającą określenie całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu, stosując albuminę jako białko modelowe [D1]. W tym celu niezbędne było oprócz redukcji wiązań disiarczkowych, wprowadzenie uprzednio etapu deproteinizacji, aby wytrącić białko i oznaczyć LA z nim związany. Domena II w albuminie jest preferowanym miejscem wiązania, ponieważ LA wykazuje strukturalne podobieństwo do średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych, np. kwasu oktanowego [50]. Dokładne oddzielenie wolnego LA od białka ma zatem zasadnicze znaczenie dla oznaczenia ProtS-LA w próbkach osocza, ponieważ jego niecałkowite usunięcie powoduje przeszacowanie kwasu związanego z białkiem. Stąd, w kolejnym etapie została wdrożona technika ekstrakcji ciecz-ciecz. Zastosowanie ekstrakcji LA z próbek osocza za pomocą chloroformu zapewniło całkowite oddzielenie wolnego LA od białka, jednocześnie dobrą stabilność białek przez co ich separację od faz ciekłych. Do dalszych badań, aby umożliwić późniejsze wprowadzenie próbki na kolumnę chromatograficzną białko zawieszane było w buforze TRIS (stężenie 0,5 mol/L, pH 9) i poddawane reakcjom redukcji oraz derywatyzacji.

W przypadku oznaczania LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych [D4], rozerwanie wiązań disiarczkowych poprzedzone było etapem hydrolizy enzymatycznej mającym na celu uwolnienie LLys z białek tkanek zwierzęcych. Optymalizację warunków hydrolizy enzymatycznej prowadziłam dla dwóch enzymów proteolitycznych, takich jak pronaza E i subtylizyna A. W tym celu sprawdzałam wpływ ilości stosowanych enzymów oraz czasu trwania hydrolizy na jej wydajność, przyjmując jako kryterium oceny wpływu poszczególnych czynników wysokość piku powstałych pochodnych. Jak wynika z doniesień literaturowych [51] najefektywniej enzymy działają w obecności chlorku wapnia w ściśle określonym zakresie pH (pH 5-9). W tych warunkach bowiem szybkość reakcji enzymatycznej

jest wyższa, a enzymy charakteryzują się wysoką aktywnością. Wykazałam, że w temperaturze 37°C i w łagodnych warunkach alkalicznych (pH 8) najwyższą wydajność w procesie enzymatycznej hydrolizy osiągnięto po 22 godzinach procesu (**Rysunek 1**). Ze względu na różnorodność gatunkową i tkankową, dla każdej z badanych tkanek zwierzęcych do medium inkubacyjnego wprowadzałam odpowiednią ilość proteaz (subtylizyny A i pronazy E), niezbędną do uwolnienia LLys z tkanek, co zostało przedstawione w mojej pracy [D4].



**Rysunek 1.** Wpływ hydrolizy enzymatycznej na zawartość LLys i LA w homogenatach. Zależności wyrażone wysokością piku pochodnej od czasu inkubacji **A**) homogenatu serca indyczego oraz **B**) homogenatu serca cielęcego.

Nie lada utrudnieniem podczas oznaczania ważnych z biologicznego punktu widzenia związków siarki są ograniczenia związane z detekcją. LA i jego forma związana z białkiem – LLys nie są kompatybilne z powszechnie stosowanym w laboratoriach chemicznych i klinicznych detektorem UV-Vis, ponieważ w swojej strukturze nie zawierają aktywnego ugrupowania chromoforowego. W celu wyeliminowania tych trudności niezbędne jest zatem zastosowanie reakcji derywatyzacji [D5]. W przypadku prezentowanych przeze mnie metod [D1,D2,D4] wykorzystywałam derywatyzację przedkolumnową wykonywaną poza układem pomiarowym w trybie *off-line*, która poprzedzona była etapem redukcji wiązań disiarczkowych. Zagadnienie derywatyzacji chemicznej i techniki derywatyzacji, które sprzężone z techniką HPLC przyczyniły się do rozwoju chemii analitycznej, szczegółowo opisałam w pracy przeglądowej [D5]. Chciałabym zaznaczyć, że tematyka przedstawiona w tej pracy jest często stosowana w analizie chemicznej, a nieustanny postęp w dziedzinie

derywatyzacji warunkuje opracowanie nowych, w pełni zautomatyzowanych procedur oznaczania.



Rysunek 2. Schemat reakcji derywatyzacji DHLA i DHLLys z użyciem BCPB.

Anality będące przedmiotem mojego zainteresowania w swojej strukturze zawierają oprócz grupy sulfhydrylowej, reaktywne grupy: aminową i karboksylową. Swoją uwagę zatem skierowałam na odczynnik derywatyzujący, bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy (BCPB), który w środowisku wodnym selektywnie i specyficznie reaguje tylko z grupą -SH. W wyniku tej reakcji atom halogenu zostaje podstawiony atomem siarki w pozycji 2 pierścienia i powstaje trwałe wiązanie tioeterowe (**Rysunek 2**) [52]. Odczynnik BCPB syntezowany jest w naszym laboratorium zgodnie z wcześniej opracowaną procedurą, poprzez czwartorzędowanie 2-chloropirydyny bromkiem benzylu [53]. Doniesienia literatury specjalistycznej wykazały, że reakcji BCPB z DHLA towarzyszy korzystne, z analitycznego punktu widzenia, przesunięcie batochromowe maksimum absorpcji z 274 nm dla samego odczynnika do 321 nm dla

pochodnej, co umożliwia stosowanie dużych nadmiarów odczynnika derywatyzującego względem analitu, niezbędne w przypadku próbek biologicznych [54].

W celu oznaczenia całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu [D1], etap optymalizacji warunków konwersji chemicznej analitów w pochodne w pierwszej kolejności obejmował dobór pH środowiska reakcji, ilość zastosowanego odczynnika derywatyzującego oraz czas prowadzenia reakcji. Jako kryterium oceny wpływu powyższych czynników na wydajność derywatyzacji przyjmowałam wysokość piku pochodnej LA-BCPB. Jak zostało ustalone, reakcja BCPB z DHLA zachodzi z największą wydajnością w środowisku alkalicznym, w buforze TRIS o pH 9 w temperaturze pokojowej, w czasie 15 minut, przy użyciu 10 µL BCPB o stężeniu 0,1 mol/L, tak aby zapewnić warunki gwarantujące ilościowe przeprowadzenie badanych analitów w 2-*S*-pirydyniowe pochodne zgodnie ze schematem reakcji zamieszczonym na rysunku 2 [D1].



Rysunek 3. Wyznaczenie stechiometrii reakcji DHLLys z BCPB metodą zmian ciągłych [D2].

W pracy podjęłam również starania zmierzające do wykazania przydatności BCPB jako odczynnika derywatyzującego dihydroliponylolizynę (DHLLys) oraz możliwości wykorzystania odczynnika do jednoczesnego oznaczenia LLys i LA w próbkach moczu i tkanek zwierzęcych [D2,D4]. W literaturze specjalistycznej nie znalazłam żadnych informacji na temat stechiometrii reakcji DHLLys z BCPB, w związku z tym podjęłam próbę wyjaśnienia tego zagadnienia. Stosując metodę zmian ciągłych wyznaczyłam stechiometrię reakcji. Wykazałam, że podobnie jak DHLA, DHLLys reaguje z BCPB w stosunku molowym 1:2 (**Rysunek 3**) [D2]. W wyniku reakcji powstaje stabilna 2-*S*-pirydyniowa pochodna (LLys-BCPB), której widmo

UV-Vis wskazywało maksimum absorpcji przy 321 nm (**Rysunek 4**). Stąd, podobnie jak dla LA-BCPB, sygnał analityczny dla LLys-BCPB był rejestrowany za pomocą detektora spektrofotometrycznego właśnie przy długości fali 321 nm, co umożliwiało jednoczesne oznaczanie obok siebie LA i LLys.





W toku prowadzonych badań, optymalizowałam zatem warunki oznaczania całkowitej zawartości LA i LLys w moczu z wykorzystaniem techniki HPLC-UV-Vis. Równolegle sprawdzałam dwie procedury analityczne: redukcję wiązań disiarczkowych z wykorzystaniem TCEP i następującą po niej derywatyzację chemiczną BCPB, a także jednoczesną reakcję redukcji i derywatyzacji, stosując mieszaniną TCEP i BCPB. Ostatecznie, wysoce powtarzalne wyniki i najwyższą wydajność uzyskałam dla jednoczesnej redukcji wiązań disiarczkowych i derywatyzacji wyżej wspomnianych analitów, które prowadzone były w temperaturze pokojowej w ciągu 10 minut, wykorzystując mieszaninę 0,25 mol/L TCEP z 0,1 mol/L BCPB w stosunku 3:4 (v/v). Optymalnym środowiskiem reakcji okazał się bufor fosforanowy o pH 11 i stężeniu 0,2 mol/L [D2]. Zastosowane warunki zapewniły ilościowe przeprowadzenie LA i LLys w stabilne 2-*S*-pirydyniowe pochodne, przy jednoczesnym skróceniu czasu i uproszczeniu procedury przygotowania próbki.

BCPB wykorzystałam również, jako pierwsza, do oznaczania LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych [D4]. W tym celu, prowadziłam optymalizację warunków przekształcania analitów w 2-*S*-pirydyniowe pochodne, sprawdzając wpływ na jej wydajność ilości zastosowanego odczynnika derywatyzującego oraz czasu prowadzenia reakcji potrzebnego do ilościowego oznaczenia badanych związków. Jako kryterium oceny wpływu poszczególnych czynników przyjęłam wysokość piku powstałych pochodnych. Wykazałam, że

LA i LLys ulegały reakcji derywatyzacji z największą wydajnością w temperaturze pokojowej w czasie 15 minut w 0,1 mol/L buforze boranowym o pH 8, stosując 10 µL BCPB o stężeniu 0,1 mol/L. Zaletą przedstawionej procedury derywatyzacji LLys w stosunku do opublikowanej wcześniej metody [34], jest możliwość stosowania bardzo łagodnych warunków reakcji, w znacząco krótszym czasie. Procedura, która oparta była o znakowanie fluorescencyjne 4-sulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolem, była czasochłonna i charakteryzowała się skomplikowanym etapem przygotowania próbki do analizy. Reakcja pomiędzy odczynnikiem derywatyzującym i analitem wymagała zastosowania wysokiej temperatury 60°C, w ciągu 60 minut, co stanowi istotne ograniczenie podczas analizy dużej liczby próbek [34]. Opracowana przeze mnie metoda posiada znaczący potencjał aplikacyjny wynikający z wysoce reaktywnego i selektywnego odczynnika derywatyzującego BCPB, reagującego w krótkim czasie, w temperaturze pokojowej, co sprzyja możliwości automatyzacji procedury przygotowania próbki i tym samym ograniczenia jej praco- i czasochłonności.

Tkanki zwierzęce oraz płyny biologiczne, takie jak krew czy osocze są złożonymi próbkami, które moga składać się z tysięcy składników, w tym soli, białek i innych cząsteczek organicznych [36-38]. Nie mogą być zatem bezpośrednio wprowadzane na kolumnę chromatograficzną, ponieważ zawarte w nich białka mogą adsorbować się na ściankach kolumny i wnikać między małe pory kolumn, przez co je zapychać, uniemożliwiając separację [37]. Dlatego też, ze względu na obecność tych wielkocząsteczkowych związków, analiza próbek biologicznych oprócz wprowadzenia etapów redukcji wiązań disiarczkowych i derywatyzacji chemicznej, niesie za sobą konieczność zastosowania deproteinizacji. Najczęściej zabiegu usunięcia protein dokonuje się poprzez wytrącenie białek, dodając różnych odczynników chemicznych, takich jak kwasy, sole czy rozpuszczalniki organiczne [37,55], co pozwala na otrzymanie po odwirowaniu klarownego, wolnego od białek supernatantu, jak również przedłuża trwałość powstających pochodnych. W przypadku metod oznaczania LLys i/lub LA w homogenatach tkanek zwierzęcych i płynach ustrojowych, takich jak osocze z wykorzystaniem techniki HPLC, do odbiałczania próbek biologicznych powszechnie stosuje się kwas chlorowy(VII) (PCA) [54], acetonitryl (ACN) [56-60] oraz mieszaninę ACN:kwas metafosforowy [61]. Podobnie w opracowanych przeze mnie procedurach przygotowania próbek osocza [D1] oraz tkanek zwierzęcych [D4] niezbędna była ich deproteinizacja. W tym celu stosowałam jako odczynnik odbiałczający PCA o stężeniu 3 mol/L w połączeniu z ACN i następnie wytrącone białka odwirowywałam w temperaturze 4°C, a wolny od białek supernatant poddawałam analizie chromatograficznej. W przypadku procedury oznaczania całkowitej zawartości LA i LLys w moczu [D2] mimo, iż nie stwierdza się obecności białek w moczu zdrowego człowieka, próbki, prewencyjnie przed wprowadzeniem do układu HPLC również zakwaszałam PCA.

Jak już wcześniej wspomniałam, próbki osocza i tkanek zwierzęcych bogate są w proteiny, kwasy tłuszczowe, lipoproteiny i wiele innych substancji. Z uwagi na charakter amfifilowy, cząsteczki LA i LLys mogą oddziaływać z powierzchnią białek [20,28]. Kluczowym etapem zatem podczas przygotowania próbek osocza i tkanek zwierzęcych do analizy jest oddzielenie analitów od białka. Podczas badań wykazałam, że zastosowanie kwasowej deproteinizacji powoduje, że białka znacznie adsorbują badane anality, które są usuwane wraz z wytrąconymi proteinami, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia strat tych analitów. Podczas optymalizowania procedury oznaczania LA w osoczu [D1] wykazałam, że ponad 60% pochodnej LA zaadsorbowało się na białku modelowym – albuminie, podczas odbiałczania próbek, natomiast w przypadku procedury oznaczania LLys i wolnego LA w tkankach zwierzęcych około 20% pochodnej LLys i 56% pochodnej LA było zaadsorbowanych na powierzchni białek [D4]. Dowiodłam, że dodanie ACN do PCA na etapie deproteinizacji osocza i homogenatów tkanek zwierzęcych pozwoliło znacząco zwiększyć odzyski wyżej wspomnianych analitów i tym samym zwiększyć efektywność oddzielenia 2-*S*-pirydyniowych pochodnych od białka (**Rysunek 5**).



**Rysunek 5.** Wpływ rodzaju i objętości rozpuszczalnika organicznego na efektywność oddzielenia analitu od białka w procesie deproteinizacji. **A**) Odmycie LA-BCPB od białek osocza za pomocą ACN lub MeOH [D1] oraz **B**) odmycie LA-BCPB i LLys-BCPB od białek homogenatu tkanek za pomocą ACN (dane niepublikowane).

#### Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego

Podobnie jak etap przygotowania próbki do analizy, tak dobór warunków rozdzielania, identyfikacja substancji i ich ilościowe oznaczenie stanowią nie małą trudność i są praco- oraz czasochłonne. Podczas optymalizacji warunków rozdzielania chromatograficznego w celu zwiększenia selektywności rozdzielania badanych związków chemicznych, istotnym był dobór ilości modyfikatora organicznego fazy ruchomej, dobór pH eluentu, prędkości przepływu fazy ruchomej przez kolumnę i warunków rozdzielania w elucji gradientowej, a także innych warunków oznaczania (np. temperatury kolumny). Zebrane doświadczalnie informacje opierały się na podobnym schemacie działania i stanowiły podstawę do opracowania nowych i prostych procedur analitycznych, służących do identyfikacji składników rozdzielanej mieszaniny oraz ich oznaczania ilościowego.

Analiza dostępnych danych literaturowych prowadzi do wniosku, że najpopularniejszą techniką wykorzystywaną w celu rozdzielenia i oznaczania LA i LLys w próbkach biologicznych jest chromatografia gazowa i chromatografia cieczowa. Biorąc pod uwagę powszechne zainteresowanie LA podyktowane jego cennymi właściwościami terapeutycznymi, bardzo ważne jest opracowanie nowych, szybkich i skutecznych metod analitycznych pozwalających kontrolować obecność zarówno LA, jak i jego formy związanej w LLys w próbkach biologicznych. Technika HPLC sprzężona z detektorem UV-Vis z matrycą diodową (DAD) daje szerokie możliwości analityczne i stanowi podstawowe wyposażenie komercyjnych laboratoriów. Z powyższych względów opracowałam trzy procedury analityczne umożliwiające oznaczanie całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu [D1], całkowitej zawartości LA i LLys w moczu [D2], a także LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych [D4] z wykorzystaniem techniki HPLC-UV-DAD (Tabela 1).

Jak już wspomniałam wcześniej zarówno LA, jak i LLys po uprzedniej redukcji wiązań disiarczkowych, w reakcji z BCPB tworzą *S*-pirydyniowe pochodne, które oznaczałam techniką HPLC w odwróconym układzie faz. LA wykazuje właściwości słabego kwasu, a jego moc jest porównywalna z mocą kwasu octowego (pK<sub>aLA</sub> = 4,7) [62]. Podczas, gdy LLys można zaklasyfikować do bardziej kwaśnych związków organicznych i jej pK<sub>a</sub> wynosi 2,24 [63]. Oznacza to, że w zależności od pH środowiska równowaga dysocjacji tych analitów przesunięta jest w stronę form zjonizowanych. Stąd, do rozdzielenia chromatograficznego pochodnych LA-BCPB i LLys-BCPB wykorzystuje się zakwaszony eluent, który powoduje "cofnięcie" dysocjacji elektrolitycznej i zmianę hydrofobowości wspomnianych pochodnych. Obniżenie pH eluentu w przypadku związków należących do słabych kwasów organicznych (np. LA)

wpływa na zwiększenie ich hydrofobowości i wzrost retencji. Natomiast w przypadku pochodnej LLys-BCPB, obecność obok grupy karboksylowej, drugiej względnie polarnej, aminowej grupy funkcyjnej, w warunkach dostatecznie niskich wartości pH fazy ruchomej, wpływa na jej jonizację, a co za tym idzie zmniejszenie retencji. Z uwagi na to, iż separowane pochodne LA i LLys różnią się znacznie powinowactwem sorpcyjnym niezbędne jest stosowanie elucji gradientowej, aby umożliwić wymycie z kolumny bardziej hydrofobowych analitów łącznie z LA-BCPB i zminimalizować czas rozdzielania. Na podstawie dostępnych danych literaturowych, badań własnych oraz wcześniej opracowanej procedury [54], podczas rozwijania metod oznaczania LA i LLys w próbkach biologicznych [D1,D2,D4] zaproponowałam jako fazę ruchomą mieszaninę ACN i kwasu octowego w wodzie.

Podejmując problematykę optymalizacji warunków chromatograficznych pozwalających na efektywne rozdzielenie analitów od składników matrycy i analizę techniką HPLC całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu [D1] przebadano pH i skład fazy ruchomej (ilość ACN i stężenie kwasu octowego), temperaturę termostatu kolumny chromatograficznej i program elucji gradientowej. Dla optymalnych warunków prowadzenia procesu rozdzielania wyznaczono czas retencji i współczynnik retencji LA-BCPB. Zgodnie z oczekiwaniami wzrost zawartości ACN w fazie ruchomej z 20 do 30% i stężenia wodnego roztworu kwasu octowego w zakresie 0,5-3% spowodował spadek wartości współczynników retencji, którym towarzyszyło jednocześnie pogorszenie rozdzielczości i symetrii pików. Temperatura kolumny w przedziale 15-40°C nieznacznie wpływała na parametry retencji. Uzyskane warunki chromatograficzne umożliwiły efektywne rozdzielenie składników złożonej matrycy, jaką jest osocze w ciągu 8 minut. LA w formie 2-S-pirydyniowej pochodnej był wymywany z kolumny w postaci symetrycznego piku po czasie 5,49 minut bez interferencji pochodzących od endogennych składników obecnych w próbkach osocza (Rysunek 6).









**Rysunek 6.** Reprezentatywne chromatogramy wodnego roztworu standardu i próbek osocza. A) Roztwór wzorcowy LA o stężeniu 15 µmol/L. **B**) Próbka osocza uzyskana od ochotnika przed suplementacją LA, stężenie całkowite LA 0,0 µmol/L (linia czarna), po doustnym przyjmowaniu LA w ilości 600 mg, steżenie całkowite LA 0.53 umol/L (108.3 µg/L) (linia czerwona) oraz w ilości 1200 mg, stężenie całkowite LA 2,08 µmol/L (430,0 µg/L) (linia niebieska). C) Próbka osocza (linia czarna) i próbka osocza doszczepionego 3 µmol/L (linia ProtS-LA czerwona). Warunki chromatograficzne: kolumna Zorbax C-18; profil gradientu 0-5 min, 10-40% B; 5-6 min, 40-10% B; 6-8 min, 10% B; rozpuszczalniki: (A) 2% roztwór kwasu octowego o pH 2,36 i (B) ACN; temperatura kolumny 25 °C, prędkość przepływu 1 mL/min, analityczna długość fali 321 nm [D1].

W kolejnym etapie badań podjęłam działania w kierunku opracowania optymalnych warunków chromatograficznych umożliwiających selektywne rozdzielenie i identyfikację LA oraz LLys w moczu i homogenatach tkanek zwierzęcych [D2,D4]. W związku z powyższym szczególną uwagę zwróciłam na aspekt doboru odpowiedniej fazy stacjonarnej do rozdzielania wyżej wspomnianych związków w odwróconym układzie faz. W tym celu przetestowałam trzy kolumny chromatograficzne firmy Agilent Technologies: Rapid Resolution SB-C18 (75×4,6 mm, 3,5 μm), Zorbax SB-C18 (150×4,6 mm, 5 μm) oraz Poroshell 120 SB-C18 (75×4,6 mm,

2,7 μm), a także kolumnę chromatograficzną firmy Thermo Scientific: ODS Hypersil (125×4,6 mm, 5 μm). Mało satysfakcjonujące wyniki uzyskałam stosując kolumny Rapid Resolution (75×4,6 mm, 3,5 μm) i ODS Hypersil (125×4,6 mm, 5 μm). Sygnały analityczne pochodzące od analitów zarejestrowane podczas stosowania wyżej wymienionych kolumn były szerokie, asymetryczne i obserwowałam ich koelucję z innymi składnikami matrycy. Ostatecznie rozdzielanie chromatograficzne pochodnych LA i LLys w próbkach moczu i tkanek zwierzęcych przeprowadziłam z wykorzystaniem odpowiednio kolumny Zorbax SB-C18 (150×4,6 mm, 5 μm) [D2] oraz kolumny typu *core-shell* Poroshell 120 SB-C18 (75×4,6 mm, 2,7 μm) [D4]. Dzięki zastosowaniu kolumny otrzymanej w technologii opartej na sorbencie *core-shell* do oznaczania badanych analitów w tkankach zwierzęcych [D4] możliwe było uzyskanie wąskich, dobrze rozdzielonych pików oraz wykonanie analizy w krótszym czasie, przy jednoczesnym ograniczeniu zużycia drogich i szkodliwych rozpuszczalników organicznych.

Analogicznie do poprzedniej metody [D1], w ramach prowadzonych badań nad opracowaniem odpowiednich układów chromatograficznych zbadałam skład fazy ruchomej (ilość modyfikatora organicznego i stężenie kwasu octowego) oraz różne warianty programu elucji gradientowej, jak również natężenie przepływu fazy ruchomej w zakresie wartości 1,0-1,5 mL/min, aż do uzyskania efektywnej separacji badanych związków, dobrej czułości oraz satysfakcjonującej powtarzalności, zachowując jednocześnie krótki czas analizy. Dla wybranej kolumny chromatograficznej i optymalnego (pod względem selektywności rozdzielania i czasu analizy) programu elucji gradientowej wyznaczyłam czas retencji, współczynnik retencji, liczbę półek teoretycznych oraz współczynnik asymetrii piku. Satysfakcjonujące rezultaty uzyskałam z zastosowaniem 2% wodnego roztworu kwasu octowego o pH=2,5 [D2,D4]. Dodatek kwasu do fazy ruchomej wpłynął korzystnie na symetrie pików oznaczanych związków oraz ograniczenie ogonowania pików chromatograficznych. W dalszym postępowaniu analitycznym stosowana była elucja gradientowa przy stałym natężeniu przepływu strumienia fazy ruchomej równym 1,1 mL/min [D2] lub 1,0 mL/min [D4]. Takie rozwiązanie zaowocowało otrzymaniem układów chromatograficznych o dużej sprawności, liczba półek teoretycznych dla LLys-BCPB i LA-BCPB wynosiła odpowiednio 27587 i 47787 [D2] oraz 37829 i 71878 [D4]. Dodatkowym atutem opisanych i opracowanych metod chromatograficznych [D2,D4] było uzyskanie zadowalającej powtarzalności czasów retencji. Mierzone wartości współczynników zmienności dla czasów retencji badanych analitów nie przekraczały 1,0%. LLys oraz LA eluowały w formie pirydyniowych pochodnych po odpowiednio 4,42 minuty i 5,38 minuty [D2] oraz 6,45 minuty i 8,79 minuty [D4], a otrzymane na chromatogramie piki były wąskie i symetryczne (**Rysunek 7** i **Rysunek 8**).



**Rysunek 7.** Reprezentatywne chromatogramy wodnego roztworu standardów i próbek moczu. **A**) Roztwór wzorcowy związków tiolowych o stężeniu 5 µmol/L, **B**) próbka moczu (linia ciągła) i próbka moczu doszczepionego 10 µmol/L LA i LLys (linia przerywana), **C**) próbka moczu porannego osoby przed suplementacją LA (linia przerywana) i po 7 tygodniach doustnej suplementacji LA (linia ciągła). Piki: 1 - cysteinyloglicyna; 2 - cysteina; 3 - homocysteina; 4 - glutation; 5 - N-acetylo-L-cysteina; 6 - LLys; 7 - LA. *Warunki chromatograficzne:* kolumna Zorbax C-18; profil gradientu 0–6,5 min, 10–44% B; 6,5–10 min, 44–10% B; rozpuszczalniki: (A) 2% roztwór kwasu octowego o pH 2,36 i (B) acetonitryl; temperatura kolumny 25 °C, prędkość przepływu 1,1 mL/min, analityczna długość fali 321 nm [D2].



**Rysunek 8.** Reprezentatywny chromatogram homogenatu serca indyka (linia niebieska) oraz homogenatu serca indyka doszczepionego 5 µmol/L LLys i LA (linia zielona). Stężenia LA i LLys w homogenacie serca indyka wynosiły odpowiednio 0,12 i 0,88 µmol/L. *Warunki chromatograficzne:* kolumna Poroshell 120 C18; profil gradientu 0-6 min, 9-21% (B); 6-11 min, 21-30%; (B); 11-13 min, 30-9% (B); 13-16 min, 9% (B); rozpuszczalniki: (A) 2% roztwór kwasu octowego o pH 2,36 i (B) acetonitryl; temperatura kolumny 25 °C, prędkość przepływu 1 mL/min, analityczna długość fali 321 nm [D4].

W **Tabeli 1** zestawiłam warunki rozdzielania chromatograficznego dla trzech opracowanych metod oznaczania badanych związków w próbkach biologicznych. Przedstawione warunki analizy chromatograficznej zapewniają bardzo dobrą separację całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu [D1], całkowitej zawartości LA i LLys w moczu [D2], a także LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych [D4]. Należy podkreślić, iż opracowane przeze mnie nowe metody [D1,D2,D4] są konkurencyjne w stosunku do dotychczas stosowanych procedur analitycznych. Charakteryzują się dobrą rozdzielczością i sprawnością, dzięki czemu składniki matrycy zostały dobrze rozdzielone i nie interferowały z analitami będącymi przedmiotem badań. Co równie ważne, LA i LLys opisane w pracach [D2,D4] nigdy wcześniej nie były oznaczane równocześnie.

Anality	Matryca	Technika	Faza ruchoma					Detekcja	T [°C]	Objętość dozowanej próbki [µL]	Lit.
			Sposób elucji	t [min]	2% CH <sub>3</sub> COOH [%]	ACN [%]	Natężenie przepływu [mL/min]				
				0	90	10	1,0	DAD 321 nm 25		5	[D1]
LA	000070	HPLC	gradientowy	5	60	40	1,0		25		
ProtS-LA	USUCZE			6	90	10	1,0		23		
				8	90	10	1,0				
			Sposób elucji	t [min]	2% CH3COOH [%]	ACN [%]	Natężenie przepływu [mL/min]				
т.			gradientowy	0	90	10	1,1	DAD 321 nm	25	5	[D2]
LA LLys	mocz	HPLC		6,5	56	44	1,1				
				10	90	10	1,1				
			Sposób elucji	t [min]	2% CH <sub>3</sub> COOH [%]	ACN [%]	Natężenie przepływu [mL/min]				
LA LLys	tkanki zwierzęce	HPLC	gradientowy	0	91	9	1,0	DAD 321 nm 25			
				6	79	21	1,0				
				11	70	30	1,0		5	[D4]	
				13	91	9	1,0				
				16	91	9	1,0				

Tabela 1. Zestawienie optymalnych warunków procesu rozdzielania chromatograficznego dla opracowanych metod analitycznych.

#### Walidacja opracowanych metod analitycznych

Każdą opracowaną podczas badań metodę analityczą poddałam walidacji zgodnie z kryteriami zalecanymi w literaturze dla metod analizy próbek biologicznych [64,65]. W ramach prac [D1,D2,D4] sprawdziłam takie parametry metody jak selektywność, zakres liniowości, precyzję wyrażoną względnym odchyleniem standardowym (RSD), dokładność wyrażoną odzyskiem, granice oznaczalności (LOQ), granice wykrywalności (LOD) oraz stabilność analitów, a w ramach pracy [D4] dodatkowo efekt matrycowy. Uzyskane parametry walidacyjne dla poszczególnych metod przedstawiłam w **Tabeli 2**.

Matryca	Anality	Zakres liniowości [µmol/L]	Precyzja [%]		Dokładność [%]			LOQ	Lit.
			min	max	min	max	[µmoi/E]		
Osocze	LA	0,1 - 20	3,5	18,9	98,6	113,3	0,05	0,1	(D1)
	ProtS-LA	0,5 - 3	2,2	10,4	94,4	106,0	0,2	0,5	נוען
Mocz	LA	0,4 - 12	0,0	9,4	96,4	109,1	0,1	0,4	[[]2]
	LLys		0,0	8,2	95,3	114,8	0,2	0,4	נטצן
Tkanki zwierzęce	LA	0,1 - 10	0,2	11,3	99,1	109,3	0,03	0,1	[D4]
	LLys		0,2	5,6	87,9	101,2			

Tabela 2. Wybrane parametry walidacyjne dla opracowanych metod.

Liniowość opracowanych metod [D1,D2,D4] została określona w oparciu o metodę krzywej wzorcowej. Równania krzywych kalibracyjnych wyznaczyłam metodą najmniejszych kwadratów z trzech niezależnych pomiarów, uśrednionych dla co najmniej 6 poziomów stężeń odpowiadających zawartości analitów w próbkach rzeczywistych (osoczu, moczu i tkanek zwierzęcych). Wysokie wartości liczbowe współczynników determinacji (wartości powyżej 0,99) potwierdziły liniowość wyznaczonych krzywych kalibracyjnych w badanych zakresach stężeń.

Istotnym elementem potwierdzenia wiarygodności metody analitycznej było również oszacowanie precyzji i dokładności wewnątrz- i międzydniowej na drodze trzech niezależnych pomiarów dla trzech różnych poziomów stężeń analitów z zakresu liniowości metod. Uzyskane w toku procedury walidacyjnej wyniki dla badanych związków w trzech matrycach, które zamieściłam w pracach [D1,D2,D4] wykazały, że precyzja i dokładność spełniają kryteria

stawiane metodom bioanalitycznym [66] i mieszczą się w granicach  $\pm$  15% wartości nominalnych, z wyjątkiem LOQ, gdzie nie przekraczają granicznej wartości  $\pm$  20%.

W toku prowadzonych badań podjęłam także starania zmierzające do określenia selektywności prezentowanych metod. Próbki rzeczywiste charakteryzują się złożonością matrycy przy jednocześnie dużej zawartości substancji przeszkadzających, które potencjalnie mogą wpływać na jakość i wartość sygnału analitycznego generowanego przez analit. W związku z powyższym, aby zbadać selektywność opracowanych metod sprawdziłam możliwość interferencji występujących podczas oznaczania LA i LLys w próbkach rzeczywistych. W tym celu przeprowadziłam analizę sześciu różnych próbek osocza [D1], moczu [D2], homogenatu wątroby wieprzowej oraz serca indyczego [D4] bez i z dodatkiem LA i LLys. Na podstawie zarejestrowanych chromatogramów stwierdziłam brak interferujących sygnałów pochodzących od badanych matryc z oznaczanymi związkami, co świadczy o selektywności opracowanych metod. Dodatkowo wykonałam test "czystości" piku chromatograficznego, wykorzystując detektor UV-Vis-DAD, który wykazał, że pikom pochodzącym od pochodnych LLys i/lub LA można przypisać tylko jeden sygnał odpowiadający badanej substancji.

W próbkach biologicznych (osocze, mocz i tkanki zwierzęce) występują endogenne tiole, których ilość w dużej mierze zależy od stylu życia, diety, stanu zdrowia i uwarunkowań genetycznych, przy czym ich stężenie (z wyjątkiem cysteiny) w osoczu człowieka jest bardzo niskie w porównaniu do innych matryc. Zgodnie z danymi literaturowymi związki tiolowe z odczynnikiem derywatyzującym BCPB ulegają przekształceniu w odpowiednie pochodne, które wykazują dobrze wykształcone maksimum absorpcji przy długości fali 316 nm [52]. Stąd też na etapie opracowywania metody oznaczania całkowitej zawartości LA i LLys w moczu [D2] koniecznym było zbadanie selektywności układu rozdzielającego w stosunku do wspomnianych analitów w obecności cysteiny, homocysteiny, glutationu, N-acetylo-Lcysteiny oraz cysteinyloglicyny. W ustalonych optymalnych warunkach rozdzielania chromatograficznego, widoczne na chromatogramie piki pochodzące od wymienionych substancji eluowały przy innych czasach retencji i tym samym nie utrudniały oznaczenia LA i LLys oraz nie powodowały zafałszowania wyników (**Rysunek 7A**).

Na etapie rozwijania metodyki, próbki biologiczne, podobnie jak roztwory wzorcowe mogą ulegać różnym przemianom biochemicznym i fizykochemicznym zależnie od czasu i sposobu ich przechowywania. W związku z powyższym podczas walidacji opracowanych metod podjęłam próbę określenia trwałości analitów lub ich pochodnych w badanych próbkach w różnych warunkach przechowywania przed i w trakcie analizy (ocena stabilności krótkoterminowej, długoterminowej stabilności przechowywanych oraz ocena w automatycznym podajniku próbek) [D1,D2,D4]. Otrzymane wyniki badań stabilności wykazały, że stężenie LA w próbkach osocza przechowywanych w temperaturze pokojowej, w 4, -20 i -78°C nie ulegało istotnym zmianom odpowiednio przez co najmniej 2 dni (**Rysunek** 9A), 10 dni, 26 tygodni i 6 miesięcy. Gdy natomiast próbka po derywatyzacji z BCPB umieszczona była w automatycznym podajniku próbek zaobserwowałam, że 2-S-pirydyniowa pochodna LA, zakwaszona i zawierająca ACN jest stabilna przez 4 godziny na poziomie 103,6% (Rysunek 9B). Majac na uwadze powyższy fakt, próbki osocza od chwili przygotowania należy niezwłocznie poddać analizie końcowej w celu ilościowego oznaczenia LA w badanej matrycy [D1].



**Rysunek 9.** Badania trwałości LA i jego 2-*S*-pirydyniowej pochodnej w osoczu. **A**) Trwałość LA w osoczu przechowywanym przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. **B**) Trwałość 2-*S*-pirydyniowej pochodnej LA w osoczu, po zakwaszeniu PCA i dodaniu ACN przechowywanym przez 19 godzin w temperaturze 25°C.

Inaczej sytuacja rysowała się w przypadku próbek homogenatów tkanek zwierzęcych. W warunkach chromatografowania utworzone pochodne 2-*S*-pirydyniowe były stabilne w temperaturze otoczenia przez 24 godziny. Świadczą o tym wysokie wartości odzysku dla LLys-BCPB i LA-BCPB, które wynosiły odpowiednio 104,5% i 106,4% (**Rysunek 10**) [D4]. Uzyskane wyniki pokazały, że po derywatyzacji próbki homogenatów tkanek zwierzęcych w odróżnieniu do próbek osocza, mogą być przechowywane w automatycznym podajniku próbek przez kilkadziesiąt godzin, co daje możliwość analizy większej liczby próbek.



**Rysunek 10.** Trwałość pochodnych LLys-BCPB oraz LA-BCPB w próbce homogenatu serca indyczego, po jej zakwaszeniu PCA i dodaniu ACN, przechowywanej przez 28 godzin w temperaturze 25°C.

Z uwagi na to, iż LLys nie jest związkiem dostępnym komercyjnie, konieczne było przeprowadzenie jej syntezy, dzięki współpracy z Katedrą Chemii Bioorganicznej Wydziału Farmaceutycznego. W związku z brakiem informacji o właściwościach fizykochemicznych, na początkowym etapie prowadzonych badań, sprawdzałam również stabilność roztworów wzorcowych LLys na trzech poziomach stężeń: 30, 1000 i 5000 µmol/L. Zaobserwowałam, że w badanych roztworach przechowywanych w temperaturach -79 i -20°C po 6 miesiącach pozostaje odpowiednio 96,1-96,9% oraz 55,5-71,0% wartości początkowej LLys. Dodatkowo, zauważyłam, że związek ten ulega szybkiej degradacji w roztworze wzorcowym o najniższym stężeniu (30 µmol/L) przechowywany w temperaturach 24 i 4°C. Podczas, gdy w roztworach o wyższych stężeniach (1000 i 5000 µmol/L) LLys jest trwała w 24°C przez 1 dzień, a w 4°C przez co najmniej 5 dni. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, zalecane jest codzienne przygotowywanie świeżych roztworów LLys, ewentualnie niezwłoczne ich zamrożenie w temperaturze -79°C zaraz po przygotowaniu [D2].

W procedurze analitycznej stosowanej do oznaczania LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych [D4] istotnym elementem walidacji było również określenie efektu matrycowego. W przedstawionym badaniu efekt matrycowy był niższy niż  $\pm$  20% w związku z tym nie był czynnikiem istotnie wpływającym na uzyskiwane stężenia LA i LLys.

Na podstawie otrzymanych danych [D1,D2,D4] można wysnuć wniosek, iż opracowane procedury analityczne charakteryzują się dobrą dokładnością i precyzją, a uzyskane wartości LOQ umożliwiają monitorowanie zawartości LLys i/lub LA w próbkach osocza, moczu i homogenatów tkanek zwierzęcych na niskich poziomach stężeń.

#### Aplikacja opracowanych procedur analitycznych do badań próbek rzeczywistych

Coraz większa zachorowalność na nowotwory odnotowana w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat determinuje potrzebę poszukiwania nowych środków wspomagających leczenie. W związku z tym naukowcy zwrócili uwagę na możliwość wykorzystania LA w profilaktyce i pomocniczo w leczeniu nowotworu [66–68]. Endogenna synteza LA nie jest jednak w stanie dostarczyć odpowiedniej ilości tego kwasu, aby móc zaobserwować jego korzystne działanie w profilaktyce chorób dietozależnych [19,20]. W związku z tym ważne jest wykorzystanie egzogennych źródeł tego związku. LA jest coraz częściej stosowany w postaci powszechnie dostępnych suplementów diety oraz dostarczany do organizmu poprzez odpowiednią dietę [31,69].

W celu terapeutycznego monitorowania ilości LA i LLys opracowane, zoptymalizowane i zwalidowane nowe procedury analityczne wykorzystałam do wykrywania i oznaczenia LLys i/lub LA w płynach ustrojowych [D1,D2]. Badaniom poddałam próbki osocza [D1] i moczu [D2] uzyskane od potencjalnie zdrowych osób, które przyjmowały LA w postaci komercyjnie dostępnego farmaceutyku. W celu określenia całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu [D1], badania przeprowadziłam z udziałem 17 ochotników w wieku 28-63 lat (7 mężczyzn i 10 kobiet), którzy otrzymywali pojedynczą porcję leku zawierającego 600 i 1200 mg LA przez 30 dni. Stężenie kwasu w osoczu znacząco różniło się i u pacjentów, którzy jednorazowo przyjęli suplement diety zawierający 600 mg LA, zmierzone wartości kwasu oscylowały od 33,9 do 287,8 µg/L. Podanie podwójnej dawki farmaceutyku, zawierającej 1200 mg LA, zgodnie z przewidywaniami, spowodowało wzrost stężenia kwasu w osoczu, które mieściło się w zakresie 260,7-430,0 µg/L (**Tabela 3**). W osoczu zebranym przed doustną suplementacją, w 14 próbkach, nie wykryto LA. Natomiast w 3 próbkach jego ilość znajdowała się poniżej granicy oznaczalności. We wszystkich badanych próbkach osocza nie została stwierdzona obecność ProtS-LA.

		Stężenie LA wyrażone w µmol/L (µg/L)					
Pleć	Wiek	Przed	Po suplementacji LA				
		suplementacją LA	600 mg	1200 mg <sup>b</sup>			
K	39	n.w.	0,16 (33,9)	1,36 (281,0)			
Μ	41	0,08 <sup>a</sup>	0,66 (135,4)	1,26 (260,7)			
Κ	43	n.w.	0,53 (108,3)	2,08 (430,0)			
Κ	40	n.w.	1,08 (223,5)	1,28 (264,1)			
Κ	28	n.w.	1,35 (277,6)	1,54 (318,3)			
K	55	n.w.	1,39 (287,8)	1,87 (386,0)			
Κ	43	n.w.	0,18 (36,9)				
М	47	0,015 <sup>a</sup>	0,27 (56,5)				
Κ	39	0,015 <sup>a</sup>	0,26 (54,5)				
K	28	n.w.	0,57 (118,5)				
K	39	n.w.	0,32 (65,0)				
М	63	n.w.	0,39 (81,3)				
М	57	n.w.	0,51 (105,0)				
М	30	n.w.	0,82 (169,3)				
М	53	n.w.	0,82 (169,3)				
М	50	n.w.	0,89 (182,8)				
Κ	62	n.w.	1,13 (233,6)				

Tabela 3. Stężenia całkowitej zav	wartości LA w osoczu człow	wieka przed i po doustnej	suplementacji LA
[D1].			

n.w., nie wykryto

<sup>a</sup> Szacunkowe stężenie LA poniżej LOQ.

<sup>b</sup> Próbki osocza pacjentów po przyjęciu 1200 mg LA, uzyskano po upływie roku.

W celu określenia farmakokinetyki wydalania LA i LLys z moczem [D2], badaniu poddałam 7 próbek moczu uzyskanych od kobiet (n=4) i mężczyzn (n=3) w wieku od 25 do 48 lat, którzy dwa razy dziennie w ciągu dwóch tygodni, doustnie przyjmowali porcję 200 mg LA. Dwie kobiety w wieku 27 i 48 lat przedłużyły okres suplementacji LA do 9 tygodni. W moczu porannym zebranym przed suplementacją, nie stwierdziłam obecności wspomnianych analitów. Po 1 tygodniu doustnego przyjmowania farmaceutyku, stężenia LA oraz LLys w moczu oscylowały odpowiednio od 0,57 do 4,73 µmol/L oraz od 0,41 do 2,88 µmol/L. Natomiast po 2 tygodniach suplementacji, stężenia badanych analitów nieznacznie wzrosły u większości pacjentów i mieściły się w przedziałach 1,07-5,60 µmol/L dla LA oraz 0,59-6,06 µmol/L dla LLys. Rozbieżności pomiędzy stężeniami mogły wynikać ze zmiennej diety, bądź metabolizmu. W celu ograniczenia różnicy wynikającej z objętości moczu wydalanego w ciągu
doby i tym samym uwzględniając różne rozcieńczenia próbek, otrzymane wyniki normalizowałam na kreatyninę. Rezultaty wydalania LA i LLys z moczem po korelacji na kreatyninę zostały przedstawione w **Tabeli 4** i na **Rysunku 11**. U dwóch ochotników, którzy doustnie przyjmowali LA, wystąpiły skutki uboczne, takie jak chroniczne zmęczenie czy rozdrażnienie.

	Wiek	Stężenie LA (mmol/mol Crn)			Stężenie LLys (mmol/mol Crn)			
Płeć		Przed	Po suplementacji LA		Przed	Po suplementacji LA		
		suplementacją LA	1 tydzień	2 tydzień	suplementacją LA	1 tydzień	2 tydzień	
K	25	n.w.	0,03	0,08	n.w.	0,02	0,07	
Κ	27	n.w.	0,11	0,23	n.w.	0,16	0,24	
Κ	29	n.w.	0,31	0,18	n.w.	0,06	0,08	
Κ	48	n.w.	0,09	0,34	n.w.	0,13	0,32	
Μ	26	n.w.	0,19	0,20	n.w.	0,03	0,05	
М	27	n.w.	0,15	0,12	n.w.	0,03	0,03	
М	46	n.w.	0,55	0,29	n.w.	0,24	0,17	

**Tabela 4.** Stężenia LA i LLys w moczu człowieka przed i po zażyciu suplementu zawierającego LA [D2].

Crn: kreatynina; n.w.: nie wykryto.



**Rysunek 11.** Wydalanie LLys i LA z moczem. Profil zmian stężenia LA i LLys w moczu dwóch zdrowych ochotniczek: kobieta lat 26 (A) i kobieta lat 48 (B) przed i po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9 tygodniach suplementacji LA [D2].

Uzyskane wyniki sugerują, że LA przyjmowany w postaci suplementu diety jest wydalany z moczem w postaci LLys. W związku z powyższym wydaje się, że LA może włączać się do

białek poprzez tworzenie wiązania z grupą ε-aminową lizyny i w procesie degradacji białek być uwalniany w postaci LLys. Zaproponowana przeze mnie metoda [D2] jest pierwszą aplikacją jednoczesnego oznaczania LA i LLys w moczu człowieka po doustnej suplementacji LA.

Uszkodzenie ludzkich komórek w warunkach stresu oksydacyjnego zwiększa się wraz z wiekiem. Stąd wzmożone spożywanie egzogennych przeciwutleniaczy pochodzących z owoców, warzyw i mięsa może wspomagać endogenny system obrony antyoksydacyjnej, a tym samym zmniejszać ryzyko wystąpienia chorób przewlekłych [7]. Wykorzystując opracowaną i opisaną wcześniej metodę oznaczania LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych, monitorowałam stężenie LLys i LA w próbkach mięsa różnego pochodzenia [D4]. Do badań użyłam tkanki, takie jak: wątroba, serce, nerka i żołądek, pochodzące od krów, cieląt, świń, kurczaków i indyków. Oznaczone zawartości LA i LLys dla różnych próbek mięsa przedstawiłam w **Tabeli 5**.

Themlet	Indyk	Cielak	Krowa	Świnia	Kurczak μg/g tkanki	
I Kanki –	μg/g tkanki	µg/g tkanki	µg/g tkanki	µg/g tkanki		
LLys						
Serce	$3{,}99 \pm 0{,}01$	$3,\!32\pm0,\!01$	$3,\!12\pm0,\!05$	$3,\!46 \pm 0,\!03$	$2,11 \pm 0,00$	
Wątroba	n.w.	$0,\!56\pm0,\!00$	$0,\!97\pm0,\!01$	n.w.	$1,\!17\pm0,\!01$	
Nerka	n.w.	$0,\!71\pm0,\!01$	$1,\!40\pm0,\!01$	$0,\!94\pm0,\!01$	$0,\!72\pm0,\!01$	
Żołądek	n.w.	n.w.	$1{,}59\pm0{,}02$	$0{,}54\pm0{,}01$	n.w.	
LA						
Serce	$0,\!36\ \pm 0,\!01$	$0{,}22 \hspace{0.1cm} \pm \hspace{0.1cm} 0{,}01$	$0{,}28\ \pm 0{,}04$	$0{,}55\ \pm 0{,}01$	$0,\!27 \pm 0,\!01$	
Wątroba	n.w.	$0,\!38\pm0,\!00$	n.w.	n.w.	$0{,}51\pm0{,}00$	
Nerka	n.w.	$0,14^{a} \pm 0,03$	$0{,}50\ \pm 0{,}05$	$0,\!41 \pm 0,\!00$	$0,32 \pm 0,01$	
Żołądek	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	$0,\!41\pm0,\!03$	

Tabela 5. Zawartość LA i LLys w jadalnych produktach pochodzenia zwierzęcego [D4].

<sup>a</sup> Stężenie szacunkowe poniżej LOQ

n.w., nie wykryto

Spośród badanych tkanek mięsa najwyższe wartości stężeń LLys i LA wykryłam w sercu, wątrobie i nerce. Średnie zawartości LLys mieściły się w przedziałach 2,11-3,99  $\mu$ g/g dla serca, 0,56-1,17  $\mu$ g/g dla wątroby i 0,71-1,40  $\mu$ g/g dla nerki. Natomiast stężenia LA oscylowały od 0,22 do 0,55  $\mu$ g/g dla serca, od 0,38 do 0,51  $\mu$ g/g dla wątroby oraz od 0,14 do 0,50  $\mu$ g/g dla

nerki. Obecność LLys stwierdziłam również w żołądku krowy i świni, z kolei LA tylko w żołądku kurczaka. Biorąc pod uwagę wyniki przedstawione powyżej i dostępne dane literaturowe, można wysnuć wniosek, iż zawartość LLys jest wysoka w tkankach aktywnych metabolicznie, które zawierają dużą liczbę mitochondriów [69,70]. LA, jeśli był obecny w badanych próbkach mięsa, znajdował się na relatywnie niskim poziomie. Oznacza to, że enzymy proteolityczne nie rozszczepiają skutecznie wiązania amidowego pomiędzy LA a lizyną i wówczas na skutek trawienia enzymatycznego LA wchłania się w postaci LLys [71]. Analizując poziomy zawartości LA i LLys w badanych próbkach mięsa można również zauważyć, że ich ilości zależne są od rodzaju mięsa. Mianowicie, najniższą zawartość wspomnianych analitów zawierało mięso kurczaka, podczas gdy najwyższą zaobserwowałam w mięsie czerwonym. Wydaje się, że wysoki poziom stężenia LA i LLys w tkankach takich jak: serce, wątroba czy nerka może stanowić mechanizm obrony antyoksydacyjnej dla tych narządów. Wyznaczone na podstawie trzech niezależnych pomiarów, średnie stężenia LLys w badanych próbkach różniły się od wartości deklarowanych przez innych badaczy [48,71]. Zawartości LLys oznaczone opracowana przeze mnie metoda były nieco wyższe w stosunku do wcześniej opublikowanej metody [48], według której dla proszku acetonowego z nerki, serca i wątroby wołowej stężenia LLys mieściły się w przedziale 0,86-2,64 µg/g, jak również były niższe, od wyników 2,14-4,38 µg/g wyznaczonych dla tych samych tkanek metodą enzymatyczną [71]. Rozbieżności pomiędzy wynikami mogą być uwarunkowane wieloma czynnikami, takimi jak: rodzaj materiału użytego do badań, gatunek zwierząt, sposób żywienia, wiek ubojowy i płeć zwierząt, czy też różnice między stosowanymi metodami analitycznymi.

Według mojej wiedzy, przedstawiona metoda [D4] jest pierwszą procedurą analityczną stosowaną do oznaczania LLys w homogenatach wątroby, serca, nerek i żołądka pochodzących od cieląt, świń, kurczaków oraz indyków. Stanowi ponadto przydatne narzędzie analityczne stosowane do badań biochemicznych i biomedycznych.

# Wyznaczenie aktywności antyoksydacyjnej liponylolizyny

Temat szkodliwości wolnych rodników koncentruje naszą uwagę na poszukiwaniu substancji, które wspierają naturalne mechanizmy obronne komórek człowieka. W tym celu opracowuje się szereg metod badawczych, które pozwalają oznaczyć potencjał przeciwutleniający tych substancji. Badania prowadzi się na organizmach żywych *in vivo*, bądź poza organizmami żywymi *in vitro*. Te ostatnie badania są stosunkowo łatwe do przeprowadzenia, mniej kosztowne i czasochłonne, a także eliminują wiele czynników wpływających na powstawanie błędów podczas pomiarów tradycyjnymi metodami *in vivo* 

[72,73]. W piśmiennictwie nie zaobserwowano doniesień literaturowych na temat aktywności antyoksydacyjnej LLys [23]. Stąd też kolejny etap mojej pracy miał na celu zbadanie tych właściwości z zastosowaniem wodno-alkoholowych roztworów standardów (LA, LLys, DHLA i DHLLys) i modelowego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH). Pomiary aktywności antyoksydacyjnej związków wykonywałam na podstawie zaniku absorbancji roztworu rodnika DPPH, którą monitorowałam spektrofotometrycznie przy długości fali 520 nm w czasie 30 min, przy ograniczonym dostępie do światła. Miarą aktywności przeciwutleniającej jest wartość stężenia przeciwutleniacza powodująca 50% spadek początkowego stężenia rodnika DPPH (EC<sub>50</sub>). Dla każdego stężenia (wyrażonego jako liczba moli przeciwutleniacza/liczba moli DPPH) badanego związku chemicznego, obliczyłam zawartość pozostałego rodnika zgodnie z równaniem [74]:

$$\text{\%DPPH}_{\text{rem}} = \frac{A_{\text{t}=30}}{A_{\text{t}=0}} \cdot 100\%$$

gdzie:

%DPPH<sub>rem</sub> - procentowa zawartość pozostałego (niezredukowanego) rodnika DPPH, A<sub>t=0</sub> - wyjściowa wartość absorbancji roztworu rodnika DPPH, A<sub>t=30</sub> - wartość absorbancji po dodaniu przeciwutleniacza po ustalonym czasie reakcji. Uzyskane wyniki dla DHLA i DHLLys zamieściłam na **Rysunku 12**.



**Rysunek 12.** Zdolność wygaszania rodnika DPPH przez badane substancje w funkcji stosunku molowego (a) DHLA/DPPH i (b) DHLLys/DPPH [D4].

Na podstawie obliczonej procentowej zawartości pozostałego w układzie reakcyjnym rodnika DPPH dla każdego badanego związku chemicznego wyznaczyłam parametr EC<sub>50</sub>. Niższa wartość parametru EC<sub>50</sub> wskazuje na wyższą reaktywność danego przeciwutleniacza.

W oparciu o doniesienia literaturowe i przeprowadzone badania pilotażowe, zdolność zmiatania rodnika DPPH badanych związków chemicznych (LA, LLys, DHLA i DHLLys) oznaczałam w zakresie stężeń 2,5-60 µmol/L. Uzyskane wyniki wskazały, że LA i LLys nie wykazują zdolności wygaszania rodnika DPPH, nawet przy wyższych stężeniach (200-2000 µmol/L). Tymczasem, jak powszechnie wiadomo LA znany jest jako "uniwersalny przeciwutleniacz" i "antyutleniacz antyutleniaczy" [20,75]. Spełnia szereg kryteriów silnego antyoksydanta, a mianowicie wykazuje zdolność zmiatania wolnych rodników, chelatowania jonów metali, regenerowania przeciwutleniaczy wewnątrzkomórkowych, takich jak GSH, witamina E czy witamina C, a także koncentruje się w tkankach, komórkach i płynach ustrojowych. [20,31,69,76]. W przypadku LLys trudno jest niestety jednoznacznie stwierdzić, czy posiada ona właściwości antyoksydacyjne. Niemniej zaobserwowałam, że zredukowana forma LLys - DHLLys wykazuje aktywność przeciwrodnikowa (Rysunek 12). Wyższa zdolność wygaszania rodnika DPPH stwierdziłam jednak dla DHLA niż DHLLys, które swoje antyoksydacyjne właściwości zawdzięczają obecności dwóm wolnym grupom tiolowym w cząsteczce [77]. Wyznaczone wartości EC<sub>50</sub> dla DHLA i DHLLys wynosiły odpowiednio 0,076 µmola DHLA/µmol DPPH (EC<sub>50</sub>, 4,56 µmol/L) oraz 0,094 µmola DHLLys/µmol DPPH (5,64 µmol/L). Wyższą wartość EC<sub>50</sub>=0,39 dla zredukowanej formy LA wykazali Madawala i wsp. [75]. Parametr EC<sub>50</sub> jest właściwością charakterystyczną dla danego antyoksydanta tylko w określonych warunkach. Z tego względu duże rozbieżności między wartościami EC<sub>50</sub> dla danego związku opisane w literaturze wynikają z różnych warunków prowadzenia reakcji z rodnikiem DPPH.

# PODSUMOWANIE

Niewątpliwie nieustający postęp technologiczny jest źródłem poprawy jakości życia ludzi. Jednakże wraz z negatywnymi skutkami zanieczyszczeń środowiska naturalnego może także wpływać na wzrost występowania chorób cywilizacyjnych. LA posiada właściwości antyoksydacyjne i przyczynia się do neutralizowania RFT, chroniąc organizm przed stresem oksydacyjnym i spowodowanymi jego występowaniem chorobami cywilizacyjnymi. Antyoksydant ten jest stosowany na szeroką skalę w profilaktyce i leczeniu chorób, takich jak nowotwór, cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe, choroby autoimmunologiczne oraz choroby neurodegeneracyjne, których patogeneza jest ściśle związana z występowaniem stresu oksydacyjnego [35].

Od kilku lat naukowcy na całym świecie interesują się właściwościami LA oraz jego wpływem na organizm człowieka. Jednak rosnąca świadomość konsumentów na temat wpływu składników żywności na zdrowie wymusza wdrażanie na rynek farmaceutyczny także innych leków i suplementów diety, zawierających składniki prozdrowotne.

W ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej przedstawiono stan najnowszej wiedzy na temat prozdrowotnych właściwości LA ze szczególnym uwzględnieniem jego aktywności antyoksydacyjnej. Opracowano trzy nowe metody analityczne umożliwiające oznaczenie:

- całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu [D1],
- całkowitej zawartości LA i LLys w moczu [D2],
- całkowitej formy LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych [D4].

Opracowane metodyki poddano walidacji. Otrzymane wyniki badań opisane w pracach [D1,D2,D4] pozwoliły wyciągnąć następujące wnioski:

- Otrzymane granice oznaczalności i wykrywalności opracowanych metod umożliwiają oznaczenie śladowych ilości LLys i/lub LA w badanych próbkach biologicznych (osocze, mocz i tkanki zwierzęce).
- Opracowane procedury analityczne odznaczają się dużą czułością, precyzją i w pełni spełniają kryteria stawiane oznaczeniom ilościowym.
- Opracowane metody doskonale wpisują się w koncepcję zielonej chemii, poprzez ograniczenie stosowania toksycznych rozpuszczalników i generowanie niewielkiej ilości odpadów.
- 4. Inne zalety powyższych metod to: proste procedury przygotowania próbek, stosunkowo krótkie czasy analizy chromatograficznej, dzięki czemu możliwe jest monitorowanie i badanie większej liczby próbek, jak również zredukowanie ilości etapów

przygotowania próbek do niezbędnego minimum (np. jednoczesna redukcja i derywatyzacja), co w konsekwencji korzystnie wpływa na ograniczenie strat oznaczanych analitów.

- 5. Zastosowanie tańszej w eksploatacji aparatury stanowi doskonałą alternatywę dla bardziej skomplikowanych narzędzi badawczych (LC-MS, GC-MS, LC-MS/MS itp.), które są trudno dostępne dla wielu laboratoriów analitycznych czy klinicznych.
- 6. Stwierdzono możliwość wykorzystania opracowanych procedur analitycznych do prowadzenia rutynowych analiz, badań farmakokinetycznych oraz kontroli stosowanych suplementów LA [D1,D2], jak również do prowadzenia badań reakcji biochemicznych, badań żywieniowych oraz w diagnostyce niektórych rodzajów chorób [D4].

Badania skomplikowanych pod względem złożoności matrycy materiałów biologicznych, jakim są płyny ustrojowe, czy homogenaty tkanek zwierzęcych bardzo często wymuszają opracowanie i wdrożenie odpowiednich procedur ułatwiających ich późniejszą analizę. Bardzo ważnym aspektem staje się zatem zastosowanie odpowiednich warunków przetwarzania próbek biologicznych. W związku z powyższym, przedmiotem prezentowanej rozprawy doktorskiej stały się również dwie prace przeglądowe dotyczące zagadnień, istotnych z punktu widzenia chemii analitycznej. Szczegółowo omówione zostały dwie techniki, stosowane na szeroką skalę niemal w każdym laboratorium analitycznym w celu ułatwienia etapu przygotowania próbki:

- homogenizacja tkanek stałych lub półpłynnnych [D3],
- derywatyzacja chemiczna [D5].

W dobie dzisiejszej robotyzacji i automatyzacji zyskały one na znaczeniu i popularności, gdyż dają możliwość poprawy jakości pracy chemika analityka. Homogenizacja, dzięki współcześnie stosowanym homogenizatorom umożliwia rozdrabnianie kilku próbek równocześnie, skracając jednocześnie czas pracy. Derywatyzację chemiczną, dzięki powszechnie dostępnym odczynnikom derywatyzującym można łatwo zastosować, co zwiększa potencjał badawczy wielu metod. W przypadku chromatografii cieczowej derywatyzacja wpływa korzystnie na separację oznaczanych związków poprzez polepszenie kształtu sygnału chromatograficznego, rozdzielczości i selektywności oznaczeń.

Na potrzeby niniejszej pracy podjęto także próbę zaadoptowania metody oceny aktywności antyoksydacyjnej *in vitro* na podstawie zdolności wygaszania wolnych rodników z wykorzystaniem stabilnego wolnego rodnika DPPH do badania LLys, LA i ich

zredukowanych form - DHLLys i DHLA [D4]. Zależność między strukturą związków sulfhydrylowych a ich aktywnością przeciwutleniającą były przedmiotem wielu badań. Z opublikowanych dotychczas w literaturze danych wynika, że antyoksydacyjne działanie związków tiolowych zależy w dużej mierze od grupy -SH [75,77]. Wyniki badań uzyskane w niniejszej pracy potwierdziły wpływ grupy tiolowej na aktywność przeciwutleniającą zredukowanych form LA i LLys. Nie można jednak jednoznacznie ocenić zdolności przeciwutleniającej LLys metodą DPPH. Stąd wydaje się, że w przyszłości interesującym krokiem może być rozszerzenie badań o aktywność przeciwutleniającą LLys *in vivo*. Wstępne badania nad właściwościami przeciwutleniającymi LLys mogłyby utorować drogę nowej generacji farmaceutyków i profilaktyce chorób cywilizacyjnych. Oczekuje się, że badania te mogłyby również przynieść korzyści naukowcom pracującym z nowymi przeciwutleniaczami.

# BIBLIOGRAFIA

(z wyłączeniem prac będących przedmiotem rozprawy doktorskiej)

- [1] Jopkiewicz, S., Stres oksydacyjny Część I. Stres oksydacyjny jako czynnik rozwoju chorób cywilizacyjnych. *Med. Śr. Environ. Med.* 2018, 48–52.
- [2] Kitajewska, W., Szeląg, W., Kopański, Z., Maslyak, Z., Sklyarov, I., Choroby cywilizacyjne i ich prewencja 2014, 5.
- [3] Jopkiewicz, S., Stres oksydacyjny Część II. Profilaktyka powstawania uszkodzeń wolnorodnikowych. *Med. Śr. Environ. Med.* 2018, 53–59.
- [4] Jung, S., Smith-Warner, S., Willett, W., Wang, M., et al., Healthy Dietary Patterns and Oxidative Stress as Measured by Fluorescent Oxidation Products in Nurses' Health Study. *Nutrients* 2016, 8, 587.
- [5] Diamanti-Kandarakis, E., Papalou, O., Kandaraki, E.A., Kassi, G., Mechanisms in endocrinology: Nutrition as a mediator of oxidative stress in metabolic and reproductive disorders in women. *Eur. J. Endocrinol.* 2017, 176, 79–99.
- [6] Ahmed, R.G., Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development? *Med. J. Islam. World Acad. Sci.* 2005, 9.
- [7] Mostafa Abd El-Aal, H.A.H., in:, Catala A (Ed.), Lipid Peroxidation, InTech, 2012.
- [8] Slavin, J.L., Lloyd, B., Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Adv. Nutr.* 2012, 3, 506–516.
- [9] Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., et al., Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *Eur. J. Nutr.* 2012, 51, 637–663.
- [10] Aune, D., Giovannucci, E., Boffetta, P., Fadnes, L.T., et al., Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality—a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int. J. Epidemiol.* 2017, 46, 1029–1056.
- [11] Reiss, R., Johnston, J., Tucker, K., DeSesso, J.M., Keen, C.L., Estimation of cancer risks and benefits associated with a potential increased consumption of fruits and vegetables. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 4421–4427.
- [12] Oyebode, O., Gordon-Dseagu, V., Walker, A., Mindell, J.S., Fruit and vegetable consumption and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data. J. Epidemiol. Community Health 2014, 68, 856–862.
- [13] Pereira, P.M. de C.C., Vicente, A.F. dos R.B., Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Sci.* 2013, 93, 586–592.

- [14] Kulczyński, B., Sidor, A., Gramza-Michałowska, A., Characteristics of Selected Antioxidative and Bioactive Compounds in Meat and Animal Origin Products. *Antioxidants* 2019, 8, 335.
- [15] Prasow, M., Domaradzki, P., Litwińczuk, A., Kowalczyk, M., Bioactive compounds in meat and their importance in human nutrition. *Med. Ogólna Nauki O Zdrowiu* 2019, 25, 170–180.
- [16] Ghosh, S., Pahari, S., Roy, T., An updated overview on food supplement. *Asian J. Res. Chem.* 2018, 11, 691.
- [17] Virmani, A., Pinto, L., Binienda, Z., Ali, S., Food, Nutrigenomics, and Neurodegeneration—Neuroprotection by What You Eat! *Mol. Neurobiol.* 2013, 48, 353– 362.
- [18] Molz, P., Schröder, N., Potential Therapeutic Effects of Lipoic Acid on Memory Deficits Related to Aging and Neurodegeneration. *Front. Pharmacol.* 2017, 8, 849.
- [19] Dörsam, B., Fahrer, J., The disulfide compound α-lipoic acid and its derivatives: A novel class of anticancer agents targeting mitochondria. *Cancer Lett.* 2016, 371, 12–19.
- [20] Gorąca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., et al., Lipoic acid biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol. Rep.* 2011, 63, 849–858.
- [21] Salehi, B., Berkay Yılmaz, Y., Antika, G., Boyunegmez Tumer, T., et al., Insights on the Use of α-Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules* 2019, 9, 356.
- [22] Tibullo, D., Li Volti, G., Giallongo, C., Grasso, S., et al., Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflamm. Res.* 2017, 66, 947–959.
- [23] Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., et al., Direct and indirect antioxidant properties of α-lipoic acid and therapeutic potential. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57, 114– 125.
- [24] Abdali, D., Samson, S.E., Grover, A.K., How Effective Are Antioxidant Supplements in Obesity and Diabetes? *Med. Princ. Pract.* 2015, 24, 201–215.
- [25] Namazi, N., Larijani, B., Azadbakht, L., Alpha-lipoic acid supplement in obesity treatment: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Clin. Nutr.* 2018, 37, 419–428.
- [26] Uskokovic, A., Dinic, S., Grdovic, N., Arambasic-Jovanovic, J., et al., Beneficial effects of α-lipoic acid in diabetes- and drug- induced liver injury. *Arch. Biol. Sci.* 2018, 70, 621– 628.

- [27] Skibska, B., Goraca, A., The Protective Effect of Lipoic Acid on Selected Cardiovascular Diseases Caused by Age-Related Oxidative Stress. Oxid. Med. Cell. Longev. 2015, 2015, 1–11.
- [28] Rochette, L., Ghibu, S., Muresan, A., Vergely, C., Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2015, 93, 1021–1027.
- [29] Seifar, F., Khalili, M., Khaledyan, H., Amiri Moghadam, S., et al., α-Lipoic acid, functional fatty acid, as a novel therapeutic alternative for central nervous system diseases: A review. *Nutr. Neurosci.* 2019, 22, 306–316.
- [30] Wołyniec, E., Karpińska, J., Łosiewska, S., Turkowicz, M., et al., Determination of lipoic acid by flow-injection and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Talanta* 2012, 96, 223–229.
- [31] Packer, L., Kraemer, K., Rimbach, G., Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 2001, 17, 888–895.
- [32] Shay, K.P., Moreau, R.F., Smith, E.J., Smith, A.R., Hagen, T.M., Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 2009, 1790, 1149–1160.
- [33] Michikoshi, H., Nakamura, T., Sakai, K., Suzuki, Y., et al., α-Lipoic acid-induced inhibition of proliferation and met phosphorylation in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 2013, 335, 472–478.
- [34] Satoh, S., Shindoh, M., Min, J.Z., Toyo'oka, T., et al., Selective and sensitive determination of lipoyllysine (protein-bound α-lipoic acid) in biological specimens by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 2008, 618, 210–217.
- [35] Kataoka, H., Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App. 1998, 717, 247–262.
- [36] Peng, J., Tang, F., Zhou, R., Xie, X., et al., New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis. *Acta Pharm. Sin. B* 2016, 6, 540–551.
- [37] Borowczyk, K., Krawczyk, M., Kubalczyk, P., Chwatko, G., Determination of lipoic acid in biological samples. *Bioanalysis* 2015, 7, 1785–1798.
- [38] Xue, Y.-J., Gao, H., Ji, Q.C., Lam, Z., et al., Bioanalysis of drug in tissue: current status and challenges. *Bioanalysis* 2012, 4, 2637–2653.

- [39] Swatiditat, A., Tsen, C. C., Determining thioctic acid (lipoic acid) in wheat flours and germs by thin layer chromatography. *Cereal Chem.* 1973, 50, 372–378.
- [40] White, R.H., A gas chromatographic method for the analysis of lipoic acid in biological samples. *Anal. Biochem.* 1981, 110, 89–92.
- [41] White, R.H., Bleile, D.M., Reed, L.J., Lipoic acid content of dihydrolipoyl transacylases determined by isotope dilution analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 94, 78–84.
- [42] Mattulat, A., Baltes, W., Determination of lipoic acid in meat of commercial quality. Z. *Für Lebensm.-Unters. -Forsch.* 1992, 194, 326–329.
- [43] Pratt, K.J., Carles, C., Carne, T.J., Danson, M.J., Stevenson, K.J., Detection of bacterial lipoic acid. A modified gas-chromatographic-mass-spectrometric procedure. *Biochem. J.* 1989, 258, 749–754.
- [44] Kochi, H., Kikuchi, G., Mechanism of reversible glycine cleavage reaction in Arthrobacter globiformis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1976, 173, 71–81.
- [45] Shih, J.C.H., Steinsberger, S.C., Determination of lipoic acid in chick livers and chicken eggs during incubation. *Anal. Biochem.* 1981, 116, 65–68.
- [46] Kataoka, H., Hirabayashi, N., Makita, M., Analysis of lipoic acid in biological samples by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 1993, 615, 197–202.
- [47] Hayakawa, K., Oizumi, J., Determination of lipoyllysine derived from enzymes by liquid chromatography. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App. 1989, 490, 33–41.
- [48] Lodge, J., Youn, H.-D., Handelman, G., Konishi, T., et al., Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *J. Appl. Nutr.* 1997, 49, 3–11.
- [49] Kawakami, A., Kubota, K., Yamada, N., Tagami, U., et al., Identification and characterization of oxidized human serum albumin.: A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. *FEBS J.* 2006, 273, 3346–3357.
- [50] Atukeren, P., Aydin, S., Uslu, E., Gumustas, Mk., Cakatay, U., Redox Homeostasis of Albumin in Relation to Alpha-Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. Oxid. Med. Cell. Longev. 2010, 3, 206–213.
- [51] Burrell, M.M., editor., *Enzymes of molecular biology*, Humana Press, Totowa, N.J 1993.

- [52] Furmaniak, P., Wyszczelska-Rokiel, M., Kubalczyk, P., Głowacki, R., Application of quinolinium and pyridinium salts for determination of selected sulfur compounds in biological samples. *Wiad. Chem.* 2014, 68, 211–232.
- [53] Bald, E., Sypniewski, S., Drzewoski, J., Stępień, M., Application of 2-halopyridinium salts as ultraviolet derivatization reagents and solid-phase extraction for determination of captopril in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 1996, 681, 283–289.
- [54] Chwatko, G., Kubalczyk, P., Bald, E., Determination of Lipoic Acid in the form of 2-Spyridinium Derivative by High-performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Curr. Anal. Chem.* 2014, 10, 320–325.
- [55] Shihabi, Z.K., Analyte Recovery from Deproteinized Serum for HPLC. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2008, 31, 3159–3168.
- [56] Chen, J., Jiang, W., Cai, J., Tao, W., et al., Quantification of lipoic acid in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2005, 824, 249–257.
- [57] Mignini, F., Streccioni, V., Tomassoni, D., Traini, E., Amenta, F., Comparative Crossover, Randomized, Open-Label Bioequivalence Study on the Bioequivalence of Two Formulations of Thioctic Acid in Healthy Volunteers. *Clin. Exp. Hypertens.* 2007, 29, 575– 586.
- [58] Khan, A., Iqbal, Z., Watson, D.G., Khan, A., et al., Simultaneous determination of lipoic acid (LA) and dihydrolipoic acid (DHLA) in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 2011, 879, 1725–1731.
- [59] Yadav, V., Marracci, G.H., Munar, M.Y., Cherala, G., et al., Pharmacokinetic study of lipoic acid in multiple sclerosis: comparing mice and human pharmacokinetic parameters. *Mult. Scler. J.* 2010, 16, 387–397.
- [60] Chng, H.T., New, L.S., Neo, A.H., Goh, C.W., et al., A sensitive LC/MS/MS bioanalysis assay of orally administered lipoic acid in rat blood and brain tissue. J. Pharm. Biomed. Anal. 2010, 51, 754–757.
- [61] Khan, M.I., Iqbal, Z., Ahmad, L., Shah, Y., et al., Simultaneous determination of the endogenous free α-lipoic acid and dihydrolipoic acid in human plasma and erythrocytes by RP-HPLC coupled with electrochemical detector. *Chromatographia* 2011, 73, 929–939.

- [62] Marin, M., Lete, C., Manolescu, B.N., Lupu, S., Electrochemical determination of αlipoic acid in human serum at platinum electrode. J. Electroanal. Chem. 2014, 729, 128– 134.
- [63] https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0012996, [dostęp 02.11.2020].
- [64] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2018, [dostęp 12.11.2020].
- [65] Ravichandran, V., Shalini, S., Sundram, K., Harish, R., Validation of analytical methods
  strategies & importance. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2010, 2, 18–22.
- [66] Li, B.J., Hao, X.Y., Ren, G.H., Gong, Y., Effect of lipoic acid combined with paclitaxel on breast cancer cells. *Genet. Mol. Res.* 2015, 14, 17934–17940.
- [67] Jeon, M.J., Kim, W.G., Lim, S., Choi, H.-J., et al., Alpha lipoic acid inhibits proliferation and epithelial mesenchymal transition of thyroid cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016, 419, 113–123.
- [68] Damnjanovic, I., Kocic, G., Najman, S., Stojanovic, S., et al., Chemopreventive potential of alpha lipoic acid in the treatment of colon and cervix cancer cell lines. *Bratisl. Med. J.* 2014, 115, 611–616.
- [69] Biewenga, G.Ph., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 1997, 29, 315–331.
- [70] Motafakkerazad, R., Wang, M., Wada, N., Matsugo, S., Konishi, T., Simple HPLC Evaluation of Lipoamidase Activity in Tissue Using a Newly Synthesized Fluorescent Substrate, Dansyl-α-lipoyllysine. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 2011, 57, 377–382.
- [71] Akiba, S., Matsugo, S., Packer, L., Konishi, T., Assay of Protein-Bound Lipoic Acid in Tissues by a New Enzymatic Method. *Anal. Biochem.* 1998, 258, 299–304.
- [72] Cybul, M., Nowak, R., Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych 2008, 54, 68–78.
- [73] Wilczyńska, A., Metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich 2009, 3, 870–874.
- [74] Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K., Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem.* 2012, 130, 1036–1043.
- [75] Madawala, S.R.P., Andersson, R.E., Jastrebova, J.A., Almeida, M., Dutta, P.C., Novel Conjugates of 1,3-Diacylglycerol and Lipoic Acid: Synthesis, DPPH Assay, and RP-LC-MS-APCI Analysis. J. Lipids 2011, 2011, 1–10.

- [76] Navari-Izzo, F., Quartacci, M.F., Sgherri, C., Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem.* 2002, 40, 463–470.
- [77] Lim, S., Choi, A.-H., Kwon, M., Joung, E.-J., et al., Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from Sargassum serratifolium and its major antioxidant components. *Food Chem.* 2019, 278, 178–184.

# **DOROBEK NAUKOWY**

# Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

- [D1] Chwatko G., Krawczyk M., Iciek M., Kamińska A., Bilska-Wilkosz A., Marcykiewicz B., Głowacki R., Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Arab. J. Chem.* 2019, 12, 4878-4886 (IF<sub>2019</sub> = 4,762; punkty MNiSW = 70).
- [D2] Kamińska A., Głowacka I.E., Pasternak B., Głowacki R., Chwatko G., The first method for determination of lipoyllysine in human urine after oral lipoic acid supplementation. *Bioanalysis* 2019, 11, 1359-1373 (IF<sub>2019</sub> = 2,371; punkty MNiSW = 70).
- [D3] Krawczyk M. J., Kamińska A., Chwatko G., Homogenizacja tkanek nieodzowny etap przygotowania próbki stałej do analizy. *Analityka: nauka i praktyka* 2017, 2, 42-47 (punkty MNiSW = 4).
- [D4] Kamińska A., Chwatko G., Estimation of lipoyllysine content in meat and its antioxidative capacity. J. Agric. Food Chem. 2020, 68, 10992-10999 (IF2019 = 4,192; punkty MNiSW = 140).
- [D5] Kamińska A., Krawczyk M. J., Chwatko G., Derywatyzacja chemiczna w wysokosprawnej chromatografii cieczowej. *Wiad. Chem.* 2016, 70, 771-802 (punkty MNiSW = 7).

Sumaryczna wartość współczynnika **Impact Factor** publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi **11,325** (**291** punktów **MNiSW**).

# <u>Pozostałe publikacje</u>

- Kamińska A., Olejarz P., Borowczyk K., Głowacki R., Chwatko R., Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC. *J. Sep. Sci.* 2018, 41, 3241-3249 (IF<sub>2018</sub> = 2,516; punkty MNiSW = 30).
- Borowczyk K., Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., Chwatko G., Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2-17 (IF<sub>2019</sub> = 4,556; punkty MNiSW = 140).
- 3. Górny M., Wnuk A., Kamińska A., Kamińska K., Chwatko G, Bilska-Wilkosz A., Iciek M., Kajta M., Rogóż Z., Lorenc-Koci E., Glutathione deficiency and alterations in the sulfur amino acid homeostasis during early postnatal development as potential triggering factors for schizophrenia-like behavior in adult rats. *Molecules* 2019, 24, 4253 (IF<sub>2019</sub> = 3,267; punkty MNiSW = 100).
- 4. Górny, M., Bilska-Wilkosz, A., Iciek, M., Hereta, M., Kamińska, K., Kamińska, A., Chwatko, G., Rogóż, Z., Lorenc-Koci, E., Alterations in the antioxidant enzyme activities in the neurodevelopmental rat model of schizophrenia induced by glutathione deficiency during early postnatal life. *Antioxidants* 2020, 9, 538 (IF<sub>2019</sub> = 5,014; punkty MNiSW = 100).

Sumaryczna wartość współczynnika IF dorobku publikacyjnego łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi 26, 678 (661 punktów MNiSW).

# Udział w konferencjach naukowych

# Międzynarodowe konferencje naukowe

- Borowczyk K., Krawczyk M., Kamińska A., Kubalczyk P., Chwatko G., Application of liquid chromatography with UV detection for determination of different forms of lipoic acid in human plasma, 18th International Symposium on advances in extraction technologies and 22nd International Symposium on Separation Science, Toruń, 3-6 lipiec 2016 (poster)
- Kamińska A., Olejarz P., Borowczyk K., Chwatko G., *The chemical derivatization in high performance liquid chromatography*, XI Copernican International Young Scientists Conference, Toruń, 28-30 czerwiec 2017 (referat)
- Kamińska A., Zakrzewski J., Chwatko G., *High-performance liquid chromatography* method with UV-Vis detection for determination of lipoyllysine, 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques and 11th Polish Conference on Chromatography, Sopot/Gdańsk, Polska, 10-13 wrzesień 2017 (poster)
- 4. Chwatko G., Kamińska A., Olejarz P., Krawczyk-Walach M. J., Kubalczyk P., Borowczyk K., Determination of thiols in brain homogenates by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques and 11th Polish Conference on Chromatography, Sopot/Gdańsk, 10-13 wrzesień 2017 (poster)
- 5. Olejarz P., Głowacki R., Borowczyk K., Chwatko G., Kamińska A., Kubalczyk P., Oncolumn derivatization with o-phthaldialdehyde for fast determination of N-acetylcysteine and glutathione in brain tissues, 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques and 11th Polish Conference on Chromatography, Sopot/Gdańsk, 10-13 wrzesień 2017 (poster)
- 6. Lorenc-Koci E., Górny M., Kamińska A., Wnuk A., Kamińska K., Chwatko G., Kajta M., Rogóż Z., Glutathione Deficiency and Alterations in the Levels of Sulfur-Containing Amino Acids in Rat Tissues During Early Postnatal Life as Markers of Schizophrenia-like Behavior

*in Adulthood*, BIT's 9th Annual World Congress of Neurotalk-2018, Bangkok, Thailand, 16-18 maj 2018 (poster)

- Kamińska A., Głowacka I. E., Chwatko G., Determination of lipoic acid and lipoyllysine contents in human urine after oral supplementation of LA, The 41st Symposium Chromatographic Methods of Investigating Organic Compounds, Szczyrk, 19-22 czerwca 2018 (poster)
- Kamińska A., Olejarz P., Borowczyk K., Chwatko G., *Determination of lipoic acid and lipoyllysine in plant tissues*, New trends on Sensing-Monitoring-Telediagnosis for Life Sciences, Brasov, Romania, 30 sierpnia-1 września 2018 (poster)
- 9. Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., Borowczyk K., Chwatko G., A novel, fast and simple method based on on-column derivatization for the determination of lipoic acid in urine samples, New trends on Sensing-Monitoring-Telediagnosis for Life Sciences, Brasov, Romania, 30 sierpnia-1 września 2018 (poster)
- Górny M., Kamińska A., Kamińska K., Chwatko G., Bilska-Wilkosz A., Rogóż Z., Lorenc-Koci E., Glutathione deficiency and alterations in the cysteine content during early postnatal life as potential factors initiating development of schizophrenia-like symptoms in adult rats, 44th FEBS Congress, Kraków, 6 -11 lipca 2019 (poster)
- Kamińska A., Chwatko G., Chromatographic Study of Lipoyllysine Taking into Consideration Its Antioxidant Properties, 25th International Symposium on Separation Sciences, Łódź, 15-18 września 2019 (poster)
- 12. Chwatko G., Kamińska A., *Determination of lipoyllysine and lipoic acid in biological samples*, QUO VADIS Life Sciences, Opole, 23-27 June 2021 (poster)

# Krajowe konferencje naukowe

- Kamińska A., Krawczyk M.J., Chwatko G., Oznaczanie siarki kwasowo labilnej techniką HPLC, VI Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź, 11 czerwiec 2015 (poster)
- Kamińska A., Krawczyk M.J., Głowacki R., Chwatko G., Oznaczanie siarki kwasowo labilnej w warzywach i owocach, IV ogólnopolska konferencja naukowa pt. Pomiędzy naukami – zjazd fizyków i chemików, Chorzów, 18 wrzesień 2015 (referat)
- Obudzińska K., Kamińska A., Krawczyk M.J., Borowczyk K., Chwatko G., Oznaczanie kwasu liponowego w tkankach roślinnych techniką HPLC, 7 Konferencja Chromatograficzna – Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, 11-13 maja 2016 (poster)
- Kamińska A., Krawczyk M.J., Chwatko G., Kwas liponowy i jego formy w organizmie człowieka – wyzwanie dla analityka, V ogólnopolska konferencja naukowa pt. Pomiędzy naukami – zjazd fizyków i chemików, Chorzów, 16 września 2016 (poster)
- 5. Krawczyk M.J., Kamińska A., Chwatko G., Znaczenie warzyw i owoców w codziennej diecie oraz możliwość ich wykorzystania jako materiału badawczego w analizie, V ogólnopolska konferencja naukowa pt. Pomiędzy naukami – zjazd fizyków i chemików, Chorzów, 16 września 2016 (poster)
- Chwatko G., Kamińska A., Krawczyk M., Derywatyzacja chemiczna wady i zalety, X Jubileuszowa Konferencja "Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej", Warszawa, 20-21 października 2016 (poster)
- 7. Kamińska A., Krawczyk M. J., Mendygrał A., Chwatko G., Oznaczanie różnych form siarki w moczu osób z kontrolowaną dietą bogatą w warzywa krzyżowe, V Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 11-12 maja 2017 (poster)

- Kamińska A., Borowczyk K., Olejarz P., Chwatko G., Wykorzystanie derywatyzacji w kolumnie do oznaczania metioniny i homocysteiny w homogenatach mózgu, VI Ogólnopolska Konferencja Pomiędzy Naukami, Chorzów, 15 wrzesień 2017 (referat)
- Kamińska A., Chwatko G., Kwas liponowy i liponylolizyna jako obiekty analityczne oznaczane techniką chromatografii cieczowej, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Lublin, 1-5 lipca 2018 (referat)
- Chwatko G., Kamińska A., Olejarz P., Borowczyk K., *Rola przygotowania próbki* biologicznej w kontekście analizy chromatograficznej, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Lublin, 1-5 lipca 2018 (referat)
- 11. Kamińska A., Olejarz P., Borowczyk K., Chwatko G., Oznaczanie wybranych związków siarczki w produktach spożywczych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej, XXIII Konferencja Nowoczesne metody instrumentalne w analizie śladowej, 10-11 grudnia 2018, Kraków (poster)
- Kamińska A., Chwatko G., Jednoczesne oznaczanie kwasu liponowego i liponylolizyny w mięsie za pomocą HPLC-DAD, VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 9-10 maja 2019 (referat)

# Przyznane granty, stypendia i wyróżnienia

- Projekt badawczy nr B1611100001287.02 pt. "Chromatograficzne badania materiału biologicznego na zawartość wybranych związków siarki" przyznany z dotacji celowej Uniwersytetu Łódzkiego dla młodych naukowców (charakter udziału w projekcie: wykonawca; okres trwania projektu: 05.2016-12.2016)
- 2. Grant nr 2016/23/N/NZ9/00071 pt. "Badanie zdolności antyoksydacyjnej liponylolizyny oraz wpływu przetwórstwa spożywczego na poziom kwasu liponowego i liponylolizyny w produktach żywnościowych" sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 12 (charakter udziału w projekcie: kierownik; okres trwania projektu: 2017-2021)

- Stypendium zagraniczne w ramach CEEPUS (CIII-RO-1111-02-1718-M-114829) Food Safety for Healthy Living realizowane w "Transilvania" University of Brasov, Faculty of Medicine w Rumunii (24.08.2018)
- Nagroda zespołowa Dziekana Wydziału Chemii za najlepszą publikację oryginalną w roku 2019 (Borowczyk K., Olejarz P., Kamińska A., Głowacki R., Chwatko G., Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2-17)
- 5. Stypendium doktoranckie w roku akademickim 2015/2016, 2016/2017, 2017/2018, 2018/2019, 2020/2021
- 6. Stypendium dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2017/2018
- Stypendium doktoranckie z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w roku akademickim 2019/2020, 2020/2021
- 8. Stypendium Rektora Uniwersytetu Łódzkiego dla najlepszych studentów w roku akademickim 2011/2012
- 9. Wyróżnienie w I edycji Konkursu chemicznego Akademii Ciekawej Chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego (02.06.2010)

# PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ



### **ORIGINAL ARTICLE**

ultraviolet detection

King Saud University

## Arabian Journal of Chemistry

www.ksu.edu.sa www.sciencedirect.com



Determination of lipoic acid in human plasma by

high-performance liquid chromatography with

# CrossMark

# Grażyna Chwatko<sup>a,\*</sup>, Marta Krawczyk<sup>a</sup>, Małgorzata Iciek<sup>b</sup>, Adrianna Kamińska<sup>a</sup>, Anna Bilska-Wilkosz<sup>b</sup>, Bernadeta Marcykiewicz<sup>c</sup>, Rafał Głowacki<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Łódź, Łódź, Poland

<sup>b</sup> Chair of Medical Biochemistry, Jagiellonian University, Medical College, Kraków, Poland

<sup>c</sup> Fressenius Nephrocare, Rydygier Hospital, Kraków, Poland

Received 26 May 2016; accepted 11 October 2016 Available online 20 October 2016

#### KEYWORDS

Derivatization; Determination; HPLC; Lipoic acid; Thiol; Plasma **Abstract** This paper describes the development and validation of an HPLC method for the determination of protein bound and total lipoic acid in human plasma. The essential steps in the total lipoic acid assay include reduction of disulfide bridge with tris(2-carboxyethyl)phosphine, derivatization via thiol group with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide and HPLC analysis of S-pyridinium derivative. Protein-bound lipoic acid is first separated from free lipoic acid with the use of liquid extraction, converted to its reduced counterpart then processed as total lipoic acid. The method is reproducible, precise and accurate. The inter- and intraday related standard deviation varied from 1.5% to 11.5% and from 1.8% to 19.6%, respectively, while recovery is in the range of 80.0–106.0% and 80.4–110.8%, respectively. The mean concentration of total lipoic acid in healthy donors after supplementation with 600 mg and 1200 mg was 0.67  $\pm$  0.40 µmol L<sup>-1</sup> (137.6  $\pm$  82.1 µg L<sup>-1</sup>) and 1.57  $\pm$  0.34 µmol L<sup>-1</sup> (323.34  $\pm$  70.07 µg L<sup>-1</sup>), respectively. We can be a standard deviation with 600 mg and 1200 mg was 0.67  $\pm$  0.40 µmol L<sup>-1</sup> (137.6  $\pm$  82.1 µg L<sup>-1</sup>) and 1.57  $\pm$  0.34 µmol L<sup>-1</sup> (323.34  $\pm$  70.07 µg L<sup>-1</sup>), respectively.

© 2016 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

#### 1. Introduction

\* Corresponding author at: University of Lodz, 163 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland. Fax: +48 426355832.

E-mail address: gchwatko@uni.lodz.pl (G. Chwatko). Peer review under responsibility of King Saud University.



1,2-Dithiolane-3-pentanoic acid ( $C_8H_{14}O_2S_2$ ), commonly known as lipoic acid (LA), is a direct and an indirect antioxidant used both in the prevention and treatment of diseases related to oxidative stress. During the dynamic transformations taking place in living organisms, LA is metabolized to some catabolites e.g. dihydrolipoic acid (DHLA), lipoamide, methyl lipoate and other (Kataoka, 1998). Moreover, it has been proven that LA forms mixed disulfides not only with GSH, but also with the cysteinyl sulfhydryl in peptides (Ishii et al., 2010). To the best of our knowledge humans are supplemented by LA but not by DHLA. LA is administered for the treat-

#### http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.10.006

1878-5352 © 2016 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

ment of various diseases, such as cardiovascular, diabetes, neurodegenerative and liver disorders (alcohol-induced damage, heavy metal intoxication and mushroom poisoning) (Bilska and Włodek, 2005; Bustamante et al., 1998; Goraca et al., 2011; Rochette et al., 2013). Furthermore, LA is used as a nutritional supplement in many countries. The use of dietary supplements without proper control raises controversy as they are not drugs, and so do not apply to the rules of drug control. To clarify the function of LA in biochemical and clinical practice, its identification and determination especially in plasma and urine is essential (Borowczyk et al., 2015). However, biological samples contain a large number of individual compounds, what leads to difficulties in determination of the analytes. Therefore, reliable analysis of these samples is a fundamental challenge for researchers. In an ideal case, no sample preparation would be necessary for the proper analysis of a sample, as every manipulation can lead to loss of analyte and hence loss of accuracy. Plasma is recognized as the most commonly analyzed biological fluid. In human plasma, albumin (HSA) is the most abundant protein, that exhibits a set of quite diverse bio-functions, such as: regulation of plasma osmotic pressure, the source of amino acids during starvation time, acting as an antioxidant, as well as binding and transport of endogenous and exogenous compounds (Kawakami et al., 2006). HSA exists in both reduced and oxidized forms. Reduced form of HSA contains free thiol group at Cys<sup>34</sup>, which is able to form mixed disulfides with low-molecular-mass thiols. Thiols bounding to HSA via disulfide bond are reversible; thus, HSA can act as specific reservoir of plasma thiols (Oettl and Stauber, 2007). Since DHLA possesses thiol groups it can be also efficiently bounded to HSA. For this reason we decided to elaborate the procedure enabling determination of both free and protein bounded LA (ProtS-LA).

High separation capacity of the HPLC makes it the preferred technique for analysis of biological samples. Several HPLC methods which exploit fluorescence (Haj-Yehia et al., 2000; Niebch et al., 1997; Satoh et al., 2007; Witt and Rüstow, 1998), electrochemical (Khan et al., 2011a, 2010; Khan et al., 2011b; Teichert and Preiss, 2002, 1995) and mass spectrometry (Chen et al., 2005; Chng et al., 2010; Ishii et al., 2010; Montero et al., 2012; Trivedi et al., 2004) detection are available for quantification of LA and DHLA in plasma. All mentioned above detection modes exhibit some advantages and have some limitations. Mass spectrometry detector is considered as an universal, highly sensitive and provides additional information concerning the structure of analytes. On the other hand, high purchase and maintenance costs as well as the necessity of handling by highly qualified staff results in low popularity of this kind of detection in clinical laboratories. Moreover, for these reasons renewed interest in the classical HPLC with fluorescence or UV detection as a tool for biological thiols quantification is observed. Fluorescence detectors are well known for their high sensitivity and selectivity. Nevertheless, LA does not exhibit a natural fluorescence; thus, for signal enhancement a derivatization reaction is usually employed. Electrochemical detectors enable direct LA determination but suffer from troublesome service of detection. UV detector is known for its stability, universality and low demand in terms of maintenance. Since molar absorptivity coefficient of LA appears to be low, the derivatization reaction is needed when UV detection is used. To the best of our knowledge, only one paper offers HPLC-UV method for LA determination in plasma (Ezhilarasi et al., 2014). In this report, we describe our efforts aimed at the elaboration of new procedures for the determination of total and protein bounded in plasma by HPLC with ultraviolet detection.

#### 2. Materials and methods

#### 2.1. Chemicals and reagents

1-Benzyl-2-chloropyridinium bromide (BCPB), a derivatization reagent, was synthesized in our laboratory as described earlier (Bald et al., 1996). Chloroform, hydrochloric acid, perchloric acid (PCA), sodium hydroxide and tris(hydroxymethyl) aminomethane (TRIS) were purchased from J.T. Baker (Deventer, the Netherlands). Acetic acid was purchased from Chempur (Piekary Ślaskie, Poland). HPLC-grade acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH) were obtained from Labscan (Dublin, Ireland). Lipoic acid (LA), dihydrolipoic acid (DHLA), human serum albumin (HSA), 1-octanol and tris (2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Stock standard solutions were prepared by dissolving an appropriate amount of LA (final concentration 0.1 mol  $L^{-1}$ ) in 0.2 mol  $L^{-1}$  NaOH, BCPB (0.1 mol  $L^{-1}$ ) and HSA (50 g  $L^{-1}$ ) in water, and TCEP  $(0.25 \text{ mol } \text{L}^{-1})$  in TRIS buffer (pH 9). Stock solutions of LA and BCPB were kept at 4 °C for several days without a noticeable change of content. TCEP solution was prepared daily. The working solutions were prepared by dilution with water as needed.

#### 2.2. Sample collection

Blood samples were donated by 17 apparently healthy, ethnically homogenous volunteers dosed with commercially available LA capsules (600 or 1200 mg of LA) for 30 days. During the study, no additional medications were allowed except LA. Blood (2 mL) was drawn, with a tourniquet applied, into a tube containing EDTA in the morning 1 day before the first LA dose and 1 day after last LA dose. Blood was centrifuged under standard conditions (10 min, 1000 g, within < 20 min after collection) and plasma was used for the determination of LA. Informed consent was obtained from all volunteers, and this study was approved by the Bioethics Committee of Regional Chamber of Physicians in Krakow (127/KBL/OIL) and University of Łódź (22/KBBN-UŁ/ II/2015). Plasma samples were stored at -78 °C until analysis. On the day of analysis, samples were thawed and processed as described below.

#### 2.3. Preparation of Albumin-Cys<sup>34</sup>-S-LA

HSA (50 g L<sup>-1</sup>) dissolved in 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer pH 7.4 was converted to albumin-Cys<sup>34</sup>-S-LA (HSA-LA) by incubation with 2-fold molar excess of DHLA or LA at 36.6 °C for 24 h. Excess LA was removed from HSA-LA by a quintuple extraction with chloroform as described in Section 2.5.2.

#### 2.4. Separation of protein and LA

Portions of 50  $\mu$ L of water or 50 g L<sup>-1</sup> HSA were each placed in eppendorf tube and spiked with 10  $\mu$ L of standard solutions with the increasing amount of LA to provide a concentration in the range 0.1–20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. Next, the mixtures were acidified with 7.5  $\mu$ L of 3 mol L<sup>-1</sup> PCA, vortex-mixed and centrifuged at 12,000g for 5 min. The supernatant was transferred to new tubes and alkalized to pH 7 by the use of 2.5 mol L<sup>-1</sup> NaOH, 25  $\mu$ L of 0.5 mol L<sup>-1</sup> TRIS buffer (pH 9) and 5  $\mu$ L of 0.25 mol L<sup>-1</sup> TCEP were added and vortexmixed. After 15 min, 10  $\mu$ L of 0.1 mol L<sup>-1</sup> BCPB was added and the mixture was vigorously shaken by hand for 10 s. Next, the sample was kept at room temperature for 15 min and was acidified with 15  $\mu$ L of 3 mol L<sup>-1</sup> PCA. The mixture was then transferred to an autosampler vial and injected (5  $\mu$ L) into the HPLC system.

A 50  $\mu$ L of water or 50 g L<sup>-1</sup> HSA was spiked with standard solution of LA (final concentration 10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>). Next, 25  $\mu$ L of 0.5 mol L<sup>-1</sup> TRIS buffer (pH 9) and 5  $\mu$ L of 0.25 mol L<sup>-1</sup> TCEP were added, vortex-mixed and allowed to stand for 15 min at room temperature. Next, 10  $\mu$ L of 0.1 mol L<sup>-1</sup> BCPB was added, vigorously mixed, held on 15 min and acidified with 15  $\mu$ L of 3 mol L<sup>-1</sup> PCA. At the end, different volume of MeCN (0–90  $\mu$ L) or MeOH (0– 80  $\mu$ L) were added, vortex-mixed and put aside for 15 min, followed by centrifugation (5 min, 12,000g). Supernatant was transferred to an autosampler vial and injected (5  $\mu$ L) into the HPLC system.

#### 2.5. Recommended analytical procedure

#### 2.5.1. Determination of total LA

Plasma samples (50  $\mu$ L) were mixed with 25  $\mu$ L of 0.5 mol L<sup>-1</sup> TRIS buffer (pH 9) and 5  $\mu$ L of 0.25 mol L<sup>-1</sup> TCEP. After 15 min of reduction, 10  $\mu$ L of 0.1 mol L<sup>-1</sup> BCPB was added, then sample was vortex-mixed and kept at room temperature for 15 min (derivatization reaction). Next, to attain a separation of LA derivative from protein, 15  $\mu$ L of 3 mol L<sup>-1</sup> PCA and 70  $\mu$ L of MeCN were added, vortex mixed and put aside for 15 min, followed by centrifugation (5 min, 12,000g). Supernatant was transferred to an autosampler vial and injected (5  $\mu$ L) into the HPLC system.

#### 2.5.2. Determination of protein bound LA

Plasma samples (50  $\mu$ L) were treated with 5  $\mu$ L of 3 mol L<sup>-1</sup> PCA and 100  $\mu$ L of chloroform and vigorously vortex-mixed for 10 min. After extraction, the mixture was centrifuged (5 min, 12,000g) and organic as well as water layers was decanted. The proteins were resuspended with 50  $\mu$ L of 0.5 mol L<sup>-1</sup> TRIS buffer (pH 9) and processed according to the procedure described in Section 2.5.1.

#### 2.6. Chromatographic analysis

The analyses were performed using a 1220 Infinity LC Agilent system consisted of a binary pump integrated with degasser, autosampler, column oven and diode-array detector. The whole HPLC system was controlled by OpenLAB CDS ChemStation Edition software. All separations were achieved through a Zorbax C-18 ( $150 \times 4.6 \text{ mm}$ , 5 µm) analytical column (Agilent Technologies). The mobile phase consisted of 2% acetic acid solution, pH 2.36 (component A) and MeCN (component B). For the determination of LA in plasma, gradient elution was used: 0-5 min, 10-40% B; 5-6 min, 40-10% B; 6–8 min, 10% B. Flow rate of mobile phase was 1 mL min<sup>-1</sup> at 25 °C. The peak of 2-S-pyridinium derivative of LA was monitored at 321 nm. LA-BCPB peak was identified by comparison of its retention time as well as diode-array spectra, taken at real time of analysis, with that of the authentic standard.

#### 2.7. Validation study

#### 2.7.1. Selectivity

Six different LA-free plasma samples, obtained from apparently healthy donors were used to evaluate the selectivity of the method. This was done by investigating the potential interferences at the chromatographic peak region for LA derivative using the recommended procedure and chromatographic conditions described in Sections 2.5.1 and 2.6, respectively. Moreover, the test of peak purity by diode-array detector was performed.

#### 2.7.2. Intra-day and inter-day variation

The intra-day accuracy and precision were estimated by analyzing five plasma samples spiked with LA at three different levels 0.1, 1 and 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. The inter-day precision and accuracy were evaluated on five consecutive days in a week at the same LA levels in plasma. The spiked plasma samples were prepared according to a recommended procedure described in Section 2.5.1. The results were expressed as the reproducibility of the recovered amount and determined concentration as the mean  $\pm$  SD and the RSD% calculated from the data obtained.

#### 2.7.3. Calibration

Total LA: To prepare the calibration standards used to determine LA in human plasma, portions of 50  $\mu$ L of blank plasma were each placed in eppendorf tube and spiked with 10  $\mu$ L of standard solutions with the increasing amount of LA to provide a concentration of 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> in plasma. The calibration standards were prepared in triplicate according to recommended procedure described in Section 2.5.1.

*Protein bound LA:* To prepare the calibration standards used to determine ProtS-LA in human plasma, portions of 50  $\mu$ L of blank plasma were each placed in eppendorf tube and spiked with the increasing amount of HSA-LA to provide ProtS-LA concentration of 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> plasma. The calibration standards were prepared in triplicate according to recommended procedure described in Section 2.5.2.

The calibration curves were obtained by least-square linear regression analysis of relationship between peak areas of the LA derivative and LA concentrations. The slope of the calibration curve was used to calculate the LA concentrations in plasma samples.

#### 2.7.4. Limit of detection and quantification

To investigate the lower limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) LA-free blank plasma samples were spiked with a decreasing concentration of the standard solution of LA and subsequently subjected to all steps of the analytical procedure. The study was repeated until the signal-to-noise ratio reached 3:1 and 6:1 for LOD and LOQ, respectively.

#### 2.7.5. Stability experiment

Short-term stability of 2-S-pyridinium derivative of LA in the final analytical solution was tested. Human plasma was spiked

with LA (final concentration  $20 \,\mu\text{mol L}^{-1}$ ) and immediately processed according to the procedure described in Section 2.5.1. Acidified final analytical solution containing MeCN was stored in the autosampler at room temperature and injected into the HPLC system without delay and consecutively after 1.5, 3, 4, 7, 10, 13, 16 and 19 h.

Short- and long-term stability of LA in plasma was also evaluated. Human plasma was spiked with LA (final concentration 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>), split into four portions and kept at 24, 4, -20 and -78 °C. 50  $\mu$ L of plasma was assayed according to procedure described in Section 2.5.1 at time zero and in successive intervals.

#### 3. Results and discussion

Utility of BCPB has been proven during determination of low molecular aminothiols in biological samples (Bald et al., 1996; Chwatko, 2013; Chwatko et al., 2014; Kuśmierek and Bald, 2009a, 2009b; Sypniewski and Bald, 1996). It has been also used as an effective derivatization reagent for LA determination in human urine (Chwatko et al., 2014). This method is based on the reduction of LA to DHLA, conversion of DHLA to UV-absorbing BCPB derivative and quantification by HPLC. The aim of present work was to extend the above derivatization scheme for the determination of total and protein-bound LA (ProtS-LA) in human plasma. Importantly, dedicated to urine analytical scheme cannot be directly applied for the determination of LA in plasma samples. The main problem has concerned physicochemical properties of LA and the presence of proteins in the sample. Therefore, individual conditions for each step of the analytical procedure were optimized.

#### 3.1. Sample preparation

Sample preparation influences nearly all of the later assay steps and for this reason it is critical for unequivocal identification and quantification of the analytes. DHLA reacts with BCPB (Fig. 1) within 15 min in water solution (pH 9) to form a stable thioether, 2-S-pyridinium derivative (LA-BCPB). This stable derivative has a well-defined maximum at 321 nm. To measure the total LA (the sum of DHLA, LA and ProtS-LA) it is necessary to cleave disulfide bonds prior to derivatization. Such approach makes free sulfhydryl groups accessible to BCPB. For this reason, we used TCEP in TRIS buffer at pH 9, at room temperature for 15 min. Our results show that both reduction and derivatization require longer times for plasma samples than for urine (Chwatko et al., 2014). A crucial step in plasma sample preparation is LA and DHLA separation from protein. LA and DHLA are the amphiphilic molecules having both hydrophilic and hydrophobic fragments and can specifically interact with the surface of proteins. Several methods, such as liquid-liquid extraction (LLE) (Chng et al., 2010; Ezhilarasi et al., 2014; Haj-Yehia et al., 2000; Khan et al., 2011a, 2010, 2011b; Montero et al., 2012; Niebch et al., 1997; Satoh et al., 2007; Trivedi et al., 2004; Witt and Rüstow, 1998), solid phase extraction (Khan et al., 2010; Teichert and Preiss, 2002, 1995) and deproteinization (Chen et al., 2005; Chng et al., 2010; Khan et al., 2011b) can be utilized for removal of LA from protein. In our study, we tested deproteinization procedure and LLE for determination of total LA and ProtS-LA, respectively.

During acidic deproteinization, plasma proteins markedly adsorb LA; consequently, the concentration of LA in the solution is lower than expected. In our study, HSA solutions containing LA in the range  $0.5-30 \ \mu\text{mol} \ \text{L}^{-1}$  were deproteinized with PCA and assayed for LA content. We observed a lower LA concentration in final analytical solutions for HSA samples compared to standard solution (Fig. 2A). Recovery of free LA was calculated with the use of the following formula:

#### Recovery (%) = LA amount in HSA sample

/LA amount in standard solution  $\times$  100%.

The recovery was found to be between 32.4% and 38.9%, meaning that more than 60% of free LA adsorbed on HSA. Similar problem concerned separation of proteins and BCPB derivative of LA. Our experiments have proven that addition of MeCN or MeOH to PCA significantly increases LA-BCPB recovery (Fig. 2B). Moreover, better results were obtained when the mixture of PCA and MeCN was used. In this case, the recovery reaches 100% while application of MeOH and PCA mixture afforded only 76%. Our results are comparable with those obtained by other investigators for the mixture of MeCN and metaphosphoric acid (recovery, 98%) (Khan et al., 2011b). Finally, for deproteinization of plasma samples for determination of total LA the mixture of PCA and MeCN was used.

Since LA shares structural similarity to the medium chain fatty acids e.g. octanoic acid it is preferably bounded by sit II in albumin (Atukeren et al., 2010; Kawakami et al., 2006). An accurate separation of free LA from proteins is essential for determination of ProtS-LA in plasma samples because incomplete removal of free LA causes overestimation of ProtS-LA. Thus, LLE with chloroform, dichloromethane, diethyl ether, ethyl acetate or 1-octanol was considered. As described earlier, dichloromethane, diethyl ether and ethyl acetate were widely used for LA extraction from plasma. Unfortunately, one can interpret provided results as inconsistent due to the extraction recoveries in case of dichloromethane, diethyl ether and ethyl acetate being in the range of 87.0-98.4%, 75.0-80.3% and 58.1-90.3%, respectively (Haj-Yehia et al., 2000; Montero et al., 2012; Khan et al., 2011b, 2011a, 2010; Trivedi et al., 2004; Witt and Rüstow, 1998). Additionally, when chloroform/ethanol mixture was used for LA extraction from plasma samples better recovery of the analyte was obtained as compared to the other solvents used (Montero et al., 2012). Then, we have decided to test chloroform and 1-octanol as the extraction solvents. Our results show that both solvents completely extracted free LA from acidified HSA and plasma samples. Additionally, after extraction of HSA containing free LA (10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) the LA-BCBP peak in protein fraction was not observed. Due to the better stability of proteins as well as better separation from the liquid phases for further experiments chloroform was used.

#### 3.2. Chromatography

Because of unique separation parameters of HPLC technique, it has frequently been used in the analysis of biological samples. In order to provide a good performance of the assay



Figure 1 Determination strategy for estimation of total and protein-bound LA in plasma.

the chromatographic conditions were optimized in terms of mobile phase MeCN and acetic acid concentration as well as column temperature. As expected, an increase in MeCN content in the mobile phase from 20 to 30% resulted in decrease of retention factor from 8 to 1 and simultaneous increase in peak height from 6 to 32 mAU. The effect of acetic acid concentration was tested in a range of 0.5–3%. The retention factor of LA-BCBP slightly decreased (1.4–1) while peak height increased (16–40 mAU) with increase of acetic acid concentra-

tion. Temperature of the column in the range of 15–40 °C slightly influenced retention parameters. Based on the results described above, we have chosen chromatographic conditions specified in Section 2.6. Chromatographic profiles obtained for the standard, blank and spiked protein fraction as well as total LA after supplementation are depicted in Fig. 3. As can be seen endogenous components do not significantly interfere with LA-BCBP peak. Under these conditions LA-BCPB is eluted after 5.49  $\pm$  0.01 min (RSD = 0.18%, n = 10).



**Figure 2** Influence of different conditions to separation of LA and LA-BCPB from protein. (A) Acid deproteinization of HSA containing LA in the range  $0.5-20 \ \mu mol \ L^{-1}$ ; (B) The relationship between MeCN/MeOH volume and separation of LA-BCPB from protein.

#### 3.3. Validation study

The method was validated for selectivity, precision, recovery, linearity, limit of detection and quantitation, and stability according to the guidelines for analytical methods (Ravichandran et al., 2010; Wille et al., 2011).

The selectivity of our method was demonstrated by providing the absence of interfering peaks with a signal obtained for the analyte. For this purpose, six various blank plasma samples and plasma spiked with LA were analyzed and the chromatograms showed sufficient separation of LA-BCPB from the matrix components. Furthermore, examination of peak purity showed that LA-BCBP peak was not attributable to more than one component.

The accuracy of an analytical method may be defined as the closeness of the measured value obtained by the method to the true value, whereas the precision as the degree of agreement among individual test results obtained by replicate measurements (Ravichandran et al., 2010; Wille et al., 2011). The precision is expressed as the relative standard deviation (RSD), while the accuracy as the percentage of analyte recovery and calculated by expressing the mean measured amount as a percentage of the added amount. In our study three concentra-



**Figure 3** Representative chromatograms of water standard solution and plasma samples. (A) Standard water solution of LA, concentration 15  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. (B) Profile of plasma obtained from volunteer before (black line) and after oral administration of 600 mg (red line) and 1200 mg (blue line) of LA with total LA amounting 0.0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, 0.53  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (108.3  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) and 2.08  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> (430.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>), respectively. (C) Profile of blank (black line) and spiked (red line) with 3  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> ProtS-LA plasma samples. Chromatographic conditions are as described in the text.

tions of LA were tested: one at the LOQ, one near the expected amount of analyte, and one near the upper boundary of the standard curve. The intra- and inter-day recovery and precision values were calculated and are shown in Table 1. The criteria for acceptability of the data included accuracy within  $\pm 15\%$  from the nominal values and a precision within  $\pm 15\%$  RSD, except for LOQ, where it should not exceed  $\pm 20\%$  for accuracy as well as precision (Wille et al., 2011). Obtained in our study values fulfill these requirements.

The relationship between detector response and LA and ProtS-LA concentrations was continuous and repeatable, and was demonstrated using a seven-point and six-point calibration curves, respectively. The calibration curves were linear in the tested range from 0.1 to 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> and from 0.5 to 3  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> for total LA and ProtS-LA, respectively. The equations for the linear regression line were y = 1.295x + 0.0726 for total LA and y = 0.330x - 0.018 for ProtS-LA; outliers were not excluded. The coefficients of correlation

for the calibration regression were 0.9998 and 0.9901 for total LA and ProtS-LA, respectively.

The LOD and LOQ for total LA and ProtS-LA were experimentally established to be 0.05 and 0.1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> for total LA and 0.2 and 0.5  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> for ProtS-LA, respectively. The analyte response at LOQ level fulfills the criteria for precision and accuracy (Wille et al., 2011), i.e. precision of 20% and accuracy of 80-120%. The LOQ and/or LOD for total LA determination by this method compare favorably with others' recently reported values which were obtained by the HPLC method with UV detection (Ezhilarasi et al., 2014) and match with the HPLC method with fluorescence detection (Niebch et al., 1997). Other HPLC methods for LA determination in plasma based on fluorescence (Haj-Yehia et al., 2000; Satoh et al., 2007; Witt and Rüstow, 1998), mass spectrometry (Chen et al., 2005; Trivedi et al., 2004) and electrochemical (Khan et al., 2011a, 2010, 2011b; Teichert and Preiss, 2002, 1995) detection have better LOQ and/or LOD than our method.

**Table 1** Evaluation of the intra-day and inter-day precision and accuracy for total LA and ProtS-LA in plasma obtained by the proposed method, n = 5.

LA added ( $\mu mol \ L^{-1}$ )	Intra-day			Inter-day		
	LA found $\pm$ SD ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Recovery (%)	LA found $\pm$ SD ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Recovery (%)
Total LA						
0.1	$0.11 \pm 0.02$	19.6	108.9	$0.09 \pm 0.01$	10.5	91.7
1.0	$1.02 \pm 0.04$	3.4	102.3	$0.93 \pm 0.06$	6.7	92.9
20	$22.2 \pm 0.40$	1.8	110.8	$20.8 \pm 0.31$	1.5	103.9
ProtS-LA						
0.5	$0.40 \pm 0.05$	12.9	80.4	$0.40 \pm 0.05$	11.5	80.0
1.5	$1.58 \pm 0.25$	15.6	105.3	$1.64 \pm 0.25$	15.3	109.4
3.0	$3.13 \pm 0.38$	12.1	104.3	$3.18 \pm 0.23$	7.4	106.0

Table 2 Concentrations of total LA in human plasma before and after supplementation with LA.

Gender	Age (year)	LA concentration in $\mu$ mol L <sup>-1</sup> ( $\mu$ g L <sup>-1</sup> )					
		Before supplementation	After supplementation				
			600 mg	1200 mg <sup>b</sup>			
F	39	n.d.	0.16 (33.9)	1.36 (281.0)			
М	41	0.08 <sup>a</sup>	0.66 (135.4)	1.26 (260.7)			
F	43	n.d.	0.53 (108.3)	2.08 (430.0)			
F	40	n.d.	1.08 (223.5)	1.28 (264.1)			
F	28	n.d.	1.35 (277.6)	1.54 (318.3)			
F	55	n.d.	1.39 (287.8)	1.87 (386.0)			
F	43	n.d.	0.18 (36.9)				
М	47	0.015 <sup>a</sup>	0.27 (56.5)				
F	39	0.015 <sup>a</sup>	0.26 (54.5)				
F	28	n.d.	0.57 (118.5)				
F	39	n.d.	0.32 (65.0)				
М	63	n.d.	0.39 (81.3)				
М	57	n.d.	0.51 (105.0)				
М	30	n.d.	0.82 (169.3)				
М	53	n.d.	0.82 (169.3)				
М	50	n.d.	0.89 (182.8)				
F	62	n.d.	1.13 (233.6)				

n.d., not detected.

<sup>a</sup> Concentration below LOQ.

<sup>b</sup> Supplementation with 1200 mg of LA processed one year later.

The stability of LA ex vivo at 24, 4, -20 and -78 °C in plasma was tested. Under these temperatures LA in plasma samples was found to be stable for at least 2, 10 days, 26 weeks and 6 months, respectively. The residual percentages of LA after mentioned periods of time were 96.5%, 102.5%, 98.7% and 103.0%, respectively and indicating no stability problems. Our stability results correspond to those obtained earlier at 24 (Khan et al., 2011b), -20 (Khan et al., 2011a; Chen et al., 2005) and -80 °C (Trivedi et al., 2004) and are inconsistent with the study provided by Khan et al. (2010) which demonstrated that spiked plasma samples were stable for only 1 week at -80 °C. Other examinations have shown that exogenous LA in plasma samples is stable at -70 °C for 6 months (Teichert and Preiss, 1995). LA-BCPB in final analytical solution containing MeCN was found to be stable at room temperature for 4 h as the concentration of analyte was found to be 103.6% of the initial concentration.

#### 3.4. Application to authentic plasma samples

The optimized procedure for the determination of total LA and ProtS-LA was applied to the analysis of plasma samples of apparently healthy volunteers, 28–63 years old (7 men and 10 women), before and after supplementation. In 14 of the 17 plasma samples collected before taking the drug the LA levels were below the LOD and in 3 samples below the LOQ. After oral administration of 600 and 1200 mg of LA, its concentration in plasma was in the range 33.9–287.8 and 260.7–430.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> plasma, respectively (Table 2). Furthermore, in all plasma samples ProtS-LA was not observed.

#### 4. Conclusion

We reported the new HPLC based methodology for determination of total LA and ProtS-LA in plasma. Since absorption of UV radiation by LA is low, it was derivatized with BCPB following the reductive cleavage of the -S-S- bond with TCEP. Use of BCPB as derivatization reagent enhances the detectability because formed S-pyridinium derivative exhibits relatively high molar absorptivity coefficient  $(\varepsilon = 1 \times 10^4 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ . Analytical figures of merit, demonstrated during the method validation procedure, justify a conclusion that present procedure is reliable and robust. It should be emphasized that established sample preparation procedure allows effective differentiation of ProtS-LA from free LA. Importantly, this solution can be utilized in other HPLC assays including those coupled with mass spectrometry or fluorescence detection. Developed method has also several other advantages over previously published assays. To the best of our knowledge there is only one other HPLC UV method allowing LA determination in human plasma (Ezhilarasi et al., 2014) while our method has better LOQ and LOD. An additional advantage is the short chromatographic run time and employment of small amount of reagents (eco-friendly method). In conclusion, the method is suitable for clinical studies and controlling the use of LA supplements.

#### Author contribution statement

G.C. supervised all experiments and prepared the manuscript, M.K. did sample preparation and HPLC analysis, M.I. did statistical analysis of the data, A.K. involved preparation of standards and HPLC analysis, A.B-W. did collection of samples, B.M. did setting up of the clinical experiment, and R. G. gave contribution in the manuscript preparation.

#### Acknowledgment

The authors wish to thank the University of Łódź for financial support of this research.

#### References

- Atukeren, P., Aydin, S., Uslu, E., Gumustas, M.K., Cakatay, U., 2010. Redox homeostasis of albumin in relation to alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Oxidat. Med. Cell. Longev. 3, 206–213.
- Bald, E., Sypniewski, S., Drzewoski, J., Stępień, M., 1996. Application of 2-halopyridinium salts as ultraviolet derivatization reagents and solid-phase extraction for determination of captopril in human plasma by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 681, 283–289.
- Bilska, A., Włodek, L., 2005. Lipoic acid the drug of the future? Pharmacol. Rep. 57, 570–577.
- Borowczyk, K., Krawczyk, M., Kubalczyk, P., Chwatko, G., 2015. Determination of lipoic acid in biological samples. Bioanalysis 7, 1785–1798.
- Bustamante, J., Lodge, J.K., Marcocci, L., Tritschler, H.J., Packer, L., Rihn, B.H., 1998. α-Lipoic acid in liver metabolism and disease. Free Radic. Biol. Med. 24, 1023–1039.
- Chen, J., Jiang, W., Cai, J., Tao, W., Gao, X., Jiang, X., 2005. Quantification of lipoic acid in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 824, 249–257.
- Chng, H.T., New, L.S., Neo, A.H., Goh, C.W., Browne, E.R., Chan, E.C.Y., 2010. A sensitive LC/MS/MS bioanalysis assay of orally administered lipoic acid in rat blood and brain tissue. J. Pharm. Biomed. Anal. 51, 754–757.
- Chwatko, G., 2013. Spectrophotometric method for the determination of total thiols in human urine. Ann. Clin. Lab. Sci. 43, 424–428.
- Chwatko, G., Kubalczyk, P., Bald, E., 2014. Determination of lipoic acid in the form of 2-S-pyridinium derivative by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Curr. Anal. Chem. 10, 320–325.
- Ezhilarasi, K., Sudha, V., Ramachandran, G., Umapathy, D., Rajaram, R., Padmalayam, I., Viswanathan, V., Hemanth Kumar, A.K., 2014. A simple and specific method for estimation of lipoic acid in human plasma by high performance liquid chromatography. J. Chromatograph. Separat. Techniq. 5, 245.
- Goraca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., Skibska, B., 2011. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. Pharmacol. Rep. 63, 849–858.
- Haj-Yehia, A.I., Assaf, P., Nassar, T., Katzhendler, J., 2000. Determination of lipoic acid and dihydrolipoic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J. Chromatogr. A 870, 381–388.
- Ishii, T., Wakabayashi, M., Mori, T., Nakayama, T., 2010. A new method for the detection and characterization of α-lipoic acid mixed disulphides. Free Radic. Res. 44, 403–409.
- Kataoka, H., 1998. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. J. Chromatogr. A 717, 247–262.
- Kawakami, A., Kubota, K., Yamada, N., Tagami, U., Takehana, K., Sonaka, I., Suzuki, E., Hirayama, K., 2006. Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. FEBS J. 273, 3346–3357.
- Khan, A., Iqbal, Z., Watson, D.G., Khan, A., Khan, I., Muhammad, N., Muhammad, S., Nasib, H.A., Iqbal, N., Faiz-ur-rehman, Kashif, M., 2011a. Simultaneous determination of lipoic acid (LA) and dihydrolipoic acid (DHLA) in human plasma using highperformance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 879, 1725–1731.

- Khan, A., Khan, M.I., Iqbal, Z., Ahmad, L., Shah, Y., Watson, D.G., 2010. Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-ECD using liquid–liquid and solid-phase extraction: method development, validation and optimization of experimental parameters. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 878, 2782–2788.
- Khan, M.I., Iqbal, Z., Ahmad, L., Shah, Y., Nazir, S., Khan, A., Nasir, F., 2011b. Simultaneous determination of the endogenous free α-lipoic acid and dihydrolipoic acid in human plasma and erythrocytes by RP-HPLC with electrochemical detection. Chromatographia 73, 929–939.
- Kuśmierek, K., Bald, E., 2009a. Analysis of major urinary aminothiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Acta Chromatogr. 21, 411–420.
- Kuśmierek, K., Bald, E., 2009b. Reversed-phase liquid chromatography method for the determination of total plasma thiols after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide. Biomed. Chromatogr. 23, 770–775.
- Montero, O., Ramírez, M., Sánchez-Guijo, A., González, C., 2012. Determination of lipoic acid, Trolox methyl ether and tocopherols in human plasma by liquid-chromatography and ion-trap tandem mass spectrometry. Biomed. Chromatogr. 26, 1228–1233.
- Niebch, G., Büchele, B., Blome, J., Grieb, S., Brandt, G., Kampa, P., Raffel, H.H., Locher, M., Borbe, H.O., Nubert, I., Fleischhauer, I., 1997. Enantioselective high-performance liquid chromatography assay of (+)R- and (-)S-α-lipoic acid in human plasma. Chirality 9, 32–36.
- Oettl, K., Stauber, R.E., 2007. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. Br. J. Pharmacol. 151, 580–590.
- Ravichandran, V., Shalini, S., Sundram, K.M., Rajak, H., 2010. Validation of analytical methods – strategies & importance. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 2, 18–22.

- Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C., 2013. Direct and indirect antioxidant properties of α-lipoic acid and therapeutic potential. Mol. Nutr. Food Res. 57, 114–125.
- Satoh, S., Toyo'oka, T., Fukushima, T., Inagaki, S., 2007. Simultaneous determination of α-lipoic acid and its reduced form by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 854, 109–115.
- Sypniewski, S., Bald, E., 1996. Determination of captopril and its disulphides in whole human blood and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and precolumn derivatization. J. Chromatogr. A 729, 335–340.
- Teichert, J., Preiss, R., 2002. High-performance liquid chromatography assay for  $\alpha$ -lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 769, 269–281.
- Teichert, J., Preiss, R., 1995. Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 672, 277–281.
- Trivedi, R.K., Kallem, R.R., Mamidi, R.N.V.S., Mullangi, R., Srinivas, N.R., 2004. Determination of lipoic acid in rat plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study. Biomed. Chromatogr. 18, 681–686.
- Wille, S.M.R., Peters, F.T., Di Fazio, V., Samyn, N., 2011. Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. Accred. Qual. Assur. 16, 279–292.
- Witt, W., Rüstow, B., 1998. Determination of lipoic acid by precolumn derivatization with monobromobimane and reversed-phase highperformance liquid chromatography. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 705, 127–131.

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

**Bioanalysis** 

# The first method for determination of lipoyllysine in human urine after oral lipoic acid supplementation

Adrianna Kamińska<sup>1</sup>, Iwona E Głowacka<sup>2</sup>, Beata Pasternak<sup>3</sup>, Rafał Głowacki<sup>1</sup> & Grażyna Chwatko<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, 163 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland <sup>2</sup>Medical University of Lodz, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Bioorganic Chemistry, 1 Muszyńskiego Str., 90–151 Łódź, Poland <sup>3</sup>University of Lodz, Faculty of Chemistry, Laboratory of Molecular Spectroscopy, 12 Tamka Str., 91–403 Łódź, Poland

\*Author for correspondence: Tel.: +48 426355843; Fax: +48 426355832; grazyna.chwatko@chemia.uni.lodz.pl

**Aim:** The first method on urinary excreted amounts of lipoyllysine (LLys) after lipoic acid (LA) supplementation was developed and validated. The suggested procedure allowed simultaneous determination of LLys and LA. **Methodology & results:** After the conversion of analytes into their reduced forms with tris(2-carboxyethyl)phosphine and derivatization via thiol group with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide, separation of analytes derivatives was performed on C18 column using a gradient mobile phase consisting of acetic acid and acetonitrile. The calibration curves for LA and LLys were linear ( $R^2 > 0.999$ ) in the range of 0.4–12  $\mu$ M concentration and all validation results were acceptable, according to the US FDA bioanalytical method guidelines. **Conclusion:** This method was effectively applied for LA and LLys quantification in human urine after oral LA supplementation.

First draft submitted: 11 January 2019; Accepted for publication: 3 June 2019; Published online: 1 August 2019

Keywords: analysis • antioxidant • chromatography • dietary supplement • thiol • urine • validation

 $\alpha$ -Lipoic acid (LA) is synthesized *de novo* from octanoic acid in mitochondria using lipoyl synthase. This enzyme possesses an auxiliary center [4Fe-4S]<sub>2</sub> cluster, which is a direct source of sulfur. In the presence of S-adenosylmethionine (cosubstrate), lipoyl synthase catalyzes the introduction of sulfur atoms in the positions C6 and C8 of octanoic acid bound to a protein. It is important that the reaction proceeds in a sequential manner through the formation of a C6-octanoyl radical, which reacts with the auxiliary [4Fe-4S]<sub>2</sub> cluster. Next, another sulfur atom is introduced at the C8-position and the remaining FeS cluster is released, resulting in the formation of a lipoylated protein, for example, E2 subunit of pyruvate dehydrogenase complex [1]. In biological systems, LA is present mainly in its protein-bound form (lipoyllysine [LLys]). LLys plays an important role in energy metabolism as a part of the pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complexes, which control the Krebs cycle, finally resulting in the production of adenosine triphosphate [2,3]. LA possesses both hydrophilic and hydrophobic properties and it is easily absorbed in the body, which may protect the integrity of cells ranging from the brain to the liver [3–5].

LA, in its pharmaceutical formulation, is readily absorbed from an oral dose and converts equally easily to its reduced form of dihydrolipoic acid (DHLA) in many tissues of the body [5]. The absolute bioavailability of the R(+)-enantiomer was found to be higher than the S(–)-enantiomer. Commercially available supplements generally contain from 50 to 600 mg of the racemic form of LA, which are the main sources of free LA [1,6]. The bioavailability of dietary supplements may fluctuate, depending on the mode of administration and the distribution of LA isomers [5]. Literature reports that bioavailability of orally administered LA at a dose of 200 mg racemic mixture is in the range of 20–40% [7]. The bioavailability of R- $\alpha$ -LA in the aqueous solution is 38%, while S- $\alpha$ -LA is only 28%. The galenical form of R- $\alpha$ -LA has 25% bioavailability and the form of S- $\alpha$ -LA only 20% [1]. LA in the form of a sodium salt can be better absorbed than free LA. When sodium salt of LA enters the acidic environment of the stomach, it is converted to the rapidly absorbed free LA [7]. It was also observed that a single oral administration of LA at dose of 50–600 mg is readily absorbed after 30 min up to 1 h, but because LA is rapidly metabolized

newlands press

Table 1.	Comparison	of methodologies fo	r determination o	of $\alpha$ -lipoic acid,	dihydrolipoic acid	and lipoyllysine in
hislasia						

biological samp	les.							
Method	Sample	Analyte	Linear range	LOD	LOQ	Ref.		
HPLC-EC	Urine, plasma	LA, metabolites without LLys	0.75–150 μmol/l urine 0.05–50 μmol/l plasma	Not given	0.5 μmol/l urine 0.022 μmol/l plasma	[12]		
HPLC-EC	Plasma, urine	LA, metabolites without LLys	Not given	Not given	0.02 $\mu$ mol/l plasma	[13]		
HPLC-FL	Spinach, animal tissues	LLys	$\textbf{0.94-60} \; \mu \textbf{mol/l}$	0.13 pmol	0.44 pmol	[2]		
HPLC-FL	Tablets, urine	LA	$0.75100 \ \mu mol/l$	2.9 nmol/l	Not given	[14]		
HPLC-FL	Urine, plasma	LA, DHLA	0–250 ng/ml	0.1 ng/ml DHLA 0.5 ng/ml LA	Not given	[15]		
HPLC-UV	Urine	LA	0.2–50 $\mu$ mol/l	0.1 μmol/l	0.2 μmol/l	[16]		
HPLC-UV	Enzyme hydrolysate	LLys	Not given	Not given	Not given	[10]		
HPLC-UV	Tablets	LA	2.5–50 μmol/l	0.21 µmol/l	0.65 μmol/l	[18]		
HPLC-UV	Plasma	LA	0.1–20 $\mu mol/l$ total LA 0.5–3 $\mu mol/l$ ProtS-LA	0.05 μmol/l total LA 0.1 μmol/l ProtS-LA	0.2 μmol/l total LA 0.5 μmol/l ProtS-LA	[19]		
LC/MS/MS	Plasma, urine, feces	LA, DHLA, metabolites without LLys	Not given	Not given	Not given	[9]		
MALDI-TOF-MS	Urine	LA	0.1–20 µmol/l	0.02 µmol/l	Not given	[17]		
Potentiometry	Tablets, urine	LA	0.1–10,000 µmol/l	$<$ 0.09 $\mu$ mol/l	Not given	[20]		
Amperometry	Tablets, synthetic urine	LA	10–130 µmol/l	0.0152 µmol/l	0.0507 μmol/l	[21]		
Enzymatic	Animal tissues	LLys	1–5 $\mu mol/l$	0.1 μmol/l	Not given	[11]		
DHLA: Dibydrolinoir, acid: LA: α-Lippir, acid: LLys: Lippyllysine								

and excreted, only a small amount of the free LA can stay in the tissues [8]. The bioavailability of LA also decreases when it is taken as a pharmacological supplement during a meal. Oral supplements of LA are better absorbed when they are taken on an empty stomach than with a meal. Thus, it is recommended to administrate LA 30 min before or 2 h after food ingestion [1,7,8]. However, due to delay of gastric emptying in diabetic patients, they should ingest fasting the drug, to achieve maximum absorption of this compound [7]. Oral supplementation of LA should not exceed the recommended dose of 400–600 mg/day, although adverse and toxic health effects have not been observed. Overdose can result fatigue, anxiety and confusion [8].

In tissues, LA is subject to extensive catabolism. It is shown that mitochondrial  $\beta$ -oxidation plays the key role in the metabolism of LA. For rodents and dogs, a total of 12 metabolites of LA have been observed as a result of sequential degradation of the carbon backbone and/or mono- and bis-methylation of the sulfhydryl groups. Regardless of the animal species examined, the major metabolite of LA appear to be bisnorlipoic acid, tetranorlipoic acid,  $\beta$ -hydroxy-bisnorlipoic acid or the bis-methylated mercapto derivatives of these compounds [5,9].

To the best of our knowledge, no paper has been published on urinary-excreted amounts of LLys. Although several methods for the determination of LLys in biological samples other than urine [2,10,11] have been described. Among analytical methods for the determination of LA in biological samples, HPLC [2,9,12–19], potentiometry [20] and amperometry [21] have been reported. All methods are summarized in Table 1. Consequently, the aim of our study was to develop the fast HPLC method using diode array detection (DAD) for the simultaneous quantitative determination of LA and LLys in urine after oral supplementation. It is important to highlight that our method unlike other reports for the determination of LA in urine does not require extraction and preconcentration, uses only simultaneous reduction of disulfide bonds with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide (BCPB). Moreover, the advantage of this method is the use of DAD, which is accessible to most analytical laboratories. It does not require any expensive dedicated instruments nor qualified staff.

In previous papers [16,19], we have reported sensitive and accurate methods for the determination of LA in urine and plasma. In this paper, we describe an extension of this method for the estimation of, not only LA but also LLys concentrations in urine. The novelty of the present procedure consists of: the development of new chromatographic conditions enabling the separation of LA and LLys from other compounds present in urine and known to form BCPB derivatives, shortening and simplifying the sample preparation procedure by using the simultaneous reduction and derivatization, and the determination of LA and its metabolite LLys.

#### Experimental

#### Chemicals, reagents & materials

All chemicals used throughout this study were commercially available and analytical-reagent grade except for the derivatization reagent BCPB that was synthesized in our laboratory according to the procedure described earlier [22] and LLys. LA, N $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)-L-lysine, TCEP, cysteine (Cys), glutathione (GSH), homocysteine (Hcy), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), cysteinylglycine (CGSH) and creatinine (Crn) were received from Sigma-Aldrich (MO, USA). HPLC-grade acetonitrile, sodium hydroxide (NaOH), tri-sodium phosphate dodecahydrate (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O), sodium dihydrogen phosphate dihydrate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) were from JT Baker (Deventer, The Netherlands), while perchloric acid and hydrochloric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Acetic acid was purchased from Chempur (Piekary Śląskie, Poland). Deionized water was obtained from a Millipore Milli-QRG system (Millipore, Vienna, Austria). LA dietary supplement tablets, *kwas liponowy* (A-Z Medica Sp.zo.o., Gdańsk, Poland) was obtained from the pharmacy.

#### Synthesis of LLys

To a solution of LA (0.100 g, 0.485 mmol) in DMF (1 ml) 2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,2,3tetramethyluroniumhexafluorophosphate (0.184 g, 0.485 mmol) and *N*-ethyldiisopropylamine (0.166 ml, 0.969 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 10 min and N $\alpha$ -(*tert*butoxycarbonyl)-L-lysine (0.119 g, 0.485 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, then concentrated in vacuo. The residue was diluted in dichloromethane (20 ml) and treated with 0.5 M KHSO<sub>4</sub> (2 × 10 ml), water (2 × 5 ml) and brine (2 × 5 ml). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on a silica gel column with chloroform–methanol mixtures (50:1, 20:1 v/v) to give pure *N*-boc LLys (0.142 g, 67% yield) as a yellowish oil.

IR (film): v = 3334, 2931, 2863, 1713, 1650, 1632, 1167 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 5.91$  (brs, 1H, NH), 5.29 (d, J = 5.0 Hz, 1H, NH), 4.31 (brs, 1H, CHCOOH), 3.60 (ddd, J = 12.6 Hz, J = 8.5 Hz, J = 6.6 Hz, 1H, SSCH), 3.28 (q, J = 6.6 Hz, 2H, C(O)NHCH<sub>2</sub>), 3.20 (ddd, J = 11.1 Hz, J = 7.0 Hz, J = 5.4 Hz, 1H, SSCHaHb), 3.14 (dt, J = 11.1 Hz, J = 7.0 Hz, 1H, SSCHaHb), 2.49 (ddd, J = 19.0 Hz, J = 6.6 Hz, J = 5.4 Hz, 1H, SSCH<sub>2</sub>CH<sub>4</sub>Hb), 2.23 (dt, J = 7.6 Hz, J = 2.8 Hz, 2H, C(O)), 1.96–1.90 (m, 1H, SSCH<sub>2</sub>CHaHb), 1.78–1.53 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.50–1.40 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.48 (s, 9H, 3 × CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 175.15$  (COOH), 173.63 (CONH), 155.89 (C = O), 80.15 (C(CH<sub>3</sub>)), 56.43 (SSCH), 53.14 (CHCOOH), 40.26 (C(O)NHCH<sub>2</sub>), 39.21 (CH<sub>2</sub>SS), 38.47 (SSCHCH<sub>2</sub>), 36.42 (CH<sub>2</sub>C(O)NH), 34.57 (SSCHCH<sub>2</sub>), 32.04 (CH<sub>2</sub>CHCOOH), 28.85 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.84 (SSCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.37 (3 × CH<sub>3</sub>), 25.43 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH), 22.41 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); Anal. Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>: C, 52.51; H, 7.89; N, 6.45. Found: C, 52.31; H, 7.65; N, 6.24.

In the next step, N-boc LLys (0.142 g, 0.327 mmol) was dissolved in a 75% aqueous solution of trifluoroacetic acid (2 ml) and stirred at room temperature for 1 h. The solvent was removed, then the residue was coevaporated with water and subsequently with ethanol. The crude product was crystallized from ethanol–diethyl ether. LLys was obtained with purity more than 98%.

IR (KBr):  $v = 3410, 3311, 3072, 2933, 2863, 1640, 1538 \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 8.22$  (brs, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.77 (brs, 1H, NH), 3.86 (brs, 1H, CHCOOH), 3.65–3.58 (m, 1H, SSCH), 3.20 (ddd, J = 10.9 Hz, J = 6.7 Hz, J = 5.7 Hz, 1H, SSCHaHb), 3.14 (dt, J = 10.9 Hz, J = 6.7 Hz, 1H, SSCHaHb), 3.28 (q, J = 6.0 Hz, 2H, C(O)NHCH<sub>2</sub>), 2.45–2.40 (m, 1H, SSCH<sub>2</sub>CHaHb), 2.06 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>C(O)), 1.90–1.84 (m, 1H, SSCH<sub>2</sub>CHaHb), 1.82–1.72 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.70–1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.59–1.45 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.59–1.45 (m, 4H, CH<sub>2</sub>).

#### Stock solutions

A stock solution of 0.01 M LLys was prepared by dissolving an appropriate amount of the synthesized LLys in 1 M HCl and diluting with deionized water. A stock solution of 0.1 M LA was prepared in 0.1 M NaOH, while 0.1 M BCPB was prepared in deionized water. These solutions were kept at 4°C for several days without a noticeable change of the analyte content. The working solutions were prepared by dilution with deionized water as needed and processed immediately. A fresh stock solution of 0.25 M TCEP was prepared daily in a phosphate-buffered saline (PBS; pH 11; 0.2 M).

#### Sample collection

Human urine samples were obtained from seven apparently healthy, ethnically homogenous volunteers, who dosed with commercially available LA capsules. Volunteers received a 200-mg oral dose of LA twice daily for 2 weeks, 30 min before meal or 2 h after food ingestion. In addition, two of the seven volunteers have expressed a desire to take the dietary supplement over a 9-week period. The excreted amounts of LA and LLys in urine were monitored weekly during the supplementation period. Blank (drug-free) urine samples were obtained from the same individuals 1 week before the first LA dose. During the study, no additional medications were allowed, except for LA. Urine samples were processed on the same day or stored at -79°C until analysis.

#### Assay procedure

In order to carry out a simultaneous reduction and derivatization reaction, 35  $\mu$ l of 0.25 M TCEP and 0.1 M BCPB mixture (3:4, v/v) were added to 50  $\mu$ l of urine and 100  $\mu$ l of PBS (pH 11; 0.2 M). The resulting mixture was vortexed, put aside for 10 min and acidified with 20  $\mu$ l of 3 M perchloric acid, followed by centrifugation (10 min, 12,000 g). 5  $\mu$ l of a clear supernatant was injected into the chromatographic system.

For an estimate of the Crn content in urine samples, a previously published method was utilized [23]. For this purpose,  $10 \ \mu$ l of a diluted urine sample with water (1:500, v/v) was injected into the HPLC column.

#### **HPLC** analysis

The chromatographic analyses were performed using a 1220 Infinity LC system from Agilent equipped with a binary pump integrated with a degasser, an autosampler, a column oven and DAD. Data acquisition and analysis were performed using OpenLAB CDS ChemStation Edition software. All separations were achieved through a Zorbax C-18 ( $150 \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ ) analytical column (Agilent Technologies). The mobile phase was composed of 2% acetic acid solution, pH 2.5 (A) and acetonitrile (B). The elution profile was as follows: 0–6.5 min, 10–44% B; 6.5–10 min, 44–10% B. An additional 3 min for re-equilibration with a mobile phase consisting of acetic acid (pH 2.5; 2%)/acetonitrile (90:10, v/v) were required. The temperature of the column was 25°C and the flow rate of the mobile phase was 1.1 ml/min. The detection and quantification were completed by absorbance set at 321 nm as the analytical wavelength. Identification of LLys and LA peaks was based on a comparison of retention times and DAD spectra with a parallel set of data obtained from authentic compounds.

For determination of Crn isocratic elution with a mobile phase consisting of PBS (pH 7.4; 15 mM)/acetonitrile (98:2, v/v) was used. The flow rate and the column temperature were 1 ml/min and 25°C, respectively. The absorbance was measured at 234 nm. The separations were accomplished with a Zorbax C-18 column [23].

#### **MS** parameters

The spectra ESI-MS were recorded using a Varian 500-MS LC ion-trap mass spectrometer (CA, USA). All the samples were introduced into the ESI-MS source through continuous infusion by means of the instrument syringe pump at a rate of 10  $\mu$ l/min. The ESI source was operated at 5.00 kV and the capillary heater was set to 350°C. The experiments were performed in positive- and negative-ion modes. All sample solutions were prepared in methanol from Baker.

#### Method validation

The analytical method was validated under optimized experimental conditions, according to the criteria for biological sample analysis [24]. Selectivity, LOD, LOQ, linearity, accuracy and precision as well as the stability of a standard solution of LLys were evaluated during the validation protocol.

#### Selectivity

The selectivity of the current method was shown through different aspects. First, analysis of a mixture containing standard solutions of Cys, Hcy, GSH, NAC, CGSH in the presence of LA and LLys standards was performed. Second, six different urine samples, obtained from apparently healthy donors were used to estimate the selectivity of the method. This was done by investigating the potential interferences at the region assigned to chromatographic peaks of LA and LLys derivatives using the assay procedure and HPLC conditions. Finally, a test of peak purity using a DAD was performed.
#### **Detection & quantification limits**

The LOD and LOQ values were experimentally evaluated by analysis of blank urine samples enriched with decreasing concentrations of LA and LLys working solutions until the S/N ratio reached 3/1 and 10/1, respectively.

#### **Calibration curves**

To determine the LA and LLys contents in human urine, calibration curves were prepared using a standard addition method. Urine samples (50  $\mu$ l) obtained from apparently healthy donors were each placed in an Eppendorf tube and spiked with increasing amounts of LA and LLys to give final concentrations in the range of 0.4–12  $\mu$ M urine. The samples were then processed according to the assay procedure. The calibration solutions were prepared in duplicate. The peak heights of LA and LLys as 2-S-pyridinium derivatives were plotted versus the analyte concentration and the equations of the calibration curves were obtained using least-squares linear regression.

#### Precision & accuracy

The intraday accuracy and precision were evaluated in five blank urine samples spiked with LA and LLys at three different concentrations: 0.4, 2 and 12  $\mu$ M. The interday precision and accuracy were evaluated over five consecutive days at the same LA and LLys levels in urine. The spiked urine samples were processed according to the assay procedure.

#### Standard solution stability

Short- and long-term stability of LLys in standard solutions was evaluated. Different concentrations of standard solutions of LLys (30, 1000 and 5000  $\mu$ M) were studied. Samples were stored at 24°C for 5 days, at 4°C for 1 month and at -20 and -79°C for 6 months. After completion of the desired storage time, solutions were prepared according to the following procedure: 100  $\mu$ l of PBS (pH 11; 0.2 M), 10  $\mu$ l of standard solution of LLys as well as 30  $\mu$ l of 0.25 M TCEP and 0.1 M BCPB mixture (1:2, v/v) were added and mixed. After 5 min, 20  $\mu$ l of 3 M perchloric acid and 840  $\mu$ l of deionized water were added. The acidified final analytical solutions of LLys were chromatographed under developed HPLC conditions.

#### **Results & discussion**

#### Sample preparation

Sample preparation is recognized as the most essential step of each analytical procedure. Biological samples such as urine, plasma or animal and plant tissues contain a large number of endogenous compounds, which result in difficulties in the separation of the analytes of interest due to their physicochemical similarity and low stability. Consequently, appropriate elaboration of the sample preparation procedure becomes the main challenge for researchers and directly affects the quality of the analysis.

During the method development for the determination of LA and LLys, the following two analytical procedures were investigated and compared: (procedure A) the reduction of disulfide bonds with TCEP followed by the derivatization of the free thiol groups by BCPB; (procedure B) the simultaneous reduction and derivatization reactions using a mixture of TCEP and BCPB. In procedure A, first, the effect of pH and time, as well as the volume of TCEP on the reduction reaction were studied (Supplementary Figure 1). Due to the fact that BCPB effectively acts in a basic medium, alkaline buffer in the pH range of 9-11 was tested for the reduction reaction. We observed that in a PBS at pH 11, in the presence of 15  $\mu$ l of 0.25 M TCEP, the reduction reaction was completed after 15 min at room temperature. During the reduction step, disulfide bonds in LA and LLys molecules are cleaved to free sulfhydryl groups accessible to BCPB. Schemes of the reduction of disulfide bonds and the conversion to 2-S-pyridinium derivatives are illustrated in Figure 1 for LLys and in an earlier article [16] for LA. The second step of procedure A constitutes derivatization, thus the derivatization reaction yield was optimized in terms of reagent excess (Supplementary Figure 2) and time. Our results indicated complete derivatization within 10 min at room temperature in the presence of 20 µl of 0.1 M BCPB. DihydroLLys and DHLA react rapidly with BCPB to form the stable thioethers 2-S-pyridinium derivatives in the stoichiometric ratio of 1:2. It was proven by the continuous variation method shown in Supplementary Figure 3 and in our previously published report [16]. 2-S-pyridinium derivatives (LA-BCPB and LLys-BCPB) possess a well-defined absorption maximum at 321 nm, whereas the absorption maximum of BCPB occurs at 274 nm. This bathochromic shift is analytically advantageous because, thanks to this phenomenon, we can use an excess of BCPB to ensure completeness of the reaction and to obtain better reproducibility of the results [16].

Research Article Kamińska, Głowacka, Pasternak, Głowacki & Chwatko





Finally, according to procedure B, we studied the time of simultaneous reduction and derivatization reactions in the presence of a TCEP and BCPB mixture (Supplementary Figure 4). It has been shown that highly reproducible results and good reaction yield for LA and LLys could be obtained in 10 min. Thus, the simultaneous reduction and derivatization reactions were carried out at room temperature for 10 min with the addition of 0.25 M TCEP and 0.1 M BCPB mixture (3:4, v/v). This solution simplifies the sample preparation procedure.

Sample preparation methods used in past studies of LA have included solid-phase extraction [9,12,13], liquid–liquid extraction [15] and dispersive liquid–liquid microextraction [17]. In our study, sample extraction or concentration are not required, which significantly simplifies the analytical procedure and eliminates the consumption of large amounts of solvents.

#### Chromatographic separation

In this study, the optimization of the chromatographic conditions for the separation of 2-S-pyridinium derivatives of LA and LLys was performed. For this purpose, several parameters such as the amount of organic modifier and acetic acid concentration as well as different flow rates were tested. Ultimately, we selected the conditions specified in



Figure 2. Representative chromatograms of standard solution and urine samples. (A) Standard water solution, concentration of each analyte 5 μM, (B) profile of urine blank (solid line) and urine spiked with 10 μM LA and LLys (dashed line), (C) profile obtained with urine samples collected before (dashed line) and after 7 weeks of oral administration of LA tablets (solid line). Peak 1, cysteinylglycine; peak 2, cysteine; peak 3, homocysteine; peak 4, glutathione; peak 5, *N*-acetyl-L-cysteine; peak 6, LLys; peak 7, LA. Chromatographic conditions are described in HPLC analysis. LA: α-Lipoic acid; LLys: Lipoyllysine.

HPLC analysis section. The representative chromatograms of blank urine, urine spiked with LA and LLys as well as urine samples collected before and after 7 weeks of supplementation with LA are depicted in Figure 2B and C. The chromatographic run time was established at 10 min. This time is significantly shorter in comparison with other values recently provided for LA determination in urine by Tsai and Preiss (15 min), Teichert *et al.* (20 min), Inoue

#### Research Article Kamińska, Głowacka, Pasternak, Głowacki & Chwatko

Table 2. Validation data.					
Analyte	LLys	LA			
Retention time (min)	4.42	5.38			
CV of retention time (%)	0.05	0.08			
Regression equation	y = 0.1335 × -0.0243	y = 0.2574 × +0.0093			
R <sup>2</sup>	0.9992	0.9997			
Linearity range (µM)	0.4–12	0.4–12			
LOD (µM)	0.2	0.1			
LOQ (μM)	0.4	0.4			
Intraday precision (%)	1.8–7.4	3.0-5.1			
Interday precision (%)	2.8-8.1	4.2-6.1			
Intraday accuracy (%)	90.7–116.0	100.4–105.0			
Interday accuracy (%)	91.4–114.9	103.2–110.5			
CV/ Coefficient of variation: LA: Lineir acid: Live: Lineir of detection: LOO: Limit of detection: LOO: Limit of quantitation: P2: Square of correlation coefficient					

CV: Coefficient of variation; LA: Lipoic acid; LLys: Lipoyllysine; LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantitation; R<sup>2</sup>: Square of correlation coefficient.

### Table 3. Concentrations of $\alpha$ -lipoic acid and lipoyllysine in human urine before and after supplementation with $\alpha$ -lipoic

uciu.								
Gender	Age	L	LA concentration (mmol/mol Crn)			LLys concentration (mmol/mol Crn)		
		Before		After	Before		After	
			1st week	2nd week		1st week	2nd week	
F	25	n.d.	0.03	0.08	n.d.	0.02	0.07	
F	27	n.d.	0.11	0.23	n.d.	0.16	0.24	
F	29	n.d.	0.31	0.18	n.d.	0.06	0.08	
F	48	n.d.	0.09	0.34	n.d.	0.13	0.32	
м	26	n.d.	0.19	0.20	n.d.	0.03	0.05	
М	27	n.d.	0.15	0.12	n.d.	0.03	0.03	
м	46	n.d.	0.55	0.29	n.d.	0.24	0.17	
Crn: Creatinine:	F: Female: LA: Lipoi	c acid: LLvs: Lipovllvsine: M	: Male: n.d.: Not detect	ed.				

*et al.* (60 min) and Schupke *et al.* (121 min) [9,12,14,17]. Moreover, the time for one analysis is in good agreement with a previously published method [15], but is also somewhat longer compared to our earlier study (8 min) [17]. There is no possibility to compare the total analysis time for LLys because there are no chromatographic methods for LLys determination in urine. The retention factor, the peak asymmetry factor, the number of theoretical plates at half height and coefficient of variation (CV) of retention times for LA-BCPB and LLys-BCPB were the criteria for the estimation of system suitability, using optimal conditions. The results showed satisfactory system performance. Under the established conditions, LA-BCPB and LLys-BCPB were eluted in the optimum range of retention factors 2–10 (2.58 for LLys-BCPB and 3.36 for LA-BCPB). The high number of theoretical plates (27,587 for LLys-BCPB and 47,787 for LA-BCPB) and correct values of the peak asymmetry factors (0.83 for LLys-BCPB and 0.80 for LA-BCPB) corresponded to good column efficiency, which generated narrow peaks. Retention times and their CV for LLys-BCPB are shown in Table 2. It should be emphasized that our approach results in effective separation of the analytes of interest, good reproducibility of retention times, as well as sharp and symmetric peaks for LA and LLys derivatives in human urine.

#### Internal standard approach

The addition of an internal standard can be a helpful tool in different chromatographic experiment for improving the accuracy and precision of the method. The internal standard may be also beneficial for methods that require multiple sample preparation steps. The present method was validated according to the US FDA guideline [24] for bioanalytical method validation. Despite the absence of an internal standard, our method is characterized by very good repeatability, accuracy and precision. The percentage recovery and RSD% values did not deviate by more than 15% even at the LOQ levels, indicating high accuracy and precision of the developed HPLC method. The intraday and interday precision (RSD%) values were less than 9% for the determination of LA and LLys in



**Figure 3. MS spectra for lipoyllysine.** Spectra obtained by ESI-MS/MS in positive ion mode of: **(A)** 335.5 and **(B)** 272.1 and **(C)** 189.1 and **(D)** 161.2 (*m*/*z*).

urine (Supplementary Table 1). Furthermore, the developed method does not require the use of extraction nor preconcentration, so we decided not to use an internal standard.

#### Identification of LLys structure by LC/ESI-MS

The confirmation of the mass of LLys was achieved by receiving a signal of 335.4 m/z in the positive ion mode and 333.3 m/z in the negative ion mode. Our further studies focused on the research of MS/MS, which confirm the structure of the title compound. For pattern ion 335.5 Da subsequent tandem spectra (Figure 3), we recorded and obtained the fragmentation pathways 335>272>189>161>127 (Supplementary Figure 5). In the negative ion mode, a substituted molecular ion of 333.3 m/z was detected. The results are presented in Figure 4. We used tandem analysis and received the fragmentation pathways 333.3>269.5>221.4>145.5, which are shown in Supplementary Figure 6. All proposed structures of the intermediate ions are in agreement with the literature [25].



**Figure 3. MS spectra for lipoyllysine (cont.).** Spectra obtained by ESI-MS/MS in positive ion mode of: **(A)** 335.5 and **(B)** 272.1 and **(C)** 189.1 and **(D)** 161.2 (*m/z*).

#### **Method validation**

#### Selectivity

At first, the selectivity of our method was demonstrated by analyzing a standard water solution of LA and LLys in the presence of other thiol compounds. As can be seen from the chromatogram depicted in Figure 2A, the BCPB derivatives of Cys, Hcy, GSH, NAC and CGSH were separated from the derivatives of LA and LLys in the standard water sample. Furthermore, in our approach, selectivity was disclosed by the comparison of chromatograms obtained from the analysis of six blank urine samples and urine spiked with LA and LLys (Figure 2B). No interfering peaks from endogenous urine compounds were observed at the retention times of LA and LLys in analyzed all blank urine samples. Moreover, the study of peak purity showed that peaks of LA-BCPB and LLys-BCPB were not attributable to more than one compound.



Figure 4. MS spectra for lipoyllysine. Spectra obtained by ESI of (A) 333.3 Da – full scan and (B) 333.3 Da ms2 and (C) 269.5 Da ms3 (m/z).

#### **Detection & quantification limits**

LOD and LOQ were defined as the lowest concentration giving the S/N ratio of 3 and 10, respectively. The values of the LOD and LOQ for LA and LLys are presented in Table 2. The LOQ value achieved with this assay for LA is better than the electrochemical detection method reported by Teichert *et al.* (0.5  $\mu$ M) [12], but inferior in comparison with our previously reported method [16]. As shown in Table 1, other methods for LA determination in urine samples [14,15,17,20,21] exhibit better LOQ and/or LOD than our method. Since this is the first paper concerning the determination of LLys in urine, it is not possible to compare LOQ and LOD values with other results.

#### Calibration curves

For the urine samples, eight-point calibration plots were constructed within a narrow range of concentrations of LA and LLys because analyzed urine samples after supplementation contained small amounts of LA and LLys. Calibration curves were linear within the tested range of concentrations of LA and LLys. In all cases, correlation coefficients were close to 1. Obtained data, including regression equations are shown in Table 2, where 'y' is the peak height in absorbance units and 'x' is the concentration in  $\mu$ M urine.

#### Precision & accuracy

Precision and accuracy were determined by the addition of known amounts of standard solutions of LA and LLys to urine samples, as was described in experimental. In our report, three concentrations representing the entire range of the calibration curves were studied: one near the lower end, one near the center and one near the upper boundary of the standard curve. The precision was expressed as the CV, while the accuracy as the percentage of analyte recovery and calculated by expressing the mean measured amount as a percentage of the added amount. The intraday and interday accuracy and precision for LA and LLys in urine samples (Table 2) fulfill all validation requirements recommended for biomedical methods [24]. Detailed data is summarized in Supplementary Table 1. The results obtained in our studies indicate that the proposed method provides good accuracy and eliminates the shortcomings associated with poor accuracy values for LA, which were previously obtained by the HPLC method with fluorescence detection reported by Haj-Yehia *et al.* [15].

#### Standard solution stability

The stability of LLys in standard solutions was evaluated for different standard concentrations (30, 1000 and 5000  $\mu$ M) in order to estimate the period during which samples could be stored at different temperatures before analysis without appreciable changes in LLys concentrations. LLys in standard solutions was found to be stable at -79°C for at least 6 months. After 6 months of storage, residual percentages for the three different LLys standards at -79°C were in the range 96.1–96.9%. However, the stability of the analyte was less when the tested standard solutions were stored for 6 months at -20°C. Residual percentage values for the three standard concentrations of LLys were in the range 55.5–71.0%. LLys in the 1000 and 5000  $\mu$ M standard solutions was also found to be stable at 24°C for 1 day (96.0 and 96.8%, respectively) and 4°C for at least 5 days (94.2 and 93.3%, respectively). Under these temperatures in 30  $\mu$ M, a standard solution of LLys exhibited a significant loss of the analyte.

#### Application of the method

The validated method was successfully applied for the study of urinary excretion of LA and LLys in healthy volunteers who received a 200-mg oral dose of LA twice daily for 2 weeks. Urine was obtained from three men and four women in the age 25–48 years. In the case of two of the seven volunteers (two women, 27 and 48 years old), oral LA supplementation was monitored for 9 weeks. At the beginning of the study, neither LA nor LLys were not present in urine samples. After 1 week of orally ingesting LA, its concentration and the LLys concentration in urine were in the range of 0.57–4.73  $\mu$ M for LA and 0.41–2.88  $\mu$ M for LLys, while after 2 weeks LA and LLys concentrations were within range of 1.07–5.60 and 0.59–6.06  $\mu$ M, respectively. To facilitate comparison of different individuals, the analytical results for urinary LA and LLys were normalized against Crn. Crn, an endogenous metabolite, is excreted by the kidney mostly by filtration and in proportion to total excretion. The results of LA and LLys urinary excretion are presented in Table 3 and Figure 5. In two volunteers, who took LA orally, side effects such as fatigue and annoyance have been appeared.



**Figure 5.** Urinary extrection of LLys and LA. The amounts of LA and LLys excreted in the urine for two healthy volunteers: female 26 (A) and female 48 (B) before and after 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 weeks of supplementation with LA.

Crn: Creatinine; LA: α-Lipoic acid; LLys: Lipoyllysine.

#### Conclusion

The presented study is the first to show that externally administrated LA is excreted in urine in the form of LLys. We believe that LA could be incorporated into proteins and then extracted as LLys. Thus, it is the first report for the simultaneous determination of LA and LLys in human urine after LA supplementation using an HPLC. This method is fast, simple and requires small volumes of samples and generates small waste amounts. Furthermore, our new approach includes a useful analytical protocol, which is characterized by several advantages over previous methodologies for LA. First, it significantly reduces the number of analytical steps and thus shortens the sample preparation procedure time. Second, the developed analytical scheme is capable of determining two analytes in human urine samples with adequate selectivity at the low micromolar level. Third, the analytical data based on linearity, precision and accuracy presented during the method validation procedure are within the criteria of analysis for biological samples. Fourth, the validated method can be widely applied in any laboratory, especially in those which may not be equipped with fluorescence or MS detection.

#### **Future perspective**

The presented method can be used to obtain results of a high analytical quality, which may contribute to a study of the important role of the above-examined compounds in the field of biomedical sciences. Moreover, it can be used for routine clinical monitoring and in pharmacokinetic studies. It is anticipated that, in the longer term, our studies can become the motivation for exploring additional properties of LLys. HPLC-DAD belongs to the standard instrumentation of a majority of analytical laboratories, not requiring particularly expensive maintenance and thus represents an excellent analytical tool alternative for more complicated chromatographic instruments (LC–MS, GC–MS, LC–MS/MS, etc.).

#### Financial & competing interests disclosure

This work was financially supported by the National Science Centre, Poland, grant number 2016/23/N/NZ9/00071. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

#### Ethical conduct of research

The authors declare that the study protocol was approved by the Bioethics Committee of the University of Lodz (12/KBBN-UE/I/2015) and informed consent forms were obtained from all volunteers.

#### Summary points

#### Background

- Lipoic acid (LA) is long been known as a potential therapeutic agent for many chronic diseases with great epidemiological as well economic and social impact. The prophylactic effect of LA in preventing diet-related diseases cannot be achieved only in consequence of endogenous synthesis, because humans can synthesize LA only in very small amounts. Hence, it is important to supply exogenous source of LA, which can be used in a form of commercially available pharmaceuticals.
- The aim of work was the development of a precise determination method for lipoyllysine (LLys) for better understanding of its properties as well as the study of the possible effect of oral LA supplementation on LA and LLys content in urine.

#### Experimental

- The method was based on the conversion of LA and LLys into their reduced forms by employing of a reductive agent, tris(2-carboxyethyl)phosphine prior to precolumn derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide.
- Chromatographic separation of the derivatives of LA and LLys has been achieved using gradient elution on a C18 column for 10 min.

#### **Results & discussion**

- The sample extraction or concentration was not required, which significantly simplified the analytical procedure and eliminated the consumption of large amounts of solvents.
- $\bullet\,$  The calibration curves for LA and LLys showed linearity in the range of 0.4–12  $\mu M$  with correlation coefficients greater than 0.999.
- For both analytes, the coefficient of variation of inter- and intraday precision were from 1.8 to 7.4% and 2.8 to 8.1%, respectively.
- The interday recovery varied between 90.7 and 116.0%, whereas intraday recovery varied between 91.4 and 114.9% for both LA and LLys.

#### Conclusion

- LA and LLys can be determined simultaneously in human urine after oral supplementation of LA.
- The results showed for the first time that externally administered LA is excreted in the urine in the form of LLys.

#### References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest and •• of considerable interest

- 1. Dörsam B, Fahrer J. The disulfide compound  $\alpha$ -lipoic acid and its derivatives: a novel class of anticancer agents targeting mitochondria. *Cancer Lett.* 371(1), 12–19 (2016).
- •• A systematic review of the current literature on cytotoxic effects of lipoic acid (LA) in cancer cells.
- Satoh S, Shindoh M, Min JZ *et al.* Selective and sensitive determination of lipoyllysine (protein-bound α-lipoic acid) in biological specimens by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 618(2), 210–217 (2008).
- Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93(12), 1021–1027 (2015).
- Borowczyk K, Krawczyk M, Kubalczyk P, Chwatko G. Determination of lipoic acid in biological samples. *Bioanalysis* 7(14), 1785–1798 (2015).
- Comprehensive review of methodology used for quantitation of LA and its metabolites in biological samples.
- Shay KP, Moreau RF, Smith EJ et al. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. Biochim. Biophys. Acta 1790(10), 1149–60 (2009).
- 6. Maglione E, Marrese C, Migliaro E *et al.* Increasing bioavailability of (R)-alpha-lipoic acid to boost antioxidant activity in the treatment of neuropathic pain. *Acta Biomed.* 86(3), 226–233 (2015).
- Brufani M, Figliola R. (R)-α-lipoic acid oral liquid formulation: pharmacokinetic parameters and therapeutic efficacy. Acta Biomed. 85(2), 108–115 (2014).
- Gomes MB, Negrato CA. Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetol. Metab. Syndr.* 6 (80), 1–18 (2014).
- A systematic review of the current literature on LA and its use as an antioxidant drug therapy for diseases that could have potential benefits from its use.
- 9. Schupke H, Hempel R, Peter G et al. New metabolic pathways of α-lipoic acid. Drug Metab. Dispos. 29(6), 855-862 (2001).
- Method for the determination of lipoic acid and its 12 metabolites using liquid chromatography/tandem mass spectroscopy technique.

- 10. Hayakawa K, Oizumi J. Determination of lipoyllysine derived from enzymes by liquid chromatography. J. Chromatogr. 490(1), 33–41 (1989).
- 11. Akiba S, Matsugo S, Packer I, Konishi T. Assay of protein-bound lipoic acid in tissues by a new enzymatic method. *Anal. Biochem.* 258(2), 299–304 (1998).
- An enzymatic method for the determination of protein-bound LA in the form of lipoyllysine in tissues.
- 12. Teichert J, Preiss R. High-performance liquid chromatography assay for α-lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B* 769(2), 269–281 (2002).
- Teichert J, Hermann R, Ruus P, Preiss R. Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. J. Clin. Pharmacol. 43(11), 1257–1267 (2003).
- Inoue T, Sudo M, Yoshida H, Todoroki K, Nohta H, Yamaguchi M. Liquid chromatographic determination of polythiols based on pre-column excimer fluorescence derivatization and its application to α-lipoic acid analysis. J. Chromatogr. A 1216(44), 7564–7569 (2009).
- Haj-Yehia AI, Assaf P, Nassar T, Katzhendler J. Determination of lipoic acid and dihydrolipoic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J. Chromatogr. A 870(1–2), 381–388 (2000).
- 16. Chwatko G, Kubalczyk P, Bald E. Determination of lipoic acid in the form of 2-S-pyridinium derivative by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Curr. Anal. Chem.* 10(3), 320–325 (2014).
- 17. Tsai CJ, Chen YL, Feng CH. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with microwave-assisted derivatization for determining lipoic acid and its metabolites in human urine. *J. Chromatogr. A* 1310, 31–36 (2013).

#### Only one method employing ecofriendly microextraction.

- Godlewska M, Odachowska A, Turkowicz M, Karpinska J. Analysis of reaction between α-lipoic acid and 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate used as a precolumn derivatization technique in chromatographic determination of α-lipoic acid. *J. Anal. Methods Chem.* 2015, 1–7 (2015).
- 19. Chwatko G, Krawczyk M, Iciek M et al. Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Arab. J. Chem. doi:10.1016/j.arabjc.2016.10.006 (2016).
- 20. Abbas MN, Radwan AA. Novel lipoate-selective membrane sensor for the flow injection determination of α-lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine. *Talanta* 74(5), 1113–1121 (2008).
- 21. Santos Pereira LN, da Silva IS, Araújo TP, Tanaka AA, Angnes L. Fast quantification of α-lipoic acid in biological samples and dietary supplements using batch injection analysis with amperometric detection. *Talanta* 154, 249–254 (2016).
- Bald E, Sypniewski S, Drzewoski J, Stępień M. Application of 2- halopyridinium salts as ultraviolet derivatization reagents and solid phase extraction for determination of captopril in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 681(2), 283–289 (1996).
- 23. Kuśmierek K, Głowacki R, Bald E. Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 385(5), 855–860 (2006).
- 24. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, US FDA, MD, USA (2018).
- 25. Allen F, Greiner R, Wishart D. Competitive fragmentation modeling of ESI-MS/MS spectra for putative metabolite identification. *Metabolomics* 11(1), 98–110 (2015).

# The first method for determination of lipoyllysine in human urine after oral lipoic acid supplementation

Adrianna Kamińska<sup>1</sup>, Iwona E. Głowacka<sup>2</sup>, Beata Pasternak<sup>3</sup>, Rafał Głowacki<sup>1</sup>, Grażyna

Chwatko<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup>University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, 163 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland

<sup>2</sup>Medical University of Lodz, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Bioorganic Chemistry, 1Muszyńskiego Str., 90-151 Łódź, Poland

<sup>3</sup>University of Lodz, Faculty of Chemistry, Laboratory of Molecular Spectroscopy, 12 Tamka Str., 91-403 Łódź, Poland

\* Author for correspondence: Grażyna Chwatko, Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Łódź, 163 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland, e-mail: <u>grazyna.chwatko@chemia.uni.lodz.pl</u>, tel. +48 426355843, fax +48 426355832

**Table S1.** Evaluation of the intra-day and inter-day precision and accuracy for LLys and LA in human urine (n = 5).

Analyte	Concentration	Concentration Precision (%)		Accuracy (%)		
Anaryte	(µM)	Intra-day Inter-day		Intra-day	Inter-day	
LLys	0.4	7.4	8.1	116.0	114.9	
	2	1.8	5.6	90.7	91.4	
	12	5.1	2.8	99.8	97.4	
LA	0.4	5.1	6.1	105.0	110.5	
	2	3.7	5.6	104.0	108.3	
	12	3.0	4.2	100.4	103.2	

LA: lipoic acid; LLys: lipoyllysine



**Scheme S1.** Estimation of stoichiometric molar ratio by continuous variation method for the reaction of dihydrolipoyllysine with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide.



**Scheme S2.** The effect of pH buffer and volume of tris-(2-carboxyethyl)phosphine on the reduction yield of lipoyllysine (A) and  $\alpha$ -lipoic acid (B) at room temperature. LA:  $\alpha$ -lipoic acid; LLys: lipoyllysine; TCEP: tris-(2-carboxyethyl)phosphine



Scheme S3. Effect of 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide excess on the derivatization yield of lipoyllysine and  $\alpha$ -lipoic acid at room temperature.

BCPB: 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide; LA: α-lipoic acid; LLys: lipoyllysine



Scheme S4. Effect of incubation time (B) on simultaneous reduction and derivatization yield of lipoyllysine and  $\alpha$ -lipoic acid in the presence of a TCEP and BCPB mixture.

BCPB: 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide; LA: α-lipoic acid; LLys: lipoyllysine; TCEP: tris-(2-carboxyethyl)phosphine



Scheme S5. Proposed fragmentation mechanism of lipoyllysine for the ion  $[m/z \ 335.5]^+$  in the positive ionization mode.



Scheme S6. Proposed fragmentation mechanism of lipoyllysine for the ion  $[m/z \ 333.3]^-$  in the negative ion-mode.





MARTA JOANNA KRAWCZYK

ADRIANNA KAMIŃSKA

GRAŻYNA CH



GRAŻYNA CHWATKO

W dzisiejszych czasach dąży się do wykorzystania homogenizacji na szeroką skalę, a w warunkach laboratoryjnych do pełnej automatyzacji tej techniki. Umożliwia to zdecydowaną poprawę jakości pracy chemika analityka.

## Homogenizacja tkanek NIEODZOWNY ETAP PRZYGOTOWANIA PRÓBKI STAŁEJ DO ANALIZY

W dzisiejszych czasach coraz częściej słyszy się o wpływie żywności na nasz stan zdrowia. W związku z tym ciekawym aspektem jest badanie tkanek roślinnych oraz zwierzęcych pod kątem zawartych w nich różnych związków chemicznych. Mogą to być związki mające pozytywny wpływ na nasz organizm, a także takie substancje, jak pozostałości stosowanych środków ochrony roślin, nawozów czy antybiotyków, które są szkodliwe dla naszego zdrowia. Potwierdzeniem dużego zainteresowania tą tematyką jest fakt, że w ostatnich latach można znaleźć ponad kilka tysięcy artykułów naukowych dotyczących oznaczania różnych związków chemicznych w tkankach roślinnych i zwierzęcych. Przeanalizowanie losowo wybranych publikacji z 2016 roku (tab. 1) wykazało, że najczęściej badanym materiałem roślinnym są liście, a najrzadziej całe rośliny. W przypadku tkanek zwierzęcych najczęściej do badań wykorzystuje się tkankę mięśniową, wątrobę, płuca i mózg.

Każdy analityk staje przed koniecznością ustalenia odpowiedniego schematu postępowania oraz dokonania wyboru, którą z dostępnych technik obróbki

Tabela 1. Rodz wykonane na p roku dotyczący	aj materiału pod oodstawie losowi ch próbek pocho	dawanego analiz o wybranych arty dzenia roślinneg	zie. Zestawienie /kułów z 2016 o i zwierzęcego
Rodzaj materiału roślinnego	Liczba na 100 artykułów	Rodzaj tkanek zwierzęcych	Liczba na 100 artykułów
liście	3	tkanka mięśniowa	39
nasiona/ziarna	16	wątroba	30
owoce	16	płuca	21
korzenie/kłącza	10	mózg	18
warzywa	10	nerki	15
łodygi	8	serce	12
zioła/przyprawy	6	tkanka tłuszczowa	2
całe rośliny	4	aorta	1
inne	6	całe organizmy	4

materiału wybrać. Sposób postępowania w dużej mierze uzależniony jest od rodzaju próbki oraz właściwości badanego analitu. Bardzo ważne jest, aby materiał badawczy był jednorodny i reprezentatywny, dlatego pracując ze stałymi próbkami biologicznymi, konieczne jest ich rozdrobnienie do takiej postaci, aby ich dalsza obróbka była jak najmniej skomplikowana. W tym celu w laboratoriach badawczych powszechnie wykorzystuje się różne odmiany techniki homogenizacji, które zostały zaprezentowane w niniejszym artykule.

#### Wybrane sposoby przygotowania stałego materiału biologicznego do badań

Przygotowanie do analizy biologicznych próbek stałych jest zadaniem niezwykle czasochłonnym i żmudnym. Przystępując do pracy z materiałem roślinnym, konieczne jest jego odpowiednie przygotowanie, a więc dokładne umycie warzywa lub owocu, osuszenie oraz obranie ze skórki. W przypadku tkanek zwierzęcych konieczne jest usunięcie takich elementów, jak pióra, skóra czy pazury, oraz wypreparowanie tkanki niezawierającej dużych naczyń krwionośnych. Postępowanie to jest niezwykle istotne, ponieważ niedokładne wykonanie tych czynności może doprowadzić do zanieczyszczenia próbki badanej. Tak wstępnie przygotowaną tkankę poddaje się dalej rozdrobnieniu czy działaniu odczynników chemicznych. Na tym etapie, spośród manualnego czy mechanicznego rozdrabniania, obróbki chemicznej, trawienia enzymatycznego czy ekstrakcji należy dokonać wyboru odpowiedniego sposobu przygotowania materiału badanego. Jak przedstawiono w tabeli 2 rozcieranie (mechaniczne i manualne) jest częściej stosowanym sposobem rozdrabniania niż homogenizacja czy działanie odczynnikami chemicznymi. W zależności od tego, czy mamy do czynienia ze świeżą, zamrożoną czy suchą tkanką, musimy dokonać wyboru odpowiedniego schematu pracy. W przypadku tkanek świeżych możliwe są dwie drogi postępowania: pierwsza z nich to mielenie tkanki bez dodatku roztworu lub homogenizacja w roztworze odpowiednio dobranym do potrzeb metody analitycznej, drugi sposób postępowania polega na tym, że świeże tkanki są najpierw zamrażane w ciekłym azocie, a następnie ucierane/ mielone na jednolity proszek, który można ponownie zamrozić, zliofilizować lub wysuszyć. Tkanki mrożone oraz te, które zostały uprzednio wysuszone, również mogą być mielone/ucierane w ciekłym azocie lub homogenizowane w odpowiednim roztworze.

Najprostszą i najstarszą metodą rozdrabniania materiału jest jego ucieranie w moździerzu. Choć może wydawać się, że jest to metoda archaiczna, to nadal stosowana jest na szeroką skalę w laboratoriach badawczych. Metoda ta jest wykorzystywana do uwolnienia białek i DNA z tkanek roślinnych bez względu na dużą wytrzymałość włókien celulozowych, a także innych polisacharydów wchodzących w skład ściany komórkowej. W przypadku tkanek zwierzęcych rozcieranie/mielenie wykorzystywane jest do dezintegracji połączeń międzykomórkowych oraz fragmentacji wysokocząsteczkowych białek.

W nowoczesnych laboratoriach ucieranie w moździerzu zastępowane jest mechanicznym rozdrabnianiem materiału badawczego. Do tego celu najczęściej stosuje się mielenie, homogenizację i sonikację. Ta ostatnia polega na lizie komórek bakterii i drobno pokrojonych tkanek oraz dokładnym ich wymieszaniu, wskutek działania pulsacyjnych fal dźwiekowych o wysokiej częstotliwości. Wysokoenergetyczną wiązkę ultradźwiękową generuje urządzenie z sondą, którą zanurza się w zawiesinie komórek. Tak dostarczana energia mechaniczna inicjuje powstawanie mikroskopijnych pęcherzyków kawitacyjnych, które emitują fale uderzeniowe przechodzące przez materiał badany. Niezmiernie ważne jest zatem, aby zapobiegać nadmiernemu nagrzewaniu próbki. Dlatego też powinna być ona zanurzona w łaźni lodowej i dopiero wówczas poddawana kilkukrotnej sonikacji w krótkich odstępach czasu. Metoda ta nie zdaje egzaminu w przypadku obróbki tkanek stałych, które nie zostały wstępnie rozdrobnione. Natomiast homogenizacja polega na wytworzeniu jednorodnej mieszaniny w wyniku intensywnego mieszania dużych cząstek próbki i ich rozdrabniania w urządzeniach zwanych homogenizatorami. W literaturze wyróżnia się różne typy homogenizacji: ultradźwiękową, ciśnieniową i mechaniczną. Jej początki sięgają czasów sprzed wybuchu drugiej wojny światowej, kiedy przygotowanie próbek opierało się jedynie na ich krojeniu w kostkę oraz siekaniu. W 1940 roku skonstruowano pierwszy homogenizator nożowy, co było wielkim ułatwieniem w pracy laboratoryjnej. W latach pięćdziesiątych XX wieku w laboratoriach pojawił się

Tabela 2. Przykładowe sposoby rozdrabniania materiału roślinnego na etapie przygotowania do końcowej analizy. Zestawienie wykonane na podstawie 100 losowo wybranych artykułów z 2016 roku

Stosowana procedura	Liczba artykułów na 100
Rozcieranie na proszek suchego/zamrożonego materiału	52
Homogenizacja bez rozpuszczalnika	20
Homogenizacja z dodatkiem rozpuszczalnika	12
Hydroliza kwasowa	7
Cięcie na drobne kawałki	7
Macerowanie	3
Hydroliza zasadowa	2

pierwszy homogenizator obrotowy, który znajduje zastosowanie po dzień dzisiejszy.

#### Homogenizator Waringa (nożowy)

Pierwszym opracowanym przyrządem do rozdrabniania był homogenizator Waringa, który swoją konstrukcją przypominał blender (homogenizator nożowy). To stosunkowo proste urządzenie służyło do przygotowania próbki do dalszej pracy polegającej na oczyszczaniu białek oraz izolacji analitów. Próbki umieszczane były w mikserze z dodatkiem buforu ekstrakcyjnego, a następnie rozcinane na mniejsze fragmenty. Blender umożliwia homogenizację dużych próbek w szybkim



- Materiały biologiczne z kolekcji ATCC
- Badania biegłości.

#### Dlaczego warto wybrać LGC?

- Najszersza oferta materiałów odniesienia
  Dostęp do ponad 40 programów badania
- biegłości
- Wsparcie techniczne
- Dostęp do wiedzy o wymaganiach i regulacjach prawnych.

Więcej informacji na www.lgcstandards.com LGC Standards Sp. z o.o., ul. M. Konopnickiej 1, Dziekanów Leśny. 05-092 Łomianki Tel.: 22 751 31 40 Faks: 22 751 58 45 E-mail pl@lgcstandards.com

🥑 @LGCStandards

RAKTYKA

LGC Quality - ISO Guide 34 · GMP/GLP · ISO 9001 · ISO/IEC 17025 · ISO/IEC 17043



A – homogenizator Waringa (blender), B – homogenizator
 Potter-Elvehjema, C – homogenizator obrotowy,
 D – homogenizator kulkowy

czasie. Może być wykorzystywany do pracy z tkankami świeżymi, suchymi oraz z materiałem o półpłynnej konsystencji. Ten typ homogenizatora używany jest do dnia dzisiejszego w wielu gospodarstwach domowych (rys. 1A). Blendery są bowiem łatwe w użyciu, a stosowane noże ze stali nierdzewnej zapewniają ich długą żywotność. W pracy laboratoryjnej są obecnie rzadko stosowane z uwagi na tworzące się wiry powodujące pienienie próbki, a także możliwą denaturację białek. Homogenizatory nożowe są mniej efektywne niż obrotowe. Ostrza tnące w tej klasie homogenizatorów są napędzane przez silnik i obracają się z prędkością 6 tys. – 50 tys. obrotów/min, dzięki czemu mogą być z powodzeniem wykorzystywane do rozcinania tkanek roślinnych oraz zwierzęcych.

#### Homogenizator Dounce'a

Drugim homogenizatorem, który pojawił się tuż po wynalezieniu blendera Waringa, był homogenizator Dounce'a. Zasada jego działania opiera się na przeciskaniu próbki pomiędzy rurką i tłuczkiem, co prowadzi do rozcierania komórek. Służy on do lizy komórek, a także do rozcierania tkanek. Ten typ homogenizatora jest stosunkowo tanim urządzeniem, jednak jest bardzo delikatny i łatwo może pęknąć. Z uwagi na duże ograniczenia w stosowaniu nie jest odpowiednim homogenizatorem do pracy z tkankami twardymi, a w przypadku jego używania do tkanek świeżych lub półpłynnych konieczne jest ich wcześniejsze rozdrobnienie.

#### Homogenizator Potter-Elvehjema

Homogenizator Potter-Elvehjema służy do rozcierania tkanek za pomocą tłuczka (rys. 1B). Tłuczek napę-

dzany jest silnikiem i może obracać się z prędkością 600–750 obrotów/min. Urządzenie to jest stosunkowo tanie, a jego zdecydowanie najdroższą częścią jest silnik. Dodatkowo homogenizator ten jest łatwy w obsłudze oraz czyszczeniu. Podobnie jak w przypadku homogenizatora Dounce'a, również to urządzenie ma wiele ograniczeń. Nadaje się bowiem do rozcierania komórek i bardzo miękkich tkanek, ale w przypadku homogenizacji tkanek twardych nie zdaje egzaminu i konieczne jest użycie innego rodzaju homogenizatora do początkowego rozdrobnienia próbki.

#### Prasa Frencha

Prasa Frencha weszła do użytku we wczesnych latach sześćdziesiątych XX wieku. Urządzenie to zostało opracowane w celu rozrywania mikroorganizmów. Obecnie prasa Frencha stosowana jest do dezintegracji komórek bakterii, drożdży oraz komórek roślinnych. Zasada działania polega na zmuszaniu komórek do przeciskania się przez wąski otwór pod wpływem bardzo wysokiego ciśnienia (ok. 20 tys. psi). Ponieważ komórki przechodzą z bardzo wysokiego do bardzo niskiego ciśnienia, następuje ich rozerwanie. Próbki stosowane w prasie Frencha muszą być płynne (wcześniej zhomogenizowana tkanka). Rozerwane komórki są następnie odwirowywane i zbierane. Urządzenie to jest bardzo efektywne, skuteczne i z powodzeniem może rywalizować z homogenizatorami ultradźwiękowymi. Dużym ograniczeniem prasy Frencha jest wymóg stosowania próbek o małej wielkości oraz konieczność wstępnej homogenizacji w przypadku pracy z tkankami.

#### Homogenizator obrotowy

Homogenizator obrotowy (wirnikowy) jest najpowszechniej stosowanym tego typu urządzeniem. Po raz pierwszy w laboratoriach pojawił się w 1950 roku. Omawiany homogenizator wykorzystywany jest do badań wymagających bardzo dokładnego rozdrobnienia próbki. Dzięki specjalnej konstrukcji noże ze stali nierdzewnej w tego typu urządzeniach osiągaja bardzo wysokie prędkości. Praca rotora (3 tys.-60 tys. obrotów/min) powoduje wciąganie próbek do środka głowicy mającej odpowiednio ukształtowane szczeliny (rys. 1C). W jej wnętrzu następuje szybkie i dokładne rozdrobnienie. Miażdżenie tkanek, z wytworzeniem jednorodnego homogenatu, przebiega bardzo szybko. Jedyną wadą homogenizatorów wirnikowych jest fakt, że generują ciepło, które może wpływać niekorzystnie na próbkę badaną. Dlatego w nowszych modelach montuje się czujniki temperatury, które wyłączają silnik w przypadku zbyt dużego nagrzania części tnących. Homogenizatory obrotowe można zakupić obecnie w różnych rozmiarach, również w postaci małego sprzętu przenośnego. Są to urządzenia stosunkowo niedrogie i proste w obsłudze. Ten typ homogenizatora ma szeroki wachlarz zastosowań. Z uwagi na jego konstrukcję umożliwia wstępną obróbkę najróżniejszych materiałów, przy zastosowaniu odpowiednich warunków pracy. Doskonale nadaje się do rozdrabniania zarówno mrożonych, świeżych czy suchych tkanek roślinnych oraz zwierzęcych, jak i substancji o półpłynnej konsystencji.

#### Młyn kulowy występujący również pod nazwą homogenizator kulkowy

Urządzenie to składa się z pojemnika, w którym umieszczany jest materiał badawczy oraz odpowiednie kulki (rys. 1D). Pojemnik ten wprawiany jest w ruch obrotowy, a znajdujące się wewnątrz kulki ścierają i rozdrabniają próbkę. Na rynku dostępnych jest kilka rodzajów kulek, wykonanych z różnych materiałów, których dobór uzależniony jest od rodzaju homogenizowanej próbki. Mogą być one wykonane z węglików (do ścierania mikroorganizmów, gleby), ceramiki (do rozdrabniania tkanek mózgu, wątroby, liści, gruczołów, mięśni), szkła (do miażdżenia zarodników, grzybów, drożdży) oraz stali (do homogenizacji kości, nasion, ziaren, zbóż, paznokci, włosów, zębów).

#### Młyn kriogeniczny

Urządzenie to zbudowane jest z wewnętrznego zbiornika z ciekłym azotem, w którym umieszcza się stelaż z próbkami oraz osłony izolacyjnej. Młynek ten wyposażony jest w programator umożliwiający regulację szybkości oraz czasu mielenia. Schłodzenie materiału za pomocą ciekłego azotu, a czasem suchego lodu znacznie zwiększa kruchość rozcieranego materiału. Urządzenie to doskonale nadaje się do homogenizacji: materiałów roślinnych (korzenie, łodygi, nasiona oleiste itp.), próbek pochodzenia zwierzęcego (włosy, zęby, paznokcie, skóra itp.), produktów spożywczych, pasz, karm, tłuszczów czy odpadów komunalnych.

#### Zastosowanie homogenizacji

Homogenizacja ma niewątpliwie wiele zalet. Jest stosunkowo szybką, niedrogą i prostą w obsłudze techniką przygotowania próbek, która nie wymaga specjalistycznego przeszkolenia pracownika. Nie narzuca konieczności użycia skomplikowanego sprzętu oraz stosowania drogich odczynników. Jest techniką wiarygodną, dzięki czemu otrzymuje się powtarzalne wyniki. Powszechnie wykorzystywana jest na etapie przygotowania próbek biologicznych do dezintegracji zarówno tkanek zwierzęcych, jak i roślinnych. Może być stosowana do rozdrabniania i mieszania próbek stałych oraz ciekłych.

Z uwagi na jej liczne zalety, homogenizacja znajduje zastosowanie nie tylko podczas przygotowania próbki do analizy, ale również w różnych gałęziach przemysłu chemicznego, spożywczego, farmaceutycznego, kosmetycznego i biotechnologicznego. Wykorzysty-

sartorius Products and Solutions for - Lab Balances the Laboratory - Pipettes & Tips - Lab Water Systems - Consumables - Services turning science into solutions

Sartorius Poland Sp. z o.o. ul. Wrzesińska 70 62-025 Kostrzyn Wlkp. info.pl@sartorius.com www.sartorius-polska.com www.sartorius.com PRAKTYKA

wana jest także w przemyśle mleczarskim do homogenizacji mleka i innych przetworów mlecznych oraz w budownictwie do homogenizacji masy ceramicznej.

Swoje atuty homogenizacja zawdzięcza współcześnie stosowanym homogenizatorom, które oprócz nowoczesnej konstrukcji wyróżniają się atrakcyjnym wyglądem, prostotą obsługi i łatwością w utrzymaniu czystości. Co jest niezwykle istotne, mogą też umożliwiać rozdrabnianie kilku próbek jednocześnie, znacznie skracając czas pracy. Homogenizatory wpływają pozytywnie na stabilność i jednorodność materiału badawczego.

#### Problemy napotykane podczas przygotowania i homogenizacji stałego materiału badawczego

Niestety, homogenizacja nie jest technika idealna i w trakcie pracy z materiałem badawczym, występującym w postaci stałej lub półpłynnej, napotykamy liczne problemy podczas ich obróbki. Jako że tkanki roślinne i zwierzęce w większości przypadków charakteryzują się różną twardością, konieczny jest wybór właściwego sposobu ich rozdrobnienia. Wybór odpowiedniego homogenizatora do pracy to jeden z dylematów, przed którymi stoi chemik analityk. Uzależniony jest on od właściwości fizycznych tkanek poddawanych homogenizacji. Jeśli rozdrabniane beda świeże tkanki miękkie lub materiał półpłynny, to wystarczy zastosować homogenizatory oparte na rozcieraniu materiału, na przykład homogenizator Dounce'a czy Potter--Elvehjema. W przypadku twardych tkanek, takich jak korzenie, gałązki, chrząstki, paznokcie czy też tkanki miękkie wcześniej zamrożone, konieczne jest stosowanie homogenizatorów nożowych, kulkowych czy też młynów. W przypadku materiału roślinnego zanim przystąpi się do homogenizacji, należy zastanowić się, którą część badanej rośliny wybrać. Najbardziej wiarygodne jest prowadzenie eksperymentu z wykorzystaniem jednorodnej części warzywa/owocu. Do rozdrobnienia można wykorzystać również całą roślinę, a otrzymany homogenat podzielić później na mniejsze porcje. Oba te sposoby pozwalają na uzyskanie dużej precyzji, jednak w drugim przypadku, ze względu na wielkość próbki, etap homogenizacji trwa zdecydowanie dłużej.

Przygotowany homogenat należy w jak najszybszym czasie poddać dalszej obróbce. Obecne w próbkach biologicznych enzymy, będące katalizatorami wielu reakcji chemicznych, przyśpieszają ich przebieg, co może niekorzystnie wpływać na prawidłowość późniejszych oznaczeń. Zachodzące na przykład zjawisko brązowienia enzymatycznego można zaobserwować w momencie, gdy pozostawimy roślinę bez skórki. Jednak jest ono szczególnie widoczne w wyniku rozdrabniania, ponieważ wtedy duża część owocu/ warzywa ma dostęp do tlenu, co przyspiesza zachodzące reakcje. Dodatkowo podczas homogenizacji należy monitorować temperaturę. Niestety, czasami, gdy rozdrabnianie trwa zbyt długo lub mamy do czynienia z wyjątkowo twardą tkanką, części tnące homogenizatora nagrzewają się i przenoszą ciepło na próbkę. Taka sytuacja może prowadzić do przegrzania materiału i termicznej degradacji substancji termolabilnych. Zbyt wysoka temperatura w konsekwencji rozkłada związki, które chcemy oznaczać. Homogenizacja powinna być zatem prowadzona w warunkach odpowiednich dla stabilności analitu, z jednoczesnym zwróceniem szczególnej uwagi na nagrzewanie próbki badanej.

Istotnym aspektem podczas prowadzenia homogenizacji jest również dobór odpowiedniego buforu, który zapewnia stałe środowisko reakcji i tym samym gwarantuje prawidłowe działanie enzymów. Z uwagi na fakt, że wiekszość tych specyficznych białek charakteryzuje optymalne pH działania, wiele z nich może w sposób nieodwracalny tracić aktywność podczas prowadzenia reakcji w środowisku "agresywnym" chemicznie. Zastosowanie odpowiedniego buforu do rozdrobnienia tkanek ułatwia dalszą optymalizację metody. Należy pamiętać, że niektóre produkty roślinne czy zwierzęce nie są bogate w wodę i wówczas w zależności od stosowanej procedury analitycznej dodaje się odpowiedniego roztworu. Jego pH dostosowywane jest do rodzaju oznaczanego związku, ponieważ anality będące przedmiotem naszego zainteresowania uwalniają się w ściśle określonych warunkach. Często uwolnione anality poddawane są dalszym reakcjom, w związku z tym niezwykle istotny jest dobór pH właściwego do prowadzonych na dalszych etapach badań reakcji. Niektóre owoce, warzywa oraz miękkie tkanki zwierzęce, które zawierają duże ilości wody, stosunkowo łatwo dają się zhomogenizować bez dodatku buforu czy innego rozpuszczalnika.

Niektóre anality mają tendencję do adsorpcji na powierzchni cząstek stałych, znajdujących się w homogenacie, bardzo często konieczne jest wprowadzenie dodatkowego kroku ich wymycia tuż po przeprowadzonej homogenizacji. W tym celu do homogenatu dodaje się rozpuszczalniki organiczne, na przykład acetonitryl, które umożliwiają uwolnienie analitów i ich oznaczenie w kolejnych etapach prowadzenia badań.

Otrzymany po homogenizacji próbek stałych homogenat powinien charakteryzować się odpowiednią gęstością. Najczęściej ma on półpłynną konsystencję, choć niekiedy w wyniku rozdrobnienia tkanek, zawierających w swojej strukturze mniejsze ilości wody, otrzymujemy gęsty homogenat. W zależności od tego, jak wygląda dalsza procedura analityczna, taka konsystencja produktu może być wadą lub zaletą. Jeżeli próbka w dalszym etapie będzie poddawana ekstrakcji, duża gęstość umożliwia bezproblemowe i dokładne jej odważenie. Natomiast w przypadku,

PRAKTYKA

gdy homogenat wykorzystywany jest bezpośrednio do reakcji (z pominięciem etapu ekstrakcji), duża jego lepkość wpływa niekorzystnie na jakość pracy. Wówczas pojawia się problem z dokładnym wymieszaniem oraz równomiernym zachodzeniem reakcji w całej objętości próbki, a tym samym małą powtarzalnością wyników. W związku z tym, stojąc przed wyborem dotyczącym czułości metody a dokładnością oznaczeń, każdy chemik analityk wybierze ten drugi wariant. Patrząc na całą procedurę przygotowania próbki, korzystniej jest ją rozcieńczyć i przeprowadzić homogenizację z użyciem buforu. W ten sposób można zminimalizować występowanie błędów oznaczeń spowodowanych niedokładnym pobraniem próbki, a także wyeliminować problem uciążliwej homogenizacji.

Bardzo istotne jest, aby przed przystąpieniem do obróbki każdej kolejnej tkanki części tnące homogenizatora były starannie i dokładnie oczyszczone. W przypadku niektórych warzyw, na przykład brokułu, drobne pączki kwiatowe dostają się do środka głowicy homogenizatora, trudno je stamtąd usunąć i w konsekwencji można łatwo zanieczyścić inne próbki.

#### Perspektywy

#### rozwoju homogenizacji

W dzisiejszych czasach dąży się do wykorzystania homogenizacji na szeroką skalę, a w warunkach laboratoryjnych do pełnej automatyzacji tej techniki. Umożliwia to zdecydowaną poprawę jakości pracy chemika analityka. W perspektywie najbliższych lat można się spodziewać pełnej robotyzacji przygotowania i analizy próbek. Rola laboranta ograniczy się tylko do wprowadzenia próbki i zaprogramowania sprzętu. Biorąc pod uwagę, że w dzisiejszych czasach dąży się do miniaturyzacji urządzeń, można się spodziewać, że niebawem rozmiar homogenizatorów ulegnie zmianie. Pojawią się homogenizatory "kieszonkowe", zachowując jednocześnie ich szeroki wachlarz zastosowań.

#### Podsumowanie

Homogenizacja jest powszechnie stosowaną techniką podczas wstępnego przygotowania do badań próbek stałych oraz półpłynnych. Charakteryzuje ją prostota obsługi i stosunkowo niskie koszty eksploatacji. Ma wiele zalet, ale jak każda technika wymaga dokładnego opracowania procedury. Skrupulatna optymalizacja wszystkich warunków homogenizacji zapobiegnie problemom, które napotyka się podczas przygotowywania próbek, oraz usprawni pracę eksperymentatora.

Marta Joanna Krawczyk, Adrianna Kamińska, Grażyna Chwatko

Katedra Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki



Bruker Polska Sp. z o.o.

## APARATURA

PRAKTYKA

naukowa i badawcza

#### Aplikacje • Sprzedaż • Serwis

- Spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego NMR
- Spektrometria paramagnetycznego rezonansu elektronowego EPR
  - Tomografia MR MRI
  - Spektrometria mas FT-ICR,
  - MALDI-TOF(/TOF), ESI-(Q)-TOF,
    - pułapki jonowe, GC-MS,
  - Spektrometria rentgenowska
     µXRF i TXRF
  - Spektrometria podczerwieni
     FT-IR, FT-NIR, RAMAN
  - Spektrometria optyczna OES
    - Analizatory CS i ON/H

think forward

www.bruker.pl



pubs.acs.org/JAFC



Article

## Estimation of Lipoyllysine Content in Meat and Its Antioxidative Capacity

Adrianna Kamińska and Grażyna Chwatko\*

Cite This: J. Agi	ric. Food Chem. 2020, 68, 10992	-10999	Read Online	
ACCESS	LII Metrics & More		Article Recommendations	s Supporting Information

**ABSTRACT:** During this research a simple, accurate, and environmentally friendly method to determine lipoyllysine and lipoic acid in meat was developed and validated. The presented approach was based on the hydrolysis of the proteins containing lipoic acid, reduction of disulfide bonds with tris(hydroxymethyl)phosphine, and precolumn derivatization of free thiol groups with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide long-term followed by HPLC separation with a diode-array detector. The method has been validated in accordance with the U.S. FDA guidelines and was linear in the range of  $0.1-10 \mu$ mol/L in concentration with  $R^2$  values  $\geq 0.9997$  for both analytes. For lipoyllysine and lipoic acid, intra- and interday precision values were lower than 10%. The intraday accuracy values ranged from 91.0% to 99.4% for lipoyllysine and from 99.1% to 107.3% for lipoic acid, whereas the interday accuracy values for lipoyllysine and lipoic acid were 92.0-95.6% and 93.5-98.8%, respectively. Additionally, in this research the antioxidant activity of lipoyllysine and reduced lipoyllysine compound using spectrophotometric method with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl was examined for the first time. The data showed that dihydrolipoyllysine exhibits stronger antioxidant capacity than lipoyllysine based on a lower value of concentration required to achieve a 50% antioxidant effect in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging test. **KEYWORDS:** antioxidants, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, high performance liquid chromatography, hydrolysis, lipoyllysine,

radical scavenging, tissue

#### INTRODUCTION

For the past few years, medical research has shown that healthy diets and long-term consumption of foods rich in antioxidants may lower oxidative stress and the occurrence of chronic diseases, such as cancer and diabetes, as well as neuro-degenerative and cardiovascular diseases.<sup>1,2</sup>

In regular and healthy people, there is an equilibrium between endogenous antioxidant defenses and the generation of reactive oxygen species (ROS) or free radicals. However, if this balance is disturbed, it can lead to oxidative stress and related damage. Consequently, oxidative stress damages proteins, lipids, and nucleic acids, thus compromising cell viability.<sup>3,4</sup> To minimize the harmful effects of free radicals, organisms are endued with a very effective antioxidant defense system. Natural antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, horseradish peroxidase) and nonenzymatic antioxidant compounds, such as vitamins E and C,  $\alpha$ -lipoic acid (LA), and glutathione, inhibit the oxidative mechanisms that lead to the development of degenerative diseases and aging.<sup>3,5</sup> Because oxidative damage of human cells increases with age, the intensified ingesting of exogenous antioxidants derived from fruits, vegetables, and meat may assist the endogenous antioxidant defense system and thus reduce the risk of chronic diseases.6

LA belongs to a group of compounds absorbed from food and it is widely known as the "universal antioxidant" and "antioxidant of antioxidants".<sup>7–9</sup> LA and dihydrolipoic acid (DHLA), which is a reduced form of LA, meet all of the criteria for a perfect antioxidant. They can easily scavenge ROS, chelate metals, and do not present any serious side effects. They can also interact with other antioxidants and can regenerate them.<sup>10,11</sup> It should be emphasized herein that despite the large number of naturally occurring antioxidants the search for new, natural compounds with antioxidant activities remains a growing research area. Numerous methods for the antioxidant activity assessment have been described in the review by Pisoschi and Negulescu.<sup>12</sup> In food and biological samples, LA occurs mainly in a protein-bound form through the amide linkage to the  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub> group of lysine and the carboxylic group of LA.8,13 The protein-bound form, lipoyllysine (LLys), plays an important role in oxidative metabolism as a part of the pyruvate dehydrogenase and  $\alpha$ ketoglutarate dehydrogenase complex, which controls the Krebs cycle, ultimately leading to the production of adenosine triphosphate.<sup>14,15</sup> Since the measurement of LLys is not an easy analytical task, only limited information exists about LLys concentration in tissues. Liberation of LA linked to proteins required the use of a hydrolysis step of the samples (often under a strong acid or alkaline conditions) and solvent extraction procedure. Therefore, this results in low recoveries because LA can experience considerable decomposition

There are several methods for LA or LLys quantification in biological tissues (Table 1), which include the colorimetric

Received:June 15, 2020Revised:September 2, 2020Accepted:September 4, 2020Published:September 4, 2020



pubs.acs.org/JAFC

Article

method	sample	analyte	linear range	recovery	LOD	LOQ	reference
colorimetric assay	animal tissues	LA	$0-100 \ \mu mol/L$	NR	NR	NR	16
enzymatic assay	animal tissues	LLys	$1-5 \ \mu mol/L$	NR	$0.1 \ \mu mol/L$	NR	17
GC-FID	chick livers, chicken eggs	LA	NR	34%	NR	NR	21
GC-FID	bacteria, cow's milk, rat liver, rat kidney	LA	0–97 $\mu$ mol/L	>87%	NR	NR	22
GC-MS	animal tissues	LA	0.05–97 µmol/L	60-70%	$0.05 \ \mu mol/L$	NR	20
GC-FDP	mouse tissue, bacterial cells	LA	20-500 ng	50-94%	50 pg	NR	19
HPLC-FLD	spinach, animal samples	LLys	$0.0155 - 1 \ \mu mol/L$	99-107%	$0.007 \ \mu mol/L$	$0.022 \ \mu mol/L$	15
HPLC-ECD	plant and animal tissue	LLys	0−2.5 µg/g	100%	NR	NR	25
HPLC-UV	enzyme hydrolysates	LLys	NR	117-120%	NR	NR	24
HPLC-DAD	liver, heart, kidney and stomach	LA LLys	$0.1-10 \ \mu mol/L$	88-101%	$0.03 \ \mu mol/L$	0.1 $\mu$ mol/L	proposed method
<sup><i>a</i></sup> NR: not reporte	d.						

Table 1. Overview of Analytical Methods, Parameters, and the Content of Lipoic Acid (LA), and Lipoyllysine (LLys) in Meat Products<sup>a</sup>

assay,<sup>16</sup> an enzymatic method,<sup>17,18</sup> gas chromatography,<sup>19–23</sup> and high performance liquid chromatography (HPLC).<sup>15,24,25</sup> However, only three HPLC methods, based on ultraviolet,<sup>24</sup> electrochemical,<sup>25</sup> and fluorescence detections,<sup>15</sup> have been developed in recent years. Although these methodologies appear to be appropriate for the detection of LLys, the utility in biological samples is not sufficient enough in terms of selectivity and sensitivity. Furthermore, it has not been determined whether LLys possesses antioxidant properties or whether it may act as a source of free LA.<sup>15,26</sup> Moreover, there is still a lack of detailed information about LLys level in animal tissues.<sup>15,17</sup> Consequently, the aim of this study was to develop a new method that would allow for the simultaneous quantification of LLys and LA in meat samples as well as to examine LLys antioxidant activity by using a spectrophotometric method with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

#### MATERIAL AND METHODS

Chemical, Reagents, and Meat Samples. All chemicals used during this study were commercially available and analytical reagent grade except for the derivatization reagent 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide (BCPB) and LLys. BBCP and LLys were synthesized according to the method previously described.<sup>14,27</sup> LA. tris-(hydroxymethyl)phosphine (THP), Pronase E from Streptomyces griseus, protease from Bacillus licheniformis (subtilisin A), DPPH, and sodium tetraborate decahydrate were received from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). HPLC grade acetonitrile (MeCN), sodium hydroxide, and boric acid were from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), while perchloric acid (PCA), sodium borohydride, and hydrochloric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Acetic acid was achieved from Chempur (Piekary Slaskie, Poland) and pure anhydrous calcium chloride from POCH (Gliwice, Poland). Deionized water was obtained from a Millipore Milli-QRG system (Millipore, Vienna, Austria).

The most commonly consumed samples of liver, heart, kidney, and stomach from cows, calves, pigs, chicken and turkey were analyzed. The studied meat samples were purchased from local markets or a local meat processing company with the exception of a beef heart and kidney, a pork stomach, and a veal heart, which were obtained from a local slaughterhouse. Tissues were kept in vacuum bags in a freezer at -20 °C until processing.

**Instrumentation.** The HPLC technique was used to separate and determine LLys and LA in meat samples. Analyses were executed on a 1220 Infinity LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, a binary pump combined with a degasser, a column oven, and a diode-array detector (DAD). Baseline separation was achieved on an analytical column Poroshell 120 C18 (75 × 4.6 mm, 2.7  $\mu$ m) (Agilent Technologies). OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Waldbronn,

Germany, Rev. C.01.05) was used for data acquisition and analysis. Hanna Instrument HI 221 pH-meter (Loveland, U.S.A.) and IKA T25 basic homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany) were used for pH sample measure and sample homogenization, respectively. The absorbance measurements were performed using an Epoll ECO 20 spectrophotometer.

**Preparation of Stock Solutions.** A stock solution of 0.1 mol/L LA was prepared in 0.1 mol/L NaOH, 0.01 mol/L LLys was prepared in 1 mol/L HCl, while 0.1 mol/L BCPB was prepared in deionized water. No noticeable change in analyte content was reported for these solutions at 4 °C by HPLC method. The working solutions were prepared daily through dilution with deionized water. Fresh solutions of THP (0.25 mol/L) and NaBH<sub>4</sub> (1 mol/L) were prepared daily in deionized water. A stock solution of 0.001 mol/L DHLA was obtained by mixing 100  $\mu$ L of 0.01 mol/L LA and 200  $\mu$ L of 1 mol/L NaBH<sub>4</sub>. The mixture was carefully stirred and heated at 40 °C for 20 min. Next, the mixture was cooled down to room temperature. After the reaction, 20  $\mu$ L of hydrochloric acid (3 mol/L) was added to the solution to decompose an excess NaBH<sub>4</sub>. At last, the mixture was diluted with deionized water to a final volume of 1 mL. Similarly, a solution of 0.001 mol/L dihydrolipoyllysine (DHLLys) was obtained.

A fresh standard stock solution of Pronase E (activity of 36 U) was obtained by mixing 1.8 mg of enzyme with 2 mL of 0.1 mol/L  $CaCl_2$  prepared in borane buffer (0.1 mol/L, pH 8). Working standard solutions of Pronase E were obtained daily by appropriate dilution of the stock solutions in 0.1 mol/L  $CaCl_2$  every day and were processed immediately. Commercially available subtilisin A is present in the form of aqueous solution and was kept at 4 °C until processing.

**Sample Preparation.** *Homogenization.* One gram of animal tissue was mechanically blended in 10 mL of 0.1 mol/L cold borate buffer at pH 8 in Falcon tubes for 30 s to 1 min (at an operating speed of 24 000 rpm) using a high-powered rotor-stator homogenizer.

*Enzymatic Hydrolysis of LA and LLys.* Two hundred microliters of each homogenate was suspended in the amount of proteases (subtilisin A and Pronase E) recommended for the selected animal tissues (see SI Table S1). The samples were then vortexed and incubated at 37 °C for 22 h in stoppered Eppendorf tubes.

Determination of LLys. After enzymatic digestion, the tissue samples were further treated with 15  $\mu$ L of 0.25 mol/L THP for 5 min to reduce -S—S— bonds. In the next step, 10  $\mu$ L of 0.1 mol/L BCPB was added to begin the derivatization reaction, during which the samples were vigorously mixed and put aside at room temperature for 15 min. To separate LA and LLys derivatives from the protein, 20  $\mu$ L of 3 mol/L PCA and 200  $\mu$ L of MeCN were added. The mixture was subsequently vortex-mixed and set aside for 5 min and finally centrifuged for 10 min (14 000×g, 4 °C). A 5  $\mu$ L solution from the above protein was transferred to the HPLC system.

**Chromatographic Analysis.** The LA and LLys derivatives were separated from other compounds by the use of mobile phase containing 2% acetic acid solution, pH 2.5, and MeCN in the gradient mode as follows: 0-6 min, 9-21% (MeCN); 6-11 min, 21-30%

Article



2-S-pyridinium derivative

Figure 1. Determination strategy for lipoyllysine. Scheme of hydrolysis of the proteins containing lipoic acid, reduction reaction equation of lipoyllysine, and conversion of dihydrolipoyllysine to 2-S pyridinium derivative.

(MeCN); 11–13 min, 30–9% (MeCN); 13–16 min, 9% (MeCN). The flow rate was 1 mL/min and the column temperature set to 25  $^{\circ}$ C. The detection wavelength was 321 nm. Identification of LLys-BCPB and LA-BCPB peaks was based on a comparison of retention times and DAD spectra with a similar set of data obtained from standard solutions.

**Analytical Method Validation.** The proposed method was validated under optimized experimental conditions in accordance with U.S. FDA guidelines.<sup>28</sup> The applied protocol involved an evaluation of the selectivity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, accuracy, precision, matrix effect, and stability of LA and LLys derivatives.

*Selectivity.* The method selectivity was evaluated after analysis of six pork liver and turkey heart homogenate samples obtained from different sources. Investigation of the potential interferences at the region assigned to chromatographic peaks of the LA and LLys derivatives determined selectivity. The procedures for sample preparation and chromatographic conditions described above were used. The peak purity test using a DAD was also executed.

Detection and Quantification Limits. The LOD and LOQ were calculated considering the parameters of the analytical curves performed for turkey heart homogenates with the use of equations: LOD = 3  $S_a/b$  and LOQ = 10  $S_a/b$ , where  $S_a$  is the standard deviation of the *y*-intercept of the calibration curve and *b* is the slope of the regression line.<sup>29</sup>

Linearity. To prepare the calibration standards for the determination of LLys and LA in meat homogenates, portions of 200 mL of turkey heart homogenate were each transferred to tubes. To each tube, increasing amounts of working standard solution of LLys and LA was added. The final concentrations of analytes were between 0.1 and 10  $\mu$ mol/L homogenate. The calibration standards were then hydrolyzed and processed in triplicate, according to procedures presented in Sample Preparation.

The peak heights of LLys and LA as 2-S-pyridinium derivatives were plotted versus the analyte concentration and the equations of the calibration curves were obtained using least-squares linear regression.

*Precision and Accuracy.* Accuracy and precision of the analytical method were determined by the addition of known amounts of LLys and LA to turkey heart. Three concentrations in the entire range of the calibration curves were studied: one near the LOQ, one near the center and one near the upper end of the calibration curves. The enriched meat samples were handled according to the analytical procedure presented in Sample Preparation. For an intraday study, the analyses were performed on five turkey heart samples on the same

#### Journal of Agricultural and Food Chemistry

day, and for an interday study the analyses were performed in triplicate on five consecutive days.

*Matrix Effect.* The matrix effect was studied with calibration standards prepared in standard aqueous solutions and in meat homogenate. The curves of aqueous solutions were prepared as described for the linearity assessment. Then the slopes of the two calibration curves were compared for each of the analytes studied. The matrix effect was evaluated using the following equation<sup>30</sup>

The matrix effect = 
$$\left[\left(\frac{A}{B}\right) - 1\right] \times 100$$
 (1)

where A and B are the slope of calibration curves in matrix and in aqueous solution, respectively.

Stability of the 2-S-Pyridinium Derivatives. The short-term stability of 2-S-pyridinium derivatives of LLys and LA in turkey heart homogenate were tested. Ten nanomoles/milliliter of LLys and LA in turkey heart homogenate were prepared and processed according to the procedure described in Sample Preparation. Acidified solutions from the above protein containing MeCN (n = 2) were placed in an autosampler at room temperature and analyzed at time zero and every hour for 28 h.

**DPPH Radical Scavenging Activity.** The antioxidant activities for different standard compounds (LA, LLys, DHLA, and DHLLys) were measured using the DPPH free radical scavenging assay according to the modified methods reported by Mishra et al. and Madawala et al.<sup>7,31</sup> Briefly, 3 mL of the antioxidant solution was mixed with 3 mL of 60  $\mu$ mol/L methanolic solution of DPPH. The reaction tubes, in pairs, were shaken vigorously and left in the dark at room temperature for 30 min. The control sample was a methanolic solution of DPPH with deionized water. The decrease in absorbance was measured spectrophotometrically at 520 nm. All measurements were done under dim light. DPPH radical scavenging capacity was calculated using the following equation<sup>31</sup>

DPPH radical scavenging activity (%) = 
$$\left(\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100$$
 (2)

 $A_0$  and  $A_1$  are the absorbance at 520 nm of the DPPH radical in the absence and presence of antioxidant, respectively.

Different sample concentrations (expressed as the number of moles of antioxidant/mol DPPH) were used to determine the antiradical curves for calculating the  $EC_{50}$  values defined as the amount of antioxidant required to decrease the initial DPPH concentration by 50%. The curves were plotted referring to concentrations on the *x*-axis and their percentage of DPPH radical remaining against the sample concentration on the *y*-axis. The  $EC_{50}$  value ( $\mu$ mol/L) was calculated using the linear interpolation method.

#### RESULTS AND DISCUSSION

**Sample Preparation.** Sample preparation has an impact on nearly all of the subsequent analysis steps and is hence crucial for the unequivocal identification, confirmation, and quantification of analytes. This is more critical for analytes present at trace content in complex matrices.

It was found that LA in food and biological samples occurs mainly in a protein-bound form. As a result, the measurement of LLys is not an easy analytical task and proper optimization of the sample preparation procedure is essential before their assay. In earlier studies, applying strong acid or alkaline conditions to liberate LA from the samples, followed by solvent extraction from the hydrolysate resulted in low recoveries because LA was considerably decomposed. On the other hand, GC methods mentioned in the review by Kataoka<sup>26</sup> offered the possibility to determine the sum of the free LA and LLys, but it was difficult to distinguish the free LA from the protein-bound LA. To counteract the above difficulties, the application of an enzymatic hydrolysis is recommended. Several enzymes, such as Pronase E and subtilisin A, were used to determine the protein-bound LA and free LA. Different incubation times and amounts of enzymes were tested to obtain the most favorable conditions. According to the literature data,<sup>32</sup> enzymatic cleavage should be carried out in the presence of calcium chloride in the pH range 5.0 to 9.0. Under these conditions, enzymes are highly stable, and the rate of hydrolysis is considerably higher. Our studies show that when the reaction was carried out at a physiological temperature of 37 °C and under mild alkaline conditions (pH 8.0), the reaction reached a plateau after 22 h (data not shown) using the appropriate amounts of proteases (subtilisin A and Pronase E), which were recommended for the selected animal tissue (SI Table S1). In the next step, the disulfide bonds (-S-S-) in free LA and LLys liberated during the enzymatic digestion were reduced with THP to their thiol forms (-SH) and derivatized with BCPB (Figure 1). Investigations on the reduction conditions showed the best yield was obtained when the reaction proceeded at room temperature for 5 min. We observed that the use of THP as a reducing agent showed many advantages over another studied tris(2-carboxyethyl)phosphine reagent.<sup>14</sup> In particular, by using THP the reduction reaction was carried out faster and was characterized by a high efficiency. The derivatization reaction occurred under mild conditions (room temperature, pH 8, 15 min). Additionally, the derivatization conditions of the proposed method were favorable compared to another previously published study utilizing fluorescence detection.<sup>15</sup> The reduced LLys was fluorescently labeled with ammonium 4-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-7-sulfonate at 60 °C for 1 h, whereas the results of the proposed method indicated total derivatization occurred within 15 min at room temperature.

As with plasma samples,<sup>33</sup> a crucial step in the preparation of animal tissues is the separation of analytes from the protein. Meat tissue is difficult to analyze because of its high content of unsaturated fatty acids. Moreover, LA and LLys are amphiphilic molecules which can interact with the surface of proteins. In the final step of sample preparation, a deproteinization procedure has been used. However, as evidenced by recent studies,33 acidic deproteinization of plasma proteins markedly adsorbs LA. As such, the analyte can be accidentally removed with the precipitated proteins and the concentration of LA in the solution becomes lower than expected. In this study, we also observed a lower LLys and LA concentration in the final analytical solutions for meat homogenates deproteinized with PCA compared to the standard solution. The recoveries of LLys and free LA were calculated using the following formula

Recovery (%) = 
$$\frac{\text{analyte amount in homogenate sample}}{\text{analyte amount in standard solution}} \times 100$$
 (3)

The recovery values for LLys and free LA were 80.7% and 44.3%, respectively, meaning that approximately 20% of LLys and 56% of free LA were adsorbed on proteins. Better results were obtained when a mixture of PCA and MeCN was used; the recoveries reached 100%. Hence, for deproteinization of meat homogenates, the additional mixture of PCA and MeCN is recommended during the determination of LLys and LA.

**Chromatographic Analysis.** Different chromatographic conditions were carefully studied and optimized to achieve good separation of the 2-S-pyridinium derivatives of LLys and

LA from each other and from the endogenous matrix components within a suitable run time. For this purpose, several parameters, such as the amount of organic modifier, the acetic acid concentration, and various gradient elution, were tested. The optimum HPLC conditions were described in Chromatographic Analysis. Under the chosen chromatographic conditions, LLys showed a retention time of 6.45 ( $\pm 0.04$ ; n = 6) min and LA showed a retention time of 8.79 ( $\pm 0.06$ ; n = 6) min. The representative chromatogram of LLys and LA in the turkey heart homogenate is shown in Figure 2. The total time



Figure 2. Representative chromatograms of turkey heart homogenate (blue line) and turkey heart homogenate spiked with 5  $\mu$ mol/L of LLys and LA (green line). Concentrations of LA and LLys in turkey heart homogenate were 0.12 and 0.88  $\mu$ mol/L, respectively.

of the analytical run was 16 min. Before analyzing the samples, six consecutively replicated analyses of the meat were assessed in order to investigate the suitability parameters including the retention factor, the asymmetry factor, and the number of theoretical plates. The results showed a satisfactory system performance. The retention factors for each analyte under the established conditions were 5.91 for LLvs-BCPB and 8.46 for LA-BCPB, both of which were in the ideal range of 2 < retention factor < 10. The efficiency of the chromatographic column was expressed as the number of theoretical plates. The high number of theoretical plates (37 829 for LLys-BCPB and 71 878 for LA-BCPB) and the correct values of the peak asymmetry factors (0.81 for LLys-BCPB and 0.83 for LA-BCPB) corresponded to good column efficiency, which generated narrow peaks. As can be seen in the chromatogram, optimization of the separation conditions leads to a good peak symmetry and excellent resolution for LLys-BCPB and LA-BCPB. Many peaks were detected on the chromatogram which

seem to be derived from endogenous compounds containing thiol group(s) but they do not interfere with studied analytes.

**Analytical Method Validation.** *Selectivity.* Selectivity is the ability to accurately measure the analyte of interest in the presence of the additional components in the sample matrix. To demonstrate the selectivity of our method, six different samples of pork liver and turkey heart homogenates with and without spikes in LLys and LA were compared. HPLC analysis of the derivatized hydrolysates showed no interfering peaks with the signals obtained for the analytes. LLys-BCPB and LA-BCPB peaks were well separated from other peaks of endogenous and extraneous substances, as depicted in the representative RP-HPLC chromatograms in Figure 2. Moreover, examination of peak purity showed that peaks assigned to LLys and LA derivatives were not attributable to more than one component.

Detection and Quantification Limits. The LODs for LLys and LA were 0.1  $\mu$ g/g (0.03  $\mu$ mol/L) and 0.06  $\mu$ g/g (0.03  $\mu$ mol/L), respectively, whereas LOQs for LLys and LA were 0.33  $\mu$ g/g (0.1  $\mu$ mol/L) and 0.21  $\mu$ g/g (0.1  $\mu$ mol/L), respectively. The LOD value achieved with this assay for LLys was worse than obtained by the HPLC method with fluorescence detection<sup>15</sup> and three times lower than the previously reported method.<sup>17</sup> The LOD for LA was comparable with the previously published GC method with MS detection<sup>20</sup> as was presented in Table 1.

*Linearity.* For studied meat samples, seven-point calibration plots were built for LLys and LA in triplicate. A linear relation between peak height and concentration of analyte was observed in the tested ranges for LLys and LA in all meat homogenates. As the slopes of the calibration curves were not statistically and significantly different, the validation method was performed for only one tissue, turkey heart. For turkey heart homogenate samples, the linear regression equations were y = 0.348x + 0.2945 for LLys and y = 0.4842x + 0.0915 for LA. The coefficient of correlation ( $R^2$ ) of the analytical curves was 0.9997 and 0.9999 for LLys and LA, respectively.

Precision and Accuracy. Three concentrations, that is, 0.1, 1, 10  $\mu$ mol/L, were used to prove the precision and accuracy of the developed method. The precision was expressed as the relative standard deviation (RSD), whereas the accuracy was expressed as the percentage of analyte recovered. Accuracy was calculated using the equation

Accuracy (%)

$$= \frac{\text{measured amount} - \text{endogenuous content}}{\text{added amount}} \times 100$$

(4)

Table 2. Estimation of the Intraday and Interday Precision and Accuracy for Lipoyllysine (LLys) and Lipoic Acid (LA) in Meat Samples (n = 5)

analyte add	addad (umal/L)	founded $\pm$ SD ( $\mu$ mol/L)		precision (%)		accuracy (%)	
		intraday	interday	intraday	interday	intraday	interday
	0.1	$1.06 \pm 0.05$	$1.03 \pm 0.6$	4.7	6.1	91.0	94.8
LLys	1	$1.86 \pm 0.07$	$1.76 \pm 0.07$	3.9	4.1	97.7	92.0
	10	$10.82 \pm 0.44$	$10.40 \pm 0.43$	4.1	4.1	99.4	95.6
	0.1	$0.36 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.03$	3.3	9.2	99.1	95.4
LA	1	$1.23 \pm 0.05$	$1.14 \pm 0.07$	4.2	6.3	107.3	98.8
	10	$10.19 \pm 0.43$	$9.50 \pm 0.55$	4.2	5.8	100.3	93.5

#### Journal of Agricultural and Food Chemistry

Results of intra- and interday accuracy and precision are summarized in Table 2. The values obtained in our study meet the acceptance criteria since RSD did not exceed 20% for LOQ and 15% at all concentration levels.<sup>28</sup> Moreover, the results obtained indicate that our method provides very good accuracy and precision. Therefore, this method can improve upon the shortcomings associated with poor accuracy and precision values for LLys in animal tissues, which were formerly obtained by the HPLC methods with fluorescence and ultraviolet detections.<sup>15,24</sup>

The Matrix Effect. Sample matrix effect was studied by comparing the slopes of the calibration curves of the standard aqueous solutions with the slopes obtained when analyzing the spiked samples. The matrix effect for LLys and LA was lower than  $\pm 20\%$ , which denotes the absence of any matrix effect and confirms that the meat homogenate matrix does not interfere with signals of the analytes.

Stability of the 2-S-Pyridinium Derivatives. As we have previously demonstrated,<sup>33</sup> LA-BCPB in plasma was stable at room temperature for 4 h. However, in meat homogenate samples the 2-S-pyridinium derivatives of both LA and LLys were found to be stable at ambient temperature for a much longer time. No significant change in peak height was noted when the acidified samples containing MeCN were kept in the autosampler for 24 h (data not shown). The residual percentages of LLys and LA after this time were 104.5% and 106.4%, respectively.

**DPPH Radical Scavenging Activity.** DPPH is commonly used to estimate the free radical scavenging ability of pure compounds. It is a stable free radical, which possesses an unpaired valence electron on one atom of the nitrogen bridge.<sup>34</sup> By accepting a hydrogen atom from an antioxidant, DPPH is transformed into DPPH-H and the color of the solution changes from purple to yellow with an associated decrease in absorbance at 515–520 nm.<sup>31</sup> This color change is measured spectrophotometrically and used to estimate the parameters for antioxidant properties.

In the present study, LA, LLys, and their reduced forms, that is, DHLA and DHLLys, were analyzed to evaluate the free radical scavenging capacity of these compounds. Each compound was tested in the range of  $2.5-60 \ \mu mol/L$ . The concentrations were chosen based on their antiradical capacity toward the DPPH radical based on pilot determinations and literature data.

Results suggest that LA and LLys did not scavenge the DPPH radical, even at higher concentrations (200-2000  $\mu$ mol/L), despite LA being used in numerous *in vivo* studies with promising results and being known as the "universal antioxidant". In the case of LLys, it has not been clearly identified whether LLys possesses any antioxidant activity or whether it acts as a source of free LA.<sup>15,26</sup> Nevertheless, in our studies we observed that DHLLys can scavenge DPPH radical (Figure 3), although at a lower scavenging capacity, as compared to DHLA. DHLA and DHLLys have stronger antioxidant activity due to their two free thiol (-SH) groups that can be readily oxidized back to their dithiolanes.<sup>35</sup> EC<sub>50</sub> values for DHLA and DHLLys were calculated as 0.076  $\mu$ moles DHLA/ $\mu$ moles DPPH (EC<sub>50</sub>, 4.56  $\mu$ mol/L) and 0.094  $\mu$ moles DHLLys/ $\mu$ moles DPPH (5.64  $\mu$ mol/L), respectively. Thus, the measured EC<sub>50</sub> for DHLA is lower than the earlier reported value of 0.39.

Application of the Method. The developed method was applied to monitor LLys and LA concentrations in five



**Figure 3.** DPPH radical reduction (%) as a function of molar ratio of (a) DHLA/DPPH free radical; (b) DHLLys/DPPH free radical.

different cow, calf, pig, chicken, and turkey samples (including liver, heart, kidney, and stomach). Heart, liver, and kidney showed the highest levels of LLys and LA among all of the examined tissues. The mean amounts of LLys were in the range of 2.11–3.99  $\mu$ g/g for heart, 0.56–1.17  $\mu$ g/g for liver, and 0.71–1.40  $\mu$ g/g for kidney, whereas the amounts of LA ranged from 0.22 to 0.55  $\mu$ g/g for heart, from 0.38 to 0.51  $\mu$ g/ g for liver, and from 0.14 to 0.50  $\mu$ g/g for kidney. LLys was also found in cow and pig stomachs, while LA was only found in chicken stomachs. Results of LA and LLys concentrations in all assayed samples are shown in Table 3. Considering our results described above and the available literature data, it may be concluded that LLys content is high in metabolically active tissues, which contain a high population of mitochondria.<sup>30</sup> The tissue level of free LA was relatively low, if present at all. This indicates that proteolytic enzymes do not effectively cleave an amide bond between LA and a protein lysine. Therefore, after digestion, LA is absorbed as LLys.<sup>17</sup> The concentrations of LA and LLys also seem to be animal species dependent. In chicken meat, the lowest amounts of LA and LLys were detected, whereas in red meat the concentrations of LA and LLys were significantly higher. It seems that the high levels of LA and LLys in tissues such as heart, liver, and kidney may provide an antioxidant defense system for these organs.

We observed some differences in the LLys concentrations found in tissue samples examined using the present method and other previously reported methods.<sup>17,25</sup> This discrepancy may be due to the physical state of the sample (e.g., fresh sample or acetone powder), the animal species (e.g., bovine, calves, pigs, chicken, and turkey), and differences in nutrition, age, sex, and, primarily, the methods used (e.g., enzymatic, GC, ECD). The LLys contents in bovine tissue acetone powders by the HPLC-ECD method<sup>25</sup> were determined for kidney, heart, and liver tissues and were from 0.86 to 2.64  $\mu$ g/g. The values obtained in the present study are somewhat higher compared to these values as well as lower in comparison to the values previously published utilizing the enzymatic method (from 2.14 to 4.38  $\mu$ g/g for the same tissues).<sup>17</sup>

The determination of the LLys in the homogenates of calf, pig, chicken, and turkey samples (liver, heart, kidney, and stomach) has not yet been reported and seems to be the first example.

In summary, a new, simple and selective method for the simultaneous quantification of LLys and LA in meat using the HPLC technique with DAD detection has been described and validated. To the best of our knowledge, the present article is currently the first report in which the examination of LLys antioxidant activity through a spectrophotometric method with DPPH was performed. Our new approach includes a handy analytical protocol for the determination of LLys and LA,

pubs.acs.org/JAFC

Article

tissues	turkey $\mu$ g/g tissue	calf $\mu$ g/g tissue	caw $\mu$ g/g tissue	pig $\mu$ g/g tissue	chicken $\mu$ g/g tissue
LLys					
heart	$3.99 \pm 0.01$	$3.32 \pm 0.01$	$3.12 \pm 0.05$	$3.46 \pm 0.03$	$2.11 \pm 0.00$
liver	n.d.	$0.56 \pm 0.00$	$0.97 \pm 0.01$	n.d.	$1.17 \pm 0.01$
kidney	n.d.	$0.71 \pm 0.01$	$1.40 \pm 0.01$	$0.94 \pm 0.01$	$0.72 \pm 0.01$
stomach	n.d.	n.d.	$1.59 \pm 0.02$	$0.54 \pm 0.01$	n.d.
LA					
heart	$0.36 \pm 0.01$	$0.22 \pm 0.01$	$0.28 \pm 0.04$	$0.55 \pm 0.01$	$0.27 \pm 0.01$
liver	n.d.	$0.38 \pm 0.00$	n.d.	n.d.	$0.51 \pm 0.00$
kidney	n.d.	$0.14^{b} \pm 0.03$	$0.50 \pm 0.05$	$0.41 \pm 0.00$	$0.32 \pm 0.01$
stomach	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	$0.41 \pm 0.03$
<sup><i>a</i></sup> n.d., not detected.	<sup>b</sup> Concentration below LC	00.			

which is characterized by the following advantages over previous methodologies: (i) it does not require the use of drastic hydrolysis conditions to release LA from the samples, which may result in partial LA degradation and low recovery; (ii) the derivatization reaction takes place at room temperature as opposed to the higher temperature required in thermally initiated derivatization; (iii) the short chromatographic run time reduces the consumption of solvents and generates small waste amounts; (iv) the developed analytical scheme is able to determine LLys and LA in meat samples with adequate selectivity at concentration levels less than 1  $\mu$ g/g, without requiring the use of extraction for cleanup and preconcentration; (v) the validation parameters are within the criteria of analysis for biological samples; (vi) this method is easily accessible to a majority of analytical laboratories and does not require particularly expensive maintenance and thus represents an excellent analytical tool alternative for more complicated chromatographic instruments (HPLC-FLD, HPLC-ECD).

The determination of LLys and LA in biological and food samples is important in the study of biochemical reactions, nutritional and pharmacodynamic studies, and the diagnosis of certain types of diseases. Furthermore, there is still a lack of knowledge of the LLys role in the organism and its pharmacological benefits. Thus, in our opinion it was interesting to get more detailed quantitative data about its content in meat.

We believe that our innovative studies on the antioxidant properties of LLys may pave the way for the new generation of pharmaceutical preparations. This study is also expected to benefit researchers working with new antioxidants.

#### ASSOCIATED CONTENT

#### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c03778.

(Table S1) The recommended amounts of proteases (subtilisin A and Pronase E) added to the studied animal tissues to determine content of LA and LLys (PDF)

#### AUTHOR INFORMATION

#### **Corresponding Author**

Grażyna Chwatko – Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, University of Lodz, 90-236 Łódź, Poland; orcid.org/0000-0001-9247-5131; Phone: +48 426355843; Email: grazyna.chwatko@chemia.uni.lodz.pl; Fax: +48 426355832

#### Author

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.0c03778

#### **Author Contributions**

A.K. designed the experiment, collected samples, performed the experiment, analyzed the data, and wrote original draft of the manuscript; G.C. collected samples, gave critical comments and edited the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### Funding

This work was financially supported by Grant 2016/23/N/NZ9/00071 from the National Science Centre, Poland.

#### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ABBREVIATION USED

BCPB, 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide; DHLA, dihydrolipoic acid; DHLLys, dihydrolipoyllysine; DPPH, 2,2diphenyl-1-picrylhydrazyl; LA,  $\alpha$ -lipoic acid; LLys, lipoyllysine; MeCN, acetonitrile; PCA, perchloric acid; ROS, reactive oxygen species; THP, tris(hydroxymethyl)phosphine

#### REFERENCES

(1) Chen, Z.; Bertin, R.; Froldi, G. EC50 Estimation of Antioxidant Activity in DPPH Assay Using Several Statistical Programs. *Food Chem.* **2013**, *138*, 414–420.

(2) Jung, S.; Smith-Warner, S.; Willett, W.; Wang, M.; Wu, T.; Jensen, M.; Hankinson, S.; Eliassen, A. Healthy Dietary Patterns and Oxidative Stress as Measured by Fluorescent Oxidation Products in Nurses' Health Study. *Nutrients* **2016**, *8*, 587.

(3) Ahmed, R. G. Is There a Balance between Oxidative Stress and Antioxidant Defense System during Development? *Med. J. Islam. World Acad. Sci.* 2005, 15, 55–63.

(4) Sharma, N. Free Radicals, Antioxidants and Disease. *Biol. Med.* 2014, 6, 2–6.

(5) Diamanti-Kandarakis, E.; Papalou, O.; Kandaraki, E. A.; Kassi, G. Mechanisms in Endocrinology: Nutrition as a Mediator of Oxidative Stress in Metabolic and Reproductive Disorders in Women. *Eur. J. Endocrinol.* **201**7, *176*, R79–R99.

(6) Mostafa Abd El-Aal, H. A. H. Lipid Peroxidation End-Products as a Key of Oxidative Stress: Effect of Antioxidant on Their Production and Transfer of Free Radicals. In *Lipid Peroxidation*; Catala, A., Ed.; InTech: London, 2012; pp 63–88..

(7) Madawala, S. R. P.; Andersson, R. E.; Jastrebova, J. A.; Almeida, M.; Dutta, P. C. Novel Conjugates of 1,3-Diacylglycerol and Lipoic

Adrianna Kamińska – Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, University of Lodz, 90-236 Łódź, Poland

Acid: Synthesis, DPPH Assay, and RP-LC-MS-APCI Analysis. J. Lipids 2011, 2011, 1–10.

(8) Motafakkerazad, R.; Wang, M.; Wada, N.; Matsugo, S.; Konishi, T. Simple HPLC Evaluation of Lipoamidase Activity in Tissue Using a Newly Synthesized Fluorescent Substrate, Dansyl- $\alpha$ -Lipoyllysine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2011**, *57*, 377–382.

(9) Turkowicz, M.; Jastrzebska, I.; Hryniewicka, M.; Kotowska, U.; Gudalewska, D.; Karpińska, J. Investigation of Lipoic Acid – 4-Methoxybenzyl Alcohol Reaction and Evaluation of Its Analytical Usefulness. *Food Chem.* **2020**, 309, 125750.

(10) Li, Y.; Zhao, Y.; Yu, W.; Jiang, S. Scavenging Ability on ROS of Alpha-Lipoic Acid (ALA). *Food Chem.* **2004**, *84*, 563–567.

(11) Rochette, L.; Ghibu, S.; Muresan, A.; Vergely, C. Alpha-Lipoic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential in Diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *93*, 1021–1027.

(12) Pisoschi, A. M.; Negulescu, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem. Anal. Biochem.* 2012, 01, 1–10.

(13) Durrani, A. I.; Schwartz, H.; Nagl, M.; Sontag, G. Determination of Free  $\alpha$ -Lipoic Acid in Foodstuffs by HPLC Coupled with CEAD and ESI-MS. *Food Chem.* **2010**, *120*, 1143–1148.

(14) Kamińska, A.; Głowacka, I. E.; Pasternak, B.; Głowacki, R.; Chwatko, G. The First Method for Determination of Lipoyllysine in Human Urine after Oral Lipoic Acid Supplementation. *Bioanalysis* **2019**, *11*, 1359–1373.

(15) Satoh, S.; Shindoh, M.; Min, J. Z.; Toyo'oka, T.; Fukushima, T.; Inagaki, S. Selective and Sensitive Determination of Lipoyllysine (Protein-Bound  $\alpha$ -Lipoic Acid) in Biological Specimens by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *618*, 210–217.

(16) Garganta, C. L.; Wolf, B. A Colorimetric Assay of Lipoyl-N-e-Lysine Hydrolysis Activity Using 2,6-Dibromoquinone-4-Chlorimide. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 177–184.

(17) Akiba, S.; Matsugo, S.; Packer, L.; Konishi, T. Assay of Protein-Bound Lipoic Acid in Tissues by a New Enzymatic Method. *Anal. Biochem.* **1998**, 258, 299–304.

(18) Konishi, T.; Handelman, G.; Matsugo, S.; Mathur, V. V.; Tritschler, H. J.; Packer, L. Amplified Determination of Lipoyl Groups by Lipoamide Dehydrogenase in the Presence of Oxidized Glutathione. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *38*, 1155–1161.

(19) Kataoka, H.; Hirabayashi, N.; Makita, M. Analysis of Lipoic Acid in Biological Samples by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **1993**, *615*, 197–202.

(20) Mattulat, A.; Baltes, W. Determination of Lipoic Acid in Meat of Commercial Quality. Z. Lebensm.-Unters. Forsch. **1992**, 194, 326–329.

(21) Shih, J. C. H.; Steinsberger, S. C. Determination of Lipoic Acid in Chick Livers and Chicken Eggs during Incubation. *Anal. Biochem.* **1981**, *116*, 65–68.

(22) White, R. H. A Gas Chromatographic Method for the Analysis of Lipoic Acid in Biological Samples. *Anal. Biochem.* **1981**, *110*, 89–92.

(23) White, R. H.; Bleile, D. M.; Reed, L. J. Lipoic Acid Content of Dihydrolipoyl Transacylases Determined by Isotope Dilution Analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *94*, 78–84.

(24) Hayakawa, K.; Oizumi, J. Determination of Lipoyllysine Derived from Enzymes by Liquid Chromatography. J. Chromatogr., Biomed. Appl. **1989**, 490, 33–41.

(25) Lodge, J.; Youn, H.-D.; Handelman, G.; Konishi, T.; Matsugo, S.; Mathur, V. V.; Packer, L. Natural Sources of Lipoic Acid: Determination of Lipoyllysine Released from Protease-Digested Tissues by High Performance Liquid Chromatography Incorporating Electrochemical Detection. *J. Appl. Nutr.* **1997**, *49*, 3–11.

(26) Kataoka, H. Chromatographic Analysis of Lipoic Acid and Related Compounds. J. Chromatogr., Biomed. Appl. **1998**, 717, 247–262.

(27) Bald, E.; Sypniewski, S.; Drzewoski, J.; Stępień, M. Application of 2-Halopyridinium Salts as Ultraviolet Derivatization Reagents and Solid-Phase Extraction for Determination of Captopril in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **1996**, *681*, 283–289.

(28) FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Available online: https://www.fda.gov/files/drugs/published/ Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf (accessed on 29 May 2020).

(29) Ravichandran, V.; Shalini, S.; Sundram, K.; Harish, R. Validation of Analytical Methods – Strategies & Importance. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2010**, *2*, 18–22.

(30) Zhang, R.; Tan, Z.; Zhao, J.; Wen, Y.; Fan, S.; Liu, Ch Determination of pyrethroid residues in herbal tea using temperaturecontrolled ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction by high performance liquid chromatography. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4709.

(31) Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N. K. Estimation of Antiradical Properties of Antioxidants Using DPPH Assay: A Critical Review and Results. *Food Chem.* **2012**, *130*, 1036–1043.

(32) Sweeney, P. J., Walker, J. M. Pronase EC (3.4.24.4). In *Enzymes of Molecular Biology*; Burrell, M. M., Ed.; Methods in molecular biology; Humana Press: Totowa, New Jersey, 1993; pp 271–276.

(33) Chwatko, G.; Krawczyk, M.; Iciek, M.; Kamińska, A.; Bilska-Wilkosz, A.; Marcykiewicz, B.; Głowacki, R. Determination of Lipoic Acid in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Arabian J. Chem.* **2019**, *12*, 4878– 4886.

(34) Sharma, O. P.; Bhat, T. K. DPPH Antioxidant Assay Revisited. Food Chem. 2009, 113, 1202-1205.

(35) Lim, S.; Choi, A.-H.; Kwon, M.; Joung, E.-J.; Shin, T.; Lee, S.-G.; Kim, N.-G.; Kim, H.-R. Evaluation of Antioxidant Activities of Various Solvent Extract from Sargassum Serratifolium and Its Major Antioxidant Components. *Food Chem.* **2019**, *278*, 178–184.

(36) Motafakkerazad, R.; Wang, M.; Wada, N.; Matsugo, S.; Konishi, T. Simple HPLC Evaluation of Lipoamidase Activity in Tissue Using a Newly Synthesized Fluorescent Substrate, Dansyl- $\alpha$ -Lipoyllysine. J. Nutr. Sci. Vitaminol. **2011**, 57, 377–382.

### Supporting Information

## Estimation of lipoyllysine content in meat and its antioxidative capacity

Adrianna Kamińska and Grażyna Chwatko\*

Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, University of Lodz, 163 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland \*Corresponding author. Email: <u>grazyna.chwatko@chemia.uni.lodz.pl</u>, Phone: +48 426355843, Fax: +48 426355832.

**Table S1.** The recommended amounts of proteases (subtilisin A and pronase E) added to the studied animal tissues to determine content LA and LLys.

Comple	Activity of	Activity of Volume of A		Volume of
Sample	<b>Pronase E</b>	Pronase E	subtilisin A	subtilisin A
LLys				
Turkey heart	9 U	10 µL	1 U	0.7 µL
Calf heart	9 U	10 µL	1 U	0.7 µL
liver	8 U	10 µL	2 U	1.5 μL
kidney	4 U	10 µL	6 U	4.4 µL
Beef heart	8 U	10 µL	2 U	1.5 μL
liver	24 U	10 µL	16 U	11.7 μL
kidney	36 U	10 µL	4 U	2.9 μL
stomach	8 U	10 µL	2 U	1.5 μL
Chicken heart	8 U	10 µL	2 U	1.5 μL
liver	5 U	10 µL	5 U	3.7 μL
kidney	4 U	10 µL	6 U	4.4 μL
Pig heart	8 U	10 µL	2 U	1.5 μL
kidney	12 U	10 µL	28 U	20.5 μL
stomach	8 U	10 µL	2 U	1.5 μL
LA				
Turkey heart	9 U	10 µL	1 U	0.7 µL
Calf heart	9 U	10 µL	1 U	0.7 µL
liver	8 U	10 µL	2 U	1.5 μL
kidney	9 U	10 µL	1 U	0.7 µL
Beef heart	8 U	10 µL	2 U	1.5 μL
kidney	36 U	10 µL	4 U	2.9 µL
Chicken heart	8 U	10 µL	2 U	1.5 μL
liver	8 U	10 µL	2 U	1.5 µL
kidney	4 U	10 µL	6 U	4.4 µL
stomach	10 U	10 µL	10 U	7.3 μL
Pig heart	8 U	10 µL	2 U	1.5 µL
kidney	3 U	10 µL	3 U	2.2 μL

WIADOMOŚCI 2016, 70, 11-12 *chemiczne* PL ISSN 0043-5104

## DERYWATYZACJA CHEMICZNA W WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

## THE CHEMICAL DERIVATIZATION IN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

## Adrianna Kamińska\*, Marta Joanna Krawczyk, Grażyna Chwatko

Katedra Chemii Środowiska, Uniwersytet Łódzki ul. Pomorska 163, 90-236 Łódź \*e-mail: adka367@interia.eu

Abstract Wykaz stosowanych skrótów Wprowadzenie

1. Techniki derywatyzacji

2. Derywatyzacja przedkolumnowa

2.1. Derywatyzacja przez grupę aminową

- 2.2. Derywatyzacja przez grupę sulfhydrylową
- 2.3. Derywatyzacja przez grupę hydroksylową
- 2.4. Derywatyzacja przez grupę karboksylową
- 2.5. Derywatyzacja przez grupę aldehydową
- 2.6. Inne sposoby derywatyzacji analitu
- 3. Derywatyzacja pokolumnowa
  - 3.1. Derywatyzacja przez grupę aminową
  - 3.2. Derywatyzacja z wykorzystaniem nanocząstek
  - 3.3. Derywatyzacja przez grupę sulfhydrylową
  - 3.4. Inne sposoby derywatyzacji analitu

4. Derywatyzacja w kolumnie

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



mgr Adrianna Kamińska ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w roku 2015. Pracę magisterską zatytułowaną "Oznaczanie siarki kwasowo labilnej techniką HPLC" obroniła w Katedrze Chemii Środowiska. Obecnie jest słuchaczką II roku studiów doktoranckich prowadzonych na Wydziale Chemii UŁ. Jednym z jej głównych zainteresowań naukowych jest opracowywanie nowatorskich metod analitycznych, umożliwiających śledzenie metabolizmu biologicznie ważnych związków siarki stosowanych w prewencji chorób cywilizacyjnych.



**mgr Marta Joanna Krawczyk** jest doktorantką na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Tytuł magistra chemii ze specjalizacją Chemia i nanotechnologia nowoczesnych materiałów uzyskała w roku 2013 za pracę zatytułowaną "Wykorzystanie izotachoforezy do oznaczania anionów nieorganicznych w produktach kosmetycznych". Jej praca naukowa obejmuje badania przemian związków siarki w próbkach biologicznych.



**dr hab. Grażyna Chwatko** od 1996 roku jest zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Pacę doktorską na temat "Wyznaczanie statusu redox tioli w osoczu krwi ludzkiej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej" obroniła w roku 2002. Roczny staż podoktorski, związany z badaniem biochemicznych aspektów aterogennego działania homocysteiny, odbyła w New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, USA. W 2014 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych

po przedstawieniu rozprawy na temat: "Analiza próbek biologicznych na zawartość metabolicznie spokrewnionych związków siarki". Jej zainteresowania naukowe obejmują opracowywanie nowych metody wykrywania i oznaczania związków siarki w próbkach biologicznych oraz zastosowanie tych metod do monitorowania przemian metabolicznych w organizmach, zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych.

#### ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is a method used to determine inorganic and organic substances in biological samples. Nevertheless, many analytes cannot be detected using HPLC method, because they do not contain a necessary chromophoric or fluophoric groups. Derivatization is the solution of this problem. This process can be defined as a conversion of analyte to corresponding derivative which possesses in its structure a moiety compatible with suitable detector [1, 2]. Reagent responsible for conversion of analyte to a derivative needs to meet a lot of requirements. It needs to be selective e.g. to react only with analysed substances and it should not generate by-products. The derivatization reagent should react rapidly, quantitatively, at lowest possible temperature and weakly pH, and the excess of reagent should be easily removable from reaction medium [1, 3, 5]. The derivatization can be carried out in pre-column, post-column and on-column mode. In the pre-column derivatization, analytes are derivatized before injection on HPLC system, and the reaction products are separated and detected. In the post-column derivatization, the reaction is performed automatically by adding the derivatization reagent after separation but before detection. The third method is based on reaction, which simultaneously proceeds with column separation [2, 3, 5, 6].

The derivatization processes in gas and liquid chromatography are subject matter among researcher from all over the world. The Polish literature has only few review articles on derivatization process in liquid chromatography [2, 4, 55]. The present article reviews derivatization techniques used in HPLC. Derivatization techniques used in gas chromatography are classified due to the chemical nature of derivatization reagent [3, 56]. Our attention is focused on the analyte and derivatization reagent, which can be react with various functional groups such as amino, sulfhydryl, hydroxyl or carboxyl groups, occurring in the examined molecules. By chemically modification compounds into derivatives, they obtain necessary properties for chromatographic separation and accurate analysis.

<u>Keywords:</u> high performance liquid chromatography, derivatization, chromophoric group

<u>Słowa kluczowe:</u> wysokosprawna chromatografia cieczowa, derywatyzacja, grupa chromoforowa
### WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

2-CA	_	2-cyjanoacetamid (ang. 2-cyanoacetamide)
2-HAP	_	2-hydroksyacetofenon (ang. 2-hydroxyacetophenone)
2-ME	_	2-merkaptoetanol (ang. 2-mercaptoethanol)
APDS	_	karbaminian 3-aminopirydylo-N-hydroksysukcyno-
		imidylu (ang. 3-amino-pyridyl-N-hydroxysuccinimi-
		<i>dyl carbamate</i> )
AQC	_	karbaminian 6-aminochinolinylo-N-hydroksysukcy-
		noimidylu (ang. 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccini-
		midyl carbamate)
BCPB	_	bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy (ang. 1-ben-
		<i>zyl-2-chloropyridinium bromide</i> )
BCETS	_	2-(11H-benzo[a]-karbazol-11-ilo)etvlo-4-metvloben-
		zenosulfonian (ang. 2-(11H-benzo[a]carbazol-11-vl)-
		-ethvl-4-methvlbenzenesulfonate)
СМОТ	_	tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy (ang.
		<i>2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate</i> )
DNFB	_	2,4-dinitrofluorobenzen (ang. 2,4-dinitrofluoroben-
		zene)
DPPH	_	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (ang. 2,2-difenylo-1-pi-
		crvlhvdrazvl)
DTNB	_	kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) (ang. 5,5-dithio-
		bis(2-nitrobenzoic acid)
EAHC	_	chlorowodorek etoksyaminy (ang. ethoxyamine hydro-
		chloride)
EDC	_	chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo)
		karbodiimidu (ang. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopro-
		<i>pyl)carbodiimide hydrochloride)</i>
ESI	_	jonizacja poprzez elektrorozpylanie (ang. <i>electrospray</i>
		ionization)
FLC	_	fluoreskamina (ang. <i>fluorescamine</i> )
FLD	_	detektor fluorescencyjny (ang. <i>fluorescence detector</i> )
FMOC	_	chloromrówczan 9-fluorenylometylu (ang. 9-fluore-
		nylmethylchloroformate)
Нсу	—	homocysteina (ang. homocysteine)
HPLC	—	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high
		performance liquid chromatography)
LA	—	kwas liponowy (ang. <i>lipoic acid</i> )
LOD	—	granica wykrywalności (ang. <i>limit of detection</i> )
LOQ	—	granica oznaczalności (ang. limit of quantification)
MASC	—	chlorek 10-metyloakrydyno-2-sulfonylu (ang. 10-methyl-
		acridone-2-sulfonyl chloride)

MS/MS	_	tandemowa spektrometria mas (ang. <i>tandem mass spectrometry</i> )
NAC	_	N-acetylo-L-cysteina (ang. N-acetyl-L-cysteine)
NBD-COCl	_	4-( <i>N</i> -chlorometyloformylo- <i>N</i> -metyloamino-7-nitro- 2,1,3-benzoksadiazol ( <i>ang.</i> 4-( <i>N</i> -chloroformylmethyl- <i>N</i> -methylamino)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole)
NBD-F	_	4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (ang. 4-fluoro- -7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole)
NDA	_	naftaleno-2,3-dikarboksyaldehyd (ang. <i>naphthalene--2,3-dicarboxaldehyde</i> )
NQS	-	1,2-naftochinono-4-sulfonian sodu (ang. <i>sodium</i> 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate)
N-Hcy	_	homocysteina związana z białkami wiązaniem ami- dowym (ang. <i>homocysteine bound to protein by an</i> <i>amide linkage</i> )
OPA	_	o-dialdehyd ftalowy (ang. o-phthaldialdehyde)
TMBB-EDAN	_	1,3,5,7-tetrametylo-8-butyretylenodiaminodifluoro- boradiaza-s-indacen (ang. 1,3,5,7-tetramethyl-8-butyre- thylenediaminedifluoroboradiaza-s-indacene)
tHcy	_	homocysteina całkowita (ang. total homocysteine)
UV-Vis	_	spektrofotometria UV-Vis (ang. <i>ultra violet visible spektrophotometry</i> )

791

#### WPROWADZENIE

Wiele substancji będących przedmiotem zainteresowania analityków wykorzystujących technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) nie jest kompatybilnych ze stosowanymi detektorami takimi jak spektrofotometryczny czy spektrofluorymetryczny, ponieważ w swojej strukturze nie zawierają aktywnych grup chromo- lub fluoroforowych. Ponadto niektóre związki obecne w próbkach materiału biologicznego występują na poziomie porównywalnym lub wyższym od poziomu analitów przez co przeszkadzają i niekiedy uniemożliwiają przeprowadzenie analizy. W rozwiązaniu takich problemów może pomóc zastosowanie reakcji derywatyzacji. Jest to proces polegający na przeprowadzeniu analitu w pochodną, która w swojej strukturze posiada ugrupowanie dobrze rozpoznawane przez określone detektory. Wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych do analitu, wskutek procesu derywatyzacji, może dodatkowo zmieniać właściwości fizykochemiczne związku takie jak polarność cząsteczki i jednocześnie jej rozpuszczalność. Nadanie nowych właściwości pozwala zatem na odróżnienie analitu od innych substancji obecnych w próbce i dodatkowo ułatwia a niekiedy wręcz umożliwia rozdzielenie składników w mieszaninie [1, 2].

Odczynnik derywatyzujący wykorzystywany do przekształcania analitu w pochodną winien spełniać wiele kryteriów. Przede wszystkim powinien być selektywny, tj. reagować tylko z oznaczaną substancją, a stechiometria reakcji oraz struktura powstającego w reakcji produktu powinna być dokładnie znana [3]. Reakcja pomiędzy odczynnikiem a analitem powinna zachodzić szybko, ilościowo, powtarzalnie i najlepiej przebiegać w łagodnych warunkach [1, 3]. Z analitem odczynnik powinien tworzyć tylko jedną pochodną, której maksimum absorpcji byłoby przesunięte w stosunku do maksimum odczynnika w kierunku fal dłuższych (w przypadku detekcji UV). Dzięki czemu występujące zjawisko przesunięcia bato-chromowego umożliwiłoby stosowanie dużych nadmiarów odczynnika derywaty-zującego w stosunku do analitu, skracając jednocześnie czas reakcji derywatyzacji [4]. Niezwykle istotne jest, aby powstające w czasie reakcji produkty uboczne, nie wykazywały absorpcji promieniowania UV czy fluorescencji, ewentualnie maksima absorpcji tych związków znacząco różniły się. Nadmiar odczynnika, jeśli przeszka-dza w analizie, powinien być łatwo eliminowany ze środowiska reakcji [1, 3].

Odczynniki derywatyzujące można podzielić na cztery grupy [5]: (1) absorbujące światło w zakresie UV-Vis, które w reakcji z analitem wprowadzają do cząsteczki grupę chromoforową, np. chlorek benzoilu, tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy (CMQT); (2) odczynniki fluorogeniczne, które same nie fluoryzują, ale reagując z określonymi związkami przekształcają się w emitujące światło cząsteczki, np. fluoreskamina; (3) odczynniki fluorescencyjne, które posiadają wysoce fluorescencyjną grupę aromatyczną (fluorofor) i grupę reaktywną; (4) odczynniki o właściwościach redoks, wykorzystywane w elektrochemii. Wybór odpowiedniego odczynnika derywatyzującego jest uzależniony od stosowanego detektora.

#### 1. TECHNIKI DERYWATYZACJI

Proces derywatyzacji znany jest od ponad sześćdziesięciu lat i stosowany niemal w każdym laboratorium analitycznym. Zarys historyczny i główne kierunki rozwoju tego procesu wykorzystywanego w połączeniu z techniką HPLC zostały przedstawione w Tabeli 1.

Derywatyzacja w połączeniu z techniką HPLC jest bardzo przydatnym narzędziem w nowoczesnym laboratorium analitycznym, ponieważ umożliwia oznaczanie związków, które są trudno wykrywalne nawet przy pomocy zróżnicowanych detektorów. Zastosowanie derywatyzacji umożliwia znaczne obniżenie wartości granicy wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ), a także eliminację interferencji pochodzących od składników matrycy. Derywatyzacja w HPLC może być prowadzona w trybie przedkolumnowym (ang. pre-column), pokolumnowym (ang. post-column) oraz w kolumnie (ang. on-column). Wyżej wymienione techniki różnicuje się w oparciu o "miejsce" prowadzenia reakcji derywatyzacji (Rys. 1). W przypadku derywatyzacji przedkolumnowej odczynnik dodawany jest do próbki przed jej wprowadzeniem do układu HPLC. W derywatyzacji pokolumnowej odczynnik dodaje się do strumienia eluatu pomiędzy kolumnę a detektor [6]. Z kolei w przypadku derywatyzacji w kolumnie do układu HPLC wprowadza się mieszaninę odczynnika derywatyzującego i próbki, a reakcja pomiędzy nimi zachodzi w kolumnie chromatograficznej w trakcie rozdzielania [2]. We wszystkich trzech sposobach prowadzenia derywatyzacji, reakcja może być zakłócona przez wpływ składników matrycy próbki. Na wybór sposobu przeprowadzenia derywatyzacji wpływa zarówno posiadana aparatura, jak i parametry w których prowadzona jest reakcja (pH buforu, czas trwania reakcji czy temperatura) [1, 3].

Tabela 1.Kamienie milowe w rozwoju technik derywatyzacyjnych łączonych z chromatografią cieczową,<br/>które znalazły zastosowanie w praktyce analitycznej.

 
 Table 1.
 Milestones in development of field of application of derivatization supported liquid chromatography in analytical practice.

Rok	Opis	Lit.
1957	Derywatyzacja małych ilości związków karbonylowych.	[7]
1966	Derywatyzacja tioli za pomocą izocyjanianu trichloroacetylu w celu uproszczenia interpre- tacji widm NMR.	[8]
1973	Zastosowanie reakcji benzoilowania do derywatyzacji hydroksysterydów. Oznaczanie po- wstałych pochodnych za pomocą chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz.	[9]
1973	Zastosowanie 1-benzylo-3-p-tolilotriazenu do derywatyzacji kwasów tłuszczowych w anali- zie HPLC z detekcją UV. Potwierdzenie struktur powstałych pochodnych za pomocą spek- trometrii mas.	[10]
1976	Pokolumnowa derywatyzacja nonapeptydów.	[11]
1977	Pierwsza opublikowana książka na temat zastosowania derywatyzacji w chromatografii.	[12]

Rok	Opis	Lit.
1978	Automatyzacja procesu derywatyzacji przedkolumnowej.	[13]
1995	Zastosowanie derywatyzacji w kolumnie do oznaczania amin.	[14]
2002	Derywatyzacja na włóknie (SPME) w połączeniu z układem HPLC.	[15]
2008	Automatyzacja procesu derywatyzacji chemicznej oraz techniki mikroekstrakcji do fazy sta- cjonarnej w postaci filmu pokrywającego wewnętrzną ściankę rurki.	[16]
2009	Jednoczesne zastosowanie derywatyzacji <i>in situ</i> oraz mikroekstrakcji poprzez membranę do fazy ciekłej w celu oznaczenia amin w próbkach żywności.	[17]
2011	Zastosowanie dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym z wykorzystaniem cieczy jonowych oraz procesu derywatyzacji do oznacza- nia sulfonamidów w wodach rzecznych, miodzie, mleku i osoczu zwierząt.	[18]





Rysunek 1. Schemat ilustrujący sposoby prowadzenia derywatyzacji: A) przedkolumnowej, B) pokolumnowej, C) w kolumnie

Figure 1. The scheme of possible derivatization procedures A) pre-column, B) post-column, C) on-column

Większość odczynników derywatyzujących można stosować tylko dla jednego sposobu prowadzenia derywatyzacji. Jednakże są i takie, jak na przykład *o*-dialdehyd ftalowy (OPA), który jest szeroko stosowany zarówno w derywatyzacji przedkolumnowej, jak i w derywatyzacji pokolumnowej i w kolumnie. W tym przypadku wybór trybu prowadzonej reakcji uzależniony jest tylko od dostępnego sprzętu, bądź efektywności rozdzielania.

Proces konwersji chemicznej analitów w ich pochodne można również prowadzić podczas pobierania próbek, w przypadku derywatyzacji *in situ*. Ten rodzaj derywatyzacji stosuje się, aby polepszyć właściwości fizykochemiczne analitów, a także dezaktywować ich reaktywne grupy funkcyjne, jak np. grupy tiolowe. Ze względu na to, iż grupę –SH charakteryzuje duża aktywność oksydoredukcyjna, dodanie akrylanu metylu zabezpiecza tę grupę w płynach biologicznych. Należy mieć jednak na uwadze, że wydłużenie czasu reakcji derywatyzacji czy też dodanie zbyt dużej ilości odczynnika derywatyzującego do matrycy, może spowodować rozcieńczenie próbki, a niekiedy nawet powstanie produktów ubocznych [19].

Ciekawym rozwiązaniem przekształcania analitu w pochodne jest połączenie techniki mikroekstakcji do fazy stałej (SPME) z procesem derywatyzacji chemicznej. Konwersję chemiczną analitu na włóknie mikroekstrakcyjnym można prowadzić jednocześnie z procesem ekstrakcji poprzez umieszczenie włókna nasyconego odczynnikiem derywatyzującym w roztworze analizowanej próbki. Przykładem takiej derywatyzacji jest przeprowadzenie w pochodną metyloaminy w próbkach wody [20]. W przypadku konwersji chemicznej analitu prowadzonej po procesie ekstrakcji, anality najpierw są adsorbowane na włóknie, a następnie derywatyzowane przez zanurzenie tych włókien w roztworze zawierającym odczynnik derywatyzujący. Zaletą derywatyzacji chemicznej na włóknie mikroekstrakcyjnym jest wyeliminowanie dużej ilości rozpuszczalników stosowanych podczas przygotowania próbki oraz czasochłonnego i pracochłonnego etapu obróbki próbki. Wadą tej metody jest jednak niska dokładność i precyzja.

W myśl koncepcji "zielonej chemii analitycznej" coraz większy nacisk kładzie się na automatyzację i miniaturyzację technik analitycznych. Procesy te są kluczem w projektowaniu bardziej ekologicznych procedur derywatyzacyjnych. Konstrukcja płaskich urządzeń o bardzo małych rozmiarach tzw. chipów, stanowi alternatywę dla konwencjonalnych kapilar w elektroforezie, czy też kolumn w chromatografii. Główną cechą tego typu urządzeń jest wysoki poziom automatyzacji procesów, które mogą na nim zachodzić. Dzięki czemu na jednym urządzeniu możliwe jest pobieranie próbki, derywatyzacja, separacja oraz detekcja. Chipy są powszechnie stosowane w elektroforezie kapilarnej, a rzadziej w chromatografii cieczowej [21].

"Zielony" charakter derywatyzacji chemicznej w laboratoriach chemicznych przedstawiono w Tabeli 2.

Idea zielonej chemii	Rozwiązanie	Lit.
redukcja czasu, pracy i energii	derywatyzacja w kolumnie	[52–54]
automatyzacja czynności laboratoryjnych, równocze- sne oznaczanie wielu analitów podczas pojedynczej analizy	derywatyzacja w układzie on-line	[23–27]
jednoczesna derywatyzacja i ekstrakcja	derywatyzacja na włóknie SPME	[20]
miniaturyzacja procesów analitycznych	derywatyzacja na chipie	[21]

Tabela 2.Zielona chemia analityczna w derywatyzacji chemicznej.Table 2.Green chemistry in chemical derivatization.

W niniejszej pracy zostaną omówione tylko te techniki derywatyzacji, które w połączeniu z techniką HPLC przyczyniły się do rozwoju chemii analitycznej. Niestety, w tak krótkim artykule nie jest możliwe szczegółowe omówienie wszystkich sposobów prowadzenia derywatyzacji, dlatego naszą uwagę skupiliśmy głównie na technikach derywatyzacji przedkolumnowej, pokolumnowej i w kolumnie wykorzystywanych w chromatografii cieczowej. Główne wady i zalety tych technik zostały zebrane i przedstawione w Tabeli 3.

Tabela 3.	Mocne i słabe strony technik derywatyzacji stosowanych w HPLC
Table 3.	The advantages and drawbacks of derivatization techniques used in HPLC

Rodzaj derywatyzacji	Zalety	Wady	Lit.
przedkolumnowa	<ul> <li>możliwość stosowania wszystkich rodzajów odczynników derywa- tyzujących, nawet jeśli wymagają zastosowania wysokiej tempera- tury lub długiego czasu reakcji;</li> <li>możliwość stosowania odczyn- ników derywatyzujących znako- wanych izotopowo, jako uniwer- salnego wzorca wewnętrznego, eliminuje błędy popełniane na etapie przygotowania próbki;</li> <li>automatyzacja procesu pozwala zmniejszyć czasochłonność i pra- cochłonność procedury</li> </ul>	<ul> <li>czasochłonność;</li> <li>możliwość wystąpienia interferen- cji sygnału analitycznego pocho- dzącego od zanieczyszczeń z pi- kami analitów;</li> <li>nieprawidłowy dobór optymalnych warunków derywatyzacji wpływa na pogorszenie wydajności reak- cji, wystąpienie produktów ubocz- nych, bądź degradację powstającej pochodnej;</li> </ul>	[1, 2, 22–40]

Rodzaj derywatyzacji	Zalety	Wady	Lit.
pokolumnowa	<ul> <li>wyeliminowanie wieloetapowego procesu derywatyzacji przedko- lumnowej, który może być źró- dłem mniejszej powtarzalności wyników;</li> <li>możliwość stosowania kilku detektorów;</li> <li>tworzenie się pochodnych tuż przed ich detekcją -zniwelowa- nie ryzyka rozkładu pochodnej podczas prowadzonej analizy chromatograficznej;</li> </ul>	<ul> <li>aparat pomiarowy wyposażony jest w dużą pętlę reakcyjną, co zmniej- sza efektywność separacji;</li> <li>koszty związane z koniecznością zakupu dodatkowej aparatury</li> <li>pompy dozującej odczynnik derywatyzujący;</li> <li>duża ilość zużywanych odczynników;</li> </ul>	[6, 40, 41–51]
w kolumnie	<ul> <li>możliwość prowadzenia reakcji derywatyzacji podczas rozdziela- nia chromatograficznego;</li> <li>nie wymaga zastosowania do- datkowej aparatury, tak jak w przypadku derywatyzacji pokolumnowej;</li> <li>znacząco upraszcza procedurę analityczną - skraca całkowity czas analizy.</li> </ul>	<ul> <li>nieprawidłowy dobór ilości od- czynnika wpływa znacząco na po- gorszenie czułości metody;</li> <li>niekiedy wymaga zastosowania ko- lumny, której wypełnienie jest sta- bilne w skrajnych warunkach pH.</li> </ul>	[52–54]

#### 2. DERYWATYZACJA PRZEDKOLUMNOWA

Derywatyzacja przedkolumnowa wymaga dodatkowych operacji podczas przygotowania próbki do analizy, w konsekwencji czego jest procesem bardziej czasochłonnym. Oznaczany związek przekształcany jest w pochodną przed wprowadzeniem go na kolumnę chromatograficzną, co może wiązać się z ryzykiem destabilizacji próbki podczas wykonywanej analizy chromatograficznej, bądź wręcz przeciwnie, zwiększyć jej stabilność [6]. Jednak, mimo ograniczeń derywatyzacja przedkolumnowa znajduje szerokie zastosowanie w przypadku kiedy przebieg reakcji wymaga długiego czasu, mieszania czy użycia wysokiej temperatury [1, 3]. Reakcje derywatyzacji prowadzone są poprzez przyłączenie odczynnika derywatyzującego w wyniku jego reakcji z różnymi grupami funkcyjnymi: aminową, sulfhydrylową, hydroksylową czy karboksylową, występującymi w badanych cząsteczkach.

#### 2.1. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ AMINOWĄ

Do derywatyzacji amin biogennych zawartych w winie ryżowym Cai wraz z grupą badaczy [22] wykorzystali chlorek  $d_0$ -10-metyloakrydono-2-sulfonylu ( $d_0$ -MASC) oraz chlorek  $d_3$ -10-metyloakrydono-2-sulfonylu ( $d_3$ -MASC). Zastosowanie tej pary odczynników derywatyzujących znakowanych izotopowo, która

pełniła rolę uniwersalnego wzorca wewnętrznego, pozwoliło zniwelować błędy popełniane na etapie przygotowania próbki, a także pozytywnie wpłynęło na skrócenie czasu analizy chromatograficznej. Przebieg reakcji derywatyzacji ilustruje Schemat 1.



Do oznaczania aminokwasów w próbkach osocza człowieka procedurę derywatyzacji przedkolumnowej poddano automatyzacji, co niewątpliwie pozytywnie wpłynęło na jej precyzję i powtarzalność oraz zwiększenie ilości próbek, które mogą być jednocześnie analizowane w krótszym czasie [23]. Anality przeprowadzano w pochodne, stosując 3-aminopyridylo-*N*-hydroksysukcynoimid (APDS) jako odczynnik derywatyzujący (Schemat 2).



Automatyczną procedurę derywatyzacji wykorzystano również do oznaczenia zawartości aminokwasów pierwszo- i drugorzędowych [24]. Do oznaczenia aminokwasów pierwszorzędowych jako odczynnik derywatyzujący zastosowano OPA w obecności 2-merkaptoetanolu (2-ME). Natomiast do derywatyzacji przedkolumnowej aminokwasów drugorzędowych wykorzystano chloromrówczan 9-fluorenylometylu (FMOC). Równania reakcji z udziałem powyższych odczynników ilustrują odpowiednio Schematy 3 i 4. Automatyzacja procedury derywatyzacji, niskie zużycie rozpuszczalników oraz krótki czas analizy (< 19 min), skutkowały znaczącą liczbą analiz o wysokiej przepustowości. Ograniczeniem stosowania OPA i FMOC była ich niestabilność w temperaturze pokojowej. W swojej pracy Ezquer-Garin i in. wykazali, że OPA w temperaturze otoczenia jest trwały tylko przez co najmniej 4 godziny [25]. OPA i FMOC przechowywane w temperaturze około 5°C nadawały się do użytku tylko przez 7 dni.



OPA zastosowano również do oznaczenia amikacyny – antybiotyku należącego do grupy aminoglikozydów. W odróżnieniu od metody opisanej przez Buha i in. [24] odczynnikiem sprzęgającym w reakcji derywatyzacji z OPA była *N*-acetylo--L-cysteina (NAC) (Schemat 3) [25]. Wyniki badań wykazały, że wzrost stężenia NAC zwiększał stabilność powstającej pochodnej fluorescencyjnej, hamując kinetykę reakcji jej rozpadu i jednocześnie spowalniając kinetykę reakcji tworzenia. Konsekwencją tego było wydłużenie czasu potrzebnego do uzyskania maksymalnej wydajności reakcji.



W roku 2016, aby oznaczyć śladowe ilości amin alifatycznych reakcję derywatyzacji prowadzono z naftaleno-2,3-dikarboksyaldehydem (NDA) w obecności jonu cyjankowego (Schemat 5) [26]. Podczas opracowania procedury derywatyzacji bardzo ważny był dobór odpowiedniej ilości NDA, ponieważ jego zbyt wysokie stężenie sprzyjało powstawaniu produktów ubocznych. Stosowany odczynnik derywatyzujący charakteryzował się wysoką trwałością. Mógł być przechowywany w lodówce przez kilka tygodni w postaci roztworu w brązowej butelce, owiniętej folią aluminiową. Jedynym ograniczeniem stosowania NDA jest jego cena, ponieważ jest to jeden z droższych odczynników wykorzystywanych w derywatyzacji przedkolumnowej.

Innym odczynnikiem derywatyzującym wykorzystywanym do przekształcenia związków, zawierających grupy aminowe pierwszorzędowe i drugorzędowe w pochodną fluoryzującą był wysoce reaktywny 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (NBD-F) (Schemat 6). NBD-F został zastosowany do oznaczenia proliny w miodzie [27]. W wyniku reakcji derywatyzacji tworzące się pochodne były stabilne przez co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej. Ograniczeniem procesu derywatyzacji był dobór odpowiedniej masy próbek miodu. Ponieważ w przypadku cięższych naważek, NBD-F nie mógł w pełni reagować z oznaczanym analitem, co było prawdopodobnie spowodowane faktem, iż podobnie jak prolina, również inne związki mogły reagować z NBD-F.



Derywatyzację przedkolumnową zastosowano również do oznaczenia lenalidomidu (LND), którego stężenie monitorowano w osoczu człowieka [28]. Konwersję analitu (Schemat 7) z utworzeniem wysoce fluorescencyjnej pochodnej prowadzono z fluoreskaminą (FLC). FLC po rozpuszczeniu w acetonitrylu mogła być przechowywana w temperaturze –20°C w ciągu 7 dni bez dostępu światła.





Odczynnikiem derywatyzującym, który zastosowano do oznaczania aminokwasów w osoczu krwi pacjentów będących w ostrych stanach chorobowych był karbaminian 6-aminochinolinylo-*N*-hydroksysukcynoimidylu (AQC) (Schemat 8) [29]. Zaletą tego odczynnika był fakt, że tworzące się pochodne mogły być oznaczane z wykorzystaniem detektora UV-Vis oraz detektora FLD. Wybór podwójnej detekcji podyktowany był ograniczeniami opracowanej metody. Znaczną ilość oznaczeń wykonano za pomocą detektora UV-Vis. Ponieważ niektóre zderywatyzowane aminokwasy, z uwagi na ich zbyt niskie stężenie, były słabo widoczne na chromatogramie detektora FLD.



Uniwersalnym i niedrogim odczynnikiem wykorzystywanym w derywatyzacji przedkolumnowej aminokwasów pierwszo- i drugorzędowych jest także 2,4-dinitrofluorobenzen (DNFB) (Schemat 9) [30]. Zaletą tego odczynnika derywatyzującego była wysoka stabilność tworzących się pochodnych aminokwasów w temperaturze pokojowej. Natomiast ograniczeniem procedury derywatyzacji był dobór odpowiedniej ilości DNFB, ponieważ nadmiar tego odczynnika derywatyzującego powodował sygnał analityczny, który interferował z sygnałem analitu.



DNFB

Schemat 9 Scheme 9

#### 2.2. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ SULFHYDRYLOWĄ

W 2014 roku do derywatyzacji kwasu 3-merkaptopropionowego zastosowano monobromobiman (MBBr) (Schemat 10) [31]. Wybór tego odczynnika derywatyzującego podyktowany był wysoką wydajnością i stabilnością tworzącej się pochodnej fluorescencyjnej. Dzięki temu próbki mogły być przechowywane w temperaturze 4°C, przez co najmniej jeden rok przy zaledwie około 3–5% straty analitu.



Samara wraz z grupą badaczy derywatyzację endogennych tioli (Schemat 11) prowadzili z użyciem propiolanu metylu (MP) [32]. Jak podkreślają autorzy dobór optymalnych warunków do reakcji derywatyzacji zapewnił odpowiednią czułość metody oraz wyeliminował powstanie produktów ubocznych.



Proces konwersji chemicznej analitu wykorzystano także do oznaczenia kwasu liponowego (LA) w moczu oraz suplementach diety [33]. Reakcję derywatyzacji poprzedzono etapem redukcji wiązania disiarczkowego, w celu przekształcenia LA do kwasu dihydroliponowego (DHLA). Zredukowana forma LA była następnie przeprowadzana w pochodną za pomocą bromku 1-benzylo-2-chloropirydyniowego (BCPB) (Schemat 12). W odróżnieniu do innych odczynników derywatyzujących, BCPB z DHLA reagował bardzo szybko w temperaturze pokojowej i z dobrą wydajnością.



#### 2.3. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ HYDROKSYLOWĄ

Przykładem analitu zawierającego w swojej cząsteczce grupę -OH jest eugenol. Do derywatyzacji tego związku zastosowano dwa odczynniki derywatyzujące. Jak wynika z danych literaturowych, metoda analityczna oznaczania eugenolu z wykorzystaniem 4-(N-chlorometyloformylometylo-*N*-amino-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu (NBD-COCl) (Schemat 13) [34] charakteryzowała się 6,7-krotnie wyższą czułością w porównaniu do tej, w której derywatyzację prowadzono z 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu (NBD-F) (Schemat 14) [35]. Reakcja derywatyzacji eugenolu z NBD-COCl zachodziła w bardzo krótkim czasie w temperaturze pokojowej. Dzięki temu etap przygotowania próbek do analizy nie był czasochłonny, a opracowana metoda oznaczania eugenolu w oleju goździkowym może być z powodzeniem stosowana do rutynowych analiz.



Schemat 13 Scheme 13



Scheme 14

#### 2.4. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ KARBOKSYLOWĄ

Derywatyzacja przedkolumnowa zastosowana została również do oznaczania fitohormonów – związków zawierających w swojej strukturze grupę karboksylową [36]. Odczynnikiem, który wykorzystywano do przekształcenia analitów w pochodne fluoryzujące był 2-(11H-benzo[*a*]-karbazol-11-ilo)etylo-4-metylobenzenosulfonian (BCETS). Reakcję (Schemat 15) prowadzono w obecności współrozpuszczalnika *N*,*N*-dimetyloformamidu i katalizatora K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, aby zwiększyć jej wydajność i selektywność, poprawić czułość detekcji oraz zapobiec wytrącaniu się produktów ubocznych.



Grupę innych fitohormonów, którą stanowiło 8 giberelin oznaczono również w pomidorach i gruszkach [37]. W tym celu derywatyzację przedkolumnową prowadzono z 1,3,5,7-tetrametylo-8-butyretylenodiaminodifluoroboradiaza-s-indacenem (TMBB-EDAN) w obecności chlorowodorku 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo) karbodiimidu (EDC) i pirydyny (Schemat 16). Autorzy w swojej pracy podkreślili, że TMBB-EDAN reagował selektywnie z grupą karboksylową tylko w łagodnych warunkach, co wpłynęło na wydłużenie czasu reakcji derywatyzacji.





#### 2.5. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ ALDEHYDOWĄ

W roku 2015 opracowano metodę oznaczania formaldehydu w próbkach piwa [38]. Do reakcji derywatyzacji zastosowano chlorowodorek etoksyaminy (EAHC), którego pochodne były stabilne tylko przez 2 dni. Procedura przekształcenia analitu w pochodną była relatywnie szybka i przebiegała w łagodnych warunkach.



#### 2.6. INNE SPOSOBY DERYWATYZACJI ANALITU

W celu określenia zawartości 2-cyjanoacetamidu (2-CA) w próbkach farmaceutycznych, optymalizacji poddano dwie procedury przeprowadzania analitu w pochodną fluoryzującą – derywatyzację przed- i pokolumnową [39]. Reakcje wykonywano stosując jako odczynnik derywatyzujący 2-hydroksyacetofenon (2-HAP) (Schemat 18). Douša i in. wykazali, że metoda oznaczania 2-cyjanoacetamidu oparta na derywatyzacji przedkolumnowej charakteryzowała się wyższą czułością w porównaniu do metody z zastosowaniem derywatyzacji pokolumnowej, ale nieco mniejszą precyzją i dokładnością. Autorzy podkreślali, że ograniczeniem procedury derywatyzacji przedkolumnowej była bardzo wysoka temperatura, która nie mogła być przekroczona, ponieważ dochodziło wówczas do degradacji powstającej pochodnej. Z kolei duży nadmiar odczynnika derywatyzującego powodował spadek intensywności fluorescencji, dlatego też bardzo ważne było dobranie odpowiedniej objętości 2-HAP do reakcji derywatyzacji, w wyniku której tworzące się pochodne były stabilne przez około 24 godziny.



W ostatnich latach opracowano metodę oznaczania tiosiarczanów w moczu człowieka z wykorzystaniem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylochinoliniowego (CMQT). Odczynnik ten był również szeroko stosowany do oznaczania egzoi endogennych tioli w próbkach biologicznych [4]. Ze względu na to, iż reakcji CMQT z tiosiarczanami towarzyszy silne przesunięcie batochromowe, możliwe było zastosowanie dużych nadmiarów odczynnika derywatyzującego względem analitu, co również wpłynęło na skrócenie czasu reakcji derywatyzacji [40].



W Tabeli 4 zebrano informacje dotyczące prezentowanych w pracy związków, które oznaczane są z zastosowaniem derywatyzacji przedkolumnowej.

Lit.	[22]	[23]	[24]		[25]	[26]	[27]	[28]	
LOQ	0,50–0,77ª μmol/l	0,39–7,55ª μmol/l	94,27–594,08ª ng/ml	b.d.	1 μg/ml	0,04–0,1ª nmol/l	10ª mg/kg	2,3ª ng/ml	
LOD	0,15–0,23 <sup>ª</sup> μmol/1	0,12–2,27 <sup>a</sup> μmol/1	34,17–196,05ª ng/ml	p.d.	b.d.	0,01–0,04ª nmol/l	3ª mg/kg	0,8ª ng/ml	
$\lambda_{ m ex}/\lambda_{ m em}$ [nm]	I	I	340/450	266/305	337/439	440/480	470/530	495/382	
γ [um]	I	I	I		I	I	I	I	
Detekcja	MS/MS ESI	MS/ESI	FLD		FLD	FLD	FLD	FLD	
Charakterystyka procedury derywatyzacji	Derywatyzację prowadzono w ciągu 15 minut w podwyższonej temperaturze 55°C w środowi- sku buforu boranowego o pH 9,4.	Reakcję derywatyzacji prowadzono w środowi- sku buforu boranowego w zakresie pH 8,7–8,9 w temperaturze 50°C w ciągu 5 minut.	erywatyzację prowadzono w środowisku, iforu boranowego o pH 9,5 w temperaturze skojowej.		Reakcja przebiegała w ciągu 5 minut w tempera- turze 80°C.	Reakcja derywatyzacji zachodziła w obecno- ści jonu cyjankowego. Czas reakcji był krótki i w środowisku alkalicznym (pH = 9), w tempe- raturze pokojowej wynosił 5 minut.	Derywatyzacja przebiegała w ciągu 12 minut w temperaturze 60°C, a tworzące się pochodne były stabilne przez co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej.	Derywatyzacja poprzedzona była deproteinizacją białek przez acetonitryl i związaniem amino- kwasów w stabilny kompleks, wskutek dodania octanu miedzi. Supernatant poddawano reakcji derywatyzacji, której czas w temperaturze poko- jowej wynosił 5 minut.	
Matryca	wino ryżowe	osocze	układy	biologiczne	osocze	wody pitne i z jeziora	miód	osocze	
Odczynnik derywatyzujący	d <sub>0</sub> -MASC, d <sub>3</sub> -MASC	APDS	OPA/2-ME	FMOC	OPA/NAC	NDA	NBD-F	FLC	
Analit	aminy biogenne	aminokwasy I° i II°	aminokwasy I°	aminokwasy II°	amikacyna	aminy alifatyczne	prolina	lenalidomid	

Ciąg dalszy	Continuation
Tabela 4.	Table 4.

	Lit.		[29]	[30]		[31]			[32]		[33]		[34]		[35]						
	DOJ	0 57 77 A7 <sup>8</sup>	1,1000μ	0,34–12,26 <sup>ª</sup> μg/ml		$14.5^{a}$		$0.4-1.5^{a}$	μmol/l		0,2 <sup>ª</sup> μmol/l		0,02ª μg/ml		$0,13^{a}  \mu g/ml$						
ſ	LOD	0,17–8,06 <sup>a</sup> μmol/ml 0,11–4,05 <sup>a</sup> μg/ml			0,17–8,06 <sup>a</sup> μmol/ml		0,11–4,05 <sup>ª</sup> μg/ml		4,3ª nmol/l			4,3ª nmol/l		$0.1-0.5^{a}$	μmol/l		$0,1^{a} \mu mol/l$		0,006ª µg/ml		$0,04^{\rm a}\mu g/ml$
	$\lambda_{ m ex}^{}/\lambda_{ m em}^{}$ [nm]		250/395	I		380/480			I		I		470/540		I						
	$\lambda$ [nm]		250	360		I			285		321		I		380						
	Detekcja	FLD	UV-Vis	UV-Vis		FLD			UV-Vis		UV-Vis		FLD		UV-Vis						
	Charakterystyka procedury derywatyzacji	Reakcja derywatyzacji trwała zaledwie 10 sekund	i prowadzona była w obecności buforu borano- wego o pH 8,8 w temperaturze pokojowej.	prowadzona była w obecności butoru borano- vego o pH 8,8 w temperaturze pokojowej. Derywatyzację przedkolumnową prowadzono v buforze węglanowym o pH = 9 w temperatu- ze 60°C w ciągu 60 minut bez dostępu światła.		2-(cykloheksyloamino)etanosulfonowego (pH 9,3), bądź Tris-HCl (pH 7,5). Reakcja derywa-	tyzacji w temperaturze pokojowej przebiegała w	Reakcja przebiegała w temperaturze pokojowej	w buforze boranowym o pH=8 z dodatkiem kwasu etylenodiaminotetraoctowego	Reakcję derywatyzacji prowadzono w buforze	Tris-HCl o pH 9, której czas w temperaturze po- kojowej wynosił 5 minut.	Reakcja w temperaturze pokojowej w środo-	wisku buforu boranowego o pH 9 przebiegała w ciągu 1 min.	Czas reakcji derywatyzacji w temperaturze 40°C	oraz w środowisku buforu boranowego o pH 8,5 wynosił 4 min.						
	Matryca		osocze	herbata		osady rzeczne		osady rzeczne			омосе	mocz,	suplementy diety	oleiek goź-	dzikowy	init.	eteryczne				
	Odczynnik derywatyzujący		AQC	DNFB		MBBr			MP		BCPB	,	NBD-COCI		NBD-F						
	Analit		aminokwasy	I°iII°		tiole		tiole	endogenne		LA		-	eugenoi							

Ciąg dalszy	Continuation
Tabela 4.	Table 4.

Lit.	279/380 $\frac{1,7-2,6^{a}}{\text{nmol/l}}$ b.d. [36]		[37]	[36] [37] [38] [39]		[65]		[40]					
ГОС			b.d. 0,042 <sup>a</sup> mg/l 1,1 <sup>a</sup> µg/l		μg/l	0,5ª µmol/l							
LOD			1,7–2,6 <sup>ª</sup> nmol/l		1,7–2,6 <sup>a</sup> nmol/l 0,081–0,22 <sup>a</sup> nmol/l		$0,4^{a}$	μg/1		0,3ª µmol/l			
$\lambda_{ m ex}/\lambda_{ m em}$ [nm]			279/380		490/510	I		315/383	I				
$\lambda \  \   [nm]$	I		I	205		I	375						
Detekcja	Detekcja MS/APCI FLD		FLD	UV-Vis	MS/APCI	FLD		UV-Vis					
Charakterystyka procedury derywatyzacji	Reakcję prowadzono w obecności współroz- puszczalnika <i>N</i> , <i>N</i> -dimetyloformamid i kataliza- tora K CO w temperaturze 90°C. Czas reakcii	derywatyzacji był stosunkowo krótki i wynosił 20 minut.	Odczynnik derywatyzujący efektywnie reagował z giberelinami w temperaturze 25°C w ciągu 75 minut, w obecności EDC i pirydyny.	Reakcja derywatyzacji prowadzona była w bu- forze fosforanowym o pH = 6 w temperaturze 25°C w czasie 20 minut.	Reakcja derywatyzacji w środowisku buforu	boranowego o pH 11 w temperaturze około 100°C przebiegała w ciągu 8 minut.	Reakcję prowadzono w środowisku kwaśnym w zakresie pH 2–8. Czas derywatyzacji był	krótki i w temperaturze pokojowej przy 10-krot- nym nadmiarze odczynnika wynosił zaledwie	2 minuty.				
Matryca	derywatyzujący BCETS owoce i warzywa		owoce i warzywa		owoce i warzywa		gruszki i pomidory	piwo	farmaceu-	tyki		mocz	
Odczynnik derywatyzujący			TMBB-EDAN	EAHC		2-HAP		CMQT					
Analit		fitohormony 1		formaldehyd	(	2-CA		tiosiarczany					

<sup>a</sup> Obliczone dla roztworów standardowych. b.d. - brak danych. 809

#### 3. DERYWATYZACJA POKOLUMNOWA

Derywatyzacja pokolumnowa posiada wiele zalet oraz wad (Tab. 3). Do jej niewątpliwych atutów można zaliczyć skrócenie czasu przygotowania próbki, ponieważ odczynnik derywatyzujący wprowadzany jest do układu. Zostaje zatem wyeliminowany wieloetapowy proces derywatyzacji przedkolumnowej, który może być źródłem zmniejszonej powtarzalności uzyskiwanych wyników. Kolejną zaletą jest tworzenie się pochodnych tuż przed ich detekcją, co ułatwia pracę z analitami, które tworzą mało stabilne pochodne. Mocną stroną tej metody jest także możliwość stosowania kilku detektorów, które wykorzystywane są do oznaczania zarówno powstałych po reakcji pochodnych, jak i związków przed derywatyzacją. Niestety, jak każda procedura analityczna, również derywatyzacja pokolumnowa posiada swoje wady. Największym minusem jest konieczność częstego stosowania długich pętli reakcyjnych, co wpływa niekorzystnie na efektywność rozdzielania. Dodatkowo ten rodzaj derywatyzacji wiąże się z większymi kosztami zakupu sprzętu, ponieważ konieczne jest wyposażenie chromatografu w dodatkową pompę dozującą odczynnik derywatyzujący. Zastosowanie derywatyzacji pokolumnowej wiąże się również z zużyciem większych ilości odczynnika derywatyzującego. Odczynnik ten, z uwagi na szybkość przepływu analitu z kolumny do detektora, musi charakteryzować się wysoką reaktywnością [6].

#### 3.1. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ AMINOWĄ

Do oznaczania amin biogennych techniką HPLC najczęściej stosuje się jako odczynnik derywatyzujący OPA, który reaguje z grupą aminową analitu w obecności grup sulfhydrylowych (Schemat 3) [41-45]. W świetle derywatyzacji pokolumnowej odczynnik ten charakteryzuje się szybką kinetyką reakcji w temperaturze pokojowej, a także tworzeniem wysoce fluorescencyjnej pochodnej. Co jest ważne, odpowiedni dobór czynnika nukleofilowego np. 2-ME, jak również ograniczony dostęp światła zapobiegają degradacji odczynnika derywatyzującego. Natomiast dodanie środka powierzchniowo czynnego (np. Brij 35) znacznie poprawia stabilność tworzących się pochodnych. Innym odczynnikiem derywatyzującym, który reaguje ze związkami zawierającymi grupę aminową jest 1,2-naftochinono-4-sulfonian sodu (NQS) [46]. W przeciwieństwie do OPA jest jednym z rzadziej stosowanych odczynników, mimo, iż cechuje się niskimi kosztami. NQS reaguje z grupami aminowymi w roztworze alkalicznym tworząc pochodną fluorescencyjną. Ze względu na ten fakt odczynnik derywatyzujący rozpuszczano w fazie ruchomej, a dopiero eluat mieszał się z NaOH w pętli reakcyjnej. NQS został zastosowany do derywatyzacji pokolumnowej streptomycyny występującej w ogórku i kapuście pekińskiej.

#### 3.2. DERYWATYZACJA Z WYKORZYSTANIEM NANOCZĄSTEK

Proces derywatyzacji pokolumnowej można również prowadzić z zastosowaniem nanocząstek tlenku terbu (Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub>NPs) jako odczynnika derywatyzującego do oznaczania pozostałości antybiotyków chinolonowych w próbkach mleka [47]. Etap derywatyzacji opierał się na tworzeniu luminescencyjnych chelatów chinolonów z Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub>NPs. Derywatyzację pokolumnową prowadzono również z wykorzystaniem nanocząstek złota (AuNPs) pokrytych niejonowym surfaktantem - Zonylem. Indukowana przez analit agregacja AuNPs mierzona była kolorymetrycznie. Zaletą takiej reakcji jest niezwykle szybka kinetyka agregacji nanocząstek oraz wysoka selektywność wiązania się z homocysteiną [48].

#### 3.3. DERYWATYZACJA PRZEZ GRUPĘ SULFHYDRYLOWĄ

Derywatyzację związków zawierających w swojej cząsteczce nukleofilową grupę –SH w obecności odpowiedniej aminy pierwszorzędowej w środowisku zasadowym prowadzono z użyciem OPA [49]. Jony amonowe niezbędne do utworzenia wysoce fluorescencyjnej pochodnej rozpuszczone były w fazie ruchomej. Innym odczynnikiem derywatyzującym, który zastosowano do derywatyzacji związków tiolowych był odczynnik Ellmana (kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy)) (DTNB) [50]. Reakcję derywatyzacji biotioli z DTNB prowadzono w obecności metylo- $\beta$ -cyklodekstryny. Dodanie tego związku cyklicznego do odczynnika derywatyzującego ułatwiało jego reakcję z tiolami. Özyürek wraz z współ. zaobserwowali również, że DTNB uprzednio rozpuszczony w roztworze metylo- $\beta$ -cyklodekstryny zwiększał stabilność tworzących się pochodnych.

#### 3.4. INNE SPOSOBY DERYWATYZACJI ANALITU

Jak opisano wcześniej w podrozdziale 2.6, odczynnik derywatyzujący 2-HAP może być stosowany do derywatyzacji 2-cyjanoacetamidu zarówno w reakcji prowadzonej przedkolumnowo, jak i pokolumnowo (Schemat 18) [40]. Autorzy wykazali, że w przeciwieństwie do metody opartej na derywatyzacji przedkolumnowej, metoda wykorzystująca derywatyzację pokolumnową charakteryzowała się wyższą precyzją i dokładnością. W 2015 r. opublikowano pracę, w której derywatyzację pokolumnową z 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylem (DPPH) wykorzystano do oznaczania szeregu homologicznego skondensowanych polifenoli w niepalonych ziarnach kakaowca [51]. Niewątpliwie zaletą tego odczynnika derywatyzującego jest fakt, iż umożliwia oznaczanie polifenoli, a także określenie zdolności przeciwutleniającej wydzielonych skondensowanych polifenoli.

Zestawienie omawianych metod oznaczania wybranych związków z zastosowaniem derywatyzacji pokolumnowej przedstawiono w Tabeli 5.

LOQ Lit.	$\begin{array}{c c} 0,01-0,08^{a} & [41] \\ mg/100g & [41] \end{array}$	0,09 <sup>a</sup> [42] mg/kg	0,5 [43] mg/kg	0,04 [44] mg/100g	0,004- 0,011ª% [45]	30	ng/g [46]
LOD	p.d.	0,03ª mg/kg	0,2 mg/kg	0,1 µg/ml	0,001–0,004*%	10	g/gu
$\lambda_{ m ex}/\lambda_{ m em}$ [nm]	340/450	340/450	330/465	340/450	345/450	263/435	
γ [um]	I	I	I	Ι	1	I	
Detekcja	FLD	FLD	FLD	FLD	FLD	FLD	
Charakterystyka procedury derywatyzacji	Mieszanina niezbędna do przeprowadzenia badanych analitów w nochodna	fluoryzującą składała się z OPA, 2-ME oraz dostępnego handlowo roztworu	Brij-35. Całość rozpuszczano w buforze boranowym, aby pH otrzymanego roztworu	byto równe 10,5. Reakcję derywatyzacji prowadzono w warunkach temperatury pokojowej.	Odczynnik derywatyzujący z dodatkiem 2-ME rozpuszczano w roztworze tetraboranu sodu, a końcowa wartość pH wynosiła 10. Temperatura układu reakcyjnego nie przekraczała 25°C. Reakcja derywatyzacji prowadzona była w reaktorze pokolumnowym PCRS-100 o objętości 250 µl, którego pętla kapilarna miała średnicę 0,42 mm.	Reakcja derywatyzacji zachodziła w środowisku alkalicznym w pętli kapilarnej o wymiarach 0,3 mm × 10 m. Tomozotren (1974) w solecnioso utremu	vana była na poziomie 50°C.
Matryca	owoce tropikalne	świeże ryby oraz z puszki	mięso i produkty jego pochodzenia	kukurydza i produkty jej pochodzenia	L-walinol	ogórek i kapusta pekińska	
Odczynnik derywaty- zujący	OPA			OPA	NQS		
Analit	aminy biogenne	histamina		biogenne	aminoalkohole	streptomycyna	

Ciąg dalszy	Continuation
Tabela 5.	Table 5.

_						
	Lit.	[48]	[48]		[40]	
	ГОО	b.d.	62ª nmol/l	b.d.	12,5ª µg/1	
	LOD	80ª pmol	19ª I/lomn	0,04–0,58 µmol/l	3,8 <sup>a</sup> µg/1	
	$\lambda_{ m ex}/\lambda_{ m em}$ [nm]	I	340/455	ı	356/445	
	$\lambda \label{eq:constraint}$	680	I	410	I	
	Detekcja	UV	PLD UV		MS/APCI	
	Charakterystyka procedury derywatyzacji	Reakcja derywatyzacji prowadzona była w reaktorze pokolumnowym RXN 1000 o objętości 1 ml, o średnicy pętli kapilarnej 0,45 m. Proces agregacji niejonowych nano cząsteczek fluorosurfaktanta zacho- dził w środowisku buforu fosforanowego o pH = 6 w temperaturze 70°C w ciągu 30 sekund.	Pętla reakcyjna miała wymiary 0,5 mm×120 cm. Reakcja prowadzona była w buforze boranowym o pH 10, w którym rozpuszczony był OPA, natomiast jony amonowe biorące udział w tworzeniu pochodnej znajdowały się w fazie ruchomej płynącej przez kolumnę.	Reakcję derywatyzacji prowadzono w pętli reakcyjnej o wymiarach 0,5 mm × 5 m. Reakcja zachodziła w środowisku buforu fosforanowego o pH 2,85.	Reakcję derywatyzacji prowadzono w środowisku buforu boranowego o pH 11. Temperatura układu reakcyjnego utrzy- mywana była na poziomie 100°C. Reaktor wyposażony był w kapilarną pętlę długości 127 cm. Czas reakcji derywatyzacji wyno- sił 8 min.	
	Matryca	mocz i osocze	mocz i osocze wino		farmaceutyki	
	Odczynnik derywaty- zujący	AuNPs	OPA	DTNB	2-HAP	
	Analit	Hcy glutation		biotiole	2-CA	

Ciąg dalszy Continuation Tabela 5. Table 5.

Lit.	[51]				
род	19–83 <sup>ª</sup> µg/ml				
LOD	6–27ª µg/ml				
$\lambda_{ m ex}^{}/\lambda_{ m em}^{}$	I				
$\lambda \  \   [nm]$	515				
Detekcja	UV-Vis				
Charakterystyka procedury derywatyzacji	Reakcja derywatyzacji zachodziła w pętli kapilarnej o wymiarach 0,38 mm × 4,5 m. Czas reakcji był krótki i odpowiadał 1 minu- cie. Wyposażony w kapilarną pętlę reaktor termostatowany był w temperaturze 60°C.				
Matryca	niepalone ziarna kakaowca				
Odczynnik derywaty- zujący	Нада				
Analit	aktywność antyoksyda- cyjna				

<sup>a</sup> Obliczone dla roztworów standardowych. b.d. – brak danych.

#### 4. DERYWATYZACJA W KOLUMNIE

Spośród trzech rodzajów prowadzenia reakcji derywatyzacji ta w kolumnie jest najrzadziej stosowana. W połączeniu z techniką HPLC umożliwia prowadzenie szybkich i prostych analiz z uzyskaniem wąskich i ostrych pików w porównaniu do analiz z wykorzystaniem derywatyzacji pokolumnowej [1].

Na przestrzeni lat 2010–2016 zostały opublikowane 3 artykuły, dotyczące zastosowania derywatyzacji chemicznej biegnącej w kolumnie chromatograficznej (Tab. 6).

Analit	Odczynnik derywatyzujący	Matryca	Detekcja	$\lambda_{ m ex}/\lambda_{ m em}$ [nm]	LOD [µmol/l]	LOQ [µmol/l]	Lit.	
zred. Hcy				370/480	b.d.	0,025 <sup>a</sup>	[52]	
tHcy		mocz	FLD		b.d.	0,025 <sup>a</sup>		
tiolakton Hcy	OPA	mocz			b.d.	0,02 <sup>a</sup>	[53]	
tHcy					b.d.	0,25 <sup>a</sup>		
tHcy		osocze			b.d.	0,25ª		
N-Hcy					b.d.	0,25 <sup>a</sup>		
tHcy		wino			0,05ª	0,1 <sup>a</sup>	[54]	

Tabela 6.Wybrane przykłady metod wykorzystujących derywatyzację w kolumnieTable 6.The selected methods using on-column derivatization

<sup>a</sup> Obliczone dla roztworów standardowych.

b.d. – brak danych.

Opisane analizy prowadzono techniką HPLC z detekcją FLD [52–54]. Odczynnikiem, który wykorzystywano do przekształcania badanych analitów w pochodną fluoryzującą był OPA (Schemat 20). Opracowane metody pozwoliły na oznaczanie: formy zredukowanej (Hcy) i całkowitej homocysteiny (tHcy) w moczu człowieka [52]; tiolaktonu homocysteiny, homocysteiny związanej z proteinami wiązaniem amidowym (*N*-Hcy) oraz tHcy w osoczu i moczu człowieka [53]; jak również tHcy w winie [54]. Do fazy ruchomej dodawano OPA oraz 0,1 M NaOH, w konsekwencji czego pH fazy było silnie zasadowe. Wykonanie analizy o wysokiej wydajności w drastycznych warunkach umożliwiło zastosowanie kolumny PRP-1 Hamilton C18. Z uwagi na jej stabilność w zakresie pH 1–13, reakcja derywatyzacji mogła być prowadzona przy wysokich wartościach pH (8–13). Dzięki temu nie dochodziło do degradacji wypełnienia kolumny i utraty jej sprawności.



Derywatyzacja w kolumnie uprościła procedurę, umożliwiając tym samym bezpośrednie oznaczenie hydrolizatów białek osocza [54], co znacząco przyśpieszyło również oznaczenie formy *N*-Hcy. Dodatkowo pozwoliła ona obniżyć wartości LOD tHcy w moczu, w porównaniu do wcześniej opisanej metody [53]. Przedstawione powyżej metody oparte na derywatyzacji w kolumnie z OPA, przede wszystkim eliminują ograniczenia derywatyzacji pokolumnowej. Skracają całkowity czas analizy oraz pozwalają uzyskać wąskie piki chromatograficzne.

#### PODSUMOWANIE

Koncepcja zielonej chemii propaguje działania zmierzające do wyeliminowania, bądź ograniczenia stosowania procesu derywatyzacji. Dostępne są procedury analityczne stosowane do rozdzielania analitów bez ich uprzedniego przeprowadzenia w pochodne. Jednakże często są one bardzo pracochłonne, bądź wymagają specjalistycznej aparatury. Dlatego też alternatywą wobec tych ograniczeń staje się proces derywatyzacji, który przede wszystkim zwiększa selektywność i czułość oznaczeń. Poprzez wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych, poprawia właściwości separacyjne analizowanych związków oraz umożliwia ich detekcję. Przeprowadzenie analitu w pochodną z wykorzystaniem powszechnie dostępnych odczynników derywatyzujących można łatwo zautomatyzować, zmniejszając ilość etapów przygotowania próbki i tym samym poprawić powtarzalność uzyskiwanych wyników. Liczne zalety oraz szeroka gama odczynników derywatyzujących warunkują nieustanny rozwój technik derywatyzacji i opracowywanie nowych procedur oznaczania.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.L. Grob, M.A. Kaiser, *Environmental problem solving using gas and liquid chromatography*, Elsevier, Amsterdam, New York 1982.
- [2] J. Kalembkiewicz, T. Ruman, Wiad. Chem., 2004, 58, 113.
- [3] J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, CEEAM, Gdańsk 2003.
- [4] P. Furmaniak, M. Wyszczelska-Rokiel, P. Kubalczyk, R. Głowacki, Wiad. Chem., 2014, 68, 211.

- [5] L. Coppex, Derivatives for HPLC Analysis. Diploma thesis, [online], University of Genf, 2000, [dostęp: 2016-07-12]. Dostępny w Internecie: https://pl.scribd.com/doc/ 189706760/ Derivatives-for-HPLC-Analysis.
- [6] A. Jones, S. Pravadali-Cekic, G.R. Dennis, R.A. Shalliker, Anal. Chim. Acta, 2015, 889, 58.
- [7] N.D. Cheronis, H. Stein, V.M. Levey, Microchem. J., 1957, 1, 39.
- [8] P.E. Butler, W.H. Mueller, Anal. Chem., 1966, 38, 1407.
- [9] F.A. Fitzpatrick, S. Siggia, Anal. Chem., 1973, 45, 2310.
- [10] I.R. Politzer, G.W. Griffin, B.J. Dowty, J.L. Laseter, Anal. Lett., 1973, 6, 539.
- [11] R.W. Frei, L. Michel, W. Santi, J. Chromatogr., 1976, 126, 665.
- [12] K. Blau, G.S. King, Handbook of Derivatives for Chromatography, Heyden & Son Ltd.: London 1977.
- [13] J.C. Gfeller, J.M. Huen, J.P. Thevenin, J. Chromatogr., 1978, 166, 133.
- [14] K. Saito, M. Horie, H. Nakazawa, J. Food Hyg. Soc. Jpn., 1995, 36, 639.
- [15] A. Namera, A. So, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A, 2002, 963, 295.
- [16] M.C. Prieto-Blanco, C. Ch'afer-Peric'as, P. L'opez-Mah'ıa, P. Camp'ıns-Falc', J. Chromatogr. A, 2008, 1188, 118.
- [17] M. Saaid M, B. Saad, A.S.M. Ali, M.I. Saleh, C. Basheer, H.K. Lee, J. Chromatogr. A, 2009, 1216, 5165.
- [18] X. Xu, R. Su, X. Zhao, Z. Liu, Y. Zhang, D. Li, X. Li, H. Zhang, Z. Wang, Anal. Chim. Acta, 2011, 707, 92.
- [19] Y.Z. Baghdady, K.A. Schug, J. Sep. Sci., 2016, 39, 102.
- [20] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, Anal. Chim. Acta, 2004, 513, 425.
- [21] E. Kłodzińska, W.A. Filipiak, M. Szumski, B. Buszewski, Chemia i Inżynieria Ekologiczna, 2004, 11, 423.
- [22] Y. Cai, Z. Sun, G. Chen, X. Liu, J. You, C. Zhang, Food Chem., 2016, 192, 388.
- [23] H. Yoshida, K. Kondo, H. Yamamoto, N. Kageyama, S.I. Ozawaa, K. Shimboa, T. Muramatsu, A. Imaizumi, T. Mizukoshi, J. Masuda, D. Nakayama, Y. Hayakawa, K. Watanabe, K. Mukaibatake, H. Miyano, J. Chromatogr. B, 2015, 88, 998.
- [24] S.M. Buha, A. Panchal, H. Panchal, R. Chambhare, S. Kumar, M. Jain, P.R. Patel, J. Chromatogr. Sci., 2011, 49, 118.
- [25] C. Ezquer-Garin, L. Escuder-Gilabert, Y. Martín-Biosca, R.F. Lisart, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, Talanta, 2016, 150, 510.
- [26] C.Y. Wang, S.Y. Tung, Y.S. Lo, H.L. Huang, C.H. Ko, Ch.H. Wu, Talanta, 2016, 152, 475.
- [27] Y. LI, J. Zhou, X. Xue, L. Wu, L. Chen, J. Zhang, S. Yang, Anal. Methods, 2015, 7, 7625.
- [28] N.Y. Khalil, I.A. Darwish, T.A. Wani, A.R. Al-Majed, Chem. Cent. J., 2013, 1, 52.
- [29] H. Wang, Y.R. McNeil, T.W. Yeo, N.M. Anstey, J. Chromatogr. B, 2013, 940, 53.
- [30] N. Li, Y. Liu, Y. Zhao, X. Zheng, J. Lu, Y. Liang, Food Anal. Methods, 2016, 9, 1307.
- [31] P. Salgado, T. Visnevschi-Necrasov, R.P. Kieneb, I. Azevedo, A.C.S. Rochaa, C.M.R. Almeida, C. Magalhães, J. Chromatogr. B, 2015, 992, 103.
- [32] A. Samara, A. Zotou, P. Tzanavaras, Food Anal. Methods, 2016, 9, 680.
- [33] G. Chwatko, P. Kubalczyk, E. Bald, Curr. Anal. Chem., 2014, 10, 320.
- [34] Y. Higashi, J. Anal. Chem., 2015, 70, 1401.
- [35] Y. Higashi, Y. Fujii, J. Liq. Chromatogr. R. T., 2011, 34,18.
- [36] G. Li, S. Liu, Z. Sun, L. Xia, G. Chen, J. You, Food Chem., 2015, 170, 123.
- [37] Y.H. Lu, Y.M. Cao, X.F. Guo, H. Wang, H.S. Zhang, Anal. Methods, 2016, 8, 1520.
- [38] J. Zhao, G. Wang, T. Cao, Z. Guo, Food Anal. Methods, 2016, 9,156.
- [39] M. Douša, J. Břicháč, M. Tkadlecová, S. Man, J. Zezula, J. Hájiček, T. Pekárek, J. Pharmaceut. Biomed., 2016, 128, 391.

- [40] G. Chwatko, E. Bald, Talanta, 2009, 79, 229.
- [41] P. Santiago-Silva, R.A. Labanca, M. Beatriz, A. Gloria, Food Rest Int., 2011, 44, 1264.
- [42] W.P. Evangelista, T.M. Silva, L.R. Guidi, P.A.S. Tette, R.M.D. Byrro, P. Santiago-Silva, Ch. Fernandes, M.B.A. Gloria, Food Chem., 2016, 211, 100.
- [43] D. Rosinska, J. Lehotay, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2014, 37, 609.
- [44] C.M. Bandeira, W.P. Evangelista, M.B.A. Gloria, Food Chem., 2012, 131, 1355.
- [45] M. Douša, J. Stach, P. Gibala, K. Lemr, J. Sep. Sci., 2016, 39, 851.
- [46] B. Chen, H. Zhang, B. Lin, J. Ge, L. Qiu, J. AOAC Int., 2012, 95, 523.
- [47] G.S. Yánez-Jácome, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, J. Chromatogr. A, 2015, 1405, 126.
- [48] C. Lu, Yanbing Zu, V.W-W. Yam, Anal. Chem., 2007, 79, 666.
- [49] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, T.D. Karakosta, D.G. Themelis, Anal. Chim. Acta, 2013, 795, 75.
- [50] M. Özyürek, S. Baki, N. Güngör, S.E. Çelik, K. Güçlü, R. Apak, Anal. Chim. Acta, 2012, 750, 173.
- [51] V. Pedan, N. Fischer, S. Rohn, Food Res. Int., 2015, 89, 890.
- [52] R. Głowacki, K. Borowczyk, E. Bald, H. Jakubowski, Anal. Bioanal. Chem., 2010, 396, 2363.
- [53] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, Amino Acids, 2011, 41, 187.
- [54] R. Głowacki, K. Borowczyk, E. Bald, Amino Acids, 2012, 42, 247.
- [55] R. Głowacki, Wiad. Chem., 2009, 63, 11.
- [56] J.M. Płotka-Wasylka, C. Morrison, M. Biziuk, J. Namieśnik, Chem. Rev., 2015, 115, 4693.

Praca wpłynęła do Redakcji

# OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Łódź, dnia 08.02.2021 r.



dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ Katedra Chemii Środowiska tel. 042-635-58-43

# Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w wymienionych poniżej pracach, włączonych przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej polegał na konsultacji naukowych na etapie prowadzenia eksperymentu i podczas pisania manuskryptu oraz korespondencji z edytorami czasopism (z wyłączeniem pracy nr 5 – autor korespondencyjny Doktorantka).

- Chwatko G., Krawczyk M., Iciek M., Kamińska A., Bilska-Wilkosz A., Marcykiewicz B., Głowacki R., Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Arab. J. Chem.* 2019, 12, 4878-4886.
- Kamińska A., Głowacka I.E., Pasternak B., Głowacki R., Chwatko G., The first method for determination of lipoyllysine in human urine after oral lipoic acid supplementation. *Bioanalysis* 2019, 11, 1359-1373.
- Krawczyk M. J., Kamińska A., Chwatko G., Homogenizacja tkanek nieodzowny etap przygotowania próbki stałej do analizy. *Analityka: nauka i praktyka* 2017, 2, 42-47
- 4. Kamińska A., Chwatko G., Estimation of lipoyllysine content in meat and its antioxidative capacity. J. Agric. Food Chem. 2020, 68, 10992-10999.
- 5. Kamińska A., Krawczyk M. J., Chwatko G., Derywatyzacja chemiczna w wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Wiad. Chem. 2016, 70, 771-802.

Grazyno Chieko

Katedra Chemii Środowiska ul. Pomorska 163, 90-236 Łódź e-mail: grazyna.chwatko@chemia.uni.lodz.pl

Kraków, 15.01.2021

dr hab. Małgorzata Iciek Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum Katedra Biochemii Lekarskiej ul. Kopernika 7 31-034 Kraków

# Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w pracę zatytułowaną *"Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection"* autorstwa Grażyna Chwatko, Marta Krawczyk, Małgorzata Iciek, Adrianna Kamińska, Anna Bilska-Wilkosz, Bernadeta Marcykiewicz, Rafał Głowacki, która została opublikowana w *Arabian Journal of Chemistry* (2019, 12, 4878-4886) i włączona przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej polegał na statystycznej analizie uzyskanych danych oraz dyskusji uzyskanych rezultatów.

Malgonste Juik

Kraków, 15.01.2021

### dr Anna Bilska-Wilkosz Uniwersytet Jagielloński

**Collegium Medicum** Katedra Biochemii Lekarskiej ul. Kopernika 7 31-034 Kraków

# Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy zatytułowanej "Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection" autorstwa Grażyna Chwatko, Marta Krawczyk, Małgorzata Iciek, Adrianna Kamińska, Anna Bilska-Wilkosz, Bernadeta Marcykiewicz, Rafał Głowacki, opublikowanej w Arabian Journal of Chemistry (2019, 12, 4878-4886), włączonej przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej polegał na kolekcji próbek osocza oraz udziale w statystycznej obróbce danych.

Anna Bilsko-Willow

# Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w pracę *Determination of lipoic acid in human plasma by highperformance liquid chromatography with ultraviolet detection, Arabian Journal of Chemistry* (2019, 12, 4878-4886), autorstwa Grażyna Chwatko, Marta Krawczyk, Małgorzata Iciek, Adrianna Kamińska, Anna Bilska-Wilkosz, Bernadeta Marcykiewicz, Rafał Głowacki, włączoną przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej, polegał na opiece nad eksperymentem obejmującym suplementację ochotników kwasem liponowym.

Bernordite

Łódź, 11.01.2021

dr Marta Krawczyk-Walach Laboratorium Analityki Chemicznej SBŁ – Instytut Biopolimerów i Włókien Chemicznych ul. M. Skłodowskiej-Curie 19/27 90-570 Łódź

### Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w pracę zatytułowaną "Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection" autorstwa Grażyna Chwatko, Marta Krawczyk, Małgorzata Iciek, Adrianna Kamińska, Anna Bilska-Wilkosz, Bernadeta Marcykiewicz, Rafał Głowacki, która została opublikowana w Arabian Journal of Chemistry (2019, 12, 4878-4886) i włączona przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej polegał na uczestnictwie w etapie optymalizacji warunków przygotowania próbek osocza do analizy chromatograficznej.

Knowyle. wehen Mise

Łódź, dnia 08.01.2021 r.



prof. dr hab. Rafał Głowacki Kierownik Katedry Chemii Środowiska tel. 042-635-58-35

# Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w wymienionych poniżej pracach, włączonych przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej polegał na konsultacji podczas dyskusji uzyskanych wyników oraz udzieleniu krytycznych uwag na etapie pisania manuskryptu.

- Chwatko G., Krawczyk M., Iciek M., Kamińska A., Bilska-Wilkosz A., Marcykiewicz B., Głowacki R., Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Arab. J. Chem.* 2019, 12, 4878-4886.
- Kamińska A., Głowacka I.E., Pasternak B., Głowacki R., Chwatko G., The first method for determination of lipoyllysine in human urine after oral lipoic acid supplementation. *Bioanalysis* 2019, 11, 1359-1373.

Goverale' Dafet

Katedra Chemii Środowiska ul. Pomorska 163, 90-236 Łódź e-mail: rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl
Łódź, 08.01.2021

dr hab. n. farm. prof. uczelni Iwona Głowacka Uniwersytet Medyczny w Łodzi Wydział Farmaceutyczny Zakład Chemii Bioorganicznej

## Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w pracę zatytułowaną *"The first method for determination of lipoyllysine in human urine after oral lipoic acid supplementation"* opublikowanej w *Bioanalysis* (2019, 11, 1359-1373), włączonej przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej polegał na syntezie i oczyszczeniu standardu liponylolizyny oraz wykonaniu i interpretacji widm IR i NMR.

Tuona Giowacka

Łódź, 11.01.2021

dr Marta Krawczyk-Walach Laboratorium Analityki Chemicznej SBŁ – Instytut Biopolimerów i Włókien Chemicznych ul. M. Skłodowskiej-Curie 19/27 90-570 Łódź

## Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w pracę zatytułowaną *"Homogenizacja tkanek – nieodzowny etap przygotowania próbki stałej do analizy"* autorstwa, Marta Krawczyk, Adrianna Kamińska, Grażyna Chwatko, która została opublikowana w *Analityka: nauka i praktyka* (2017, 2, 42-47) i włączona przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej polegał na opracowaniu podrozdziału zatytułowanego "Wybrane sposoby przygotowania stałego materiału biologicznego do badań".

Knowyh-Welsen Horse

Łódź, 25.01.2021

dr Beata Pasternak Uniwersytet Łódzki Wydział Chemii Katedra Chemii Organicznej Pracownia Spektroskopii Molekularnej

## Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w pracę zatytułowaną *"The first method for determination of lipoyllysine in human urine after oral lipoic acid supplementation"* (*Bioanalysis* 2019, vol. 11, s. 1359-1373), która została włączona przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej polegał na wykonaniu i interpretacji widm MS liponylolizyny.

Besta Postemole

Łódź, 11.01.2021

dr Marta Krawczyk-Walach Laboratorium Analityki Chemicznej SBŁ – Instytut Biopolimerów i Włókien Chemicznych ul. M. Skłodowskiej-Curie 19/27 90-570 Łódź

## Oświadczenie

Oświadczam, że mój wkład w pracę zatytułowaną *"Derywatyzacja chemiczna w wysokosprawnej chromatografii cieczowej"* autorstwa Adrianna Kamińska, Marta Krawczyk, Grażyna Chwatko, która została opublikowana w *Wiadomościach chemicznych* (2016, 70, 771-802) i włączona przez Panią mgr Adriannę Kamińską (Warkoczewską) do rozprawy doktorskiej polegał na opracowaniu podrozdziału zatytułowanego "Derywatyzacja pokolumnowa".

Knewyk-cheesen Merke