

**KWAS  $\alpha$ -LIPONOWY – ANTYUTLENIACZ  
ANTYUTLENIACZY – WŁAŚCIWOŚCI I METODY  
OZNACZANIA**

**$\alpha$ -LIPOIC ACID – ANTIOXIDANT OF ANTIOXIDANTS  
– PROPERTIES AND DETERMINATION METHODS**

**Agata Skorupa\*, Sławomir Michałkiewicz**

*Uniwersytet Jana Kochanowskiego, Instytut Chemii  
ul. Świętokrzyska 15G, 25-408 Kielce  
\*e-mail: agata.skorupa@ujk.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Kwas  $\alpha$ -liponowy – właściwości fizykochemiczne
2. Kwas  $\alpha$ -liponowy – właściwości biochemiczne
3. Metody oznaczania
  - 3.1. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)
  - 3.2. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)
  - 3.3. Chromatografia gazowa (GC)
  - 3.4. Spektrofotometria
  - 3.5. Elektroforeza kapilarna (CE)
  - 3.6. Metody elektrochemiczne
  - 3.7. Oznaczanie LA związanego w lipolizynie

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr Agata Skorupa** w 2006 r. ukończyła studia chemiczne na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Akademii Świętokrzyskiej (obecnie Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach). Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w marcu 2016 r. na tym samym Wydziale. Pracuje na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Analitycznej Instytutu Chemii UJK. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół właściwości elektrochemicznych substancji o znaczeniu biologicznym.



**Dr hab. Sławomir Michałkiewicz** prof. UJK ukończył w 1989 r. studia chemiczne na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Kielcach (obecnie Uniwersytet Jana Kochanowskiego). Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 1998 r. na Wydziale Chemii UMCS w Lublinie, a doktora habilitowanego (dziedzina nauk chemicznych, dyscyplina chemia) na Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie w 2013 r. Pracuje na stanowisku profesora nadzwyczajnego w Zakładzie Chemii Analitycznej Instytutu Chemii UJK w Kielcach. Tematyka badawcza obejmuje

właściwości elektrochemiczne i voltamperometryczne oznaczanie substancji biochemicznie czynnych.

## ABSTRACT

Attention has been paid to healthy lifestyle in recent years. This is possible through increased physical activity and proper nutrition. This involves a significant increase in the interest in natural ingredients in a human daily diet. They come from both vegetable and animal products. This group of substances includes, for example, ascorbic acid (vitamin C), tocopherol (vitamin E), vitamin D, coenzyme Q10 and others. The important role of many compounds provided with food is their antioxidant action, which protects the body against the harmful effects of reactive oxygen species. They also exhibit therapeutic effects in diseases caused by oxidative stress.  $\alpha$ -Lipoic acid (LA) also fits well into this group of substances and even gains the title of an “*universal antioxidant*” and an “*antioxidant of antioxidants*”.

LA is produced in the human body in small amounts, and its biosynthesis occurs in the mitochondria. It is a compound with a very broad spectrum of therapeutic and biological activity. The amounts produced in the body are not sufficient and should therefore be supplied to the body from external sources. Food is the second, except *de novo* synthesis, the source of this compound. LA is a great antioxidant that can counteract the effects of aging. It is used mainly in the treatment of diabetic neuropathy and cardiovascular diseases, multiple sclerosis and Alzheimer's disease.

Such a wide action and occurrence causes the development of determination methods. Literature data indicate that free LA is primarily determined by liquid and gas chromatography, capillary electrophoresis, spectrophotometric and electrochemical techniques. In plant and animal cells it is mainly in the form of lipoyllysine. Determination of such a bound LA requires the proper preparation of the sample. This is usually acid, alkaline or enzymatic hydrolysis.

This review summarizes the basic physicochemical and biochemical properties of  $\alpha$ -lipoic acid and the methods of its determination.

Keywords:  $\alpha$ -lipoic acid, dihydrolipoic acid, lipoyllysine, antioxidant, determination  
Słowa kluczowe: kwas  $\alpha$ -liponowy, kwas dihydroliponowy, lipolizyna, przeciwutleniacz, oznaczanie

---

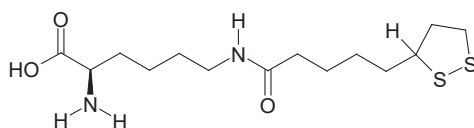
---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Asc	– kwas askorbinowy, witamina C
ASE	– przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikowa (ang. <i>accelerated solvent extraction</i> )
ASS	– zateżanie przez spiętrzanie w mieszaninie acetonitrylu i soli (ang. <i>acetonitril-salt stacking</i> )
BDDE	– elektroda diamentowa domieszkowana borem (ang. <i>boron doped diamond electrode</i> )
CE	– elektroforeza kapilarna (ang. <i>capillary electrophoresis</i> )
CEAD	– wielokanałowy detektor kulometryczny (ang. <i>culometric electrode array detector</i> )
CL	– chemiluminescencja
DHAA	– kwas dehydroaskorbinowy
DHLA	– kwas dihydroliponowy (ang. <i>dihydrolipoic acid</i> )
DPV	– woltamperometria pulsowa różnicowa (ang. <i>differential pulse voltammetry</i> )
$\varepsilon$	– molowy współczynnik absorpcji
$E_{pa}$	– potencjał piku anodowego
ESI-MS	– jonizacja przez elektrorozpylanie sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>electrospray ionisation mass spectrometry</i> )
FPD	– detektor płomieniowo-fotometryczny (ang. <i>flame photometric detector</i> )
FID	– detektor płomieniowo-jonizacyjny (ang. <i>flame ionization detector</i> )
FL	– fluorymetria
FTO	– elektroda z tlenku cyny domieszkowana fluorem (ang. <i>fluorine-doped tin oxide</i> )
GC	– chromatografia gazowa (ang. <i>gas chromatography</i> )
GCE	– elektroda ze szklanego węgla (ang. <i>glassy carbon electrode</i> )
GSH	– glutation, forma zredukowana
GSSG	– glutation, forma utleniona
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high performance liquid chromatography</i> )
$I_p$	– natężenie prąd piku
LA	– kwas $\alpha$ -liponowy (ang. <i><math>\alpha</math>-lipoic acid</i> )
LLys	– lipolizyna (ang. <i>lipoyllysine</i> )
LOD	– granica wykrywalności (ang. <i>limit of detection</i> )
LOQ	– granica oznaczalności (ang. <i>limit of quantification</i> )
$\log K_{ow}$	– współczynnik podziału <i>n</i> -oktanol/woda w postaci logarytmicznej

NADH	– dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
PG/CoPc	– elektroda z pirolitycznego grafitu modyfikowana ftalocyjanianem kobaltu (ang. <i>pyrolytic graphite electrode modified with cobalt phthalocyanine</i> )
ROS	– reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i> )
RP-HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. <i>reverse phase high performance liquid chromatography</i> )
RP-TLC	– chromatografia cienkowarstwowa w odwróconym układzie faz (ang. <i>reverse phase thin layer chromatography</i> )
SWV	– woltamperometria fali prostokątnej (ang. <i>square wave voltammetry</i> )
TFA	– kwas trifluorooctowy
TOH	– tokoferol, witamina E





Rysunek 2. Struktura lipolizyny (LLys)

Figure 2. Structure of lipoyllysine (LLys)

LA jest stabilny jako ciało stałe, łatwo ulega polimeryzacji po podgrzaniu powyżej temperatury topnienia (47,5°C, Tab. 1) lub pod wpływem światła po rozpuszczeniu w obojętnych rozpuszczalnikach [5]. Jest rozpuszczalny zarówno w środowisku wodnym, jak i tłuszczowym, dlatego może jednocześnie chronić błony lipidowe komórek skóry, jak i przestrzenie międzykomórkowe, do których przenikają składniki rozpuszczalne w wodzie. Zdolność do rozpuszczania LA w obydwu środowiskach tkwi w chemicznej strukturze cząsteczki. Zarówno LA, jak i DHLA zawierają niepolarny łańcuch alifatyczny, którego obecność sprzyja rozpuszczaniu w rozpuszczalnikach organicznych. Niewielka długość tego łańcucha oraz obecność polarnej grupy karboksylowej powoduje natomiast, że obydwie te związki wykazują ograniczoną rozpuszczalność w wodzie. Jest ona jednak mniejsza niż w rozpuszczalnikach niepolarnych [3, 7] (Tab. 1). Stosunkowo mała masa molowa LA (206,33 g mol<sup>-1</sup>), większa niż kwasu askorbinowego (176,12 g mol<sup>-1</sup>), ale znacznie mniejsza niż tokoferolu (430,69 g mol<sup>-1</sup>) sprawia, że LA wykazuje większą rozpuszczalność w wodzie niż TOH. LA i DHLA mają jednocześnie więcej atomów węgla niż kwas askorbinowy, co sprawia, że są lepiej od niego rozpuszczalne w lipofilowych błonach komórkowych [3].

Tabela 1. Podstawowe właściwości fizykochemiczne kwasu  $\alpha$ -liponowegoTable 1. The main physico-chemical properties of  $\alpha$ -lipoic acid

Postać	Żółte ciało stałe
Temperatura topnienia, °C	47,5 [9]
Temperatura wrzenia, °C	162,5 [9, 10]
Rozpuszczalność w wodzie, g L <sup>-1</sup>	0,127 [9]
Rozpuszczalność w etanolu, g L <sup>-1</sup>	50 [11]
log Kow	3,40 [9]
pKa	4,52 [10, 12], 4,70 [2, 9, 13]
Molowy współczynnik absorpcji $\epsilon$ , ( $\lambda = 332$ nm), L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	150 [14–16]

LA wykazuje właściwości słabego kwasu. Jego moc jest porównywalna z mocą kwasu octowego (pK<sub>a</sub> = 4,75 [17]).

Cząsteczka kwasu  $\alpha$ -liponowego posiada w swojej strukturze asymetryczny atom węgla w pozycji 6 łańcucha węglowego (Rys. 1). Może więc też występować w postaci dwóch stereoizomerów: *R*-LA i *S*-LA [5, 8]. Tylko izomer *R*-LA jest syntezowany endogenicznie i może być kowalencyjnie przyłączony przez wiązanie ami-

dowe do lizyny oraz może działać jako kofaktor wspomagający enzymy katalizujące reakcje chemiczne w organizmie [8].

## 2. KWAS $\alpha$ -LIPONOWY – WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE

Kwas  $\alpha$ -liponowy jest bardzo rozpowszechniony w organizmach żywych. Występuje w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Jest istotnym elementem łańcucha oddechowego, ważnym i zasadniczym substratem w metabolizmie energetycznym i w tworzeniu aminokwasów, a także koenzymem w wieloenzymatycznych kompleksach katalizujących oksydacyjną dekarboksylację  $\alpha$ -ketokwasów [7]. Literatura podaje wiele zastosowań leczniczych LA. Podstawową właściwością kwasu  $\alpha$ -liponowego jest działanie przeciwutleniające. Według Packera i współpracowników [18] przeciwutleniacz stosowany w terapii powinien spełniać szereg kryteriów: reagować z wolnymi rodnikami, mieć możliwość chelatowania jonów metali, współdziałać z innymi antyutleniaczami, uczestniczyć w ekspresji genów, a także powinien być łatwo absorbowany z diety oraz koncentrować się w tkankach, komórkach i płynach ustrojowych. Takie właśnie cechy wykazuje LA.

Zarówno kwas  $\alpha$ -liponowy, jak i dihydroliponowy, działają jako zmiatacze wolnych rodników. Reaktywne formy tlenu (ROS), które występują w organizmie w stanie homeostazy odgrywają rolę obronną przed patogenami. Będąc w nadmiarze reagują one jednak z podstawowymi strukturami organizmu: białkami, lipidami i DNA. Reakcje te mogą powodować ich uszkodzenia i wywoływać groźne skutki prowadzące do powstawania wielu chorób [19] oraz przyspieszać proces starzenia się organizmu [20]. LA reaguje z tlenem singletowym ( $^1\text{O}_2$ ), natomiast DHLA z rodnikiem ponadtlenkowym ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) oraz peroksylovym ( $\text{LOO}^{\cdot}$ ). Obydwa związki skutecznie unieszkodliwiają rodniki hydroksylowe ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) oraz kwas chlorowy(I) ( $\text{HOCl}$ ) [18, 21].

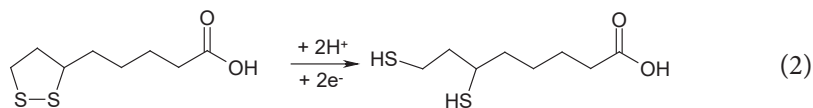
Wchodząc w reakcję z rodnikowymi i nierodnikowymi ROS, kwas  $\alpha$ -liponowy przekształca się w kationorodnik  $\text{LA}^{+\cdot}$  według równania:



Kationorodnik ten jest znacznie mniej reaktywny niż ROS i nie stwarza już tak dużego zagrożenia dla komórek, oraz jest łatwo przekształcany ponownie w LA przy udziale innych antyutleniaczy wewnątrzkomórkowych ( $\text{Asc}$ ,  $\text{TOH}$ ) (Rys. 3).

Dzięki niewielkim rozmiarom cząsteczek, kwas  $\alpha$ -liponowy potrafi szybko penetrować w głąb komórek ludzkich gdzie przez redukcję grupy ditiolowej jest przekształcany w kwas dihydroliponowy (DHLA):

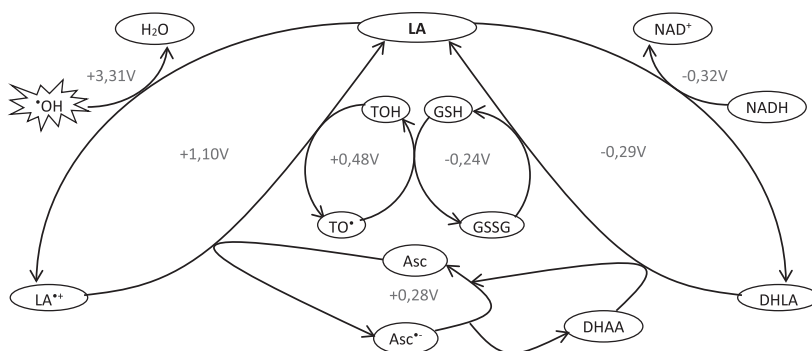




Niski ujemny potencjał redoks ( $E^{0b} = -0,29V$  [22] lub  $-0,32V$  [3, 23, 24]) powoduje, że DHLA jest silnym reduktorem. Dzięki temu potrafi skutecznie regenerować i przedłużać efektywność witaminy C i E. Wzmacnia działanie innych ważnych przeciwutleniaczy, takich jak koenzymu Q10, glutationu i kwasu dehydroaskorbinoowego (DHAA) poprzez redukcję ich postaci rodnikowych i form utlenionych:



Procesy te zachodzą zarówno w membranach, jak i fazie wodnej [3, 25, 26] (Rys. 3). Synergistyczne oddziaływanie z innymi przeciwutleniaczami powoduje, że LA zyskuje miano „antyutleniacza antyutleniaczy” [4]. Wpływa on ponadto na obniżenie poziomu NADH, który pełni istotną rolę w procesach oddychania komórkowego [26] (Rys. 3).



Rysunek 3. Interakcje kwasu  $\alpha$ -liponowego i dihydroliponowego z innymi przeciwutleniaczami [7]  
 Figure 3. Interactions of lipoic and dihydrolipoic acid with other antioxidants [7]

Zapobieganie stresowi oksydacyjnemu przez kwas  $\alpha$ -liponowy i dihydroliponowy wiąże się również z ich zdolnością do chelatowania jonów metali. Jony żelaza, miedzi czy kobaltu jako katalizatory biorą udział w reakcjach enzymatycznych będąc przenośnikami elektronów. W postaci niezwiązanej z białkami mogą jednak przyczyniać się do generowania wolnych rodników. Zarówno LA jak i DHHLA tworzą w roztworach trwałe związki kompleksowe z jonami metali przejściowych, np.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  eliminując je w ten sposób ze środowiska. DHHLA kompleksuje dodatkowo jony  $\text{Fe}^{3+}$ , a także  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$ . Kompleksowanie jonów metali przez obydwie postaci kwasu  $\alpha$ -liponowego zachodzi z udziałem grupy karboksylowej. DHHLA wiąże jony metali silniej niż LA, chociaż reakcje te mogą być powodem jego

właściwości prooksydacyjnych, czyli zdolności do uszkodzania innych związków chemicznych i ich zamiany w wolne rodniki. Zaobserwowano, np. że w obecności jonów  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  może wzrastać stężenie rodnika hydroksylowego. Właściwości przeciwtleniające przeważają jednak nad niepożądanym działaniem prooksydacyjnym [7, 25]. Właściwości chelatujące kwasu  $\alpha$ -liponowego chronią ponadto przed konsekwencjami zatruc rtęcią, arsenem, ołowiem i innymi metalami ciężkimi [27–30].

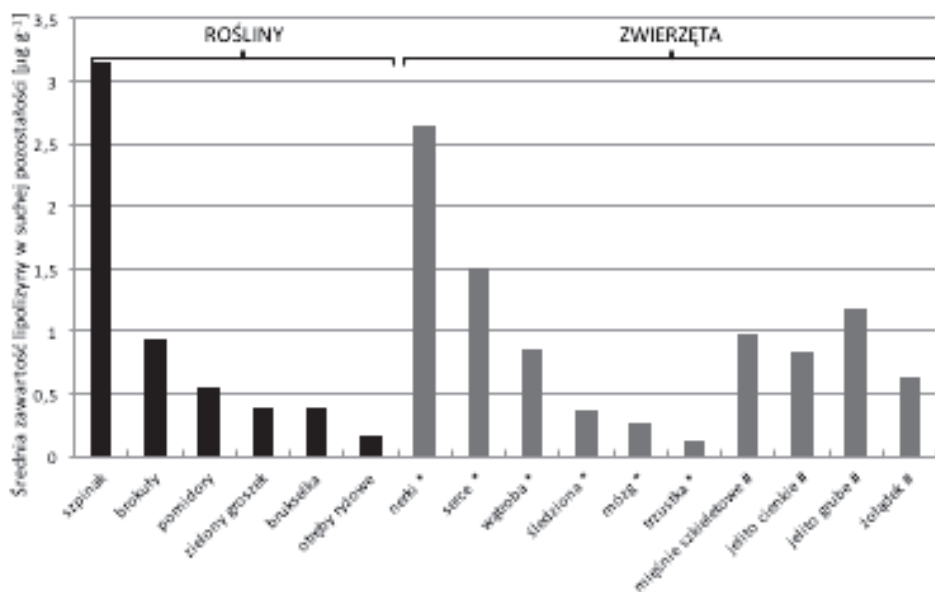
Ze względu na właściwości hepatoprotekcyjne i lipotropowe, LA jest często stosowany także w zatruciach grzybami oraz w leczeniu chorób wątroby powodowanych nadużywaniem alkoholu [6].

Kwas  $\alpha$ -liponowy wpływa regulująco na metabolizm węglowodanów i lipidów co umożliwia stosowanie go przy ograniczeniu przyrostu masy ciała i otyłości, redukcji poziomu lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), całkowitego cholesterolu i triglicerydów [31]. Szczególne zastosowanie lecznicze ma w przypadku neuropatii cukrzycowej [6, 7]. Wynika to z hamowania akumulacji kwasów tłuszczowych, zwiększając wrażliwość na insulinę u pacjentów chorych na cukrzycę typu drugiego. Wzrasta tym samym wychwyt glukozy przez wątrobę i mięśnie, a tym samym zmniejsza się jej stężenie we krwi. LA korzystnie wpływa na metabolizm komórek trzustki oraz ułatwia wytwarzanie insuliny, co jest związane ze współdziałaniem tego związku z kompleksem dehydrogenazy pirogronianowej [5, 7, 32].

Właściwości terapeutyczne LA przejawiają się również w zapobieganiu między innymi skutkom starzenia, w leczeniu chorób związanych ze stresem oksydacyjnym. Należą do nich choroby sercowo-naczyniowe [33], stwardnienie rozsiane [8, 34, 35] oraz choroba Alzheimera [36]. Ważną i cenną cechą kwasu  $\alpha$ -liponowego jest możliwość jego migracji przez barierę krew-mózg, co jest pomocne w przypadku chorób neurologicznych. Może on docierać do wszystkich komórek nerwowych gdzie zwiększa poziom glutationu, który pełni rolę swoistego neuroprzekaźnika i niweluje skutki stresu oksydacyjnego powstającego np. w trakcie udarów czy innych chorób mózgowo-naczyniowych. LA może także łagodzić skutki terapii przeciwnowotworowej. W badaniach nad zwierzętami stwierdzono, że w trakcie podawania chemioterapeutyków zmniejszała się aktywność enzymów antyoksydacyjnych, obniżał poziom przeciwtleniaczy wewnątrzkomórkowych (GSH, TOH i Asc) oraz nasilała się peroksydacja lipidów. Suplementacja LA w dużym stopniu zapobiegała tym skutkom [5, 7]. Jest on także pożądanym składnikiem ergogenicznym, czyli doprowadzającym do wzrostu sprawności, szybszej regeneracji oraz lepszej wydajności całego organizmu.

Prowadzone są też badania dotyczące wpływu LA na przebieg AIDS, choroby wywoływanej przez wirus HIV, który uszkodza i niszczy limfocyty  $T_H$ . Kwas  $\alpha$ -liponowy przerywa replikację tego wirusa przez całkowite blokowanie aktywacji czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B, który jest odpowiedzialny za ekspresję genów wirusa [6, 37].

Zalety terapeutyczne kwasu  $\alpha$ -liponowego sprawiają, że wzrasta zainteresowanie jego źródłami zewnętrznymi. W układach biologicznych występuje w postaci związanej jako lipolizyna (Rys. 2). Nie wiadomo jednak, czy kompleks ten sam może działać jako przeciwutleniacz, czy służy jako źródło wolnego LA. Dlatego też ostatnie badania skupiają się na określeniu ilości endogennego kwasu  $\alpha$ -liponowego w postaci Llys w tkankach roślinnych i zwierzęcych, które są typowymi składnikami diety człowieka [23, 38].

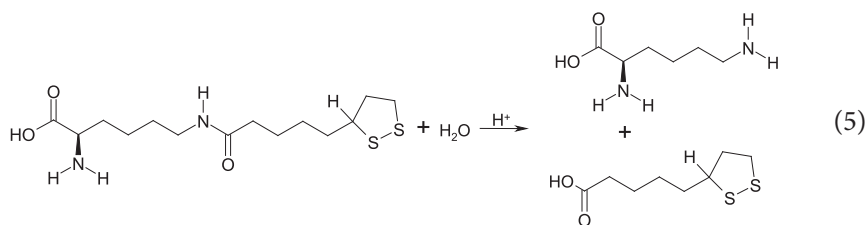


Rysunek 4. Średnia zawartość lipolizyny w suchej pozostałości wybranych roślin i tkanek zwierzęcych [38].

\* – sproszkowana tkanka bydlęca, # – liofilizowana tkanka szczurza

Figure 4. The mean lipolysine content of various plant and animal tissues [38]. \* – powdered bovine tissue, # – lyophilized rat tissue

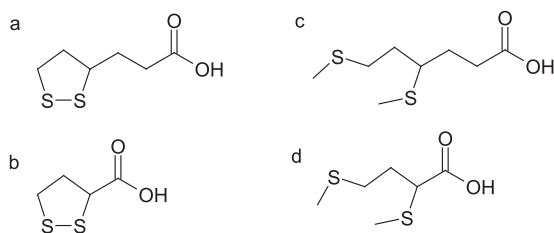
Bardzo bogatym źródłem lipolizyny w diecie człowieka są: szpinak, brokuły, pomidory, zielony groszek, brukselka, otręby ryżowe (Rys. 4), a także czerwone mięso i podroby zwierzęce (nerki, serce, wątroba i in.). Stwierdzono jednocześnie, że spożywanie kwasu  $\alpha$ -liponowego jedynie wraz z naturalnymi składnikami jest wystarczające do procesów metabolicznych, ale niedostateczne do celów leczniczych. Spowodowane jest to faktem, że LA jest przyswajany w formie Llys, która następnie ulega hydrolizie we krwi z uwolnieniem kwasu  $\alpha$ -liponowego według równania:



Braki LA mogą być z powodzeniem uzupełniane w postaci syntetycznych suplementów. Przyjmowanie ich z posiłkami zmniejsza jednak biodostępność kwasu. Można temu zapobiec spożywając go na 30 minut przed lub 2 godziny po posiłku [5, 7].

Wiele komercyjnie dostępnych suplementów diety zawiera mieszaninę racemiczną enancjomerów *R* i *S*. Badania dowiodły, że łatwiej przyswajalny jest enancjomer *R*-LA (40–50% większe stężenie w osoczu niż *S*-LA). Może to sugerować, że *R*-LA jest bardziej odpowiedni do doustnej suplementacji, obecność formy *S*-LA może jednakże zapobiegać polimeryzacji związku, a tym samym zwiększać jego biodostępność [39, 40].

Kwas  $\alpha$ -liponowy przejściowo gromadzi się głównie w wątrobie, sercu i mięśniach szkieletowych, ale także znajduje się w innych tkankach, takich jak jelita czy żołądek. Bardzo szybko jest usuwany z krwioobiegu, co jest wynikiem metabolizowania go w wątrobie. Główne ścieżki metaboliczne to  $\beta$ -oksydacja i *S*-metylacja. W wyniku  $\beta$ -oksydacji, która zachodzi w obszarze łańcucha węglowego bez naruszenia pierścienia ditiolowego, powstają kwasy: bisnorliponowy i tetranorliponowy (Rys. 5a, 5b). Natomiast produktami *S*-metylacji (redukcja pierścienia ditiolowego i podstawienie grup metylowych) zidentyfikowanymi we krwi człowieka są kwas 4,6-bismetylotioheksanowy i kwas 2,4-bismetylotiobutanowy (Rys. 5c, 5d) [7, 39, 41]. Większość metabolitów jest usuwana z moczem. Mogą one także uczestniczyć w reakcjach kompleksowania jonów metali. Kwasy bisnorliponowy i tetranorliponowy tworzą kompleksy między innymi z  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$ , które są bardziej stabilne niż z kwasem  $\alpha$ -liponowym. Może to być skutkiem mniejszej odległości między grupą karboksylową i pierścieniem ditiolowym [7].



Rysunek 5. Główne metabolity kwasu  $\alpha$ -liponowego, kwasy: a – bisnorliponowy, b – tetranorliponowy, c – 4,6bismetylotioheksanowy, d – 2,4-bismetylotiobutanowy

Figure 5. The main metabolites of  $\alpha$ -lipoic acid, acids: a – bisnorlipoic, b – tetranorlipoic, c – 4,6-bismethylthiohexanoic, d – 2,4-bismethylthiobutanoic

Oprócz działania wewnątrz organizmu, LA znalazł także zastosowanie jako konserwant w przemyśle spożywczym i kosmetycznym [13]. Ze względu na swoje właściwości przeciwutleniające, a także możliwość wnikania w głąb skóry, jest on składnikiem kremów do jej pielęgnacji i ochrony przed skutkami starzenia oraz działania promieniowania UV [42].

Prace badawcze na myszach i szczurach wykazały, że stosowanie kwasu  $\alpha$ -liponowego nie niesie ze sobą efektów ubocznych. Przybliżona dawka powodująca zgon 50% zwierząt doświadczalnych ( $LD_{50}$ ) wynosi bez względu na sposób podawania 400–500 mg na kg masy ciała zwierzęcia. Długotrwała suplementacja doustna powoduje jedynie wzrost redukcji masy ciała. Nic także nie wskazuje na kancerogeniczne i teratogenne działanie kwasu  $\alpha$ -liponowego. Nie zaleca się jednak przyjmowania go przez kobiety w ciąży. Efektami ubocznymi stosowania kwasu  $\alpha$ -liponowego mogą być skórne reakcje alergiczne, a w przypadku diabetyków, możliwość wystąpienia hipoglikemii (konsekwencja zwiększenia zużycia glukozy przy wysokich dawkach LA) [18].

### 3. METODY OZNACZANIA

W układach biologicznych kwas  $\alpha$ -liponowy występuje w trzech formach: wolnego kwasu, białek wiążących kwas słabymi wiązaniami wodorowymi oraz mocnymi wiązaniami kowalencyjnymi (lipolizyna).

Ze względu na powszechne występowanie i wszechstronne zastosowanie terapeutyczne, oznaczanie LA w próbkach biologicznych jest bardzo istotne do kontroli jego zawartości oraz poznania przemian metabolicznych. Można go oznaczać w postaci wolnej lub w formie związanej w lipolizynę [3, 43–46]. Do oznaczania ilościowego kwasu  $\alpha$ -liponowego w próbkach biologicznych oraz suplementach diety stosuje się wiele technik analitycznych: wysokosprawną chromatografię cieczą (HPLC) z różnymi sposobami detekcji: chemiluminescencyjną [47], spektrofotometryczną UV-Vis [48, 49], fluorescencyjną [50], elektrochemiczną [51], chromatografię gazową (GC) [52, 53], a także spektrofotometrię [54–58], elektroforezę kapilarną (CE) [59, 60], kulometrię [61, 62] oraz woltamperometrię z zastosowaniem różnych materiałów elektrody pracującej [13, 63–66]. W Tabeli 2 przedstawiono przegląd metod analitycznych stosowanych do oznaczania kwasu  $\alpha$ -liponowego przede wszystkim w suplementach diety, farmaceutykach, osoczu oraz produktach spożywczych.

Jak można zauważyć, przeważają metody chromatograficzne, ale często stosowane są także spektrofotometryczne i elektrochemiczne. Przewaga chromatografii wiąże się z jej zaletami, takimi jak: duża selektywność, wysoka czułość oraz niskie granice wykrywalności. Wadami tych technik są jednak: wysokie koszty aparatury, złożony i długotrwały proces przygotowania próbki. Na korzyść metod elektrochemicznych przemawia natomiast tania aparatura, krótki i prosty sposób przygotowa-

nia próbki, szczególnie w przypadku matryc niebiologicznych oraz porównywalne do metod chromatograficznych parametry analityczne.

Tabela 2. Przegląd najczęściej stosowanych metod oznaczania kwasu  $\alpha$ -liponowego oraz ich podstawowe parametry analityczne

Table 2. Overview of methods generally used for the determination of  $\alpha$ -lipoic acid and their basic analytical parameters

Metoda <sup>1)</sup>	Rodzaj próbki	Zakres liniowości $\mu\text{g mL}^{-1}$	LOD $\mu\text{g mL}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Odzysk %	Lit.
HPLC-BDDE	Suplementy diety	0,01–60	3,00 ng mL <sup>-1</sup>	10,00 ng mL <sup>-1</sup>	94,4–103,6	[51]
HPLC-ESI-MS	Suplementy diety	0,005–1	0,003	bd <sup>2)</sup>	96	[14]
HPLC-CEAD		0,01–1	0,005	bd	96	
HPLC-UV-Vis	Suplementy diety Farmaceutyki	10–500	4,4	16,8	66–67	[15]
HPLC-UV-Vis	Próbki biologiczne Suplementy diety	1,03–20,6	0,008	0,027	98–102,6	[48]
HPLC-UV-Vis	Farmaceutyki	50–175	0,5	1	98–102	[49]
HPLC-FL	Suplementy diety Osocze	bd	0,0062	<0,021	95,7	[50]
HPLC-CL	Suplementy diety Produkty spożywcze	2,5–30	1,77	1,91	bd	[47]
RP-TLC	Suplementy diety	500–1500	60	195	98,5–105,2	[67]
UV-Vis	Farmaceutyki	10–50	0,46	1,38	101,41	[54]
UV-Vis	Farmaceutyki	150–500	1,64–44,16	5,49–147,21	99,5–100,8	[55]
UV-Vis	Farmaceutyki	1–10	0,089	bd	99,7–101,4	[56]
UV-Vis	Farmaceutyki Osocze	0,01–0,1	0,018	bd	99,7–101,6	[57]
UV-Vis	Farmaceutyki Wodne płyny infuzyjne	1,54–20,6	bd	bd	bd	[58]
CE	Suplementy diety	10–900	0,8	2,5	97,8–98,3	[59]
CE	Próbki biologiczne	0,1–16,5	0,1	bd	95,8–112	[60]
DPV (GCE)	Suplementy diety	0,5–15	0,37	1,3	98,2	[63]
DPV (Pt)	Osocze	2–165	2,71	10,84	bd	[13]
DPV(BDDE)	Próbki biologiczne	0,062–21,63	0,018	bd	95–97	[64]

Metoda <sup>1)</sup>	Rodzaj próbki	Zakres liniowości $\mu\text{g mL}^{-1}$	LOD $\mu\text{g mL}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Odzysk %	Lit.
SWV (FTO)	Suplementy diety	1,03–41,2	0,76	2,53	99,3–104,1	[65]
DPV (PG/CoPc)	Suplementy diety	0,1–3,9	0,7 ng mL <sup>-1</sup>	2,5 ng mL <sup>-1</sup>	99,0–103,0	[66]
Miareczkowanie kulometryczne	Roztwory wzorcowe	2,4–35,6	1,18	bd	bd	[61]

1) objaśnienia w spisie skrótów

2) bd – brak danych

### 3.1. WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA (HPLC)

HPLC z różnymi sposobami detekcji: elektrochemiczną, spektrofotometryczną, chemiluminescencyjną, fluorymetryczną jest najczęściej stosowaną techniką do oznaczania LA.

Do analizy zawartości LA w suplementach diety Siangproh i współpracownicy [51] zastosowali chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz z detekcją elektrochemiczną na elektrodzie diamentowej domieszkowanej borem (HPLC-BDDE). Fazą ruchomą była równoobjętościowa mieszanina acetonitryl-bufor fosforanowy (pH 2,5). Optymalny potencjał do amperometrycznej detekcji LA to 1,05 V vs Ag/AgCl. Prędkość przepływu eluentu wynosiła 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Metodą odniesienia była HPLC z detekcją spektrofotometryczną w zakresie UV [15]. Badania ilościowe na próbkach suplementów wykazały dużą zgodność z danymi deklarowanymi przez producentów, a otrzymane wyniki nie różniły się znacząco od tych uzyskanych metodą odniesienia.

Durrani i współpracownicy [14] zastosowali także HPLC lecz do detekcji użyli wielokanałowego detektora kulometrycznego (CEAD) lub jonizacji przez elektrorozpylanie sprzężone ze spektrometrią mas (ESI-MS). Oznaczano LA w suplementach diety. W przypadku detekcji CEAD zastosowano elucję izokratyczną; fazą ruchomą była mieszanina: acetonitryl-metanol-bufor fosforanowy pH 3 (350:65:585, v/v). Detekcja ESI-MS wymagała użycia mieszaniny 0,1% lodowatego kwasu octowego z acetonitrylem (55:45, v/v) jako eluentu. Korzystano z wzorca wewnętrznego, którym był bisfenol A. Wykazuje on podobne do LA właściwości elektrochemiczne i chromatograficzne. Wyniki uzyskane przy zastosowaniu detekcji CEAD i ESI-MS były porównanie co świadczy o bardzo dobrej korelacji obydwu metod. Natomiast detekcja ESI-MS pozwoliła uzyskać niższą granicę wykrywalności (Tab. 2).

Do oznaczania LA w suplementach diety i farmaceutykach Aboul-Enein i Hoenen [15] zastosowali chromatografię w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z detekcją spektrofotometryczną przy długości fali 332 nm. Analizy wykonywano w kolumnie Supelcosil LC-18, a eluentem była mieszanina acetonitryl-0,05M monofosforan potasu o pH = 2,5 w stosunku objętościowym 45:55. Uzyskane wyjątkowo duże wartości LOD i LOQ (Tab. 2) są wynikiem niewielkiego molowego współ-

czynnika absorpcji LA przy wybranej długości fali (Tab. 1). Metoda była selektywna względem LA, nie obserwowano sygnałów pochodzących od innych składników leku.

Taki sam typ detekcji, ale przy innej długości fali zastosował Santos Perreira z zespołem [48] do analizy zawartości LA w suplementach diety oraz próbkach biologicznych. Stosowano detekcję przy długości fali 220 nm. Metoda ta jest rekomendowana przez Farmakopeę Amerykańską. Eluentem była mieszanina metanol-diwodorofosforan potasu o stężeniu 5 mM-acetonitryl (52:40:8, %). Otrzymano znacznie niższe wartości LOD i LOQ niż w przypadku metody wyżej opisanej [15] (Tab. 2). Uzyskane wyniki są zgodne z deklaracją producentów.

Tę samą metodę zastosował Rajkumar ze współpracownikami [49] do badania zawartości LA w obecności innych substancji czynnych w lekach. Jako wypełnienie kolumny autorzy zastosowali fazę C18, a eluentem była równoobjętościowa mieszanina acetonitrylu i roztworu zawierającego 20 mM octanu amonu i 30% kwasu octowego (pH 4,6). Detekcję prowadzono przy długości fali 210 nm. Substancją towarzyszącą był allopurinol, który jest składnikiem leków stosowanych w chorobach związanych z podwyższonym poziomem kwasu moczowego, takich jak dna moczanowa. Uzyskane wartości LOD i LOQ były zdecydowanie niższe dla allopurinolu (odpowiednio  $3 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ) w porównaniu do LA (Tab. 2). Jego obecność nie przeszkadza w oznaczaniu LA. Według autorów zastosowana metoda jest więc selektywna, dokładna, precyzyjna, i może być zastosowana do rutynowych analiz obydwu związków.

Innym sposobem detekcji stosowanym w HPLC jest fluorymetria (FL). Cząsteczka LA nie posiada żadnych grup fluoroforowych, dlatego wymagane jest zastosowanie chemicznej modyfikacji poprzez wprowadzenie reagentów fluorogenicznych. Satoh i inni [50] oznaczali jednocześnie LA i DHLA w suplementach i próbkach biologicznych. Powstałe pochodne wykazują fluorescencję przy długościach fal 510 nm (emisja), 380 nm (wzbudzenie). Rozdzielania dokonywano w odwróconym układzie faz z zastosowaniem elucji gradientowej za pomocą mieszaniny woda-acetonitryl z dodatkiem 0,1% kwasu trifluorooctowego (TFA). Skład eluentu zmieniano od 95:5 do 5:95 przez 40 minut utrzymując stały dodatek TFA. Taki sposób wykrywania związków po derywatywacji jest bardziej czuły i selektywny niż w przypadku detekcji spektrofotometrycznej. Otrzymane wartości LOD i LOQ były niższe niż te uzyskane w HPLC-UV-Vis (Tab. 2). Ponieważ DHLA nie jest składnikiem suplementów, oznaczanie obydwu związków obok siebie może mieć zastosowanie w przypadku próbek biologicznych. Metoda HPLC z detekcją fluorymetryczną pozwala na oznaczenie LA w próbkach biologicznych, ale etap derywatywacji jest czasochłonny i stwarza ryzyko popełnienia błędów analitycznych.

Kwas  $\alpha$ -liponowy można także oznaczać metodą HPLC z zastosowaniem detekcji chemiluminescencyjnej (CL). Badania prowadzone przez Wołyniec i współpracowników [47] opierały się na pomiarze chemiluminescencji będącej wynikiem reakcji LA z manganianem(VII) potasu w roztworze heksametafosforanu sodu



o pH 3. Słaba chemiluminescencja może być dodatkowo wzmocniona w obecności formaldehydu. Pomiary chromatograficzne prowadzone były w kolumnie Cosmosil 5C18-MS-II z elucją izokratyczną za pomocą mieszaniny acetonitrylu i diwodorofosforanu potasu o stężeniu 0,05M, pH 3 (30:70, v/v). Chemiluminescencja jako technika detekcji w HPLC wydaje się być bardzo atrakcyjna z powodu jej wysokiej czułości i selektywności oraz możliwości oznaczania wolnego LA w matrycach biologicznych. Proponowana metoda jest szybka, precyzyjna, dokładna i ekonomiczna. Jest ona prostsza niż detekcja fluorymetryczna.

### 3.2. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA (TLC)

Ravanić z zespołem [67] analizowali zawartość kwasu  $\alpha$ -liponowego w preparatach farmaceutycznych i suplementach diety za pomocą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC). Sorbentem był żel krzemionkowy 60RP-18F<sub>254s</sub>, natomiast eluent stanowiła mieszanina 2-propanol-metanol-aceton-woda-kwas octowy w stosunku objętościowym 6:4:2:8:0,2. Po rozwinięciu chromatogram spryskiwano roztworem chlorku palladu(II), a pojawiające się żółte plamki były wizualizowane światłem przy długości fali 375 nm. Droga rozwijania dla LA i DHLA wynosiła odpowiednio 43,0 oraz 34,2 mm. Inne, bardziej polarne składniki, jak na przykład aminokwasy czy karnityna miały znacznie większe współczynniki retencji. Pomiary densytometryczne wykazały, że istnieje ilościowa zależność między polem powierzchni plamki a stężeniem naniesionej substancji. Umożliwiło to sporządzenie krzywej kalibracyjnej i wyznaczenie granic wykrywalności i oznaczalności, które są zdecydowanie większe niż w przypadku chromatografii kolumnowej (Tab. 2). Opracowaną metodę zastosowano do analizy zawartości LA w preparatach farmaceutycznych i suplementach diety. Wykazywała ona duży odzysk, a wyniki były porównywalne do metody odniesienia, którą była wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) rekomendowana przez Farmakopeę Europejską.

### 3.3. CHROMATOGRAFIA GAZOWA (GC)

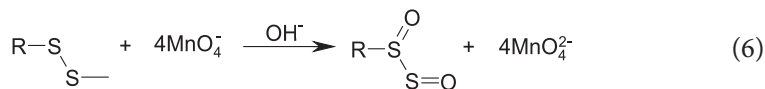
Chromatografia gazowa (GC), szczególnie sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) jest uważana za bardzo czułą i specyficzną metodę do oznaczania endogennego kwasu  $\alpha$ -liponowego [52, 53]. Wymaga ona jednak skomplikowanego procesu przygotowania próbki, co może wpłynąć na zmniejszenie odzysku. LA związany z białkiem musi być uwolniony przez kwasową lub zasadową hydrolizę w wysokich temperaturach, co prowadzi do jego rozkładu i ostatecznie do strat wolnego kwasu  $\alpha$ -liponowego. Metody alternatywne, takie jak enzymatyczne testy immunologiczne nie prowadzą do wzrostu dokładności i czułości pomiarów [38]. Różne metody oznaczania kwasu  $\alpha$ -liponowego i związków pokrewnych, np.: kwasu dihydroliponowego, lipoamidu, liponianu metylu, lipolizyny i innych za pomocą chromatografii gazowej (GC) szeroko opisał Kataoka [52].

### 3.4. SPEKTROFOTOMETRIA

Metody spektrofotometryczne są stosowane nie tylko do detekcji w innych technikach analitycznych, ale mogą stanowić odrębny sposób oznaczania kwasu  $\alpha$ -liponowego. Głównym problemem w oznaczeniach spektrofotometrycznych LA jest brak sprzężonego wiązania podwójnego w jego strukturze. Jedynie pierścień ditiolowy wykazuje niewielką absorpcję przy długości fali 330 nm [16]. Niska wartość molowego współczynnika absorpcji (Tab. 1) powoduje, że spektrofotometryczne oznaczanie wolnego LA charakteryzuje się niewielką czułością. Taką metodę zastosowali Patel i współpracownicy [54] do oznaczania LA w obecności allopurinolu w preparatach farmaceutycznych. Jako środowiska użyli roztworów metanowych. W przypadku oznaczania kwasu  $\alpha$ -liponowego podstawą do konstrukcji krzywej kalibracyjnej i wyznaczenia LOD i LOQ był pomiar pola powierzchni pod widmem w zakresie 310–390 nm. Analiza allopurinolu opierała się natomiast na pomiarze absorbancji w maksimum pasma (250 nm). Według badaczy zaproponowana metoda może być z powodzeniem stosowana do oznaczania tych substancji w lekach.

Metanol był również rozpuszczalnikiem stosowanym do oznaczania kwasu  $\alpha$ -liponowego w preparatach farmaceutycznych przez Gotiego i zespół [55]. Jego podstawą była analiza widm UV-Vis zerowego rzędu i ich pierwszej pochodnej. Do określenia parametrów analitycznych wykorzystano pomiar absorbancji w maksimum pasma oraz pola powierzchni pod widmami absorpcji. Wartości granic wykrywalności i oznaczalności ustalone na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 322 nm były wyższe (odpowiednio 44,16 i 147,21  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) w porównaniu z wartościami uzyskanymi metodą pomiaru pola powierzchni pod widmem (1,64 i 5,49  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Odzysk LA bez względu na sposób interpretacji widm był w zakresie 99,5–100,8%.

W celu zwiększenia czułości pomiarów spektrofotometrycznych przekształca się oznaczaną substancję w produkty pochłaniające światło. Walsh z zespołem [56] zastosował prostą i czułą metodę oznaczania LA w preparatach farmaceutycznych używając zasadowego roztworu manganianu(VII) potasu jako utleniacza. Reagent taki utlenia związki siarkowe, a sam przechodzi w zielono zabarwiony jon manganianu(VI), który absorbuje promieniowanie o długości 610 nm:

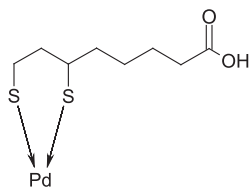


Proponowana metoda jest według autorów prosta, dokładna, precyzyjna, czuła, szybka i tania, a granica wykrywalności wynosi 0,089  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Do oznaczenia LA metodą UV-Vis można także użyć innych reakcji redoks [57]. Jedną z nich jest reakcja między azydkiem sodu i jodem przebiegająca w roztworach zakwaszonych. Jej produktami są jon jodkowy oraz wolny azot. Obecność związków siarkowych i tiolowych, w tym również LA znacznie przyspiesza reakcję.

Metoda opiera się na zmianach absorbancji przy długości fali 348 nm, proporcjonalnych do stężenia LA. Procedura była zastosowana przez autorów do oznaczania LA w farmaceutykach i osoczu. Granica wykrywalności wyznaczona tym sposobem wynosi  $0,018 \mu\text{g mL}^{-1}$  i jest niższa niż w przypadku zastosowania reakcji z manganem(VII) potasu [56].

Podstawą spektrofotometrycznego oznaczania LA mogą być również reakcje kompleksowania. Taki sposób zastosowali Korićanac z zespołem [58]. Metoda opiera się na tworzeniu połączenia kompleksowego pomiędzy palladem(II) i LA w roztworze buforu Brittona-Robinsona o pH 2,2. W jego powstaniu biorą udział atomy siarki pierścienia ditiolowego. Proponowaną strukturę kompleksu przedstawia Rysunek 6.



Rysunek 6. Proponowana struktura kompleksu kwasu  $\alpha$ -liponowego i palladu(II)  
Figure 6. Suggested structure of complex  $\alpha$ -lipoic acid with pallad(II)

Rejestrowane widma absorbancji utworzonego połączenia kompleksowego wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 365 nm. Liniowa zależność  $A = f(c)$  w zakresie  $1,54\text{--}20,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tab. 2) była podstawą do oznaczania LA w lekach i wodnych płynach infuzyjnych.

### 3.5. ELEKTROFOREZA KAPILARNA (CE)

Spektrofotometria jako metoda detekcji znajduje również zastosowanie w elektroforezie kapilarnej (CE). Taką metodę zastosowali Sitton i współpracownicy [59] do analizy zawartości kwasu  $\alpha$ -liponowego w suplementach diety. Oznaczenie prowadzono w roztworach buforu fosforanowego o stężeniu 50 mM i pH 7 zawierających 20% metanolu (v/v) przy napięciu 15 kV. Zastosowano detekcję spektrofotometryczną przy długości fali 208 nm. Autorzy nie zaobserwowali sygnałów od innych składników preparatu. Wadą stosowanej metody jest adsorpcja LA na ściankach kapilary, co wiąże się z potrzebą jej częstego przemywania. Szeroki zakres liniowości oraz niskie granice wykrywalności i oznaczalności (Tab. 2) wskazują na możliwość zastosowania opracowanej metody do analizy ilościowej LA w farmaceutykach.

Oznaczanie LA w próbkach biologicznych wymaga zwykle potraktowania jej rozpuszczalnikami organicznymi w celu wyeliminowania makrocząsteczek, np. białek. Li i współpracownicy [60] zaproponowali elektroforezę kapilarną z załadowaniem metodą spiętrzania przy użyciu mieszaniny acetonitrylu i chlorku sodu (ang. *acetonitrile-salt stacking*, ASS). Sposób załadowania analitów tą metodą opisali wcześniej

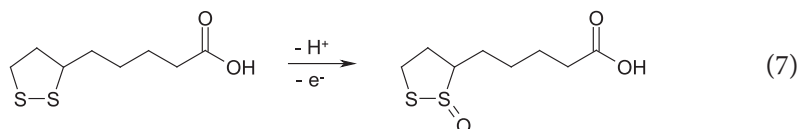
Mrass i Bald [68]. Zastosowane napięcie podczas oznaczania LA wynosiło 7,0 kV, a elektrolitem podstawowym był 90 mM bufor boranowy (pH 9,1). Badania dowiodły, że opracowaną metodę można stosować do oznaczania LA na poziomie mikromolowym.

### 3.6. METODY ELEKTROCHEMICZNE

Alternatywą dla chromatografii i spektrofotometrii, często stosowanych do analizy zawartości kwasu  $\alpha$ -liponowego są metody elektrochemiczne. W przypadku LA związanego w białko głównym problemem napotykanym przy ich stosowaniu może być konieczność stosowania wstępnego etapu hydrolizy. Ponieważ wolny kwas  $\alpha$ -liponowy jest najważniejszą postacią terapeutyczną, jest on najczęstszym obiektem badań elektrochemicznych. Procesy elektrodowe będące podstawą oznaczania są najczęściej badane na klasycznych elektrodach wykonanych z platyny [13] lub szklanego węgla [63]. Coraz częściej stosowane są obecnie elektrody o modyfikowanych powierzchniach [64–66].

Przygotowanie roztworów do badań elektrochemicznych jest zwykle znacznie prostsze niż w przypadku chromatografii. Często ogranicza się ono do rozpuszczenia preparatu w odpowiednim rozpuszczalniku. Taka procedura została zastosowana w pracy [63]. Rozpuszczalnikiem była mieszanina wody i metanolu (1:1, v/v). Powstały roztwór wymagał jedynie sączenia. Elektrolitem podstawowym był 0,1 M bufor fosforanowy (pH 6,9). Materiałem elektrody pracującej był szklisty węgiel (GCE). Do oznaczeń ilościowych zastosowano voltamperometrię pulsową różnicową (DPV). Podstawą oznaczania LA był jego pik utleniania obserwowany na voltamperogramach przy potencjale 0,8 V vs Ag/AgCl. Wadą opracowanej metody jest możliwość interferencji sygnałów pochodzących od innych elektroaktywnych substancji towarzyszących, dających sygnały w podobnym zakresie potencjałów, na przykład kwas askorbinowy, moczowy czy glukoza.

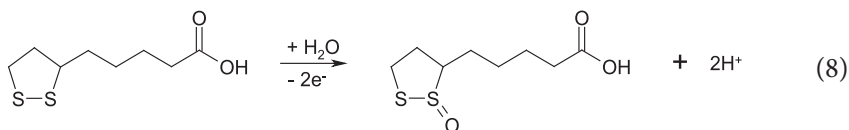
Również w przypadku matryc biologicznych takich jak osocze krwi ludzkiej, przygotowanie próbki do oznaczania wolnego kwasu  $\alpha$ -liponowego nie jest skomplikowane. Marin ze współpracownikami [13] rozpuszczali próbki krwi w roztworze 0,2 M buforu octanowego o pH 4,5 (1:24, v/v). Pomiary elektrochemiczne prowadzone były w układzie trójelektrodowym. Elektroda pracującą był dysk platynowy, elektrodą pomocniczą – drut platynowy, a potencjał mierzono względem elektrody chlorosrebrowej (Ag/AgCl). Elektrolitem podstawowym był 0,2 M bufor octanowy o pH 4,5. Roztwory zawierały ponadto dodatek 0,9% NaCl, którego obecność była uzasadniana jego częstym występowaniem w płynach ustrojowych organizmu ludzkiego oraz zapobieganiem utlenianiu glukozy. Badania wstępne pozwoliły określić charakter i mechanizm utleniania LA, który jest procesem nieodwracalnym i przebiega z wymianą jednego elektronu i jednego protonu, według zaproponowanego przez autorów [13] równania:



Analiza zawartości LA w osoczu krwi opierała się na krzywych DPV rejestrowanych w roztworach o podanym składzie. Dobrze ukształtowany pik przy potencjale 0,66 V vs Ag/AgCl odpowiada utlenianiu LA. Stwierdzono, że inne substancje mogące występować w osoczu, takie jak kwas askorbinowy czy moczowy nie interferują z sygnałem utleniania LA. Autorzy uznali metodę woltamperometryczną za prostą i wiarygodną do bezpośredniego oznaczania LA z granicą oznaczalności wynoszącą 10,84  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . W opracowanej metodzie jest potrzebna niewielka ilość próbki badanej, której przygotowanie nie wymaga skomplikowanych procedur. Może ona być stosowana w badaniach klinicznych do dokładnych i czułych analiz wymaganych w diagnostyce różnych chorób wywołanych stresem oksydacyjnym.

Technikę DPV do oznaczania LA w moczu przy użyciu elektrody diamentowej domieszkowanej borem (BDDE) zastosowali Stanković z zespołem [64]. Elektrolitem podstawowym był bufor Brittona-Robinsona o pH 3. Dobrze zdefiniowany pik utleniania otrzymano przy potencjale około 0,9 V vs Ag/AgCl. W porównaniu do wyżej wymienionych metod, autorzy [64] uzyskali znacznie niższą wartość LOD wynoszącą 0,018  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Badania wykazały, że obecność kwasów moczowego i askorbinowego nie przeszkadza w oznaczeniach LA, podczas gdy sygnał pochodzący od dopaminy interferuje z pikiem utleniania LA. Proces utleniania obydwu związków jest uzależniony od zmiany pH roztworu. Zwiększenie pH do 6 może powodować rozdzielanie sygnałów i umożliwić analizę.

Woltamperometrię fali prostokątnej (SWV) z zastosowaniem innego rodzaju elektrody pracującej do analizy LA w suplementach diety przedstawili Miranda z zespołem [65]. Była nią elektroda z tlenku cyny domieszkowana fluorem (FTO). Elektrolit podstawowy stanowił roztwór kwasu siarkowego(VI) o pH 2. Elektroultnienie LA przebiega według mechanizmu EC opisanego równaniem:



Badania wstępne wykazały, że w takich warunkach obserwowany jest dobrze ukształtowany pik utleniania LA przy potencjale 0,95 V vs Ag/AgCl. Sygnał ten może być wykorzystany do ilościowego oznaczania LA w preparatach farmaceutycznych. Wyznaczono zakres liniowości (1,03–41,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) oraz wartości LOD i LOQ (odpowiednio 0,76 i 2,53  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Niestety obecność kwasów askorbinowego i moczowego wpływa niekorzystnie na wyniki pomiarów ponieważ utlenianie tych związków na FTO zachodzi w podobnym do LA zakresie potencjałów. Prezentowana metoda nie może więc być zastosowana do analizy LA w próbkach biologicz-

nych, takich jak osocze czy moczu. Można ją natomiast stosować w oznaczeniach LA w suplementach nawet w obecności ryboflawiny, kwasu foliowego czy witaminy B<sub>12</sub>.

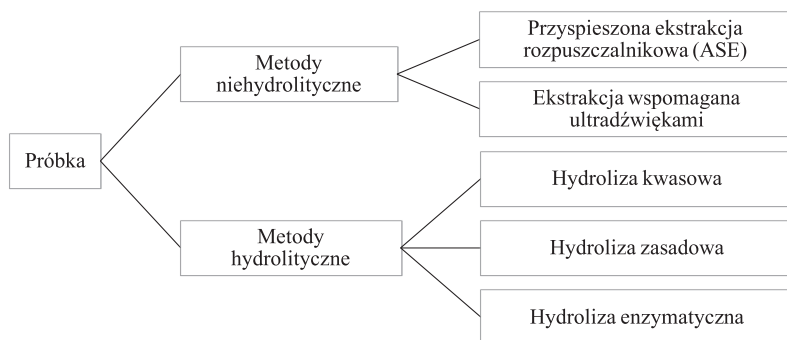
Ferreira z zespołem [66] badali proces utleniania LA na elektrodzie wykonanej z pirolitycznego grafitu modyfikowanego ftalocyjanianem kobaltu (PG/CoPc). Badania ilościowe prowadzono techniką DPV w buforze fosforanowym o pH 7,0. Zakres liniowości zależności natężenia prądu pikowego ( $I_p$ ) od stężenia analitu jest znacznie węższy niż w przypadku uzyskanego na elektrodzie FTO [65], ale granice wykrywalności i oznaczalności są nawet 1000-krotnie niższe (Tab. 2). Oznaczanie LA w suplementach diety prowadzono metodą wielokrotnego dodatku wzorca. Odzysk w proponowanej metodzie wynosił 99–103%.

Do oznaczania LA możliwe jest również zastosowanie miareczkowania kulometrycznego. Wykazali to Ziyatdinova z zespołem [61] w badaniach opartych na roztworach wzorcowych. Jako titranty mogą być użyte Cl<sub>2</sub> i Br<sub>2</sub> generowane na elektrodzie platynowej w wodnych roztworach zakwaszanych kwasem siarkowym oraz I<sub>2</sub> w buforze winianowym o pH 3,56. LA reaguje z chlorem w stosunku stechiometrycznym 1:5, a z bromem i jodem 1:2. Punkt końcowy miareczkowania określano biamperometrycznie. Autorzy uzyskali odzysk na poziomie 97,9–101,9; 100,7–105,7 i 99,0–103,1% odpowiednio dla Cl<sub>2</sub>, Br<sub>2</sub> i I<sub>2</sub> jako titrantów. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że przedstawiona metoda jest prosta, czuła i szybka do oznaczania LA.

Tego samego typu miareczkowanie z zastosowaniem elektrogenowanego chloru do oznaczania kwasu  $\alpha$ -liponowego testowali Ciesielski i Skowron [62]. Niestety reakcja LA z Cl<sub>2</sub> przebiega zbyt wolno i niecałkowicie. Mimo wielu prób autorom nie udało się dobrać warunków umożliwiających oznaczanie LA z błędem poniżej 10%.

### 3.7. OZNACZANIE LA ZWIĄZANEGO W LIPOLIZYNIE

Oznaczanie kwasu  $\alpha$ -liponowego w żywności pochodzenia roślinnego i zwierzęcego może być utrudnione ponieważ występuje on zarówno w formie wolnej, jak i związanej z białkami w postaci lipolizyny. W związku z tym analiza może dotyczyć wolnego LA, jego zredukowanej formy (DHLA), LLys lub całkowitej zawartości analitu. Każda z tych analiz wymaga innego sposobu przygotowania próbki. W przypadku oznaczania wolnego LA stosuje się metody niehydrolityczne. Analiza całkowitej zawartości wymaga natomiast zastosowania metod hydrolitycznych (Rys. 7).



Rysunek 7. Metody przygotowania próbek biologicznych do oznaczenia LA [43]

Figure 7. Biological sample preparation methods to determination LA [43]

W celu oznaczenia LA w połączeniach kowalencyjnych z białkami w próbkach żywności, takich jak jaja czy wątroba drobiowa, należy zastosować drastyczne warunki hydrolizy kwasowej [69]. Następuje ona poprzez gotowanie próbki z 12 M kwasem siarkowym przez 6 godzin w temperaturze 125°C. Hydrolizat ekstrahowany jest następnie benzenem, oznaczenie LA przeprowadza się metodą chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID). Odzysk w proponowanej metodzie wynosił 34% i był określony na podstawie kwasu  $\alpha$ -liponowego znakowanego izotopem  $^{14}\text{C}$ . Zwiększenie odzysku do 60–70% Mattulat i Baltes [46] uzyskali poprzez zmniejszenie stężenia kwasu siarkowego do 2 M i ogrzewanie hydrolizowanych próbek wątroby, nerek i mięsa w temperaturze 120°C przez 7 godzin. Po ekstrakcji i derywatywacji, LA oznaczano za pomocą GC-MS.

Do analizy LA w skomplikowanych matrycach można także zastosować hydrolizę zasadową. Kataoka z zespołem [53] ogrzewali próbki żywności zadawanej roztworem 3 M wodorotlenku sodu w temperaturze 110°C przez 3 godziny. Roztwory zawierały ponadto surowiczą albuminę wołową zapobiegającą utlenianiu LA. Po przeprowadzeniu LA w lotną pochodną, jego zawartość analizowano za pomocą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-fotometrycznym (GC-FPD). Odzysk LA w przypadku drobiu, mięsa, mleka, jaj zawierał się w granicach 50–60%.

Innym rodzajem przygotowania próbki biologicznej do oznaczania LA jest hydroliza enzymatyczna. Zastosowali ją Satoh z zespołem [45] do uwolnienia Llys z białek tkanek zwierzęcych poprzez reakcję z enzymami takimi jak: pronaza E i subtylizyna. W przypadku próbek roślinnych, np. szpinaku dodatkowo stosowano celulazę, która miała za zadanie zniszczenie ścian komórkowych zawierających celulozę. Po odbiałczaniu, odwirowaniu, derywatywacji i filtrowaniu, próbki były analizowane za pomocą HPLC z detekcją fluorescencyjną. Odzysk Llys mieścił się w granicach 99–107%.

## UWAGI KOŃCOWE

Kwas  $\alpha$ -liponowy jest produkowany w organizmie człowieka w niewielkich ilościach, a jego biosynteza zachodzi w mitochondriach. LA jest związkami o bardzo szerokim spektrum aktywności terapeutycznej i biologicznej. Jego ilości wytwarzane w organizmie nie są wystarczające, dlatego też powinien być dostarczany do organizmu z zewnętrznych źródeł. Pokarm jest drugim, oprócz syntezy *de novo*, źródłem tego związku. LA jest doskonałym antyutleniaczem, który może przeciwdziałać konsekwencjom starzenia się organizmu. Stosowany jest głównie w leczeniu neuropatii cukrzycowej, oraz w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego, stwardnienia rozsianego oraz choroby Alzheimerera. Ważną zaletą kwasu  $\alpha$ -liponowego jest regeneracja zredukowanych postaci innych przeciwutleniaczy, takich jak witaminy C i E oraz glutation. Dzięki temu wzmacnia się ich terapeutyczne działanie, jednocześnie istotnie zmniejszając skutki stresu oksydacyjnego wywołanego nadprodukcją wolnych rodników.

Tak wszechstronne działanie i występowanie skłania do opracowywania metod jego oznaczania. Źródła literaturowe wskazują, że w postaci wolnej LA jest oznaczany głównie za pomocą chromatografii cieczowej, a także gazowej, elektroforezy kapilarnej, technikami spektrofotometrycznymi oraz elektrochemicznymi. W komórkach roślinnych i zwierzęcych występuje on głównie w postaci lipolizyny. Oznaczanie tak związanego LA wymaga zastosowania odpowiedniego sposobu przygotowania próbki. Jest to zazwyczaj hydroliza kwasowa, zasadowa lub enzymatyczna.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] V.E. Kagan, A. Shvedova, E. Serbinova, S. Khan, C. Swanson, R. Powell, L. Packer, *Biochem. Pharmacol.*, 1992, **44**, 1637.
- [2] C.V. Krishnan, M. Garnett, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2011, **6**, 3607.
- [3] F. Navari-Izzo, M.F. Quartacci, C. Sgherri, *Plant Physiol. Biochem.*, 2002, **40**, 463.
- [4] A. Bilaska, L. Włodek, *Pharm. Rep.*, 2005, **27**, 570.
- [5] A. Gorąca, H. Huk-Kolega, A. Piechota, P. Kleniewska, E. Ciejka, B. Skibska, *Pharm. Rep.*, 2011, **63**, 849.
- [6] A. Bilaska, *Kwas liponowy. Udział w metabolizmie oraz możliwości farmakologicznego działania* [w:] *Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*, red. L. Włodek, Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003.
- [7] D. Malińska, K. Winiarska, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2005, **59**, 535.
- [8] A. Azimi, M. Khalili, *Lipoic Acid Function and Its Safety in Multiple Sclerosis* [w:] *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion*, R.R. Watson, V.R. Preedy (Red.), Elsevier, 2016.
- [9] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/864#section=2D-Structure>, [dostęp 11.11.2017].
- [10] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00166>, [dostęp 11.11.2017].
- [11] Karta charakterystyki substancji chemicznej, zgodnie z Rozporządzeniem WE 1907/2006, Aktualizacja 11.01.2015, Sigma Aldrich.
- [12] [www.chemicalize.com](http://www.chemicalize.com), [dostęp 11.11.2017].



- [13] M. Marin, C. Lete, B.N. Manolescu, S. Lupu, J. Electroanal. Chem., 2014, **729**, 128.
- [14] A.I. Durrani, H. Schwartz, W. Schmid, G. Sontag, J. Pharm. Biomed. Anal., 2007, **45**, 694.
- [15] H.Y. Aboul-Enein, H. Hoenen, J. Liq. Chromatogr. Related Technol., 2004, **27**, 3029.
- [16] M. Koike, K. Koike, *Lipoic acid* [w:] Metabolism of Sulfur Compounds, D.M. Greenberg (Red.), Academic Press, Londyn, 1975.
- [17] K. Izutsu, *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2002.
- [18] L. Packer, E.H. Witt, H.J. Tritschler, Free Rad. Biol. Med., 1995, **19**, 227.
- [19] G. Bartosz, *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2006.
- [20] R. Moreau, W.-J. Zhang, T.M. Hagen, *Cellular Effects of Lipoic Acid and Its Role in Aging* [w:] *Handbook of Antioxidants*, E. Cadenas, L. Packer (Red.), Marcel Dekker, 2002.
- [21] H. Moini, L. Packer, N.-E.L. Saris, Toxicol. Appl. Pharmacol., 2002, **182**, 84.
- [22] J. Bustamante, J.K. Lodge, L. Marcocci, H.J. Tritschler, L. Packer, B.H. Rihn, Free Rad. Biol. Med., 1998, **24**, 1023.
- [23] J.K. Lodge, L. Packer, *Natural Sources of Lipoic Acid in Plant and Animal Tissues* [w:] *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, L. Packer, M. Hiramatsu, T. Yoshikawa (Red.), ACADEMIC PRESS, San Diego 1999.
- [24] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Chem-Biol. Interact., 2006, **160**, 1.
- [25] G. Atmaca, Yonsei Med. J., 2004, **45**, 776.
- [26] O. Tirosh, S. Roy, L. Packer, *Lipoic acid: Cellular Metabolism, Antioxidant Activity, and Clinical Relevance* [w:] *Handbook of Antioxidants*, E. Cadenas, L. Packer (Red.), Marcel Dekker, 2002.
- [27] L. Patrick, Altern. Med. Rev., 2002, **7**, 456.
- [28] L. Patrick, Altern. Med. Rev., 2003, **8**, 106.
- [29] H. Gurer, H. Ozgunes, S. Oztezcan, N. Ercal. Free Rad. Biol. Med., 1999, **27**, 75.
- [30] P. Ou, H.J. Tritschler, S.P. Wolff, Biochem. Pharmacol., 1995, **50**, 123.
- [31] B. Carrier, T.C. Rideout, J. Hum. Nutr. Food Sci., 2013, **1**, 1002.
- [32] M. Jasik, N. Chojnowska, T. Stasiak, E. Wójcik-Sosnowska, W. Karnafel, Med. Metab., 2013, **4**, 75.
- [33] B. Skibska, A. Goraca, Oxid. Med. Cell. Longev., 2015, doi: 10.1155/2015/313021
- [34] V. Yadav, G. Marracci, J. Lovera, W. Woodward, K. Bogardus, W. Marquardt, L. Shinto, C. Morris, D. Bourdette, Mult. Scler., 2005, **11**, 159.
- [35] V. Yadav, G. Marracci, D.N. Bourdette, US Neurology, 2008, **4**, 12.
- [36] A. Maczurek, K. Hager, M. Kenklies, M. Sharman, R. Martins, J. Engel, D.A. Carlson, G. Munch, Adv. Drug Delivery Rev., 2008, **60**, 1463.
- [37] L. Patrick, Altern. Med. Rev., 2000, **5**, 290.
- [38] H.C. Lukaski, *Lipoic Acid* [w:] *Nutritional ergogenic aids*, red. I. Wolinsky, J.A. Driskell, CRC Press LLC, 2004.
- [39] K. Petersen Shay, R.F. Moreau, E.J. Smith, A. R Smith, T.M. Hagen, Biochim. Biophys. Acta, 2009, **1790**, 1149.
- [40] L. Rochette, S. Ghibu, A. Muresan, C. Vergely, Can. J. Physiol. Pharmacol., 2015, **93**, 1021.
- [41] U. Çakataş, Med. Hypotheses, 2006, **66**, 110.
- [42] J.J. Thiele, F. Dreher, L. Packer, *Antioxidant Defense Systems in Skin* [w:] *Cosmeceuticals. Drugs vs. Cosmetics*, P. Elsner, H.I. Maibach (Red.), Marcel Dekker, Inc., 2000.
- [43] G. Sontag, H. Scharz, *Analytical Methods for Determination of  $\alpha$ -Lipoic Acid, Dihydrolipoic Acid, and Lipoyllysine in Dietary Supplements and Foodstuffs* [w:] *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*, L.M.L. Nollet, F. Toldrá (Red.), CRC Press LLC, 2012.
- [44] A.I. Durrani, H. Schwartz, M. Nagl, G. Sontag, Food Chem., 2010, **120**, 1143.
- [45] S. Satoh, M. Shindoh, J.Z. Min, T. Toyooka, T. Fukushima, S. Inagaki, Anal. Chim. Acta, 2008, **618**, 210.
- [46] A. Mattulat, W. Baltes, Z. Labensm. Unters. Forsch., 1992, **194**, 326.

- [47] E. Wołyniec, J. Karpińska, S. Łosiewska, M. Turkowicz, J. Klimczuk, A. Kojło, *Talanta*, 2012, **96**, 223.
- [48] L.N. dos Santos Pereira, I.S. da Silva, T.P. Araújo, A.A. Tanaka, L. Angnes, *Talanta*, 2016, **154**, 249.
- [49] B. Rajkumar, T. Bhavya, A.A. Kumar, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2014, **6**, 307.
- [50] S. Satoh, T. Toyooka, T. Fukushima, S. Inagaki, *J. Chromatogr. B*, 2007, **854**, 109.
- [51] W. Siangproh, P. Rattanasat, O. Chailapakul, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 7699.
- [52] H. Kataoka, *J. Chromatogr. B*, 1998, **717**, 247.
- [53] H. Kataoka, N. Hirabayashi, M. Makita, *J. Chromatogr. B*, 1993, **615**, 197.
- [54] D.J. Patel, V.C. Jain, H.A. Raj, *Research and Reviews: J. Pharm. Anal.*, 2014, **3**, 28.
- [55] P.P. Goti, J.J. Savsani, P.B. Patel, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2012, **4**, 519.
- [56] M.I. Walash, A.M. El-Brashy, M.S. Metwally, A.A. Abdelal, *Bull. Korean Chem. Sci.*, 2004, **25**, 517.
- [57] M.I. Walash, M.E.-S. Metwally, A.M. El-Brashy, A.A. Abdelal, *Il Farmaco*, 2003, **58**, 1325.
- [58] Z. Korićanac, M. Čakar, S. Tanasković, T. Jovanović, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2007, **72**, 29.
- [59] A. Sitton, M.G. Schmid, G. Gübitz, H.Y. Aboul-Enein, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2004, **61**, 119.
- [60] H. Li, Y. Kong, L. Chang, Z. Feng, N. Chang, J. Liu, J. Long, *Chromatographia*, 2014, **77**, 145.
- [61] G.K. Ziyatdinova, G.K. Budnikov, V.I. Pogorel'tsev, *J. Anal. Chem.*, 2004, **59**, 288.
- [62] W. Ciesielski, M. Skowron, *Chem. Anal.*, 2005, **50**, 47.
- [63] O. Corduneanu, M. Garnett, A.M. Oliveira Brett, *Anal. Lett.*, 2007, **40**, 1763.
- [64] D.M. Stanković, E. Mehmeti, K. Kalcher, *Anal. Sci.*, 2016, **32**, 847.
- [65] M.P. Miranda, R. del Rio, M.A. del Valle, M. Faundez, F. Armijo, *J. Electroanal. Chem.*, 2012, **668**, 1.
- [66] A.P.M.M. Ferreira, L.N. dos Santos Pereira, I.S. da Silva, S.M.C.N. Tanaka, A.A. Tanaka, L. Angnes, *Electroanalysis*, 2014, **26**, 2138.
- [67] N. Ravanić, S. Filipić, K. Nikolić, G. Popović, I. Vovk, B. Simonovska, D. Agbaba, *Acta Chromatogr.* 2009, **21**, 433.
- [68] A. Mrass, E. Bald, *Wiad. Chem.* 2011, **55**, 933.
- [69] J.C.H. Shih, S.C. Steinsberger, *Anal. Biochem.*, 1981, **116**, 65.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 listopada 2017