

**ZASTOSOWANIE SOLI CHINOLINIOWYCH  
I PIRYDINIOWYCH DO OZNACZANIA  
WYBRANYCH ZWIĄZKÓW SIARKI  
W PRÓBKACH BIOLOGICZNYCH**

APPLICATION OF QUINOLINIUM AND PYRIDINIUM  
SALTS FOR DETERMINATION OF SELECTED SULFUR  
COMPOUNDS IN BIOLOGICAL SAMPLES

**Paulina Furmaniak, Monika Wyszczelska-Rokiel,  
Paweł Kubalczyk, Rafał Głowacki\***

*Katedra Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki  
\*e-mail: glowar@uni.lodz.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Charakterystyka soli oniowych
2. Sole pirydyniowe i chinoliniowe jako odczynniki derywatyzujące
  - 2.1. Reaktywność soli oniowych względem wybranych związków siarki
  - 2.2. Właściwości fizykochemiczne pochodnych
3. Wykorzystanie soli oniowych w analityce próbek biologicznych
  - 3.1. Zastosowanie do próbek osocza
  - 3.2. Zastosowanie do próbek moczu
  - 3.3. Ślina, homogenaty tkanek roślinnych i produkty spożywcze

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---



**Mgr Paulina Furmaniak** studiowała w latach 2007–2012 na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego na kierunku chemia. W 2012 roku ukończyła studia chemiczne broniąc pracę magisterską w Katedrze Chemii Organicznej na temat „Supramolekularne agregaty polilaktydów gwiaździstych poprzez oddziaływanie grup końcowych”. Obecnie jest słuchaczką drugiego roku studiów doktoranckich prowadzonych na Wydziale Chemii UŁ. Zainteresowania naukowe mgr Furmaniak dotyczą opracowywania nowych metod analitycznych z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej i umożliwiających badania związków aktywnych biologicznie.



**Mgr Monika Wyszczelska** ukończyła studia chemiczne na Uniwersytecie Łódzkim w roku 2011. Pracę magisterską na temat „Badanie właściwości tri-biologicznych pochodnych kwasów dialkilo(arylo)ditiiofosforowych w układach kompozytowych” obroniła w Katedrze Technologii i Chemii Materiałów. W tym samym roku rozpoczęła czteroletnie studia doktoranckie na Wydziale Chemii UŁ. Zainteresowania naukowe mgr Wyszczelskiej-Rokiel obejmują opracowywanie nowych metod wykrywania i oznaczania związków siarki w próbkach biologicznych.



**Dr Paweł Kubalczyk** studia chemiczne na Uniwersytecie Łódzkim ukończył w 1996 roku. Jest pracownikiem Uniwersytetu Łódzkiego od 1996 r. Początkowo był zatrudniony na stanowisku asystenta, a od czerwca 2003 roku na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii UŁ. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 2003 roku po przedstawieniu rozprawy na temat: „Wysokosprawna elektroforeza kapilarna 2-S-pirydyniowych pochodnych hydrofilowych tioli”. Zainteresowania naukowe dr. Pawła Kubalczyka od początku jego działalności badawczej dotyczyły analizy chemicznej zanieczyszczeń środowiska, roli związków siarki w organizmie człowieka oraz rozwijania nowych metod wykrywania i oznaczania biologicznie

ważnych związków siarki w próbkach biologicznych z zastosowaniem techniki wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej. W ostatnich latach jego badania naukowe ukierunkowane są na problematykę dotyczącą wyrafinowanych metod zateżania analitów bezpośrednio w układzie pomiarowym kapilarnej elektroforezy.



**Dr hab. Rafał Głowacki** ukończył studia na Uniwersytecie Łódzkim w roku 1996. W tym samym roku podjął pracę w ówczesnym Zakładzie Chemii Środowiska Katedry Technologii Chemicznej i Ochrony Środowiska UŁ. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 2001. W latach 2002–2003 odbył staż podoktorski w University of Medicine and Dentistry of New Jersey (USA), związany z biochemicznymi aspektami roli homocysteiny i tiolaktonu homocysteiny w schorzeniach sercowo-naczyniowych. Wiosną 2011 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badanie mechanizmu homocysteinylacji białek z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii

cieczowej”. Obecnie jest zatrudniony na stanowisku profesora nadzwyczajnego w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii UŁ. Jego aktualne zainteresowania naukowe dotyczą m.in. chemii i biochemii aminotiolu, ich oddziaływań z białkami, analityki próbek biologicznych, analizy chemicznej zanieczyszczeń środowiska z wykorzystaniem technik separacyjnych w fazie ciekłej, a także możliwości zwiększenia czułości CE z wykorzystaniem zateżania analitów w kapilarze.

## ABSTRACT

Quinolinium and pyridinium salts belong to the group of onium compounds and are widely used in organic, structural and analytical chemistry. Their synthesis is mainly based on quaternization of the nitrogen atom in a heterocyclic ring [4, 13, 23]. In analytical chemistry quinolinium and pyridinium salts such as 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate (CMQT) or 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide (BCPB) perform very well as thiol specific derivatization reagents in terms of derivatization reaction velocity, stability, chromatographic properties of the derivatives, and thus, amenability to automatization [18–22, 32–42]. Analytical procedures for thiol determination usually involve reduction of disulfide bonds with tris(2-carboxyethyl)phosphine, tri-*n*-butylphosphine or mercaptoethanol, chemical derivatization of the sulfur compound with the use of 2-halopyridinium or 2-haloquinolinium salts and then deproteinization, followed by ion-pair reversed-phase HPLC or CE separation and spectrophotometric detection. Derivatization reaction takes advantage of great susceptibility of quinolinium or pyridinium molecules at 2-position to nucleophilic displacement, and a high nucleophilicity of the thiol group. Derivatization reaction mixture is usually ready to be analyzed just after mixing of the substrates. CMQT and BCPB exhibit very high reactivity toward thiols [44, 45], sulfides [63] as well as thiosulfates [40, 54]. 2-S-quinolinium and 2-S-pyridinium derivatives possess advantageous spectrophotometric and chromatographic properties. They are stable and more hydrophobic than thiols themselves, possessing a well-defined absorption maximum in the UV region. The reaction is accompanied by an analytically advantageous bathochromic shift from reagent maximum to the maximum of the derivative. Thanks to this phenomenon it is possible to use a large excess of derivatization reagent in order to drive the reaction to completion and avoid a huge signal of unreacted compound on the chromatogram [26]. Elaborated with the use of onium salts methods have proven to be useful in quantitative HPLC and CE analysis of endogenous and exogenous low-molecular-weight biological thiols in human body fluids, plant extracts and some groceries [44, 45].

**Keywords:** pyridinium salts, quinolinium salts, thiol aminoacids, chemical derivatization, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis

**Słowa kluczowe:** sole pirydyniowe, sole chinoliniowe, aminokwasy tiolowe, derywatywacja chemiczna, wysokosprawna chromatografia cieczowa, elektroforeza kapilarna

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKROTÓW

BCPB	- bromek 1-benzylo-2-chloropirydyniowy
CMLT	- tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylolepidyniowy
CMPI	- jodek-2-chloro-1-metylopirydyniowy
CMQT	- tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy
CPPI	- jodek 2-chloro-1-propylopirydyniowy
Cys	- cysteina
Cys-Gly	- cysteinyloglicyna
DNPH	- 2,4-dinitrofenylohydrazyna
DTT	- ditiotreitol
FLD	- detektor spektrofotometryczny
GSH	- glutation
$\gamma$ -Glu-Cys	- $\gamma$ -glutamylcysteina
Hcy	- homocysteina
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa
MTE	- merkaptoetanol
<i>N</i> -acetylo-Cys	- <i>N</i> -acetylocysteina
$N\epsilon$ -Hcy-Lys	- $N\epsilon$ -homocysteinylo-lizyna
OPA	- aldehyd <i>o</i> -ftalowy
PCA	- kwas chlorowy (VII)
RP-HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
TBF	- tri- <i>n</i> -butylofosfina
TCEP	- tris(2-karboksyetylo)fosfina
TMSH	- wodorotlenek trimetylosulfoniowy
UV-Vis	- spektrofotometria z zakresu promieniowania ultrafioletowego i widzialnego

## WPROWADZENIE

Sole pirydyniowe i chinoliniowe należą do grupy związków szeroko wykorzystywanych w przemyśle, a także różnych dziedzinach nauki, włączając chemię organiczną, strukturalną i analityczną. Najczęstszą metodą ich syntezy jest czwartorzędowanie atomu azotu w pierścieniu aromatycznym. Sole takie jak bromek 1-benzylo-2-chloropirydiniowy oraz tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy są od lat z powodzeniem wykorzystywane w analityce związków siarki. Ich duża reaktywność oraz selektywność względem aminokwasów tiolowych, jonów tiosiarczanowych i siarczkowych oraz możliwość tworzenia stabilnych, aktywnych spektrofotometrycznie pochodnych sprawiły, że znalazły one zastosowanie podczas opracowywania wielu metod analitycznych, wykorzystujących techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej, elektroforezy kapilarnej i spektrofotometrii. Opracowane z ich udziałem metodyki oznaczania biologicznie ważnych aminokwasów tiolowych obejmują zazwyczaj etap redukcji wiązań disiarczkowych, po czym następuje etap derywatyzacji, deproteinizacji i końcowa analiza jedną z wyżej wymienionych technik. Mechanizm reakcji z tiolami polega na podstawieniu nukleofilowym atomu halogenu w pozycji 2 pierścienia heterocyklicznego przez silnie nukleofilową grupę tiolową. Cechą charakterystyczną jest możliwość prowadzenia reakcji w łagodnych warunkach, tj. w roztworze wodnym i temperaturze pokojowej. Czas reakcji nie przekracza wówczas kilku, a tylko w niektórych przypadkach kilkunastu minut. Otrzymywane pochodne – stabilne tioetery, wykazują bardzo korzystne właściwości spektroskopowe i chromatograficzne. Obserwowane zjawisko przesunięcia batochromowego pozwala na stosowanie znacznych nadmiarów molowych odczynnika derywatyzującego w stosunku do analitu, co przyspiesza reakcję, nie powodując jednocześnie utrudnienia w interpretacji chromatogramu. Wykorzystując sole oniowe opracowano szereg chromatograficznych i elektroforetycznych metod oznaczania hydrofilowych związków siarki w różnych matrycach, włączając osocze, moczu, ślinę oraz homogenaty tkanek roślinnych i zwierzęcych, a ich przydatność została potwierdzona w badaniach populacyjnych.

### 1. CHARAKTERYSTYKA SOLI ONIOWYCH

Związkiem oniowym nazywamy kation otrzymywany w wyniku protonowania cząsteczki posiadającej w swojej budowie atom z 15, 16 lub 17 grupy układu okresowego. Najbardziej znanym jonem oniowym jest jon amoniowy  $\text{NH}_4^+$ , będący sprotonowaną pochodną amoniaku ( $\text{NH}_3$ ). Nazwa „związki oniowe” może być również używana w stosunku do kationów powstałych w wyniku podstawienia atomów wodoru w tych jonach, przez halogenki czy rodniki organiczne, np. kation tetrafenylofosfoniowy  $(\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{P}^+$ . Jony oniowe w większości przypadków posiadają pojedynczy ładunek dodatni ( $\text{PH}_4^+$ ,  $\text{H}_3\text{S}^+$ ,  $\text{NH}_3\text{OH}^+$ ), zdarzają się jednak związki

z dwoma lub większą liczbą ładunków, o których mówi się, że są dwukrotnymi lub trójkrotnymi jonami oniovymi (np.  ${}^+\text{H}_2\text{N}=\text{NH}_2^+$ ) [1].

Związki kationu oniowego i jonu o ładunku ujemnym są nazywane solami oniovymi. Wspomniane sole są jonowymi związkami chemicznymi o wzorze ogólnym  $(\text{R}_{n+1}\text{M})^+\text{X}^-$ , gdzie **R** - oznacza atom wodoru lub rodnik organiczny, **M** - atom azotu, fosforu, siarki, tlenu, itp., **X** - określony anion, a **n** - wartościowość pierwiastka **M** w związku organicznym [2]. Wśród soli oniowych wyróżnić można m.in. sole amoniowe, sulfoniowe, pirydyniowe, chinoliniowe czy fosfoniowe.

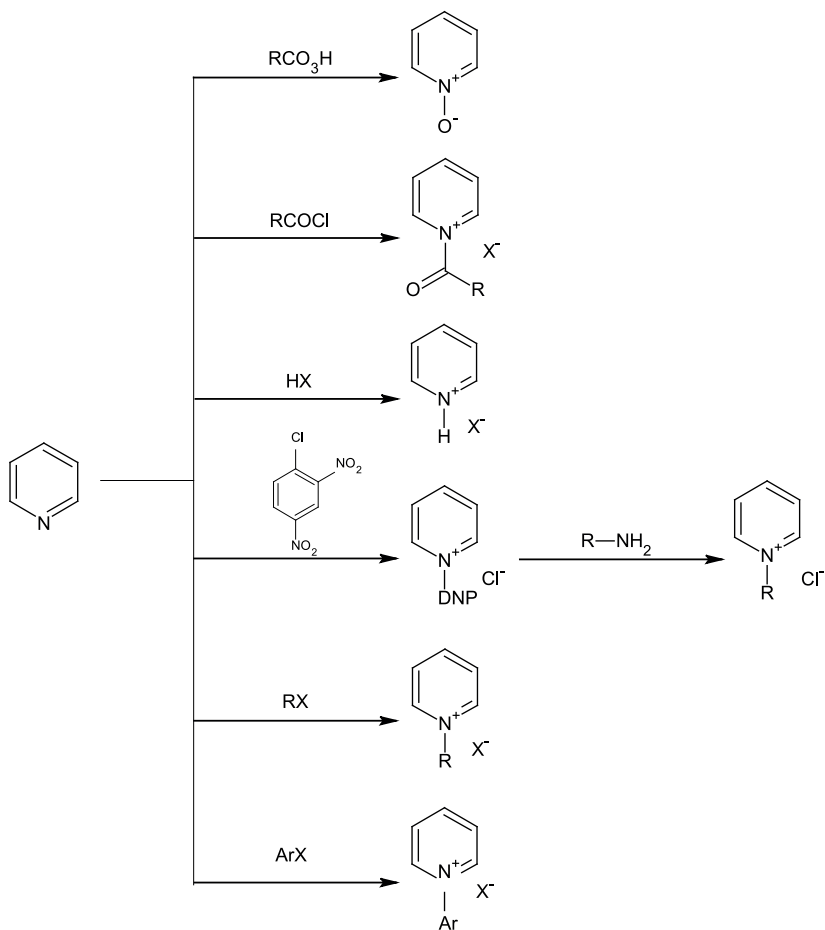
Syntezę organiczną soli oniowych zapoczątkowali w 1894 r. Hartmann oraz Meyer przygotowując wodorosiarczany 4-jododifenyloniowy, sugerując tym samym zakończenie oniowe jako właściwe dla tego rodzaju związków [3]. Najczęściej wykorzystywanym sposobem syntezy soli oniowych, takich jak sole amoniowe są reakcje czwartorzędowania, czyli otrzymywania amin czwartorzędowych lub reakcje wymiany halogenku w innej soli [4]. Przykładem tego typu reakcji może być synteza fenacylowych soli oniowych, wykorzystująca reakcję halogenku fenacylu z nukleofilowym związkiem heteroatomowym [5].

Specyficzna budowa oraz unikatowe właściwości soli oniowych umożliwiają ich wykorzystanie, m.in. jako katalizatorów w asymetrycznej katalizie przeniesienia fazowego środków acylujących, biocydów, kationowych środków powierzchniowo czynnych, czy też do produkcji barwników i wskaźników pH [6–8]. Są również szczególną klasą związków wykorzystywanych jako inicjatory kationowych fotopolimeryzacji [9,10]. Wszystkie sole oniowe, a zwłaszcza sole diazoniowe i jodoniowe są użytecznymi reagentami w asymetrycznej syntezie organicznej. Specyficzne związki tego typu są wykorzystywane do syntezy peptydów [11] oraz katalizowania reakcji metali przejściowych i reakcji wieloskładnikowych [12].

Spśród wielu metod syntezy soli pirydyniowych fundament stanowią reakcje podstawienia elektrofilowego na azocie w pierścieniu pirydyny (Rys. 1) [13, 14].

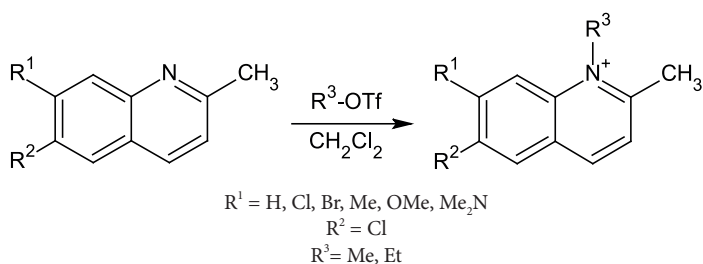
Wybór warunków reakcji czwartorzędowania pirydyny, zachodzącej zwykle wg mechanizmu  $\text{S}_{\text{N}}2$ , jest zależny od przewidywanej końcowej struktury soli pirydyniowej [15].

Czwartorzędowe sole pirydyniowe są nienasyconymi związkami heterocyklicznymi zaliczanymi do grupy kationowych związków powierzchniowo czynnych. Obecność różnych grup, zarówno w pierścieniu pirydynowym jak i na atomie azotu w pierścieniu sprawia, że sole pirydyniowe są często wykorzystywane np. w przemyśle farmaceutycznym jak i w badaniach naukowych. Mogą być stosowane jako środki antyseptyczne, antybiotyki czy jako środki dezynfekujące [16]. Pochodne tych soli wykazują również aktywność hemolityczną w stosunku do erytrocytów oraz aktywność w stosunku do bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych [17]. Sole pirydyniowe znalazły ponadto zastosowanie w analizie chemicznej jako odczynniki derywatyzujące [18–22].



Rysunek 1. Otrzymywanie soli pirydyniowych  
 Figure 1. Preparation of pyridinium salts

Spośród wielu soli oniwych dużą uwagę, ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, zwracają sole chinoliniowe. Generalną metodą ich syntezy, podobnie jak w przypadku soli pirydyniowych, jest czwartorzędowanie cząsteczki chinoliny lub jej pochodnych (Rys. 2), a także reakcje alkilowania i cyklizacji [23].



Rysunek 2. Synteza soli chinoliniowych  
 Figure 2. Synthesis of quinolinium salts

Meth-Cohn i Taylor opracowali jedną z pierwszych metod syntezy soli chinoliniowych, która opierała się na reakcji chlorku fosforylu i *N*-metyloacetanilidu. Fischer i Vilsmeier wykorzystywali opisywaną reakcję do otrzymywania barwników [24, 25]. Dla potrzeb derywatywacji związków tiolowych opracowano prostą metodę syntezy soli chinoliniowych polegającą na alkiłowaniu atomu azotu w pierścieniu chinoliny tetrafluoroboranem trimetylooksoniowym [26].

Wiele soli chinoliniowych jest uważanych za potencjalne leki przeciwnowotworowe, które posiadają w strukturze dodatnie ładunki, umożliwiające interakcje z organelami komórkowymi. Podczas badań na ludzkich komórkach naskórka wykazano zahamowanie wzrostu zmutowanych komórek po zaaplikowaniu niektórych *N*-podstawionych soli chinoliniowych, a stopień toksyczności badanych związków w stosunku do komórek rakowych jest porównywalny z antykancerogenną eliptycyną [27]. Sole chinoliniowe mogą być ponadto wykorzystywane w jednoetapowych reakcjach syntezy benzoxazocyn posiadających interesujące właściwości biologiczne umożliwiające ich wykorzystanie do produkcji leków antydepresyjnych, przeciwpyschotycznych czy przeciwzakrzepowych [28]. Niektóre sole chinoliniowe posiadają właściwości zahamujące naturalny proces apoptozy limfocytów w organizmach wielokomórkowych, jednak aktywność opisywanych struktur silnie zależy od struktury soli, a badania nad nimi wciąż trwają [29]. Interesującą grupą soli oniowych są czwartorzędowe sole chinoliniowe z długim łańcuchem alkiłowym w strukturze, wykazujące znaczne aktywności przeciwbakteryjne w szczególności względem Gram dodatnich ziarniaków, a także względem grzybów *Candida Albicans* [30]. Sole chinoliniowe takie jak sole styrylochinoliniowe są wykorzystywane również jako sondy do monitorowania przebiegu procesu polimeryzacji rodnikowej, a także jako związki pośrednie w syntezie równoległej [31]. Podobnie jak sole pirydyniowe także sole chinoliniowe są z powodzeniem stosowane w analizie chemicznej do selektywnej derywatywacji związków tiolowych [26, 32–42].



## 2. SOLE CHINOLINIOWE I PIRYDINIOWE JAKO ODCZYNNIKI DERYWATYZUJĄCE

Próbki biologiczne ze względu na różnorodność występujących w nich składników stanowią bardzo skomplikowany materiał do badań. Bardzo często podczas oznaczania niezbędnym etapem pracy jest modyfikacja właściwości fizykochemicznych analitów. Jeżeli do analiz wykorzystywana jest wysokosprawna chromatografia cieczowa lub elektroforeza kapilarna, otrzymane pochodne powinny posiadać w swojej strukturze chromofor albo fluorofor, aby umożliwić detekcję związku za pomocą klasycznych detektorów UV-Vis i FLD [43].

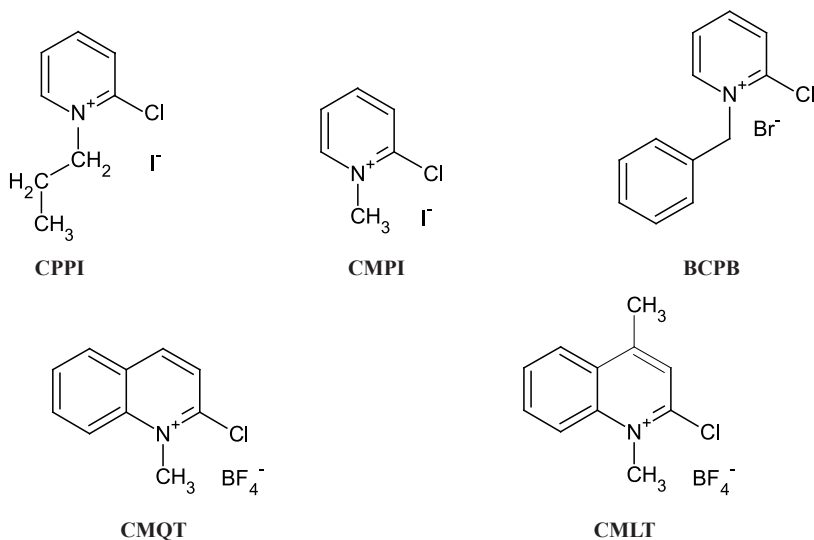
Odczynniki derywatyzujące można podzielić na kilka grup z uwzględnieniem budowy chemicznej odczynnika, a także spektroskopowych właściwości otrzymanych pochodnych. Biorąc pod uwagę klasy związków, do których należą dane odczynniki możemy wyróżnić enony, maleimidy, dialdehydy, chinony, aziridyny, disiarczki oraz związki posiadające aktywny halogen [43].

Jednymi z częściej stosowanych do derywatywacji aminokwasów tiolowych związków są halogenosulfonylobenzofurazany (SBD-F, ABD-F) oraz bromobimany [43]. Ich wadą jest stosunkowo długi czas reakcji oraz duża skłonność do rozkładu w warunkach prowadzenia reakcji, co utrudnia interpretację uzyskanych chromatogramów.

Wśród biologicznie ważnych aminokwasów tiolowych wyróżnić można cysteinę (Cys), homocysteinę (Hcy), glutation (GSH), cysteinyloglicynę (Cys-Gly), kwas liponowy, niektóre peptydy czy enzymy. Procedury ich oznaczania są zwykle oparte o technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz (RP-HPLC), a przygotowanie próbki obejmuje m.in. zablokowanie grupy tiolowej z jednoczesnym włączeniem w strukturę cząsteczki chromoforu lub fluoroforu [44, 45].

### 2.1. REAKTYWNOŚĆ SOLI ONIOWYCH WZGLĘDEM WYBRANYCH ZWIĄZKÓW SIARKI

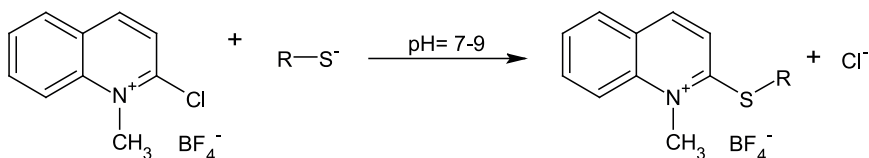
Sole pirydyniowe i chinoliniowe są powszechnie stosowanymi odczynnikami do derywatywacji, głównie podczas oznaczania endo- i egzogennych tioli w próbkach biologicznych [21, 22, 44, 46–49]. Potwierdzono także ich przydatność podczas derywatywacji tiosiarczanów [40]. Aminokwasy tiolowe można oznaczać m.in. w postaci ich 2-S-chinoliniowych, 2-S-lepidyniowych lub 2-S-pirydyniowych pochodnych, wykorzystując do derywatywacji tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy (CMQT), tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylolepidyniowy (CMLT), bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy (BCPB), jodek 2-chloro-1-propylopirydyniowy (CPPI) oraz jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI) (Rys. 3) [45].



Rysunek 3. Wzory soli chinoliniowych i pirydyniowych wykorzystywanych w analizie chemicznej  
 Figure 3. Structures of pyridinium and quinolinium salts used in chemical analysis

Cechą charakterystyczną tej grupy odczynników jest obecność w strukturze aktywnego halogenu. Dzięki prowadzeniu reakcji w łagodnych warunkach możliwa jest pełna automatyzacja procedur analitycznych [36]. Wykorzystując wspomniane sole można oznaczać tiole zarówno w roztworach wodnych jak i płynach biologicznych, a zwłaszcza w płynach ustrojowych człowieka i zwierząt, homogenatach tkanek roślinnych oraz w produktach żywnościowych [39, 40, 46, 47, 49, 50].

Ze względu na obecność w strukturze biologicznie ważnych aminotiolei innych niż  $-SH$  reaktywnych grup, takich jak  $-COOH$  czy  $-NH_2$  istotne jest, że w warunkach prowadzenia reakcji nie reagują one ze wspomnianymi solami [26]. Selektyność soli polega na tym, że w środowisku wodnym, wyłącznie podczas reakcji z grupą tiolową, następuje podstawienie atomu chlorowca atomem siarki w pozycji 2 pierścienia, w wyniku czego powstaje trwałe wiązanie tioeterowe (Rys. 4).



Rysunek 4. Schemat reakcji derywatywacji tiole za pomocą CMQT  
 Figure 4. General chemical derivatization reaction of thiols with the use of CMQT

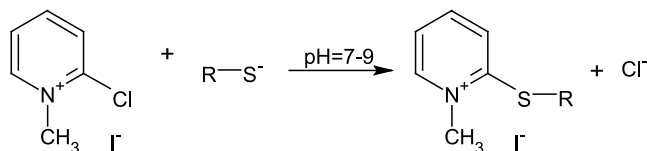
Stosowanie soli chinoliniowych i pirydyniowych jako odczynników derywatyzujących pozwala na prowadzenie reakcji w łagodnych warunkach, tzn. w środowisku wodnym,  $pH$  7–8, w temperaturze pokojowej, w czasie nieprzekraczającym

kilku minut. Duża reaktywność CMQT w stosunku do tioli spowodowała, że zastosowano go do derywatywacji związków tiolowych w analizie przepływowej [41], a uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania odczynnika nie tylko do derywatywacji przedkolumnowej ale również w trybach kolumnowym i pokolumnowym. Powstałe pochodne wykazują dużą trwałość w kwaśnym środowisku, toteż zakwaszenie mieszaniny po zakończeniu reakcji umożliwia gromadzenie próbek i ich późniejszą analizę [32, 37, 44, 45]. W temperaturze pokojowej próbki mogą być przechowywane przez kilkanaście godzin, natomiast w temperaturze  $-18^{\circ}\text{C}$  nawet do kilku tygodni. Wykazano, że w środowisku wodnym CMQT ulega również reakcji z jonami siarczkowymi i tiosiarczanowymi [26, 40], a produktem reakcji jest w tym przypadku tiochinolon.

Zastosowanie homologu CMQT, tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylolepidyniowego (CMLT) do derywatywacji tioli skutkuje otrzymaniem trwałych pochodnych w temperaturze pokojowej już po czasie 3 min. [42]. Mechanizm reakcji jest analogiczny do opisanego powyżej.

Podjęto udaną próbę syntezy tetrafluoroboranu 2-metoksy-1-metylocholinolinyowego oraz zbadano jego właściwości spektroskopowe w kontekście wykorzystania jako alternatywnego do CMQT odczynnika derywatyżującego tiole [51]. Stwierdzono, że odczynnik ten wykazuje czterokrotnie większą w porównaniu z CMQT fluorescencję, jednakże uzyskane z jego udziałem tiolowe pochodne nie posiadają korzystniejszych właściwości spektroskopowych i chromatograficznych.

Do grupy odczynników derywatyżujących, zawierających aktywny halogen należą również CMPI, BCPB oraz CPPI. Mechanizm reakcji z tiolami jest analogiczny jak w przypadku soli chinoliniowych i polega na nukleofilowym podstawieniu atomu chloru atomem siarki grupy tiolowej. Wykorzystywanie soli halopirydyniowych wymaga zastosowania dłuższego czasu reakcji niż w przypadku ich odpowiedników chinoliniowych [44, 45]. Na Rysunku 5 przedstawiono schemat reakcji tioli z CMPI.



Rysunek 5. Schemat reakcji derywatywacji tioli za pomocą CMPI

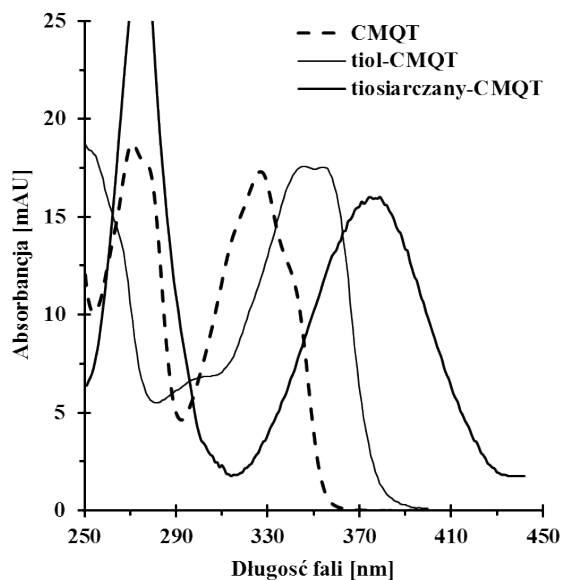
Figure 5. General chemical derivatization reaction of thiols with the use of CMPI

BCPB był wykorzystany m.in. do oznaczania kaptoprylu w moczu i krwi człowieka [21, 52]. Podobnie jak w przypadku innych soli pirydyniowych reakcja derywatywacji chemicznej prowadzona była w środowisku lekko alkalicznym, a uzyskane pochodne rozdzielano w odwróconym układzie faz i monitorowano w zakresie promieniowania UV.

Podczas stosowania wspomnianych soli do redukcji wiązań disiarczkowych nie należy używać 2-merkaptoetanolu (MTE) czy ditioneitolu (DTT). Związki te reagują z odczynnikiem zużywając go, a jego pozostała ilość może nie być wystarczająca do całkowitej derywatywacji analitu. Dodatkowo powstałe pochodne są widoczne na chromatogramie i mogą zakłócać sygnały analizowanych związków tiolowych. Innym odczynnikiem z tej grupy, wykorzystywanym do derywatywacji tioli w środowisku wodnym, w pH 8,2 i temperaturze pokojowej jest CPPI. Czas reakcji derywatywacji wynosi w tym przypadku około 30 min, a otrzymane pirydyniowe pochodne wykazują znaczącą absorpcję w zakresie promieniowania UV [18, 19].

## 2.2. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE POCHODNYCH

Do grupy odczynników chinoliniowych stosowanych najczęściej podczas derywatywacji aminokwasów tiolowych można zaliczyć CMQT i CMLT (Rys 3). Z analitycznego punktu widzenia 2-S-chinoliniowe pochodne tioli posiadają bardziej korzystne, w porównaniu z tiolami właściwości spektroskopowe i chromatograficzne [26, 32, 35–37]. Maksimum absorpcji pochodnych jest przesunięte w stosunku do maksimum odczynnika w kierunku fal dłuższych o ok. 20 nm (Rys. 6).



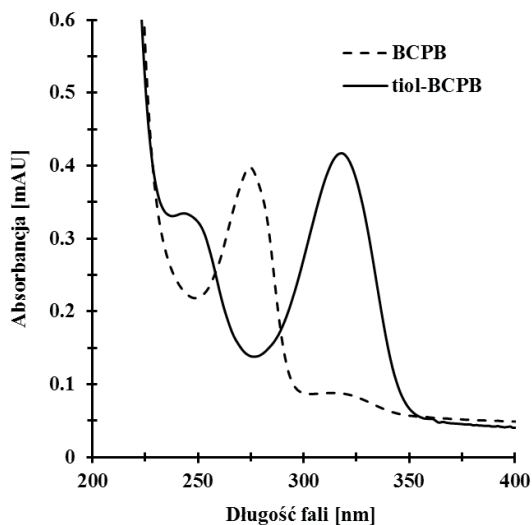
Rysunek 6. Widma UV CMQT oraz jego pochodnych  
Figure 6. UV spectra of CMQT and its derivatives

Cechuje je również wysoki molowy współczynnik absorpcji, który wynosi ok. 20.000 L/mol·cm. [26]. Występujące zjawisko przesunięcia batochromowego jest w tym przypadku bardzo korzystne ponieważ umożliwia stosowanie znacznych

nadmiarów odczynnika derywatyzującego względem analitu, nie utrudniając jednocześnie interpretacji chromatogramu. W przypadku soli lepidyniowej sytuacja jest analogiczna i pozwala na otrzymanie tiolowych pochodnych aktywnych spektrofotometrycznie, które mogą być oznaczane przy długości fali 350 nm [42].

Produktem reakcji CMQT z jonami siarczkowymi i tiosiarczanowymi jest tiochinolon, którego maksimum absorpcji wynosi 375 nm [40]. Tak silne przesunięcie batochromowe umożliwia stosowanie dużych nadmiarów odczynnika w stosunku do analitu, co skraca czas reakcji derywatyzacji do ok. 1 min, a na chromatogramie pik CMQT jest praktycznie niewidoczny.

Uzyskiwane techniką RP-HPLC chromatogramy próbek moczu i osocza krwi, zawierające piki pochodzące od 2-S-pirydyniowych pochodnych tioli, są dość złożone, ale umożliwiają uzyskanie porównywalnych z pochodnymi chinolinowymi granic oznaczalności. Molowy współczynnik absorpcji 2-S-pirydyniowych pochodnych jest dwukrotnie mniejszy niż w przypadku CMQT i wynosi ok. 10 000 L/mol·cm [26, 30]. Porównywalne z CMQT właściwości spektroskopowe posiada BCPB, co umożliwiło opracowanie prostej metody oznaczania sumy związków tiolowych w moczu [21]. Produkty reakcji tioli z odczynnikami pirydyniowymi są również stabilnymi tioeterami z dobrze wykształconym maksimum absorpcji przy długości fali 316 nm (Rys. 7).

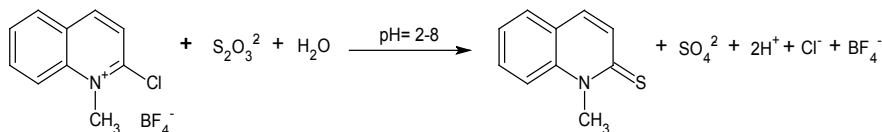


Rysunek 7. Widma UV BCPB oraz jego tiolowej pochodnej  
Figure 7. UV spectra of BCPB and its thiol derivative

Przeprowadzenie tioli w pochodne za pomocą soli onioowych powoduje zmianę ich właściwości chromatograficznych. 2-S-chinoliniowe pochodne wykazują znacznie większą hydrofobowość w stosunku do tioli, co umożliwia ich wydajną retencję w odwróconym układzie faz [26, 42, 44, 45]. Ze względu na obecność dodatkowej grupy metylowej położonej w pozycji 4 pierścienia chinoliny, CMLT wykazuje nieco

większą hydrofobowość aniżeli CMQT. Powstałe, w wyniku reakcji z udziałem soli chinoliniowych, lepidyniowych i pirydyniowych pochodne tioli mogą być z powodzeniem rozdzielane nie tylko techniką RP-HPLC, ale również przy pomocy technik elektromigracyjnych, w tym kapilarnej elektroforezy strefowej (CZE) [46, 50, 53]. Jest to możliwe dzięki obecności stałego dodatniego ładunku na czwartorzędowym atomie azotu powstałej pochodnej.

Z odmienną sytuacją mamy do czynienia w przypadku tiochinolonu, produktu reakcji CMQT z jonami siarczkowymi i tiosiarczanowymi (Rys. 8).



Rysunek 8. Schemat reakcji derywatyzacji tiosiarczanów za pomocą CMQT

Figure 8. General chemical derivatization reaction of thiosulfate with the use of CMQT

Cechą odróżniającą tiochinolon od 2-S-chinoliniowych pochodnych tioli jest brak ładunku na atomie azotu i wynikająca z tego znacznie większa hydrofobowość. Powoduje to, że w odwróconym układzie faz tiochinolon jest eluowany znacznie później niż S-chinoliniowe pochodne tioli, co umożliwia zastosowanie faz ruchomych o dużej mocy elucyjnej w przypadku oznaczania w próbce jedynie siarczków lub tiosiarczanów i skrócenie analizy do kilku minut [40, 54]. Ponieważ w reakcji jonów siarczkowych i tiosiarczanów z CMQT powstaje ten sam produkt ważne jest różnicowanie obydwu związków w trakcie analizy. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu różnych warunków pH podczas derywatyzacji. Tiosiarczany, w przeciwieństwie do siarczków, ulegają reakcji z CMQT w środowisku kwaśnym, co pozwala na oznaczenie zawartości obydwu związków w dwóch kolejnych analizach, wykonanych dla próbek „derywatyzowanych” w różnych warunkach pH [40].

### 3. WYKORZYSTANIE SOLI ONIOWYCH W ANALITYCE PRÓBEK BIOLOGICZNYCH

Oznaczanie w próbkach biologicznych endogennych aminokwasów tiolowych, takich jak Cys, Hcy, Cys-Gly,  $\gamma$ -Glu-Cys czy GSH jest ważne, ze względu na rolę jaką związki te odgrywają w organizmach żywych. W wielu przypadkach równie istotna jest możliwość oznaczania leków tiolowych. Związki te są obecne w osoczu, moczu, ślinie, a także w częściach roślin i narządach wewnętrznych zwierząt, w tym również człowieka. Opracowanie metod oznaczania w tak złożonych matrycach jest pracochłonne, ale tylko jakościowe i ilościowe oznaczenie może pomóc w zrozumieniu złożonych szlaków metabolicznych, diagnozie niektórych chorób czy stresu abiotycznego.

Ze względu na słabą absorpcję w zakresie UV-Vis i brak fluorescencji, podczas oznaczania tioli poddawane są zazwyczaj derywatywacji chemicznej. Szerokie zastosowanie znalazły tutaj sole pirydyniowe i chinoliniowe. Technika najczęściej stosowaną w procedurach oznaczania tioli, wykorzystującymi derywatyzację solami oniovymi jest HPLC w odwróconym układzie faz oraz elektroforeza kapilarna (CE) (Tab. 1).

Tabela 1. Zastosowanie soli oniovych w analizie próbek biologicznych  
Table 1. Application of onium salts for biological sample analysis

Lp.	Odczynnik	Analit	Matryca	Technika	Odośnik
1	CMQT	Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze	HPLC	[32]
2		Mesna	Mocz		[33]
3		Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Ślina		[34]
4		Hcy, Cys, Cys-Gly	Mocz		[35]
5		Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze		[36]
6		N-acetylo-Cys, Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze		[37]
7		Nε-Hcy-Lys, Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze		[38]
8		Hcy, Cys, GSH, γ-Glu-Cys	Tkanki roślinne		[39]
9		Tiosiarczany	Mocz		[40, 54]
10		Cys zredukowana, Cys całkowita	Mocz		[57]
11		Metimazol	Embriony kurze, białko i żółtko jaja kurzego		[48]
12		Hcy zredukowana, Hcy całkowita, Hcy związana z proteinami	Osocze		[55]
13		Cys, GSH	Sok pomarańczowy		[62]
14		Cysteamina	Osocze	CE	[53]
15		Cys, GSH	Sok pomarańczowy		[50]
16		Hcy	Osocze		[56]
17	BCPB	Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly	Osocze	HPLC	[52]
18		Hcy, Cys, Cys-Gly	Mocz		[21]
19		Kwas liponowy	Mocz		[22]
20	CMPI	Cys, Hcy	Mocz	HPLC	[18]
21		Hcy	Osocze		[19]
22		Cys	Osocze		[20]
23		Siarkowodór	Osady denne		[63]

### 3.1. ZASTOSOWANIE DO PRÓBEK OSOCZA

Osocze to bardzo skomplikowana, a jednocześnie najczęściej wykorzystywana matryca do badań analitycznych. W jego skład wchodzi białka, a także produkty ich metabolizmu, witaminy, kwasy tłuszczowe, lipoproteiny, liczne sole mineralne, produkty metabolizmu hemu i wiele innych substancji. Stężenie biologicznie ważnych tioli w osoczu człowieka jest niskie (wyjątkiem jest Cys) i zależy od diety, stylu życia, uwarunkowań genetycznych oraz stanu zdrowia.

Metody oznaczania niskocząsteczkowych tioli w osoczu z wykorzystaniem soli onionych składają się zazwyczaj z kilku etapów, obejmujących przygotowanie próbki i końcowe rozdzielanie na kolumnie chromatograficznej lub w kapilarze. Etapami tymi są redukcja wiązań disiarczkowych, derywatywacja wolnych tioli i usunięcie białek. Zmieniając kolejność wykonywania tych etapów możemy oznaczyć całkowitą zawartość tioli, tiole zredukowane lub związane z białkami. Ze względu na to, że w organizmach żywych tiole występują najczęściej w postaci utlenionej, pierwszym etapem przygotowania próbki podczas oznaczania tzw. tioli całkowitych jest redukcja wiązań disiarczkowych. Etap ten możemy pominąć jeśli chcemy oznaczyć tylko stężenie zredukowanych form tioli. Jeśli etap deproteinizacji wykonamy jako pierwszy, w wytrąconym białku możemy oznaczyć tiole z nim związane.

Opisano kilka metod oznaczania tioli w osoczu, wykorzystujących technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz, z detekcją UV i derywatyzacją przedkolumnową CMQT [45]. CMQT wykorzystywany jest m.in. do oznaczania w osoczu Cys, Hcy, GSH, Cys-Gly, Nε-Hcy-Lys czy γ-Glu-Cys [32, 36, 42]. W celu oznaczenia zredukowanych form tych tioli bezpośrednio do osocza dodawany jest roztwór buforu fosforanowego o pH = 7,6, zawierający 0,01 M CMQT [32, 36]. Czas reakcji jest stosunkowo krótki i wynosi ok. 2 min. Następnie próbka jest deproteinizowana PCA. Zakwaszenie próbki przedłuża trwałość powstałych pochodnych. W przypadku oznaczania całkowitej zawartości tioli w osoczu etap derywatywacji poprzedzony jest redukcją z użyciem tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP) [36]. Powstałe pochodne rozdzielane są chromatograficznie z wykorzystaniem elucji gradientowej. Co istotne, metoda ta pozwala na oznaczenie obok siebie, w stosunkowo krótkim czasie (12 min.) i w trakcie jednej analizy, kilku ważnych z biologicznego punktu widzenia związków tiolowych.

Wykazano, że TCEP może zostać zastąpiona borowodorkiem sodu [32]. Wówczas do próbki osocza dodawane są kolejno EDTA, 6 M NaBH<sub>4</sub> w 0,1 M wodorotlenku sodu, 3 M kwas solny oraz *n*-oktanol, którego zadaniem jest zapobieganie nadmiernemu pienieniu się próbki na skutek wydzielanego w trakcie reakcji wodoru. Kiedy nadmiar NaBH<sub>4</sub> ulegnie rozkładowi do roztworu dodawany jest bufor fosforanowy o pH = 7,6, w celu zapewnienia odpowiedniego środowiska dla reakcji tioli z CMQT. Zakres liniowości metody dla Cys i Cys-Gly wynosi 0,5–10 μM, dla GSH 0,3–5 μM, a dla Hcy 0,2–2 μM.

Wyżej opisane procedury przygotowania próbki są uniwersalne i można je zastosować chcąc oznaczyć tylko jeden związek. W celu skrócenia czasu analizy



należy zmodyfikować warunki chromatograficzne. Opracowano metodę oznaczania Hcy z zastosowaniem elucji izokratycznej [55]. Fazę ruchomą stanowił 0,05 M kwas trichlorooctowy doprowadzony do pH = 3,2 wodorotlenkiem litu (88%) oraz acetonitryl (12%). Granica wykrywalności tej metody, dla zredukowanej formy Hcy i tzw. Hcy wolnej (pula Hcy niezwiązana z białkami) wynosi odpowiednio 0,1 i 0,3  $\mu\text{M}$ , a granica oznaczalności 0,2 i 0,5  $\mu\text{M}$ .

Dzięki temu, że pochodne jakie tworzy CMQT z tiolami posiadają ładunek dodatni w prawie całym zakresie pH, odczynnik ten z powodzeniem może być wykorzystywany do oznaczania Hcy techniką elektroforezy kapilarnej [56]. W celu zredukowania wiązań disiarczkowych do osocza dodawana jest TCEP. Częsteczki Hcy poddawane są następnie derywatacji odczynnikiem CMQT. Po deproteinizacji 3 M kwasem solnym otrzymany supernatant mieszany jest z acetonitrylem w stosunku objętościowym 1:2, co w odpowiednich warunkach elektroforetycznych pozwala na zatężenie analitu w kapilarze. Zakres liniowości dla tej metody mieści się w przedziale 8–50  $\mu\text{M}$ , a granica wykrywalności to 1  $\mu\text{M}$ . W podobny sposób wykorzystano CMQT podczas opracowywania elektroforetycznej metody oznaczania cysteaminy w próbkach osocza [53].

Bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy (BCPB) to sól, która także może być stosowana jako odczynnik derywatazujący obecne w osoczu aminokwasy tiolowe. W 2008 r. opracowano metodę, w której etap derywatacji z BCPB poprzedzony jest redukcją wiązań disiarczkowych TCEP w buforze Tris [52]. Derywatacja z 0,1 M BCPB przebiega dość szybko (10 min.), a separacja analitów prowadzona jest z wykorzystaniem elucji gradientowej w odwróconym układzie faz. Metoda ta pozwala na oznaczenie Cys, Hcy, GSH i Cys-Gly w trakcie jednej analizy w czasie 8 minut. Granica wykrywalności dla wszystkich analitów wynosi 0,2  $\mu\text{M}$ , natomiast limit oznaczalności 0,5  $\mu\text{M}$ .

Oznaczenia Cys w osoczu można wykonać używając jako reduktora MTE, a jako odczynnika derywatazującego CMPI [20]. Reakcja redukcji disiarczków MTE zachodzi całkowicie po 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej. Pomimo tego, że MTE reaguje z CMPI, przesunięcie batochromowe maksimum absorpcji z 293 nm dla samego odczynnika do 312 nm dla pochodnej oraz różnica w czasach retencji pochodnych Cys-CMPI i MTE-CMPI pozwalają na oznaczenie całkowitej zawartości Cys w osoczu. Zakres liniowości dla tej metody mieści się w przedziale 20–300  $\mu\text{M}$ .

### 3.2. ZASTOSOWANIE DO PRÓBEK MOCZU

Z analitycznego punktu widzenia mocz jest bardzo atrakcyjną, choć złożoną matrycą do badań. Pomimo, że nie zawiera białek czy lipidów znajdują się w nim inne substancje będące produktami metabolizmu leków, degradacji białek i produktów ubocznych wielu procesów biochemicznych zachodzących w organizmie.

Pozyskiwanie próbek w przypadku moczu nie jest skomplikowane, co wpływa na wybór tej matrycy podczas badań analitycznych.

Tiole endogenne występujące w moczu to głównie Cys, Cys-Gly, Hcy oraz *N*-acetylo-Cys. W przypadku przyjmowania leków tiolowych ich pozostałości lub metabolity są również obecne w moczu. Podobnie jak w przypadku osocza etapy przygotowania próbki do analizy różnią się w zależności od tego czy oznaczane jest całkowite stężenie aminokwasów tiolowych czy tylko ich formy zredukowanej. W przypadku moczu otrzymane stężenia tioli są zazwyczaj normalizowane względem kreatyniny, substancji bezprogowej, której wydzielanie dla danej osoby w ciągu doby pozostaje na stałym poziomie [35]. Przyczyną jest trudność w otrzymaniu reprezentatywnych próbek moczu, bowiem ich skład i rozcieńczenie jest zależne od różnic w metabolizmie, diety oraz stylu życia.

Opracowano kilka metod oznaczania związków tiolowych w moczu z wykorzystaniem soli oniowych jako odczynników derywatyzujących. Jedna z nich pozwala na stosunkowo szybkie i dokładne oznaczenie zawartości tzw. Cys zredukowanej i całkowitej [57]. Większość Cys występuje w moczu w postaci disiarczku – cystyny, toteż w celu redukcji wiązań disiarczkowych próbki moczu były w pierwszym etapie inkubowane w 60°C, przez 30 min. z dodatkiem TBF. Dodatkowo do próbki został wprowadzony standard wewnętrzny w postaci kwasu 3-merkaptopropionowego. Po derywatyzacji z CMQT próbki nanoszono na kolumnę i eluowano izokratycznie. Granica wykrywalności i oznaczalności na poziomie 0,09  $\mu\text{M}$  i 0,28  $\mu\text{M}$  oraz krótki czas analizy (6 min.) powodują, że metoda ta może być stosowana do rutynowego oznaczania Cys w moczu.

Inna metoda oparta o derywatyzację z CMQT pozwala na oznaczenie w moczu Cys, Hcy i Cys-Gly [35]. Pierwszym etapem jest redukcja wiązań disiarczkowych borowodorkiem sodu, a następnie derywatyzacja otrzymanych tioli. Zastosowanie techniki HPLC z detekcją UV i elucją gradientową pozwala na oznaczenie pochodnych tiol-CMQT w trakcie jednej analizy. Zakres liniowości metody mieści się w przedziale 50–500  $\mu\text{M}$  dla Cys, 2–14  $\mu\text{M}$  dla Hcy i 2,5–25  $\mu\text{M}$  dla Cys-Gly. Istotny jest fakt, że dzięki opracowaniu i zastosowaniu tej metody do próbek rzeczywistych pochodzących od 91 potencjalnie zdrowych dawców, po raz pierwszy w literaturze pojawiła się informacja o znormalizowanym na kreatyninę stężeniu Cys-Gly w moczu.

Kolejna metoda, w której wykorzystano CMQT do derywatyzacji biologicznie ważnych tioli, pozwoliła na wyznaczenie ich statusu redoks w moczu [58]. Przeanalizowano próbki pochodzące od 45 ochotników, których usystematyzowano według różnych grup wiekowych. Wyznaczone stężenia zredukowanej i utlenionej formy Cys pozwoliły stwierdzić, że jej status redoks nie zależy od wieku. W przypadku Cys-Gly stwierdzono natomiast, że status redoks tego tiolu u dzieci różni się od statusu redoks dorosłych.

Opublikowano procedurę, w której wykorzystano CMQT do derywatyzacji tiosiarczanów obecnych w moczu człowieka [40]. W przeprowadzonych badaniach

wykazano m.in., że CMQT reaguje z tiosiarczanami w środowisku kwaśnym, co pozwala na ich różnicowanie w próbce od jonów siarczkowych, dających w środowisku alkalicznym taką samą pochodną – tiochinolon. Granica oznaczalności metody wynosi  $0,5 \mu\text{M}$ , a zakres liniowości mieści się w przedziale  $0,5\text{--}50 \mu\text{M}$ .

CMPI oraz BCPB również znalazły zastosowanie do oznaczania ważnych z biologicznego punktu widzenia aminokwasów tiolowych. Ze względu na fakt, że CMPI reaguje z takimi reduktorami jak MTE czy DTT, zaproponowano metodę oznaczania Cys i Hcy z wykorzystaniem TBF jako reduktora [18]. Po redukcji następuje etap derywatyzacji z CMPI, który w buforze o  $\text{pH} = 8,2$  i temperaturze pokojowej trwa 10 min. Zakres liniowości metody dla Cys mieści się w przedziale  $20\text{--}200 \mu\text{M}$ , a dla Hcy w przedziale  $5\text{--}150 \mu\text{M}$ . Metoda ta została zastosowana do oznaczania stężenia wydalanej z moczem Cys i Hcy. BBCP wykorzystano do spektrofotometrycznego oznaczania sumy tioli w próbkach moczu [21]. Jako analityczną długość fali przyjęto  $316 \text{ nm}$ . Kalibracji dokonano w zakresie  $50\text{--}500 \mu\text{M}$ , a metodę aplikowano do 37 próbek moczu pochodzących od zdrowych ochotników.

### 3.3. ŚLINA, HOMOGENATY TKANEK ROŚLINNYCH I PRODUKTY SPOŻYWCZE

Obecność związków siarki w organizmach roślinnych i zwierzęcych oraz funkcje jakie pełnią sprawiają, że istnieje konieczność ich oznaczania nie tylko w osoczu, moczu ale również w ślinie, tkankach roślin i osadach dennych. Także w tym przypadku wykazano przydatność soli onioowych jako odczynników derywatyzujących. Przykładem jest ślina, której próbki są łatwo dostępne i ich pobieranie nie stwarza większych trudności. W ponad 90% składa się ona z wody, ale zawiera też wiele istotnych z analitycznego punktu widzenia substancji. Obecne są w niej aminotiole, takie jak Cys, Hcy, Cys-Gly, a także GSH. W ślinie występuje też wiele elementów przeciwdziałających czynnikom szkodliwym, takim jak bakterie, dym tytoniowy czy komórki rakowe [59]. Ponadto, w niektórych przypadkach ślina wykorzystywana jest do celów diagnostycznych [60, 61].

Metoda oznaczania związków tiolowych w ślinie z wykorzystaniem CMQT obejmuje trzy etapy [34]. Pierwszym, tak jak w przypadku osocza i moczu, jest redukcja wiązań disiarczkowych, do której wykorzystano TBF. Po 30 min. inkubacji w  $60^\circ\text{C}$  do próbki dodano bufor fosforanowy z CMQT. Ostatni etap to deproteinizacja z użyciem 3 M kwasu chlorowego(VII). Na kolumnę nanoszono  $20 \mu\text{l}$  supernatantu i prowadzono separację z wykorzystaniem elucji gradientowej. Przeprowadzono również walidację metody i zastosowano ją do oznaczania aminokwasów tiolowych w próbkach pochodzących od kilku dawców. Metoda pozwala, w ciągu 10 min., oznaczyć obok siebie cztery biologicznie ważne związki tiolowe występujące w ślinie.

CMQT został zastosowany do oznaczania niskocząsteczkowych związków tiolowych w korzeniach pszenicy podczas badania wpływu na ich rozwój metali, takich jak miedź, kadm i nikiel [39]. Korzenie pszenicy zostały zhomogenizowane w bufo-

rze fosforanowym. Do otrzymanego po odwirowaniu supernatantu dodano TCEP w celu redukcji wiązań disiarczkowych, a następnie CMQT w celu derywatywacji wolnych tioli. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że poszczególne metale wywierają znaczny wpływ na zawartość oznaczanych związków tiolowych w tej części rośliny. Wyżej wspomniana metoda została także wykorzystana do oznaczenia GSH i Cys-Gly w liściach przypołudnika kryształkowego (łac. *Mesembryanthemum Crystallinum*) [49]. Na podstawie wyznaczonej zawartości zredukowanej formy GSH i GSH związanego z białkami stwierdzono, że stres oksydacyjny wywołany infekcją powoduje zwiększenie S-glutationylacji białek. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku Cys-Gly.

Związki tiolowe są obecne nie tylko w liściach czy korzeniach roślin ale również w owocach i wytworzonych z nich produktach. Wykorzystując techniki separacyjne oraz derywatyzację z użyciem CMQT opracowano procedury umożliwiające oznaczanie niektórych aminotiolei w sokach owocowych. Do oznaczania Cys i GSH w soku pomarańczowym wykorzystano techniki elektroforezy kapilarnej i chromatografii cieczowej z detekcją UV [50, 62]. W przypadku metody elektroforetycznej próbkę soku rozcieńczono w pierwszym etapie buforem Tris i poddano redukcji z użyciem TCEP. Następnie przeprowadzono reakcję derywatywacji odczynnikiem CMQT, deproteinizację 3 M PCA i dodano acetonitryl w stosunku 1:2. Do kapilary hydrodynamicznie wprowadzono 60 nL próbki. Zakres liniowości metody określono w przedziale 2,5–30  $\mu\text{M}$ . Przygotowanie próbki w metodzie chromatograficznej wyglądało w sposób analogiczny do opisanych wcześniej dla próbek osocza i moczu [22, 36, 46, 52, 58]. Uzyskano podobne zakresy liniowości i granice oznaczalności.

CMPI wykorzystano podczas oznaczania siarkowodoru w próbkach wodnych, uzyskanych po sedymentacji osadów dennych [63]. Przygotowanie próbki obejmowało sączenie i derywatyzację w lekko alkalicznym środowisku. Powstały po reakcji jonów siarczkowych z CMPI tiopirydon był rozdzielany od innych składników mieszaniny na kolumnie C18, w warunkach elucji izokratycznej, z dodatkiem oktylo-sulfonianu sodu jako odczynnika par jonowych. Zakres liniowości metody mieścił się w przedziale 5–600  $\mu\text{M}$ .

## PODSUMOWANIE

Zastosowanie derywatywacji chemicznej wykorzystującej sole oniowe, w przypadku oznaczania biologicznie ważnych tioli, siarkowodoru oraz tiosiarczanów, pozwala na uzyskanie granic oznaczalności na poziomie nmol na ml próbki, podczas gdy ich zawartości w materiale biologicznym wynoszą średnio kilka lub kilkadziesiąt nmol na ml próbki. Korzystne właściwości fizykochemiczne wspomnianych soli, jak i uzyskanych pochodnych umożliwiły opracowanie wielu prostych, tanich i szybkich metod analitycznych, pozwalających na efektywne oznaczanie endogennych aminokwasów tiolowych takich jak Hcy, Cys, GSH, Cys-Gly,  $\gamma$ -Glu-Cys i niektórych leków tiolowych w płynach fizjologicznych oraz tkankach roślinnych

i zwierzęcych. Stosując wspomniane metody można oznaczać w/w związki z dobrą czułością i precyzją, w szerokim zakresie stężeń, charakterystycznych zarówno dla stanów patologicznych jak i normalnych. Metody te są konkurencyjne w stosunku do innych, wykorzystujących np. derywatyzację dającą pochodne fluoryzujące, czy też pochodne aktywne elektrochemicznie.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] G.A. Olah, *Onium Ions*, John Wiley & Sons, Kanada, 1998.
- [2] A. Kunze, U. Müller, K. Tittes, J.-P. Fouassier, F. Morrlet-Savary, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1997, **110**, 115.
- [3] N.V. Tsarevsky, V. Slaveykova, S. Manev, D. Lazarov, *J. Chem. Educ.*, 1997, **74**, 734.
- [4] J. Zaltewicz, L. Deady, *Adv. Heterocycl. Chem.*, 1978, **22**, 71.
- [5] Y. Yagci, Y.Y. Durmaz, B. Aydoğan, *Chem. Rec.*, 2007, **7**, 78.
- [6] E.F.V. Scriven, *Chem. Soc. Rev.*, 1983, **12**, 129.
- [7] R. Azzouz, C. Fruit, L. Bischoff, F. Marsais, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 1154.
- [8] J. Pernak, J. Rogoża, *ARKIVOC*, 2000, **6**, 889.
- [9] J.V. Crivello, *J. Polym. Sci. part A: Polym. Chem.*, 1999, **37**, 4241.
- [10] Y. Yagci, Y. Y. Durmaz, B. Aydoğan, *Chem. Rec.*, 2007, **7**, 78.
- [11] C. Roche, M. Pucheault, M. Vaultier, A. Commerçon, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 8325.
- [12] L. Cuifen, Z. Li, Y. Guichun, C. Zuxing, *Chin. J. Chem.*, 2010, **28**, 2469.
- [13] J.A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, Malden, MA, 2000.
- [14] T. Eicher, S. Hauptmann, *The Chemistry Heterocycles*, Wiley-VCH, New York, 1995.
- [15] P. Madaan, V.K. Tyagi, *J. Oleo Sci.*, 2008, **57**, 197.
- [16] M. Kratky, J. Vinsova, *Curr. Pharm. Design*, 2013, **19**, 1343.
- [17] A. Ilangovan, P. Venkatesan, M. Sundararaman, R. Rajesh Kuma, *Med. Chem. Res.*, 2012, **21**, 694.
- [18] E. Kaniowska, G. Chwatko, R. Głowacki, P. Kubalczyk, E. Bald, *J. Chromatogr. A*, 1998, **798**, 27.
- [19] E. Bald, E. Kaniowska, G. Chwatko, R. Głowacki, *Talanta*, 2000, **50**, 1233.
- [20] G. Chwatko, E. Bald, *Talanta*, 2000, **52**, 509.
- [21] G. Chwatko, *Ann. Clin. Lab. Science*, 2013, **43**, 4.
- [22] G. Chwatko, P. Kubalczyk, E. Bald, *Curr. Anal. Chem.* 2014, DOI: 10.2174/1573411010999131219 101340.
- [23] A.R. Katritzky, D. Semenzin, B. Yang, D.P.M. Pleynt, *J. Heterocycl. Chem.*, 1998, **35**, 467.
- [24] O. Meth-Cohn, D. Taylor, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 12869.
- [25] V.J. Minkin, B.J. Ardashev, *Russ. J. Gen. Chem.*, 1958, **29**, 1099.
- [26] E. Bald, R. Głowacki, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.*, 2001, **24**, 1323.
- [27] C. Vélez, O. Cox, C.A. Rosado-Berrios, D. Molina, L. Arroyo, S. Carro, A. Filikov, V. Kumar, S.V. Malhotra, M. Cordero, B. Zayas, *O. J. Apo.*, 2013, **2**, 13.
- [28] F.M. Moghaddam, H. Saeidian, M. Kiamehr, Z. Mirjafary, S. Taheri, *ARKIVOC*, 2010, **6**, 91.
- [29] S.D. Barchechath, R.I. Tawatao, M. Corr, D.A. Carson, H.B. Cottam, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 1785.
- [30] J. Marek, P. Stodulka, J. Cabal, O. Soukup, M. Pohanka, J. Korabecny, K. Musilek, K. Kuca, *Molecules*, 2010, **15**, 1967.
- [31] M. Bazin, C. Kuhn, *J. Comb. Chem.*, 2005, **7**, 302.
- [32] E. Bald, G. Chwatko, R. Głowacki, K. Kuśmierk, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1032**, 109.
- [33] R. Głowacki, D. Gryglik, K. Kuśmierk, E. Bald, *Talanta*, 2005, **66**, 534.

- [34] E. Bald, R. Głowacki, *Amino Acids*, 2005, **28**, 431.
- [35] K. Kuśmierk, R. Głowacki, E. Bald, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 855.
- [36] R. Głowacki, E. Bald, *J. Chromatogr. B*, 2009, **877**, 3400.
- [37] R. Głowacki, E. Bald, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.*, 2009, **32**, 2530.
- [38] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, *Amino Acids*, 2010, **39**, 1563.
- [39] E. Gajewska, R. Głowacki, J. Mazur, M. Skłodowska, *Plant. Growth. Regul.*, 2013, **71**, 13.
- [40] G. Chwatko, E. Bald, *Talanta*, 2009, **79**, 229.
- [41] P.D. Tzanavaras, M. Aristeridou, E. Bald, R. Głowacki, *Anal. Lett.*, 2014, **47**, 331.
- [42] R. Głowacki, K. Borowczyk, E. Bald, *J. Anal. Chem.*, 2014, **69**, 583.
- [43] R. Głowacki, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 1049.
- [44] K. Kuśmierk, G. Chwatko, R. Głowacki, P. Kubalczyk, E. Bald, *J. Chromatogr. B*, 2011, **879**, 1290
- [45] K. Kuśmierk, G. Chwatko, R. Głowacki, E. Bald, *J. Chromatogr. B*, 2009, **877**, 3300.
- [46] P. Kubalczyk, G. Chwatko, E. Bald, *Curr. Anal. Chem.* 2014, DOI: 10.2174/1573411010999131219 101552.
- [47] D. Kowalczyk-Pachel, G. Chwatko, M. Iciek, J. Czyżyk, M. Filip, L. Włodek, E. Lorenc-Koci, *Neurotox. Res.*, 2013, **24**, 377.
- [48] S.L. an Herck, S. Geysens, E. Bald, G. Chwatko, E. Delezic, E. Dianati, A. Ahmed, V.M. Darras, *J. Endocrinol.*, 2013, **218**, 105.
- [49] E. Kuźniak, A. Kaźmierczak, M. Wielanek, R. Głowacki, A. Kornaś, *Plant Physiol. Bioch.*, 2013, **63**, 30.
- [50] P. Kubalczyk, E. Bald, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 2280.
- [51] B. McCaughan, G. Kay, A. Di Salvo, P. J. Cox, D. Cairns, *J. Chem. Crystallogr.*, 2010, **40**, 417.
- [52] K. Kuśmierk, E. Bald, *Biomed. Chromatogr.*, 2009, **23**, 770.
- [53] P. Kubalczyk, E. Bald, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 3636.
- [54] G. Chwatko, E. Forma, J. Wilkosz, R. Głowacki, P. Józwiak, W. Różański, M. Bryś, A. Krześlak, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2013, **51**, 1825.
- [55] G. Chwatko, E. Bald, *J. Chromatogr. A*, 2002, **949**, 141.
- [56] P. Kubalczyk, E. Bald, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 1181.
- [57] E. Bald, R. Głowacki, J. Drzewoski, *J. Chromatogr. A*, 2001, **913**, 319.
- [58] K. Kuśmierk, G. Chwatko, E. Bald, *Chromatographia*, 2008, **68**, S91.
- [59] B. Zappacosta, A. Mannic, S. Persichillia, D. Scribanoa, A. Minuccia, D. Lazzarola, P. De Solea, B. Giardinaa, *Clin. Chim. Acta*, 2003, **338**, 57.
- [60] J. Liu, Y. Duan, *Oral Oncology*, 2012, **48**, 569.
- [61] S. Chiappin, G. Antonelli, R. Gatti, E.F. De Palo, *Clin. Chim. Acta*, 2007, **383**, 30.
- [62] K. Kusmierk, E. Bald, *Food Chem.*, 2008, **106**, 340.
- [63] E. Kaniowska, R. Głowacki, G. Chwatko, P. Kubalczyk, E. Bald, *Determination of reduced sulfur compounds in the aquatic environment by high - performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*, [w:] *Chemistry for the Protection of the Environment 3*, L. Pawłowski, M.A. Gonzales, M.R. Dudzińska, W.J. Lacy (Red.), Plenum Publishing Corporation, New York, 1998.