

Glutation: metody przygotowania próbek dla analiz z wykorzystaniem technik chromatograficznych i elektroforezy kapilarnej

Ewelina BŁOŃSKA-SIKORA, Jerzy OSZCZUDŁOWSKI, Zygfryd WITKIEWICZ, Dariusz WIDEL - Instytut Chemii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2012, **66**, 9, 929-942

Wykaz skrótów: GSH- glutation zredukowany, GSSG- disulfid glutationu, SH- grupa tiolowa, K₂EDTA- wersenian dwupotasowy, K₃EDTA-wersenian trójpotasowy, NMR- magnetyczny rezonans jądrowy, SDS-PAGE- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczynu (VI) sodowego dodocydu, MALDI-ToF- spektrometria mas z jonizacją przez desorpcję laserową z udziałem matrycy w połączeniu z analizatorem czasu przelotu, TCA- kwas trichlorooctowy, NADHP- zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, NEM- N-etylomaleimid, IAA- kwas jodooctowy, DTT- ditiotreitol, ME- -merkaptioetanol, MBB- monobromobiman, OPA- orto-ftalaldehyd, BH- borohidrat, TBP- tributylofosfina, TPP- tryfenylofosfina, TCEP- tris-2-karboksyetylofosfina, DTNB- kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowym, IA- jodoacetamid, VP- 2-winylopirydyna, DTPD- 4,4'-ditiopirydyna, CMQT- tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinliny, SBD-F- 4-sulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol, ABD-F- 4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol, DBD-F- 4-(N,N-dimetyloaminosulfonylo)-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol.

Wstęp

Glutation (γ -glutamylcysteinylglicyna) pełni w organizmie człowieka wiele pożytecznych funkcji, w związku z czym oznaczanie stężenia tej substancji ma duże znaczenie we współczesnej medycynie i farmacji.

Synteza glutationu odbywa się w każdej komórce prokariotycznej i eukariotycznej, gdyż bierze on udział w procesach antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych, a także w modulowaniu odporności. Dzięki tej substancji organizm człowieka może się bronić przed zakażeniami różnego pochodzenia, rozwojem nowotworów, wątroba wykazuje zdolność detoksykacji metali ciężkich, toksyn i innych ksenobiotyków, a komórki nie ulegają nieustającemu niszczeniu.

Charakterystycznym elementem budowy glutationu jest grupa tiolowa (-SH), z którą wiąże się bezpośrednio jego biologiczne funkcje. Dzięki jej obecności glutation może występować w kilku formach redoks, z których najważniejsze są postaci: zredukowana (GSH) oraz utleniona (GSSG). Inne ważne formy to: S-nitrozoglutation oraz mieszane disiarczki glutationu i białek.

Główną rolę fizjologiczną pełni zredukowana forma glutationu, gdyż bierze ona udział w obronie organizmu przed tzw. stresem oksydacyjnym. Chroni organizm przed działaniem substancji utleniających, do których należą m.in. reaktywne formy tlenu (nadtlenuk wodoru, nadtenki organiczne), egzo- i endogenne związki elektrofilowe, a także utlenione formy innych przeciwutleniaczy, np. witaminy C i E. Część glutationu wchodzi również w skład specyficznego selenoenzymu – peroksydazy glutationowej, pełniącej funkcję najważniejszego reduktora nadtlenu wodoru i nadtlenuków lipidów. Funkcją glutationu związaną z działaniem przeciwutleniającym jest także utrzymywanie grup tiolowych aminokwasów w stanie zredukowanym, co zapobiega ich nieodwracalnemu utlenieniu do kwasów sulfonowych i sulfonowych i utracie właściwości biologicznych białka.

Duża część glutationu występuje w postaci związanej z różnymi białkami [1]. Jest to tzw. zjawisko glutationylacji – procesu, w którym grupy -SH aminokwasów są przyłączane do cząsteczki glutationu. Takie połączenia wpływają na stabilizację niektórych białek, chronią je przed procesami utleniania, regulują aktywność enzymów i proces transkrypcji. Do takich specyficznych białek należą nukleofosfiny, mające wpływ na rybosomy i cyklofiliny, odpowiadające za proteosomalną degradację białek, a także białka cytoszkieletowe [2].

Właściwości przeciwutleniające GSH są szczególnie istotne dla erytrocytów, gdyż krwinka czerwona jest silnie narażona na działanie wolnych rodników, m.in. ze względu na obecność w niej żelaza na różnym stopniu utlenienia [3, 4]. Stosunek stężeń postaci zredukowanej do utlenionej glutationu oznacza się symbolem R, który obrazuje status redoks komórki. Przykładowo w wątrobie wartość R wynosi 300-400 w warunkach fizjologicznych, natomiast w stanie głodu wartość ta spada do ok. 2.

Zmiany stężenia glutationu obserwuje się jednak głównie we wszelkiego rodzaju schorzeniach. Jest to wykorzystywane w celu stwierdzenia stopnia uszkodzenia danego narządu. W przebiegu różnych procesów chorobowych w organizmie obserwuje się zarówno spadek jak i wzrost stężenia GSH. Zwykle występuje jednak niedobór tej substancji, który może być wrodzony lub nabyty.

Spadek stężenia zredukowanej formy glutationu GSH często wiąże się z występowaniem w organizmie stanów patologicznych, takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, dystrofia mięśniowa, poalkoholowe uszkodzenie wątroby, jaskra, AIDS [2], choroby neurodegradacyjne (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane), schizofrenia, autyzm, miażdżycy naczyń, cukrzyca, astma oraz przewlekła obturacyjna choroba płuc [5÷8]. Pomiar stężenia glutationu we krwi jest istotny w diagnozie schorzeń związanych z cyklem -glutamylowym, które charakteryzują się deficytem enzymów: syntazy glutationowej i syntazy γ -glutamylcysteinowej w erytrocytach lub w całym organizmie [2].

Rodzaje matryc, w których oznacza się glutation

Stężenie glutationu u ludzi i zwierząt oznaczane jest głównie w osoczu, krwi pełnej i erytrocytach, gdyż poziomy stężeń formy utlenionej i zredukowanej w tych elementach są wskaźnikiem stresu oksydacyjnego całego organizmu. Próbkę do analizy pobierano również z innych tkanek i komórek, takich jak: błona śluzowa żołądka [9], mitochondria pochodzące z limfocytów i granulocytów [10], komórki HL-60-ostrej w przebiegu białaczki szpikowej [11], tkanka płucna [12], nerki, śledziona i mózg [13]. Glutation oznaczano z powodzeniem także w organizmach roślinnych, np. w sadzonkach kukurydzy [14] i kapuście sarepskiej [15].

Przygotowanie próbki do analizy

Przygotowanie próbki stanowi jeden z najważniejszych etapów analizy substancji posiadających grupy tiolowe, ze względu na fakt, iż mają one dużą aktywność oksydoredukcyjną i są jedną z najbardziej

reaktywnych grup związków chemicznych. Szczególnie dużą uwagę należy poświęcić odpowiedniemu pobraniu krwi, zamrażaniu próbek, a w przypadku analizy osocza należy niezwłocznie odwirować pobraną krew. Długi czas izolacji erytrocytów z krwi, skomplikowane metody pobierania próbek tkanek i organelli wewnątrzkomórkowych powodują, że analizy GSH i GSSG są obciążone licznymi błędami.

GSH ulega w pH 7 nieenzymatycznej autooksydacji, przy czym zjawisko to zostaje odwrócone podczas reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzym γ -glutamylotranspeptydazę, który wykazuje optymalną aktywność przy pH neutralnym. GSH wykazuje więc duże zdolności oksydoredukcyjne, co jest uwarunkowane obecnością grupy $-SH$.

Oznaczanie stężenia GSSG, szczególnie w osoczu, również wymaga dużej ostrożności i specjalnych procedur przygotowania próbki. W ciągu ok. 2 minut od momentu pobrania krwi GSSG jest degradowany w procesie proteolizy [19]. Proces zamrażania próbki i precypitacja białek minimalizują zarówno proces utleniania GSH jak i proteolizy GSSG.

Metody przygotowania próbki są oczywiście uzależnione od rodzaju tkanki, oznaczanej formy glutationu, a także od samej metody analizy, jednak istnieją pewne wspólne dla wszystkich metod zasady. Przygotowanie próbki można podzielić na kilka etapów, jednakże nie każda analiza musi obejmować je wszystkie:

- pobieranie próbki i jej zabezpieczenie
- precypitacja białek
- blokowanie wolnych grup tiolowych, przy wykorzystaniu odczynników zasadowych bądź kwasowych
- redukcja disulfidów
- derywatyżacja.

Pobieranie próbki i jej zabezpieczenie

Podczas pobierania próbek krwi, najważniejszym aspektem jest zabezpieczenie jej przed koagulacją pod wpływem jonów wapnia, będących kofaktorem enzymów biorących udział w kaskadzie krzepnięcia krwi. To niepożądane zjawisko można zminimalizować poprzez dodanie do świeżo pobranej krwi niewielkiej ilości związków chelatujących, np. K_2EDTA , K_3EDTA bądź heparyny, lub umieszczenie krwi w specjalnych probówkach zawierających te substancje. Związki te zapobiegają krzepnięciu krwi przez hamowanie aktywności jonów Ca^{2+} i trombocytów, a także unieczynnają inne jony (np. Fe^{2+}), które mogą inicjować reakcje utleniania tioli.

Najczęściej analizowanym elementem krwi na zawartość glutationu jest osocze, mimo że zawiera jedynie ok. 0,5% całkowitej ilości tego związku w stosunku np. do erytrocytów, w których zawartość glutationu wynosi ok. 99,5%. Wynika to z faktu, iż stężenie glutationu w osoczu najpełniej odzwierciedla stężenie tej substancji w całym organizmie [1]. Analiza osocza niesie jednak ze sobą pewne utrudnienia i nieodpowiednie przygotowanie próbki może zafałszować wyniki. W związku z tym, że erytrocyty zawierają do 500 razy większą ilość GSH niż osocze, należy przede wszystkim zwrócić baczną uwagę na zabezpieczenie próbki przed hemolizą krwinek czerwonych, ponieważ uwolnienie do badanego osocza nawet 1% glutationu pochodzącego z krwinek może drastycznie zmienić wynik analizy.

Drugą istotną kwestią związaną z przygotowaniem krwi, ale także innych tkanek i narządów, jest zabezpieczenie próbek przed wysoką temperaturą. Podczas przechowywania w temperaturze pokojowej, stężenie GSH szybko maleje w wyniku utlenienia do GSSG, nawet o kilkadziesiąt procent po 5 min od czasu pobrania. W zależności od czasu przechowywania, próbki zamraża się w temperaturach od $-20^{\circ}C$ do $-80^{\circ}C$.

Precypitacja białek

Niezbędnym etapem przygotowania próbki jest wyeliminowanie pewnych enzymów występujących we krwi, do których należy m.in. γ -glutamylotranspeptydaza, odpowiadająca za katabolizm glutationu.

Aby nie dopuścić do całkowitego rozłożenia badanego związku należy niezwłocznie usunąć ten enzym, a także inne substancje białkowe, które mogą przeszkadzać w wykonaniu analizy. Tkanki, w których występuje wysoki poziom γ -glutamylotranspeptydazy, takie jak: nerki i trzustka, należy niezwłocznie po pobraniu zhomogenizować a następnie zamrozić, natomiast tkanki z małą ilością enzymu, takie jak: wątroba, mózg i śledziona nie muszą być homogenizowane, należy je tylko zamrozić po pobraniu i przechowywać w temperaturze: $-20^{\circ}C$. Bezpośrednie dozowanie próbek biologicznych do systemu HPLC lub CE nie jest wskazane [19]. Obecność białek w próbce podczas analizy za pomocą CE może prowadzić do ich adsorpcji na ściankach kapilary, co może zaburzać czasy migracji, kształt pików i odpowiedź detektora [20]. Tylko kilka metod analitycznych, stosowanych w analizie amiotoli (np. NMR) nie wymaga zastosowania odbiałczania. Zakwaszenie, dodawanie organicznych rozpuszczalników, takich jak np. acetonitryl, aceton lub metanol, a także mikrofiltracja, są używane do eliminacji białek z próbki [2]. Rozpuszczalniki organiczne są preferowane podczas analiz wykonywanych przy użyciu spektrometru mas [19]. Ultrafiltracja jest użyteczną metodą stosowaną w celu usunięcia białek z próbki, ponieważ nie wymaga stosowania kwasów lub rozpuszczalników organicznych, które mogą wpływać na procesy derywatyżacji, rozdzielania i detekcji. Przygotowanie próbek krwi można przeprowadzić również przy użyciu filtrów membranowych w połączeniu z zagęszczaniem próbki podczas wirowaniem [20]. Najczęstszą metodą stosowaną w celu uzyskania osocza z próbek krwi jest jej zakwaszenie bezpośrednio po pobraniu [21]. Zakwaszenie powoduje usunięcie niepożądanych białek, w tym także enzymów zaburzających procesy analizy. Zakwaszenie umożliwia także pomiar stężenia całkowitego glutationu (GSH+GSSG) w poszczególnych tkankach poprzez uwalnianie GSH z połączeń białkowych [1]. Do oznaczania glutationu w połączeniach z białkami (w białkach glutationyloowanych) stosuje się głównie metody elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu(VI) sodowego dodecyłu (SDS-PAGE) oraz spektrometrię mas MALDI-ToF. Te metody analizy stosuje się jednak tylko w niektórych stanach patologicznych organizmu, gdyż są specyficzne tylko dla niektórych połączeń białkowych glutationu [2].

Do wytrącania substancji białkowych stosuje się różne kwasy, m.in. trichlorooctowy (TCA), chlorowy(VII), 5-sulfosalicylowy, pikrynowy i metafosforowy. Kwasy 5-sulfosalicylowy i pikrynowy stosuje się zwykle w stężeniu 5% w/v, natomiast metafosforowy, chlorowy(VII) i trichlorooctowy w stężeniu 1% w/v. Precypitacja kwasowa pozwala na otrzymanie po odwirowaniu przejrzystego, wolnego od białek supernatantu. Główną wadą stosowania tych związków przy oznaczaniu glutationu jest zjawisko utleniania tioli, które prowadzi często do zawyżenia stężenia disulfidów [13]. TCA wydaje się być najbardziej użytecznym, ponieważ podczas jego stosowania obserwuje się tylko ok. 3-4% GSH w czasie 20 h w temperaturze $0^{\circ}C$ [11]. Przywrócenie naturalnego bądź zasadowego pH w zakwaszonej próbce często prowadzi do gwałtownego spadku stężenia tioli, w przypadku gdy uprzednio nie dodano odczynnika maskującego tiole.

Redukcja disulfidów

Analiza sumy GSH w postaci niezwiązanej z białkami i formy związanej, a także oznaczanie innych niskocząsteczkowych tioli wymaga redukcji wiązań disiarczkowych utworzonych między zredukowanym glutationem a innymi białkami [19]. Prekursor GSH – cysteina może być oznaczany jedynie po redukcji wszystkich disulfidów w próbkach biologicznych. Proces redukcji może być przeprowadzony poprzez: reakcje chemiczne (dodawanie reduktorów), elektrolizę albo reakcje enzymatyczne (dodawanie reduktazy glutationu lub NADHP do próbki) [2, 22]. Istnieje wiele grup reduktorów chemicznych, a wybór odpowiedniego odczynnika ma bardzo duże znaczenie. Niektóre reduktory mogą reagować z odczynnikiem derywatyżującymi, co jest źródłem błędów.

Zredukowana forma glutationu może ulegać procesowi utlenienia jeszcze przed procesem derywatywacji, co skutkuje zwiększeniem ilości GSSG i zaburzeniem wyników. Tęgo zjawiska można uniknąć przez zastosowanie odczynników maskujących tiole, takich jak N-etylomaleimid (NEM) [11, 23÷27] albo kwas jodooctowy (IAA) [19,28]. Utlenianie jest także katalizowane przez jony metali (głównie jony miedzi), dlatego stosowanie odczynników chelatujących, takich jak: EDTA, 1,10 fenantroliny [2], albo deferoksaminy [11] podczas pobierania krwi jest konieczne. W przypadku niektórych analiz konieczne jest całkowite usunięcie nadmiaru odczynnika redukującego poprzez dalszą obróbkę próbki, np. filtrację żelową lub precypitację kwasową. Odczynnik redukujący nie powinien także reagować z odczynnikami służącymi do derywatywacji [29].

Ilościowa eliminacja nadmiaru odczynnika redukującego za pomocą precypitacji kwasowej wiąże się z pewnymi trudnościami, natomiast zastosowanie filtracji żelowej może doprowadzić do regeneracji disulfidów, gdy pH buforu jest wysokie. Dodatkowym minusem filtracji żelowej jest fakt, iż nie może być stosowana w przypadku częściowo zagregowanego materiału [2, 30].

Reduktory zawierające grupę tiolową

Do grupy tych związków zalicza się: ditionoerytrytol, ditionotreitol (DTT) i β -merkaptoetanol (ME). Należą do najczęściej stosowanych, wysoce specyficznych reduktorów, jakkolwiek nie są pozbawione wad. Niekorzystnym zjawiskiem występującym podczas ich stosowania są reakcje krzyżowe z odczynnikami derywatyżującymi, takimi jak: monobromobiman (MBB), albo orto-ftalaldehid (OPA), co prowadzi do powstania interferujących, fluorescencyjnych połączeń [2,19]. Kolejną niedogodnością związaną z ich używaniem jest konieczność stosowania pH powyżej 7, co może powodować utlenianie. Odczynniki z tej grupy są również same w sobie wrażliwe na utlenianie, stąd istnieje konieczność przechowywania ich z dala od światła, z dodatkiem chelatorów. ME należy do stosunkowo słabych reduktorów i musi być stosowany w dużym stężeniu. Jest stosowany głównie w obecności dodecylosiarczanu(VI) sodu [2]. Odczynnik ten był stosowany w wielu aplikacjach: UV, fluorymetrycznych, CE i LC/MS. DTT jest silniejszym reduktorem niż ME i używany jest głównie w technikach spektrofotometrycznych. Zaletą tego odczynnika jest zdolność przenikania przez błony biologiczne, co daje możliwość zastosowania tego odczynnika jako reduktora w systemach komórkowych.

Ester etylowy N-acetylocysteiny należy do silnych reduktorów wiązań disiarczkowych. Był używany m.in. do ilościowego oznaczania GSH i GSSG w cytozolu krwinek czerwonych, w reakcji z OPA jako odczynnikiem derywatyżującym [31].

Borohydrat (BH) sodu i potasu są bardzo silnymi, wysoce reaktywnymi reduktorami i dlatego ich roztwory powinny być przygotowywane bezpośrednio przed użyciem. Są również nietrwałe w roztworach wodnych. Zastosowanie borohydratu sodu może spowodować problemy z procesem derywatywacji, z powodu trudności z kontrolowaniem pH [28, 29]. Redukcja disulfidów przy użyciu wysokiego stężenia tego odczynnika wysokiego stężenia (1,4 mol/l) jest kompletna po zaledwie kilku minutach, a przy niższym stężeniu trwa nawet do 30 minut.

BH jest używany do ilościowej redukcji disiarczków bez albo w obecności odczynników denaturujących, albo do redukcji disiarczków białkowych w ekstraktach całych komórek. Największą zaletą BH jest fakt, że jego nadmiar może być łatwo usunięty przez dodanie kwasu lub acetonu. Roztwory BH wykazują tendencję do tworzenia aerozoli podczas reakcji, zjawisko to można jednak ograniczyć przez dodatek związków powierzchniowo-czynnych, takich jak np. oktanol lub heksanol [2,19].

Trialkilofosfiny

Związkami pozbawionymi wyżej wymienionych działań niepożądanych są trialkilofosfiny, np. tributylfosfina (TBP), trifenylfosfina (TPP)

i tris-2-karboksyetylofosfina (TCEP). Są to silne reduktory, działające już przy niewielkich stężeniach. Fosfiny nie reagują z innymi grupami funkcyjnymi protein, a także z czynnikami alkalizującymi i derywatyżującymi. Jednak dość łatwo reagują z kwasem jodooctowym i jodoacetamidem, a także NEM, nawet w środowisku kwaśnym, co sprawia, że redukcja za pomocą tych związków musi być oddzielona od procesu alkilacji [2, 22].

TCEP jest najpopularniejszym związkiem należącym do tej grupy. Jego stosowanie zapewnia bardziej powtarzalne wyniki niż TBP lub TPP. Jest substancją bardzo dobrze rozpuszczalną w wodzie, nietłną, najczęściej używaną do redukcji disulfidów niskocząsteczkowych, a także powierzchniowych białek z grupami disiarczkowymi. Zaletą TCEP jest większa odporność na utlenienie katalizowane jonami metali niż w przypadku reduktorów zawierających grupy tiolowe. Jednak TCEP może interferować z odczynnikami derywatyżującymi, posiadającymi grupy disiarczkowe, m.in. kwasem 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowym (DTNB) [19]. Odczynnik ten był stosowany w różnych analizach [9, 29, 32]. Estry mno-, di- i trimetylowe są bardziej reaktywne w niskim pH i bardziej litofilne niż TCEP. Są również bardziej reaktywne w stosunku do małych cząsteczek [19]. Estryfikacja zwiększa przepuszczalność przez błony komórkowe, pozwalając na penetrację estrów przez dwuwarstwą lipidową [2].

Derywatywacja

Wszystkie metody oznaczania związków posiadających grupy tiolowe, z wyjątkiem tych, które są oparte na detekcji elektrochemicznej i tandemowej spektrometrii mas, a także prowadzonych *in vivo*, wymagają przeprowadzenia procesu derywatywacji. Proces derywatywacji GSH zazwyczaj zwiększa specyficzność i czułość metod. Odczynnik stosowany do derywatywacji powinien działać szybko i specyficznie z oznaczaną próbką w możliwie najniższej temperaturze i lekko kwasowym pH, aby zapobiec utlenieniu analitów. Chromofory i fluorofory dodawane do analitu obniżają granicę wykrywalności i granicę oznaczalności. Wzrost czułości pod wpływem derywatywacji powoduje, że do detektorów stosowanych w chromatografii dociera więcej analitu, a otrzymane piki są węższe. Derywatywaty są zazwyczaj bardziej lipofilne niż związki macierzyste, co jest szczególnie istotne w przypadku niskocząsteczkowych tioli, które są zawsze hydrofilowe [33].

Odczynniki stosowane w detekcji UV-Vis

Detekcja UV-VIS jest powszechnie stosowana w chromatografii cieczowej i elektroforezie kapilarnej. Metody wykorzystujące techniki chromatograficzne, w których stosuje się detektor UV-Vis są mniej czułe w porównaniu do metod, w których stosuje się detekcję fluorescencyjną albo elektrochemiczną, lecz jednocześnie są mniej skomplikowane. Istnieje wiele odczynników służących do derywatywacji w analizach z detekcją UV-Vis powszechnie stosowanych w laboratoriach. Najpowszechniej stosowanymi związkami z tej grupy są odczynniki o strukturze maleimidu, do których należy m.in.: N-etylomaleimid (NEM), a także kwas jodooctowy (IAA) i jodoacetamid (IA) tworzące tioetery [19]. NEM jest używany również w reakcji enzymatycznej opartej na reakcji GSH z kwasem 5,5'-ditiobis-nitrobenzenowym (DTNB) w obecności reduktazy glutationu [34÷36], a także w analizach wykorzystujących detekcję fluorescencyjną i spektrometrię mas do oznaczania GSSG, jako związek maskujący tiole. Metody, w których stosowany jest NEM, stwarzają pewne niedogodności, gdyż odczynnik ten hamuje enzym – reduktazę glutationową. Jego nadmiar musi być więc usuwany przez ekstrakcję cieczą i ekstrakcję do fazy stałej [19]. NEM stosowany jest w stężeniu 1 mol/dm³ i pH powyżej 7, albo przy wartości pH poniżej 7, jeżeli czas inkubacji wynosi powyżej 2 godzin. Są niestabilne w środowisku zasadowym, co jest spowodowane hydrolizą pierścienia maleimidowego, a także faktem, że niektóre niskocząsteczkowe tiole tworzące derywatywaty z NEM mogą ulegać wewnątrzcząsteczkowej transaminacji do form cyklicznych przy

wartości pH powyżej 9 [2]. NEM ma również zdolność do wiązania grupy aminowej poniżej pH równego 7,5. Zjawisko to zachodzi wolniej niż wiązanie grupy tiowej i dlatego podczas długiej inkubacji w środowisku alkalicznym, albo gdy związek derywatyzuje grupę aminową (np. 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen) jest użyty w nadmiarze, należy usunąć nadmiar NEM przed procesem alkalizacji środowiska [20, 22]. Giustarini i wsp. [37] opisali metodę opartą na oznaczaniu koniugatów GSH z NEM. Próbkki krwi z dodatkiem tego odczynnika były stabilne w temperaturze -20°C w temperaturze -20°C przez 90 dni.

IA i IAA są stosowane jako związki maskujące tiole w analizie GSSG. Odczynniki te reagują z tiolami w nieodwracalnej reakcji opartej na substytucji nukleofilowej tworząc derywatyzy S-karboksymetylowe i S-karboksyamidoetylowe. Są rozpuszczalne w wodzie i mogą być przygotowywane w stężeniu 1 mol/dm^3 i $0,5\text{ mol/dm}^3$, przy pH 8. Podczas przechowywania należy chronić je przed dostępem światła. Ich wadą jest fakt, że w środowisku obojętnym lub alkalicznym mogą reagować z innymi grupami funkcyjnymi, np. grupą hydroksylową tyrozyny, aminową lizyny, lub imidazooową histydyny. Poza tym przy niskim pH oba odczynniki reagują z atomem siarki pochodzącym od metioniny. Jednakże grupa $-\text{SH}$ reaguje z tymi odczynnikiemami w sposób nieodwracalny znacznie szybciej niż jakakolwiek inna grupa, np. IAA reaguje z histydyną 1000 razy wolniej niż z cysteiną. Z tego względu reakcje, w których stosowane są te odczynniki wydają się być specyficzne względem tioli. Wadą IA w stosunku do IAA jest fakt, że jest to odczynnik, który nie przenika przez błony biologiczne i dlatego jest nieodpowiedni dla analiz przeprowadzanych *in vivo*. Może również dawać niepożądane produkty [2, 19].

Innym odczynnikiem należącym do tej grupy jest 2-winylopirydyna (VP). W przeciwieństwie do NEM odczynnik ten nie hamuje reduktazy glutationowej i dlatego jest stosowany jako odczynnik alkilujący w reakcji DTNB – reduktaza glutationowa. Optymalne pH dla VP mieści się w granicach 5-8, a reakcja wymaga dużego nadmiaru tego odczynnika i długiego czasu inkubacji [2]. Pochodnymi tej substancji, stosowanymi w analizie tioli jako związki maskujące, są: trimetanosulfonian 1-metylo-2-winylopirydyny i trimetanosulfonian 1-metylo-4 winylopirydyny [19].

DTNB (odczynnik Ellmana) został wynaleziony przez Ellmana w 1959 r. i od tej pory jest najpopularniejszym odczynnikiem stosowanym przy oznaczaniu tioli w reakcjach z derywatyzacją pokolumnową [20]. Reaguje z anionem tiananowym w reakcji wymiany tiolo-disulfidy dając żółty derywatyzy. DTNB jest powszechnie stosowany w reakcjach derywatyzy GSH i GSSG w analizie spektrofotometrycznej i w reakcji enzymatycznej, opracowanej przez Tietze [34]. Jest ona oparta na redukcji GSSG do GSH za pomocą reduktazy glutationowej w obecności NADHP, prowadzącej do powstania barwnego produktu: 5-tionitrobenzoenu [19]. DTNB był stosowany w wielu analizach [35, 40, 41]. Wiele dowodów wskazuje na fakt, że DTNB reaguje z grupami sulfhydrylowymi tioli w sposób niekompletny, nawet wtedy, gdy czas reakcji jest wydłużony. Reiner i wsp. [43] rozwiązali ten problem poprzez zastosowanie cysteaminy jako „pośrednika” pomiędzy grupą sulfhydrylową aminokwasów a DTNB.

Kolejnymi przedstawicielami odczynników stosowanych w reakcjach w metodach z detekcją UV-Vis są 4,4'-ditiopirydyna (DTPD) i 2,2'-ditiopirydyna, które reagują z tiolami w reakcji wymiany. DTPD jest odczynnikiem bardziej czułym i reaktywnym niż 2,2'-ditiopirydyna i może być używany przy niższym pH ($\geq 4,5$ zamiast pH 8,0), jednakże wykazuje mniejszą odporność na hydrolizę [2, 19, 20]. Ze względu na mały rozmiar cząsteczki, amfifilową naturę i brak ładunku DTPD reaguje szybko z grupami sulfhydrylowymi [43].

Tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochlininy (CMQT) jest używany jako odczynnik derywatyzy różnego rodzaju tiolowe występujące w osoczu: cysteinę, cysteino- glicynę, glutation i homocysteinę. Metoda CMQT-HPLC-UV umożliwia ilościowe oznaczenie całkowitych, wolnych i związanych z białkami tioli po derywatyzy, której poddawane są tiole po redukcji całego osocza lub jego rozpuszczalnych w kwasie

frakcji. Substancjami redukującymi używanymi w reakcjach z CMQT są: borohydrat sodu albo tris- 2-karboksyetylofosfina [29]. CMQT był stosowany jako odczynnik derywatyzy tiolowe występujące w osoczu [46] i ślinie [47].

Inne, powszechnie stosowane odczynniki z tej grupy to sole 2-halopirydyny i 2-halochinolininy, które szybko reagują z tiolami w lekko zasadowych roztworach wodnych tworząc stabilne S-pirydynowe i S-chinolinowe derywatyzy. Umożliwiają jednoczesne oznaczenie wielu różnych tioli w temperaturze pokojowej w czasie 1-15 minut.

Odczynniki dające derywatyzy fluoryzujące

Derywatyzyzacja oparta na użyciu odczynnika fluorescencyjnego jest powszechnie stosowana w metodach wykorzystujących techniki chromatograficzne lub elektroforezę kapilarną z tego względu, że detektory fluorescencyjne pozwalają osiągnąć niższe granice wykrywalności, niż detektory UV. Tworzą z GSH fluoryzujące połączenia, pozwalające na oznaczanie tego tripeptydu w ilościach pikomolarnych lub mniejszych. Związki fluorescencyjne reagują z grupą tiolową w sposób bardzo selektywny, jednak nie pozwalają na oznaczanie GSSG. Tylko odczynniki, które równocześnie reagują z grupą aminową, mimo mniejszej selektywności, pozwalają na jednoczesne oznaczanie GSH i GSSG [19].

Przedstawicielami odczynnika dających derywatyzy fluoryzujące są fluorosulfonylobenzofurazany: 4-sulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol (SBD-F), 4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol (ABD-F) i 4-(N,N-dimetyloaminosulfonylo)-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol (DBD-F). Aktywność odczynnika z tej grupy przedstawia się następująco: $\text{DBD-F} > \text{ABD-F} > \text{SBD-F}$, a zarówno selektywność względem tioli jak i rozpuszczalność w roztworach wodnych maleje w odwrotnym szeregu: $\text{SBD-F} > \text{ABD-F} > \text{DBD-F}$ [20]. Zaletą tych odczynnika jest fakt, iż w stanie nieaktywnym, a także produkty ich hydrolizy nie wykazują właściwości fluorescencyjnych. Z tego względu są bardzo czułe i specyficzne w stosunku do grup sulfhydrylowych, a same nie dają interferujących pików [19]. SBD-F jest najpopularniejszym odczynnikiem z tej grupy, używanym w różnych analizach. Wady związane z jego stosowaniem, to długi proces derywatyzyzacji wymagający wysokiej temperatury (1 h, 60°C), natomiast zaletą jest fakt, że derywatyzy tioli są stabilne przez przynajmniej 8 h, jeżeli są chronione przed światłem [48]. W przeciwieństwie do SBD-F derywatyzyzacja za pomocą ABD-F jest szybka i wymaga łagodniejszych warunków, dlatego jest to odczynnik odpowiedni do analiz za pomocą CE. Ich zaletą jest również fakt, iż nie dają reakcji krzyżowych z fosfinami, z tego powodu można prowadzić redukcję disiarczoków i derywatyzyzację tioli w tym samym czasie [2, 49, 50]. Innymi przedstawicielami związków derywatyzyzujących o budowie benzofurazanów są: 4-(N-acetyloaminosulfonylo)-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol i 7-fluoro-4-(N-trichloroacetyloaminosulfonylo)- 2,1,3-benzoksadiazol [51].

Kolejną grupą odczynnika dających fluorescencyjne derywatyzy są bimany. Przedstawicielem tych związków jest monobromobiman, który reaguje szybko, ale niespecyficznie z oznaczanymi tiolami w temperaturze pokojowej przy pH 8 [48]. Umożliwia uzyskanie stosunkowo dużej fluorescencji i tym samym pozwala na detekcję nawet niewielkich ilości analitu. Wadą tego związku jest, że odczynnik sam w sobie wykazuje fluorescencję i ulega fotooksydacji. Dodatkowym minusem jest zdolność tego związku do reakcji z reduktorami zawierającymi w swojej budowie grupę tiolową, a także z innymi nieoznaczanymi tiolami [2, 53]. Odczynnik ten był stosowany do oznaczania glutationu w różnych organach i tkankach, takich jak: osocze [29, 37], krew pełna i ślina [53], mioblasty we włóknach mięśniowych [54], erytrocyty [55], mitochondria [56], komórki śródbłonna [57] i astrocyty [58].

Ortoftalaldehyd (OPA) jest odczynnikiem, który reaguje zarówno z grupą sulfhydrylową jak i aminową, tworząc fluorescencyjne derywatyzy [2]. OPA nie wykazuje własnej fluorescencji, ale pod-

czas reakcji z tiolami generuje się pochodna izoindolowa z podstawnikiem alkilowym, która jest silnie fluorescencyjna. Istnieją dwa typy reakcji OPA z tiolami: selektywna i heterobifunkcyjna. W reakcji selektywnej konieczne jest użycie amin jako dodatkowego odczynnika, aby proces derywatacji był selektywny. Dodatkowymi odczynnikiem powszechnie stosowanymi są np.: glicyna, 2-aminoetanol, 2-merkaptopetanol, N-acetylocysteina lub kwas 3-merkaptopropionowy [19]. W reakcji heterobifunkcyjnej OPA reaguje bezpośrednio ze związkami zawierającymi zarówno grupę tiolową jak i aminową, do których należą m.in.: GSH i gamma-Glu-Cys. Nie jest konieczne w tym przypadku stosowanie dodatkowych odczynników, jednak użyte do oznaczania aminotiole zwiększają selektywność OPA względem tych związków [59]. GSSG nie daje fluorescencyjnych derywatacji z OPA; jest to możliwe dopiero po hydrolizie tego związku przy pH 12 [25]. Reakcje prowadzone przy użyciu tego odczynnika wymagają łagodnych warunków i umożliwiają również oznaczanie niektórych aminokwasów. Jednak jednoczesne oznaczanie kilku aminotiole w analizach, w których stosuje się OPA wymaga alkilacji wolnych tioli. Zaletą OPA, jest również krótki czas derywatacji, którą można prowadzić w temperaturze pokojowej [39]. Optymalne pH dla tego odczynnika mieści się w zakresie od 9,5-12 [13,60÷63]. Główne wady OPA to: wrażliwość na zmiany pH, niestabilność derywatacji w środowisku wodnym uwarunkowana ich hydrolizą spowodowaną przez nadmiar OPA [59]. Odczynnikiem o budowie zbliżonej do OPA jest naftaleno-2,3-dikarbonylaldehyd, który jest z powodzeniem stosowany przy oznaczaniu GSH [19,27,51].

Halidki są kolejną grupą odczynników, które należą do pochodnych IAA. Są stosowane przy oznaczaniu tioli w próbkach rzeczywistych. Należą do nich: 5-jodoacetamidofluoresceina [65-68] i 6-jodoacetamidofluoresceina [69], stosowane głównie przy oznaczaniu tioli metodą elektroforezy kapilarnej z laserowo wyzwalaną fluorescencją [51].

Podsumowanie

Proces przygotowania próbki jest najważniejszym i jednocześnie najbardziej skomplikowanym etapem w analizie glutationu i innych tioli. Stężenie glutationu u ssaków jest oznaczane głównie w osoczu, krwi pełnej i erytrocytach. Techniki chromatograficzne i elektroforeza kapilarna są stosowane przy oznaczaniu aminotiole niemal w każdej tkance i narządzie, co sprawia, że są bardziej użyteczne niż powszechnie stosowane w laboratoriach metody enzymatyczne, oparte na analizie krwi [70].

Etapy przygotowania próbek są podobne dla metod wykorzystujących techniki chromatograficzne lub elektromigracyjne. Każdy organ i tkanka po pobraniu muszą być schłodzone i przechowywane w niskiej temperaturze od -20°C do -80°C, co zależy od czasu, jaki upłynął od momentu pobrania próbki do czasu jej dalszej obróbki. Próbkę krwi i osocza muszą być zabezpieczone przed koagulacją poprzez dodanie do świeżo pobranej krwi odczynnika chelatującego, bądź umieszczenie krwi w specjalnych probówkach zawierających chelator. Procesy odbiałczania, redukcji i derywatacji nie są niezbędne dla wszystkich metod wykorzystujących techniki chromatograficzne lub elektromigracyjne. Konieczność zastosowania tych procedur zależy również od rodzaju analizowanych tkanek bądź komórek. Tkanki, w których występuje duże stężenie białek glutationolowanych albo enzymu γ -glutamylotranspeptydazy, wymagają odbiałczania. Oznaczanie glutationu całkowitego albo analiza stężenia wiązań disulfidowych wymaga procesu redukcji disulfidów. Proces derywatacji jest niezbędny w przypadku niemal wszystkich metod analitycznych, z wyjątkiem CE albo tandemowej spektrometrii mas, co czyni je mniej pracochłonnymi. Eliminacja tego etapu przygotowania próbki chroni ją przed powstaniem niepożądanych połączeń z odczynnikiem derywatacyjnym albo z innymi aminotiolami.

Literatura

- Serru V., Baudin B., Ziegler F., David J.P., Cals M.J., Vaubourdolle M., Mario N.: *Quantification of Reduced and Oxidized Glutathione in Whole Blood Samples by Capillary Electrophoresis*. Clin. Chem. 2001, 47, 1321-1324.
- Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F.: *Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification*. Clin. Chim. Acta. 2003, 333, 19-39.
- Bilska A., Kryczyk A., Włodek L.: *The different aspects of the biological role of glutathione*. Post. Hig. Med. Dośw. 2007, 61, 438-453.
- Winiarska K.: *Glutathione: niezwykle funkcje pospolitego tripeptydu*. Post. Bioch. 2000, 46, 318-326.
- Radwańska-Wala B., Buszman E., Drużba D.: *Reactive oxygen species in pathogenesis of central nervous system diseases*. Wiad. Lek. 2008, 66, 13, 67-72.
- Tylec A., Jarzab A., Stryjecka-Zimmer M., Wójcicka A.: *Stress oxidative in schizophrenia*. Pol. Merk. Lek. 2007, 23, 133, 74-76.
- Kałużna-Czaplińska J., Grys W., Szymańska A., Rynkowski J.: *Role of oxidative stress in autism*. Nowa Pediat. 2008, 4, 67-70.
- Miller E., Mrowicka M., Zotyński K., Kedziora J.: *Oxidative stress in multiple sclerosis*. Pol. Merk. Lek. 2009, 27, 162, 499-502.
- Nolin T.D., McMenamin E., Himmelfarb J.: J. Chromatogr. B. 2007, 852, 1-2, 554-561.
- Sakhi A.K., Blomhoff R., Gundersen T.E.: *Simultaneous and trace determination of reduced and oxidized glutathione in minute plasma samples using dual mode fluorescence detection and column switching high performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. A. 2007, 1142, 2, 178-184.
- Iwasaki Y., Saito Y., Nakano Y., Mochizuki K., Sakata O., Ito R., Saito K., Nakazawa H.: *Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples*. J. Chromatogr. B. 2009, 877, 28, 3309-3317.
- Overbo K., Sorbye H., Svardal A., Grong K., Svanes K.: *Glutathione and N-acetylcysteine reduce gastric mucosal blood flow in rats*. Dig. Dis. Sci. 1997, 42, 8, 1765-1774.
- Lenton K., Theriault H., Wagner J.R.: *Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde*. Anal. Biochem. 1997, 274, 1, 125-130.
- Hiraku Y., Murata M., Kawanishi S.: *Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay*. Biochim. Biophys. Acta. 2002, 1570, 1, 47-52.
- Lakritz J., Plopper C.G., Buckpitt A.R.: *Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples*. Anal. Biochem. 1997, 247, 63-68.
- Lazzarino G., Amorini A.M., Fazzina G., Vagnozzi R., Signoretti S., Donzelli S., Di Stasio E., Giardina B., Tavazzi B.: *Single-sample preparation for simultaneous cellular redox and energy state determination*. Anal. Biochem. 2003, 322(1), 51-59.
- Potesil D., Petrlova J., Adam V., Vacek J., Klejduš B., Zehnalek J., Trnkova L., Havel L., Kizek R.: *Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (Zea mays L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. J. Chromatogr. A. 2007, 1084(1), 134-144.
- Mendoza J., Soto P., Ahumada I., Garrido T.: *Determination of oxidized and reduced glutathione, by capillary zone electrophoresis, in Brassica juncea plants treated with copper and cadmium*. Electrophoresis. 2004, 25(6), 890-896.
- Monostori P., Wittmann G., Karg E., Túri S.: *Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review*. J. Chromatogr. B. 2009, 877, 3331-3346.
- Kusmierk K., Chwatko G., Glowacki R., Kubalczyk P., Bald E.: *Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis*. J. Chromatogr. B. 2011, 879, 1290-1307.
- Jones D.P.: *Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC*. Clin. Chim. Acta. 1998, 275, 175-184.
- Camera E., Picardo M.: *Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes*. J. Chromatogr. B. 2002, 781, 181-206.

23. McDermott G., Francis P.S., Holt K.J., Scott K.L., Martin S.D., Stupka N., Barnett M.W., Conlan X.: *Determination of intracellular glutathione and glutathione disulfide using high performance liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection*. *Analyst*. 2011, **136**, 2578-2585.
24. Harwood D.T., Kettle A., Brenna J.S., Winterbourn C.C.: *Simultaneous determination of reduced glutathione, glutathione disulphide and glutathione sulphonamide in cells and physiological fluids by isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *J. Chromatogr. B*. 2009, **877** (28), 3393-3399.
25. Kandar R., Žaková P., Lotkováb H., Kučerab O., Červinková Z.: *Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, **43**, 1382-1387.
26. Chang C., Tseng W.: *Gold nanoparticle extraction followed by capillary electrophoresis to determine the total, free, and protein-bound aminothiols in plasma*. *Anal. Chem.* 2010, **82** (7), 2696–2702.
27. Marchand S., Guzek A., Leroy P.: *HPLC study of the host–guest complexation between fluorescent glutathione derivatives and β -cyclodextrin*. *J. Incl. Phenom. Macro.* 2009, **66**(3-4), 409-418.
28. Hansen R.E., Østergaard R., Nørgaard P., Winther J.R.: *Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine*. *Anal. Biochem.* 2007, **363**(1), 77-82.
29. Glowacki R., Bald E.: *Fully automated method for simultaneous determination of total cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine in plasma by HPLC with UV absorbance detection*. *J. Chromatogr. B*. 2009, **877**(28), 3400-3404.
30. Hansen R.E., Winther J.R.: *An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations*. *Anal. Biochem.* 2009, **394**(2), 147–158.
31. Michaelsen J.T., Dehnert S., Giustarini D., Beckmann B., Tsikas. D.: *HPLC analysis of human erythrocytic glutathione forms using OPA and N-acetylcysteine ethyl ester: Evidence for nitrite-induced GSH oxidation to GSSG*. *J. Chromatogr. B*. 2009, **877** (28), 3405–3417.
32. Jones D.P., Carlson J.L., Mody V.C., Cai J., Lynn M.J., Sternberg Jr. P.: *Redox State of Glutathione in Human Plasma*. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, **28**(4), 625–635.
33. Rosenfeld J.: *Enhancement of analysis by analytical derivatization*. *J. Chromatogr. B*. 2011, **879** (17-18), 1157–1158.
34. Tietze F.: *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues*. *Anal. Biochem.* 1969, **27**(3), 502-522.
35. Rahman I., Kode A., Biswas S.K.: *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method*. *Nat. Protocols*. 2007, **1**, 3159 – 3165.
36. Eyer P., Podhradský D.: *Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent*. *Anal. Biochem.* 1986, **153**(1), 5766.
37. Giustarini D., Milzani A., Dalle-Donne I., Rossi R.: *Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids*. *Blood Cells Mol. Dis.* 2008, **40**(2), 174-179.
38. Winters R.A., Żukowski J., Ercal N., Matthews R.H., Spitz D.R.: *Analysis of glutathione, glutathione disulfide, cysteine, homocysteine, and other biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by n-(1-pyrenyl)maleimide*. *Anal. Biochem.* 1995, **227**(1), 14-21.
39. Benkova B., Lozanov V., Ivanov I.P., Todorova A., Milanov I., Mitev V.: *Determination of plasma aminothiols by high performance liquid chromatography after precolumn derivatization with N-(2-acridonyl)maleimide*. *J. Chromatogr. B*. 2008, **870** (1), 103–108.
40. Brehe J.E., Burch H.E.: *Enzymatic assay for glutathione*. *Anal. Biochem.* 1976, **74**(1), 189-97.
41. Katrusiak A.E., Paterson P.G., Kamencic H., Shoker A., Lyon A.W.: *Precolumn derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts*. *J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications*. 2011, **758**(2), 207-2012.
42. Nozal M.J., Bernal J.L., Toribio L., Marinero P., Moral O., Manzanar L., Rodriguez E.: *Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*. *J. Chromatogr. A* 1997, **778**(1-2), 347-353.
43. Riener K., Kada G., Gruber H.J.: *Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, **373**(4-5), 266-276.
44. Bald E., Chwatko G., Glowacki R., Kuśmieriek K.: *Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. *J. Chromatogr. A*. 2004, **1032**(1-2), 109-115.
45. Iciek M., Chwatko G., Lorenc-Koci E., Bald E., Wtodek L.: *Plasma levels of total, free and protein bound thiols as well as sulfane sulfur in different age groups of rats*. *Acta Biochim. Pol.* 2004, **51**(3), 815–824.
46. Kuśmieriek K., Glowacki R., Bald E.: *Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, **385**(5), 855-860 .
47. Bald E., Glowacki R.: *Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection*. *Amino Acids*. 2005, **28**(4), 431-433.
48. McMenamin M.E., Himmelfarb J., Nolin T.: *Analysis of multiple aminothiols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection*. *J. Chromatogr. B*. 2009, **877**(28), 3274–3281.
49. Tang D., Wen L., Santschi P.: *Analysis of biogenic thiols in natural water samples by high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection with ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBD-F)*. *Anal. Chim. Acta*. 2000, **408**(1-2), 299-307.
50. Fermo I., Paroni R.: *Total plasma homocysteine analysis by HPLC with SBD-F precolumn derivatization*. *Methods Mol. Biol.* 2000, **159**, 237-244.
51. Toyo'oka T.: *Analysis of thiols*. *J. Chromatogr. B*. 2009, **877** (28), 3318-3330.
52. Fujikawa Y., Urano Y., Komatsu T., Hanaoka K., Kojima H., Terai T., Inoue H., Nagano T.: *Design and Synthesis of Highly Sensitive Fluorogenic Substrates for Glutathione S-Transferase and Application for Activity Imaging in Living Cells*. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**, 14533–14543.
53. Wintner E.A., Deckwerth T.L., Langston W., Bengtsson A., Leviten D., Hill P., Insko M.A., Dumpit R., VandenEkar E., Toombs C.F., Szabo C.: *A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood*. *Br. J. Pharm.* 2010, **160**(4), 941–957.
54. Conlan X.A., Stupka N., McDermott G.P., Paul S., Francis P.S., Barnett N.W.: *Determination of intracellular glutathione and cysteine using HPLC with a monolithic column after derivatization with monobromobimane*. *Biomed. Chromatogr.* 2010, **24**(5), 455–457.
55. Sakhi A.K., Berg T.J.: *Reduced glutathione concentrations are not decreased in red blood cells of patients with long term type 1-diabetes*. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2011, **71**(2), 108-111.
56. Kimura Y., Goto Y., Kimura H.: *Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria*. *Antioxid. Redox Sign.* 2010, **12**(1), 1-13.
57. Djurhuus R., Nossum V., Lundsett N., Hovin W., Svardal A., M., Havnes M.B., Fismen, L., Hjelde A., Brubak A.O.: *Simulated diving after heat stress potentiates the induction of heat shock protein 70 and elevates glutathione in human endothelial cells*. *Cell Stress Chaperones*. 2010, **15**(4), 405-414.
58. Hilgier W., Węgrzynowicz M., Ruszkiewicz J., Oja S.S., Saransaari P., Albrecht J.: *Direct Exposure to Ammonia and Hyperammonemia Increase the Extracellular Accumulation and Degradation of Astroglia-Derived Glutathione in the Rat Prefrontal Cortex*. *Toxicol. Sci.* 2010, **117** (1), 163-168.
59. Zu Y.: *Molecular and Nanoparticle Postcolumn Reagents for Assay of Low-Molecular-Mass Biothiols using High-Performance Liquid Chromatography*. *J. Chromatogr. B*. 2009, **877**, 3358-3365.
60. Senft A.P., Dalton T.P., Shertzer H.G.: *Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using the Fluorescence Probe o-Phthalaldehyde*. *Anal. Biochem.* 2000, **280**, 80-86.
61. Cereser C., Guichard J., Draï J., Bannier E., Garcia I., Boget S., Parvaz P., Revol A.: *Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts*. *J. Chromatogr. B*. 2001, **752**(1), 123-132.
62. Leroy P., Nicolas A., Wellmann M., Michelet F., Oster T., Siest G.: *Evaluation o-phthalaldehyde as bifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC*. *Chromatographia*. 1993, **36**, 130-134.
63. Parmentier C., Leroy P., Wellman M., Nicolas A.: *Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection*. *J. Chromatogr. B*. 1998, **719**(1-2), 37-46.

64. Böhmer A., Jordan J., Tsikas D.: *High-performance liquid chromatography ultraviolet assay for human erythrocytic catalase activity by measuring glutathione as a phthalaldehyde derivative*. Anal. Biochem. 2011, **410** (2), 296–303.
65. Musenga A., Mandrioli R., Bonifazi P., Kennedler E., Pompei A., Raggi M.A.: *Sensitive and selective determination of glutathione in probiotic bacteria by capillary electrophoresis-laser induced fluorescence*. Anal. Bioanal. Chem. 2007, **387**(3), 917-924.
66. Landino L.M., Moynihan K.L., Todd J.V., Kennett K.L.: *Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, **314**(2), 555-560.
67. Wang Y., Xie Y., Bernier M., Wainer I.W.: *Determination of free and protein-bound glutathione in HepG2 cells using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. J. Chromatogr. A. 2009, **1216** (16), 3533-3537.
68. Zinellu A., Sotgia S., Posadino A.M., Pasciu V., Zinellu E., Usai M.F., Scanu B., Chessa R., Gaspa L., Tadolini B., Deiana L., Carru C.: *Protein-bound glutathione measurement in cultured cells by CZE with LIF detection*. Electrophoresis. 2007, **28**(18), 3277–3283.
69. Caussé E., Malatray P., Calaf R., Charpiot P., Candito M., Bayle C., Valdiguié P., Salvayrel R., Couderc F.: *Plasma total homocysteine and other thiols analyzed by capillary electrophoresis/laser-induced fluorescence detection: Comparison with two other methods*. Electrophoresis. 2000, **28**(18), 3277–3283.
70. Araujo A., Saraiva, M., Lima, J.: *Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system*. Talanta. 2008, **74**(5), 1511-1519.

Mgr Ewelina BŁOŃSKA-SIKORA jest absolwentką Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (2008). Obecnie jest doktorantką Instytutu Chemii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Zajmuje się analizą glutationu we krwi pacjentów z RZS. Jest autorką 6 artykułów w prasie naukowej i autorem lub współautorką 3 posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Dr Jerzy OSZCZUDŁOWSKI - absolwent Uniwersytetu Jagiellońskiego. Autor 30 artykułów w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz w innych recenzowanych czasopismach naukowych, kilkudziesięciu referatów i komunikatów na konferencjach naukowych, krajowych i zagranicznych. Członek Rady Redakcyjnej czasopisma: Aparatura Badawcza i Dydaktyczna. Członek Kolegium Redakcyjnego w Polskim Komitecie Normalizacyjnym. Recenzent wniosków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Obecnie zajmuje stanowisko wicedyrektora do spraw dydaktycznych w Instytucie Chemii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.

Staż naukowy: Szwecja, University of Umea – Department of Public Health and Environmental Studies, Environmental Chemistry and National Defense Research Establishment (1993)

Prof. zw. dr hab. inż. Zygfryd WITKIEWICZ jest dyrektorem Instytutu Chemii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach oraz pracownikiem Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Jest redaktorem naczelnym czasopisma Aparatura Badawcza i Dydaktyczna, wydawanego przez COBRA-BiD. W Polskim Komitecie Normalizacyjnym przewodniczy Komitetowi Technicznemu ds. Jakości Powietrza. Jest członkiem Komitetu Chemii Analitycznej PAN i członkiem Komisji Analizy Chromatograficznej tego Komitetu, członkiem PTChem, IUPAC i The Chromatographic Society. Opublikował ponad 250 prac naukowych i 7 książek, jest współautorem 21 patentów. Otrzymał Medal Cwieta przyznany przez Rosyjskie Towarzystwo Chromatograficzne.

Mgr Dariusz WIDEŁ - ukończył w 2009 r. 5-letnie studia magisterskie w kierunku chemia z ochroną środowiska na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego Jana Kochanowskiego w Kielcach. Pracuje na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Fizycznej Instytutu Chemii UJK. Realizuje pracę doktorską pt: „Zastosowanie metod elektromigracyjnych i chromatograficznych w analizie wód i napojów” pod kierunkiem prof. zw. dr. hab. inż. Zygryda Witkiewicza.

VIII Międzynarodowa Konferencja „Paliwa z odpadów”

Katedra Technologii i Urządzeń Zagospodarowania Odpadów, Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki w Gliwicach, w dniach 14 – 16 listopada 2012 r. organizuje w Szklarskiej Porębie VIII Międzynarodową Konferencję „Paliwa z odpadów”.

„Paliwa z odpadów” to miejsce spotkań krajowych i zagranicznych specjalistów zajmujących się gospodarką odpadami i ich wykorzystaniem. Wzorem ubiegłych lat udział w Konferencji wezmą specjaliści z dziedziny ochrony środowiska i gospodarki odpadami, reprezentujący zarówno krajowe jak i zagraniczne podmioty gospodarcze, administrację państwową i samorządową oraz wywodzący się z wiodących ośrodków naukowych. Konferencja ma dać uczestnikom przegląd możliwych procesów zagospodarowania odpadów ze szczególnym uwzględnieniem procesów termicznych.

Tematyka konferencji obejmuje zarówno aspekty teoretyczne, jak i analizę konkretnych rozwiązań technologicznych, w zakresie:

- badania właściwości odpadów i produktów powstałych na ich bazie (w tym paliw)
- termicznego unieszkodliwiania odpadów niebezpiecznych
- technologii mechanicznego i biologicznego przetwarzania i zagospodarowania odpadów (m.in. sortowanie, kompostowanie, fermentacja, recykling)
- energetycznego wykorzystania odpadów (w tym komunalnych i osadów ściekowych)
- technologii wytwarzania i właściwości paliw
- technologii unieszkodliwiania odpadów niebezpiecznych
- ekologicznych skutków zagospodarowania odpadów
- skojarzonej gospodarki odpadowo-energetycznej
- tworzenia i eksploatacji rozwiniętych systemów gospodarki odpadami (w tym ich optymalizacji)
- wykorzystania odpadów w procesach produkcyjnych
- monitoringu środowiska w aspekcie gospodarki odpadami, w tym w szczególności procesów termicznych
- prawnych aspektów gospodarki odpadami.

Szczegółowe informacje dostępne są na stronie internetowej <http://waste.polsl.pl>.

(<http://katalog-konferencyjny.pl>)