

UNIwersYTET W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ CHEMII



Monika Joanna Turkowicz

**ZASTOSOWANIE REAKCJI DERYWATYZACJI
DO OPRACOWANIA NOWYCH PROCEDUR OZNACZANIA
KWASU LIPONOWEGO**

ROZPRAWA DOKTORSKA

wykonana w Pracowni Chemii Środowiska
Katedry Chemii Analitycznej i Nieorganicznej
Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku

Promotor: prof. dr hab. Joanna Karpińska

Promotor pomocniczy: dr Marta Hryniewicka

Białystok, 2020

Serdecznie podziękowania

Pani prof. dr hab. Joannie Karpińskiej

oraz Pani dr Marcie Hryniewickiej

*za pomoc naukową, cierpliwość oraz za opiekę promotorską
i miłą atmosferę w czasie realizowania niniejszej pracy.*

Praca była częściowo finansowana przez Narodowe Centrum Nauki
w ramach realizacji projektu badawczego Nr 2011/01/N/NZ9/01768
w latach 2011-2016

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	7
SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	9
I. WSTĘP.....	13
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA	15
1. Charakterystyka kwasu liponowego.....	15
1.1. Właściwości fizyczne kwasu liponowego	15
1.2. Właściwości chemiczne kwasu liponowego	16
1.3. Funkcje biologiczne, metabolizm, wykorzystanie kwasu liponowego.....	19
1.4. Otrzymywanie kwasu liponowego - procesy naturalne i syntetyczne	29
1.5. Występowanie kwasu liponowego w produktach spożywczych.....	34
2. Analityka kwasu liponowego.....	36
2.1. Ekstrakcja/wydzielanie kwasu liponowego z materiału biologicznego oraz z produktów spożywczych.....	36
2.2. Przykłady metod wydzielania kwasu liponowego	39
2.3. Reakcja derywatywacji.....	42
2.4. Derywatywacja kwasu liponowego.....	43
2.4.1. Derywatywacja grupy karboksylowej kwasu liponowego.....	43
2.4.2. Derywatywacja grup tiolowych kwasu liponowego.....	45
2.5. Techniki analityczne wykorzystywane do rozdzielania kwasu liponowego	47
2.5.1. Wysokosprawna chromatografia ciekłowa (HPLC)	47
2.5.2. Chromatografia gazowa (GC).....	50
2.5.3. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC).....	51
2.5.4. Elektroforeza kapilarna (CE)	52
2.5.5. Metody elektrochemiczne.....	52
2.5.6. Spektrofotometria.....	54
III. CEL I ZAKRES PRACY.....	57
IV. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	59
1. APARATURA, ODCZYNNIKI I MATERIAŁ BADAWCZY	59
1.1. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....	59
1.2. Odczynniki chemiczne	60
1.3. Roztwory	62
1.4. Materiał badawczy	64
1.4.1. Procedura przygotowania próbek do badań.....	65

2.	SPOSÓB WYZNACZANIA PARAMETRÓW STATYSTYCZNYCH	67
3.	STOSOWANE PROCEDURY	69
3.1.	Redukcja wiązania disiarczkowego	69
3.2.	Derywatywacja grupy tiolowej 2,4-dibromoacetofenonem (DBAF)	69
3.3.	Derywatywacja grupy tiolowej tetrafluoroboranem 2-chloro- 1-metylocholinowym (CMQT)	69
3.4.	Derywatywacja grupy tiolowej jodkiem 2-chloro- 1-metylopirydynowym (CMPI)	70
3.5.	Derywatywacja grupy karboksylowej alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA), procedura preparatywna	70
4.	WYNIKI I DYSKUSJA	71
4.1.	Identyfikacja otrzymanych produktów reakcji derywatywacji	71
4.2.	Badanie przebiegu reakcji derywatywacji grupy karboksylowej	80
4.2.1.	Optymalizacja i walidacja opracowanych procedur oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) jako odczynnika derywatywującego	80
4.2.2.	Przydatność analityczna nowo opracowanych metod	87
4.3.	Badanie przebiegu reakcji derywatywacji grup tiolowych	89
4.3.1.	Optymalizacja reakcji redukcji wiązania disiarczkowego S-S	89
4.3.2.	Optymalizacja procesu derywatywacji grup tiolowych	90
4.3.3.	Porównanie warunków przebiegu reakcji derywatywacji opracowanych metod	95
4.3.4.	Walidacja opracowanych procedur spektrofotometrycznego oznaczania zawartości kwasu liponowego po zastosowaniu derywatywacji grup tiolowych	97
4.3.5.	Przydatność analityczna nowo opracowanych metod	99
4.3.6.	Optymalizacja parametrów chromatograficznego oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem derywatywacji grup tiolowych	100
4.3.7.	Walidacja opracowanych procedur oznaczania zawartości kwasu liponowego z zastosowaniem derywatywacji grup tiolowych metodą HPLC-UV	104
4.3.8.	Przydatność analityczna nowo opracowanych metod	106
V.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	113
VI.	STRESZCZENIE	117
VII.	SPIS RYSUNKÓW	119
VIII.	SPIS TABEL	121
IX.	LITERATURA	123
X.	OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE	139
XI.	SUPLEMENT	143

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

Skrót/akronim	Termin polski	Termin angielski
ABD-F	4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol	4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol
APMB	2-(4-aminofenylo)-6-metylobenzotiazol	2-(4-aminophenyl)-6-methylbenzothiazole
ATP	adenozynotryfosforan	adenosine triphosphate
BNLA	kwasy bisnorliponowe	bisnorlipoic acid
Br-AMN	2-bromoacetylo-6-metoksynaftalen	2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene
Br-DMC	4-bromometylo-6,7-dimetoksykumaryna	4-bromomethyl-6,7-dimethoxykumaryna
BSTFA	N,O-bis-(trimetylosililo)trifluoroacetamid	N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
BzCl	chlorek benzylu	benzyl chloride
CDCl₃	deuterowany chloroform	deuterated chloroform
CEAD	wielokanałowy detektor kulometryczny	culometric electrode array detector
CE	elektroforeza kapilarna	capillary electrophoresis
CL	detekcja chemiluminescencji	chemiluminescence detection
CMPI	jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy	2-chloro-1-methylpyridinium iodide
CMQT	tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy	2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate
CoA	koenzym A	coenzyme A
DAD	detektor diodowy	diode array detector
DBAF	2,4'-dibromoacetofenon	2,4'-dibromoacetophenone
DHLA	kwasy dihydroliponowe	dihydrolipoic acid
DIBAL-H	wodorek diizobutyloglinu	diisobutylaluminum hydride solution
DPV	różnicowa woltamperometria pulsowa	differential pulse voltammetry
EC, ECD	detekcja elektrochemiczna	electrochemical detection
ECF	chloromrówczan etylu	ethyl chloroformate

Skrót/akronim	Termin polski	Termin angielski
EDAC	1-etylo-3-(3- dimetyloaminopropylo) karbodiimina	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
ESI	jonizacja przez elektrorozpylanie	electrospray ionization
FI, FIA	analiza przepływowa	flow analysis
FID	detekcja płomieniowo - jonizacyjna	flame ionization detection
FL	detekcja fluorymetryczna	fluorimetric detection
FPD	detektor płomieniowo – fotometryczny	flame photometric detector
GC	chromatografia gazowa	gas chromatography
GCE	elektroda ze szklanego węgla	glassy carbon electrode
GR	reduktaza glutationowa	glutathione reductase
HOBN	kwask 3-hydroksybisnorliponowy	3-hydroxybisnorlipoic acid
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa	high performance liquid chromatography
LA	kwask liponowy	lipoic acid
LAM	lipoamid	lipoamid
LC	chromatografia cieczowa	liquid chromatography
lipa	syntaza liponianowa	liponate synthase
lipB i lplA	ligaza	ligase
LLE	ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz	liquid-liquid extraction
LLys	lipolizyna	lipoyllysine
LOD	granica wykrywalności	limit of detection
LOQ	granica oznaczalności	limit of quantification
MALDI-TOF-MS	spektrometria mas z laserową desorpcją wspomaganą matrycą sprzężoną z analizatorem czasu przelotu jonów	matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
mBBr	monobromobiman	monobromobiman
4-MBA	alkohol 4-metoksybenzylowy	4-methoxybenzyl alcohol
MeOD	deuterowany metanol	deuterated methanol
MS	spektrometria mas	mass spectrometry

Skrót/akronim	Termin polski	Termin angielski
MS/MS	tandemowy spektrometr mas	tandem mass spectrometer
MSTFA	N-metylo- N-(trimetylosililo)trifluoroacetamid	N-methyl- N- (trimethylsilyl) trifluoroacetamide
MTBE	eter tert-butylo-metylowy	tert-butyl methyl ether
MTBSTFA	N-tert-butylo-dimetylo- sililo-trifluoroacetamid	N-tert-butylodimetylo- sililo-trifluoroacetamid
PIAA	N-(1-pyreno)jodoacetamid	N- (1-pyreno) iodoacetamide
PMIA	N-(1-pyrenometylo) jodoacetamid	N- (1-pyrenometylo) iodoacetamide
PTA	alkilowanie międzyfazowe	phase transfer alkylation
RP-HPLC	chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz	liquid chromatography reversed phase
RFT	reaktywne formy tlenu	reactive oxygen species
SBD-F	4-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolo- 7-sulfonian amonu	ammonium 4-fluoro- 2,1,3-benzoxadiazole- 7-sulfonate
SPE	ekstrakcja do fazy stałej	solid phase extraction
TLC	chromatografia cienkowarstwowa	thin layer chromatography
TMS	tetrametylosilan	tetramethylsilane
TMSIM	N-trimetylosililoimidazol	N-trimethylsilylimidazole
TMCS	trimetylochlorosilan	trimethylchlorosilane
TNLA	kwasy tetranorliponowe	tetranorlipoic acid
TR	reduktaza tioredoksynowa	thioredoxin reductase
UV	detekcja w ultrafiolecie	ultraviolet detection
UV-VIS	detekcja spektrofotometryczna	spectrophotometric detection

I. WSTĘP

Postęp technologiczny, poprawa jakości życia jakie miały miejsce w ciągu kilkudziesięciu ostatnich lat nie rozwiązały problemów zdrowotnych, z którymi borykają się społeczeństwa państw rozwijających. Mówi się o epidemii takich chorób jak miażdżyca, nadciśnienie tętnicze, astma oskrzelowa, cukrzyca oraz choroby uszkadzające układ nerwowy (choroba Parkinsona i Alzheimera) (1–4). Jako jedną z przyczyn wskazuje się ekspozycję organizmów na działanie wolnych rodników.

Wolne rodniki, bardzo reaktywne cząsteczki lub atomy powstające w wyniku wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych (wytwarzania energii, przenoszenia elektronów i protonów itp.), wskazywane są jako jedna z przyczyn powstawania chorób zwyrodnieniowych (5–10), a nawet nowotworów (9,11). W prawidłowo funkcjonującym organizmie istnieje równowaga pomiędzy utleniaczami a przeciwutleniaczami. Brak stanu równowagi pomiędzy działaniem wolnych rodników, a biologiczną zdolnością do wygaszania i eliminacji skutków ich działania, zwany jest stresem oksydacyjnym. Najczęściej powstaje w wyniku życia w ciągłym napięciu nerwowym, w zanieczyszczonym środowisku, nadmiernej ekspozycji na promienie słoneczne, palenia papierosów, kontaktu z metalami ciężkimi (ołowiem, kadmem i rtęcią) oraz z tlenkami azotu (poprzez żywność czy spaliny samochodowe), zażywania niektórych leków (antykonceptyjnych, antydepresyjnych, sterydów oraz antykoagulantów). Nie bez znaczenia jest także wiek, gdyż z upływem lat naturalne mechanizmy regulacyjne organizmu ulegają znacznemu osłabieniu (2,3,8,9,12). Istotną przyczyną stresu oksydacyjnego jest również niewłaściwa dieta (13,14).

Barierę ochronną żywych organizmów przed nadmierną ekspozycją na wolne rodniki tworzy skomplikowany system enzymatycznych procesów utleniania i redukcji, w które zaangażowane są związki o właściwościach redoks zwane przeciwutleniaczami. Do przeciwutleniaczy należą: witamina A, E i C, karotenoidy (na przykład β -karoten, zeaksantyna), ksantofile, polifenole i bioflawonoidy, niektóre składniki mineralne, np.: jony manganu (II) i selenu (II), a także związki, takie jak koenzym Q₁₀, glutation czy kwas liponowy (2,7,15–17).

Spośród wyżej wymienionych endo- i egzogennych antyoksydantów na szczególną uwagę zasługuje kwas liponowy (LA). Pełni on szereg ważnych funkcji w organizmach żywych. Charakteryzuje się dużym potencjałem antyoksydacyjnym, zdolnością do

chelatacja jonów metali, oraz regeneracji innych antyoksydantów. Wielokierunkowe działanie kwasu liponowego daje możliwość jego szerokiego zastosowania w medycynie. Kwas alfa-liponowy występuje naturalnie w organizmach roślinnych, zwierzęcych a także w organizmie człowieka (18). Jednak produkowany jest w niewielkich ilościach. Uzupelnienie niedoborów tego składnika może nastąpić poprzez suplementację lub właściwe zbilansowanie diety. W związku z powyższym olbrzymie znaczenie ma poznanie zawartości kwasu liponowego (LA) w spożywanych produktach.

Potrzeba oznaczania kwasu liponowego (LA) wymaga opracowania nowych, prostych, czułych i selektywnych procedur. We współczesnej analizie chemicznej dużym zainteresowaniem cieszą się metody chromatograficzne sprzężone z detekcją spektrofotometryczną i spektrofluorymetryczną. Stosowanie tego rodzaju detekcji pociąga za sobą konieczność derywatywacji cząsteczki kwasu liponowego (LA). Dlatego też podstawowym celem podjętych w niniejszej rozprawie badań było opracowanie nowych procedur oznaczania kwasu liponowego (LA) z zastosowaniem odczynników derywatywujących.

Badania prowadzono z wykorzystaniem technik chromatografii gazowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Niniejsza rozprawa doktorska składa się z dwóch zasadniczych części: literaturowej oraz eksperymentalnej. W części literaturowej przedstawiono krótką charakterystykę kwasu liponowego (LA). Omówiono jego właściwości, funkcje biologiczne, otrzymywanie i występowanie w produktach spożywczych. Dokonano również przeglądu dotychczas opracowanych metod oznaczania kwasu liponowego (LA). W części eksperymentalnej pracy przedstawiono wyniki badań własnych, które dotyczą opracowania nowych metod chromatograficznych z wykorzystaniem reakcji derywatywacji. Budowę otrzymanych w wyniku procesu derywatywacji struktur potwierdzono poprzez zastosowanie analizy spektralnej ^1H NMR, IR, UV oraz MS.

Opracowane metody wykorzystano do oznaczenia kwasu liponowego w próbkach rzeczywistych (produktach spożywczych, suplementach diety). Szczególną uwagę poświęcono ocenie analitycznej przydatności opracowanych procedur.

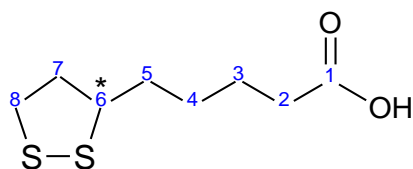
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Charakterystyka kwasu liponowego

1.1. Właściwości fizyczne kwasu liponowego

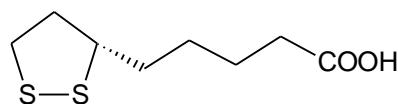
Kwas liponowy ($C_8H_{14}O_2S_2$) jest to krystaliczna jasnożółta substancja o masie molowej 206,33 g/mol (19). Wyróżnia się charakterystycznym zapachem (5,20).

Obecność krótkiego łańcucha alifatycznego oraz polarnej grupy karboksylowej powoduje, że kwas liponowy wykazuje ograniczoną rozpuszczalność w wodzie. Lepiej rozpuszcza się w tłuszczach oraz rozpuszczalnikach organicznych np. w benzenie, metanolu, octanie etylu, eterze etylowym (5,21–23). Temperatura wrzenia kwasu liponowego mieści się w zakresie 160-165°C, natomiast topnienia w zakresie 47,5-62°C (2,11,24). Kwas liponowy jako ciało stałe jest stabilny, po podgrzaniu powyżej temperatury topnienia łatwo ulega polaryzacji (2,24). Ze względu na obecność asymetrycznego węgla w pozycji (6) kwas liponowy wykazuje aktywność optyczną.

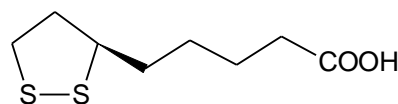


Rys. 1. Kwas liponowy z zaznaczonym asymetrycznym atomem węgla (*) (11).

Naturalny LA występuje jako prawoskrętny enancjomer R, natomiast w wyniku syntezy chemicznej otrzymuje się racemat (18,25). Izomery R i S posiadają skręcalność właściwą wynoszącą +109° i -107° (11,26,27).



enancjomer S

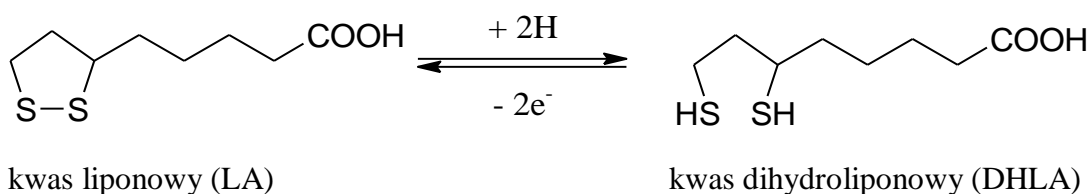


enancjomer R

Rys. 2. Izomery S i R kwasu liponowego (28).

1.2. Właściwości chemiczne kwasu liponowego

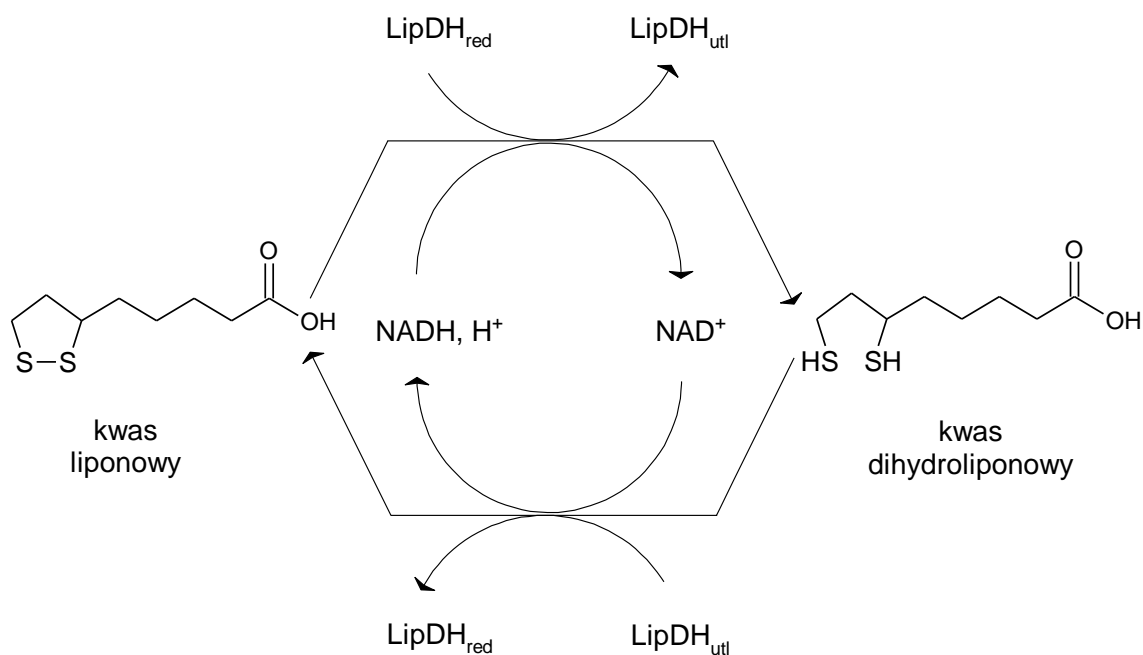
Pod względem chemicznym, kwas liponowy (kwas 6,8-ditiooktanowy lub tiooktanowy) jest ośmiowęglowym kwasem tłuszczowym o nasyconych wiązaniach. Szósty i ósmy atom węgla połączony jest z atomem siarki, dzięki czemu powstaje pierścień ditiolowy. Pierścień ten może ulec rozszczepieniu, tworząc kwas dihydroliponowy (DHLA) (16,29,30). W wyniku otwarcia pierścienia powstają dwie grupy -SH (przy atomach C(6) i C(8)), co przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Reakcja redukcji kwasu liponowego (31,32).

Kwas liponowy wykazuje właściwości słabego kwasu. Jego moc jest porównywalna z mocą kwasu octowego ($pK_a=4,75$) (2). Stała dysocjacji kwasu liponowego wynosi $pK_a=4,76 \div 5,3$ (33,34), natomiast kwasu dihydroliponowego $pK_a=4,85 \div 4,91$ (33,35). Kwas liponowy i dihydroliponowy tworzą parę redoks, której standardowy potencjał liponian/dihydroliponian mieści się w przedziale $-0,24 \div -0,32V$ (10,11,21,26,36–40). Obie formy występują w organizmach żywych w równowadze. W stanie równowagi w komórkach występuje głównie w formie utlenionej jako kwas liponowy (LA) (90%) oraz około 10% w formie zredukowanej jako kwas dihydroliponowy (DHLA) (41,42).

Równowaga LA-DHLA jest utrzymywana w wyniku działania układu dehydrogenazy lipoamidowej sprzężonej z parą $NADH-NAD^+$. Kwas liponowy w obecności $NADH$ jest redukowany przez dehydrogenazę do DHLA. Kwas liponowy może być redukowany także przez reduktazę glutationową (GR) i reduktazę tioredoksynową (TR), co przedstawiono na rysunku 4 (43). Procesy te są odwracalne.

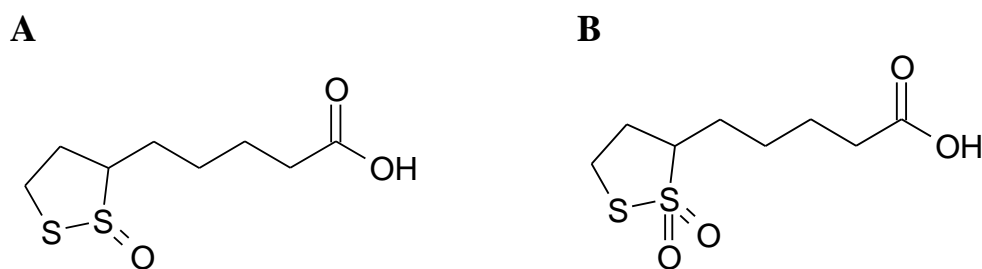


Rys. 4. Schemat reakcji redoks LA/DHLA (43).

Kwas liponowy może być zredukowany nie tylko do kwasu dihydroliponowego. W wyniku reakcji metabolicznych mogą powstawać: kwas 3-hydroksybisorliponowy (HOBN), kwas bisnorliponowy (BNLA), kwas tetranorliponowy (TNLA), kwas 3-hydroksyliponowy oraz lipoamid (LAM) (44). Kwas liponowy występuje także pod postacią lipoilolizyny (LLys) (13,22,45).

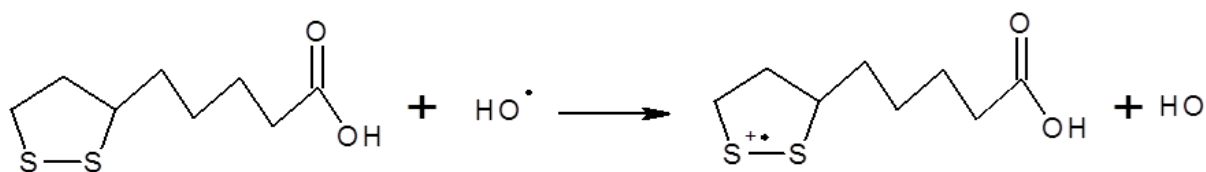
Warto zaznaczyć, że literatura dotycząca analizy kwasu liponowego często opisuje oznaczanie omawianego związku jako lipolizyny lub liponianu. Wynika to z faktu, że kwas liponowy w produktach roślinnych i zwierzęcych znajduje się w postaci lipoilolizyny, ϵ -aminolizyny. Lipolizyna jest hydrolizowana przez lipoamidazę w efekcie czego uwalniany jest liponian. Łączy się on z innymi aminokwasami poprzez wiązania peptydowe. Pod tą postacią staje się składnikiem enzymów. Ugrupowanie lipoilowe tworzy się pod wpływem adenylozotryfosforanu (ATP) w komórkach pełniąc ważne biologiczne funkcje (1,13,26). Metabolity kwasu liponowego w większości wydalone są z moczem (21,22,46).

Kwas liponowy ulega reakcjom utlenienia za pomocą tlenu, w wyniku których z jednej z grup tiolowych powstaje grupa tiosulfonowa. Dalsze utlenianie kwasu liponowego prowadzi do powstania grupy tiosulfonowej (11), co przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Kwas liponowy z grupą tiosulfinową (A) oraz tiosulfonową (B).

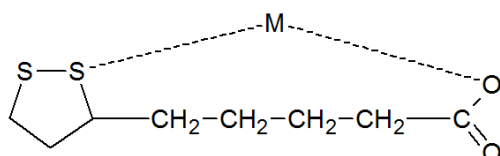
Liczne badania wykazały, że kwas liponowy jest zdolny do zmiatania rodników HO^\cdot , NO^\cdot , NO_2^\cdot , tlenu singletowego $^1\text{O}_2$, kwasu chlorowego (I) HClO oraz nadtlenuazotanu (III) ONOO^- , nie reaguje natomiast z anionorodnikiem ponadtlenkowym $\text{O}^{\cdot-}_2$ oraz z nadtleniem diwodoru H_2O_2 (3,5,6,21,25,37,47–51). Reakcję „zmiatania” rodnika hydroksylogowego HO^\cdot przez kwas liponowy przedstawiono na rysunku 6. Powstały w wyniku reakcji kationorodnik jest znacznie mniej reaktywny niż reaktywne formy tlenu i nie stwarza już tak dużego zagrożenia dla komórek, a dodatkowo jest łatwo przekształcany ponownie w kwas liponowy (2). Uważa się, że kwas liponowy może neutralizować także rodniki peroksyłowe ROO^\cdot . Skutecznym zmiataczem rodników peroksyłowych jest natomiast kwas dihydroliponowy (52). Neutralizuje on również $\text{O}^{\cdot-}_2$, HOCl , ONOO^- oraz prawdopodobnie OH^\cdot (11,16,51,53). Okazał się jednak nieskuteczny w unieszkodliwianiu singletowych form tlenu oraz – podobnie jak kwas liponowy – nadtlenu diwodoru.



Rys. 6. Reakcja dezaktywacji rodnika hydroksylogowego (16).

Kwas: liponowy oraz dihydroliponowy posiadają także zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych. Zjawisko to powoduje dezaktywację metali. Kwas liponowy tworzy stabilne kompleksy z kationami Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} oraz Cu^{2+} . Kwas dihydroliponowy z kolei chelatuje kationy: Pb^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} oraz Fe^{3+} (kompleks z Fe^{3+} jest stabilniejszy niż z Fe^{2+}) (2,5,7,21,32,36,39,54–57).

Dodatkowo, metabolity kwasu liponowego takie jak kwas tetranorliponowy i bisnorliponowy tworzą kompleksy z Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} i Mn^{2+} . Są one stabilniejsze niż kompleksy tych jonów z liponianem (58–60). W tworzenie nierozpuszczalnych kompleksów zaangażowana jest grupa karboksylowa, skutkiem czego przy krótszym łańcuchu alifatycznym pierścienie dodatkowo stabilizują powstały kompleks. Schemat kompleksu kwasu liponowego z jonem metalu przedstawiono na rysunku 7 (16).



Rys. 7. Schemat kompleksu kwasu liponowego z jonem metalu (M) (16).

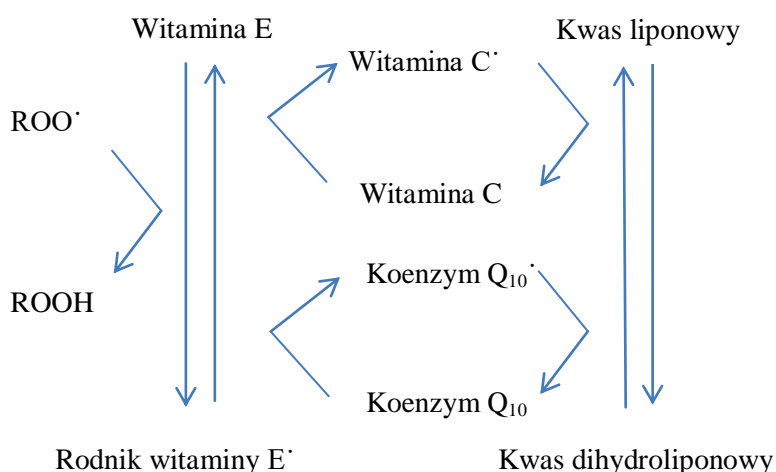
Badania dowodzą, że kwas liponowy oraz kwas dihydroliponowy zapobiegają następstwom stresu oksydacyjnego wywołanego jonami metali przejściowych. Wykazano, że liponian zapobiega katalizowanemu przez Cu^{2+} utlenianiu kwasu askorbinowego (61). W przypadku działania Cd^{2+} w hepatocytach zarówno kwas dihydroliponowy jak i kwas liponowy (w mniejszym stopniu) zapobiegają uszkodzeniom wywoływanym przez ten jon (62). Kwas dihydroliponowy wykazuje większą zdolność do chelatowania jonów metali niż kwas liponowy. Oddziaływania jonów metali z kwasem dihydroliponowym mogą być przyczyną działania prooksydacyjnego. Zjawisko takie obserwowano w układach doświadczalnych w obecności jonów Fe^{3+} (2,63) i Cu^{2+} (2,53,64).

1.3. Funkcje biologiczne, metabolizm, wykorzystanie kwasu liponowego

Kwas liponowy w układach biologicznych występuje w trzech formach: kowalencyjnie związany poprzez wiązanie peptydowe z resztą ϵ -aminową lizyny, luźno związany wiązaniami wodorowymi z kompleksami białkowymi oraz w postaci wolnego kwasu liponowego. Rola kwasu liponowego w organizmach żywych jest głównie związana z jego właściwościami redoks. Ze względu na obecność grupy karboksylowej oraz łańcucha węglowego kwas liponowy wykazuje powinowactwo do polarnych jak i niepolarnych rozpuszczalników (11,22,24,65–67). Ta cecha powoduje, że staje się on

uniwersalnym antyoksydantem działającym niezależnie od środowiska reakcji. Jest obecny w osoczu, cytoplazmie oraz w błonach komórkowych (7,44,53,68,69). Właściwość ta sprawia, że jest łącznikiem pomiędzy antyoksydantami lipofilowymi (np.: α -tokoferolem, koenzymem Q_{10}) i hydrofilowymi (np.: glutationem i witaminą C) (70). Potrafi skutecznie regenerować i przedłużać efektywność działania innych przeciwutleniaczy. Synergistyczne oddziaływanie na inne antyoksydanty oraz działanie antyutleniające, spowodowało, że kwas liponowy zyskał miano „uniwersalnego przeciwutleniacza” (20,26,34,37,50,52,65,68,71) i „antyutleniacza antyutleniaczy” (38,44,72,73). Każda substancja antyutleniająca, która neutralizuje wolny rodnik sama ulega utlenieniu, co powoduje, że aż do momentu redukcji staje się niezdolna do dalszego zmiatania wolnych rodników. Kwas liponowy a także kwas dihydroliponowy pozwalają odzyskać tym substancjom potencjał antyoksydacyjny. Obie substancje mają zdolność do redukcji utlenionych form m.in. witaminy C, pośrednio witaminy E (2,12,31,36,37,41,45,53,57,65,70,71,74–77), glutationu czy utlenionych form koenzymu Q_{10} (2,52,65,68,71,74,75,77–80), co przedstawia rysunek 8. Niektóre badania sugerują, że może brać udział w naprawie utlenionych białek (67,81).

Sumarycznie wpływa to na zmniejszenie stresu oksydacyjnego organizmu zwiększając tym samym skuteczność bariery antyoksydacyjnej. Umożliwia również regenerację uszkodzonych struktur DNA, lipidów i protein poprzez dodanie elektronu do kluczowych koenzymów (6,12,36,56,67,75,81).

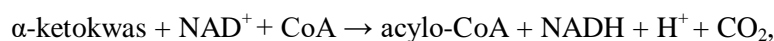


Rys. 8. Wzajemne oddziaływanie kwasu liponowego i dihydroliponowego z innymi antyoksydantami (2,16,82–84).

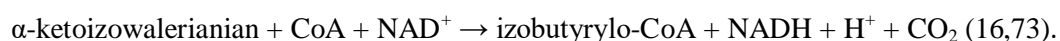
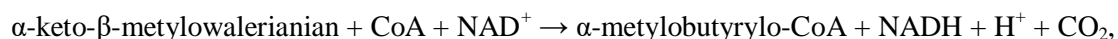
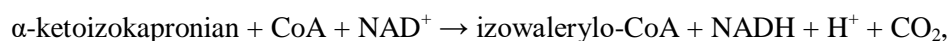
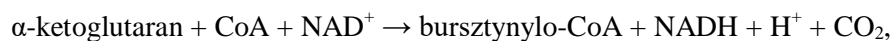
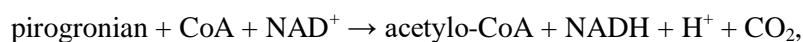
Kwas liponowy pełni rolę koenzymu w oksydacyjnej dekarboksylacji kwasu pirogronowego. Produkt tej reakcji w kompleksach dehydrogenazy pirogronianowej i dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej, przenosi grupę acylową na koenzym A (CoA), umożliwiając powstanie acetylo- lub bursztynylo-CoA. Jednocześnie pośredniczy w przekazywaniu uzyskanej w procesie utleniania energii, która jest wykorzystywana do redukcji jonu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD^+). W wyniku związania, a następnie oddania grupy acylowej, kwas liponowy ulega redukcji do kwasu dihydroliponowego (DHLA), co pośrednio umożliwia odtworzenie NADH z NAD^+ (15,16,30,39,85,86).

Kwas liponowy, bierze udział w metabolizmie takich aminokwasów jak: leucyna, walina i izoleucyna (11,19,28). Pełni rolę kofaktora w wieloenzymatycznym kompleksie dehydrogenazy α -ketokwasów o rozgałęzionych łańcuchach. Podobnie jak podczas oksydacyjnej dekarboksylacji pirogronianu oraz 2-oksoglutaranu, przenosi na CoA grupę acylową powstałą z dekarboksylacji α -ketokwasu danego aminokwasu (11,18,22,25,48,79,80,86–93).

Mechanizm tych reakcji przedstawiono poniżej:



czyli:



Kwas liponowy stymuluje sekrecję insuliny poprzez bezpośredni wpływ na komórki β trzustki, jednocześnie wpływa na metabolizm tych komórek oraz samych komórek mięśniowych. Jest najważniejszym składnikiem enzymatycznego kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, dzięki czemu usprawnia metabolizm energetyczny komórek trzustkowych, przez co ułatwia produkcję insuliny oraz ich regenerację. W tkance mięśniowej, wzrost aktywności dehydrogenazy pirogronianowej pod wpływem kwasu liponowego prowadzi do wzrostu poziomu metabolitów glukozy, zwiększających przepuszczalność błony komórkowej komórek mięśniowych dla aminokwasów jak i kreatyny. Ponieważ dehydrogenaza pirogronianowa jest jednym z najważniejszych kompleksów enzymatycznych metabolizmu tlenowego, kwas liponowy wpływa na wydolność tlenową (16,94).

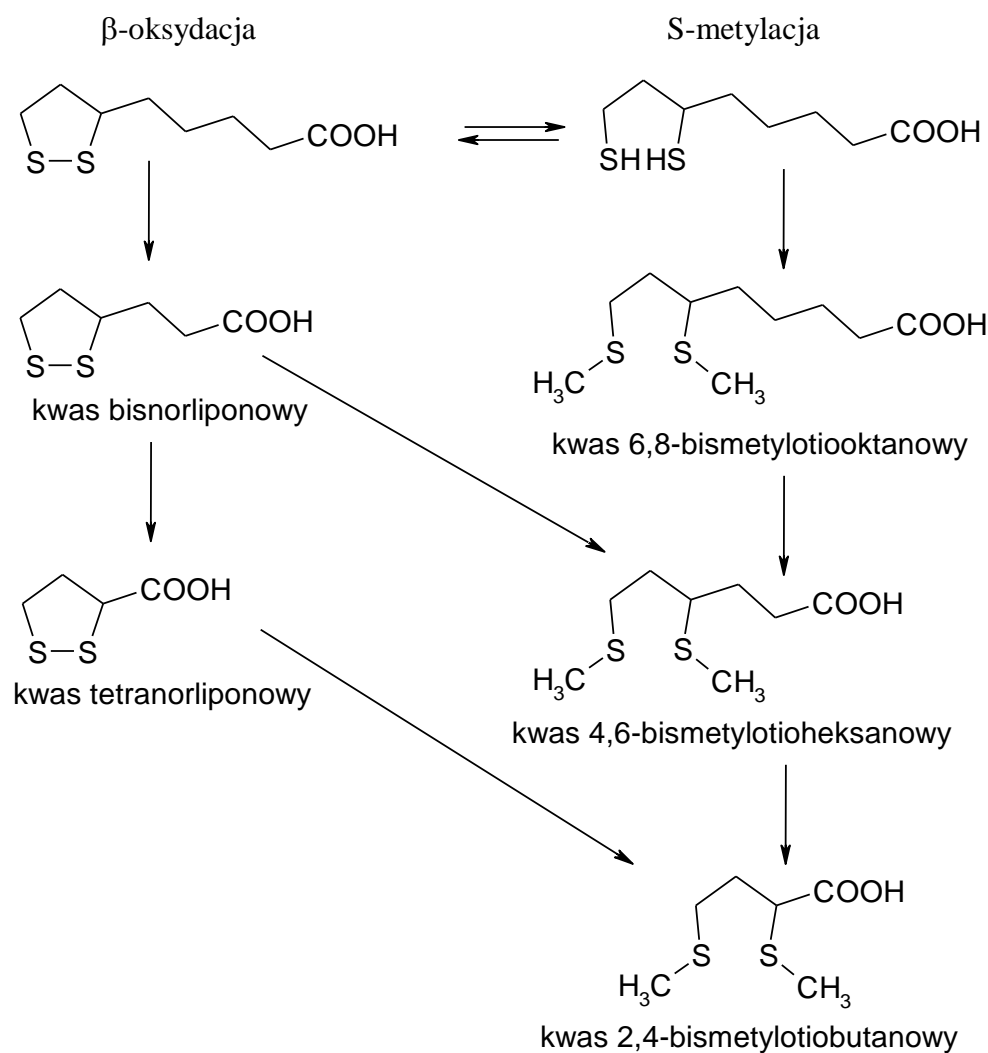
W pracy Bilskiej i wsp. (5) uwagę zwrócono, że kwas liponowy wpływa na szybkość reakcji chemicznych, generujących reaktywne formy tlenu. Wyniki badań potwierdzają, iż kwas liponowy jest inhibitorem kompetycyjnym, wytwarzającej anionorodnik ponadtlenkowy, oksydazy ksantynowej, enzymu katalizującego głównie utlenianie hipoksantyny do ksantyny i ksantyny do kwasu moczowego.

Pomimo, że kwas liponowy jest syntetyzowany w organizmie człowieka z kwasów tłuszczowych i cysteiny, otrzymane tą drogą ilości tego związku są niewielkie (18,26). Głównym źródłem kwasu liponowego jest dieta oraz suplementy. Oszacowano, iż suplementy zawierające kwas liponowy w ilości od 200 do 600 mg mogą skutecznie dostarczyć nawet do 1000 razy więcej tego składnika, niż można byłoby pozyskać z większości diet (95,96). Kwas liponowy jest szybko wchłaniany po podaniu doustnym, w dawce 600 mg (1,94,97–102). Prowadzono również badania po podaniu doustnym wyższych jednorazowych dawek w wielkości 800 mg (103) oraz 1200 mg (104). Dzięki łatwości wchłaniania z przewodu pokarmowego oraz zdolności do przekraczania bariery krew – mózg, kwas liponowy może swobodnie być transportowany do różnych tkanek organizmu (16,22,59,62,63,73,74,105,106).

Niezależnie od źródła (dieta lub preparaty farmaceutyczne) kwas liponowy jest przekształcany w kwas dihydroliponowy i metabolizowany w wątrobie, a następnie wydalany z organizmu poprzez nerki (22,80,107). Za pobieranie kwasu liponowego z jelit odpowiedzialne jest białko transbłonowe, wytwarzane przez gen SLC5A6 (108).

Ogólna biodostępność absorbowanej substancji waha się pomiędzy 20 a 40% (96). Stopień, w jakim organizm jest w stanie przyswoić kwas liponowy zależy od źródła, z jakiego on pochodzi, ale także od jego odmiany enancjomerycznej (56,82,94,109). Syntetyczny kwas liponowy to mieszanina racemiczna enancjomerów R i S. Ulega szybkiemu wchłanianiu, maksymalne stężenie w osoczu zarejestrowano w czasie od 0,5 do 1 godziny (110,111). Zaobserwowano wyższe stężenia dla enancjomeru R (40-50%) niż w przypadku enancjomeru S (16,43,95,109,112–115). W związku z powyższym stwierdzono, że enancjomer R jest bardziej odpowiedni do doustnej suplementacji, jednak obecność formy S może zapobiegać polimeryzacji związku, a tym samym zwiększać jego biodostępność (28). Jest on także bardzo szybko usuwany z organizmu, gdyż jego okres półtrwania w osoczu wynosi zaledwie 30 minut (33,46,112,113,115,116). Wynika to przede wszystkim z intensywnego procesu metabolicznego zachodzącego w wątrobie (78). Kwas liponowy ulega głównie reakcjom β -oksydacji, utlenianiu ugrupowań

metylosulfonowych jak również S-metylacji. W wyniku β -oksydacji, która zachodzi w obszarze łańcucha węglowego bez naruszenia pierścienia ditiolowego powstają kwasy: bisnorliponowy i tetranorliponowy. 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 (16,28,94). Produkty β -oksydacji oraz S-metylacji przedstawiono na rysunku 9.



Rys. 9. Produkty β -oksydacji oraz S-metylacji kwasu liponowego oraz kwasu dihydroliponowego (16,117).

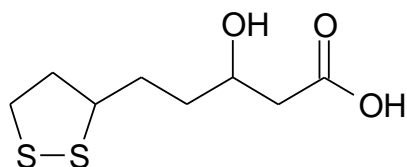
Badania nad farmakokinetyką kwasu alfa-liponowego u zdrowych ochotników (118) potwierdziły, iż na szybkość przyswajania suplementowanego kwasu liponowego ma wpływ stosowana dieta (108,114). Zaleca się przyjmowanie kwasu liponowego 30 minut przed lub 2 godziny po posiłku (16,36).

W badaniach dotyczących przyswajania kwasu liponowego używano zazwyczaj racematu tego związku. W eksperymentach przeprowadzanych na zwierzętach, stwierdzono, że szczury przyswajają 65-80% podanego im doustnie kwasu liponowego (16). U ludzi ze względu na niemożność stosowania technik izotopowych, stopień przyswajania kwasu liponowego określano na podstawie pomiaru stężenia liponianu we krwi po jego doustnym podaniu. Dlatego uzyskane parametry mogą być zaniżone z powodu intensywnego metabolizowania przez wątrobę.

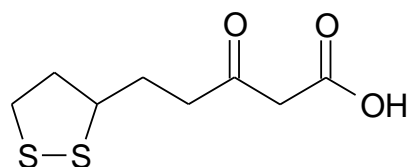
U myszy i szczurów spożyty kwas liponowy może być także modyfikowany przez sprzężenie z glicyną, jednak tego zjawiska nie zaobserwowano u ludzi (119).

Większość produktów metabolizmu kwasu liponowego wydalana jest z moczem (94,113). U myszy, szczurów i psów przez pierwsze 24h po podaniu znakowanego radioaktywnie związku stwierdzono 55-72% kwasu liponowego w moczu, w zależności od gatunku zwierzęcia. W tym samym czasie w kale wydalone zostało 11-17% znakowanego kwasu liponowego. Stwierdzono, że po 168 godzinach ulega wydaleniu wraz z moczem 93% znakowanego kwasu liponowego (113).

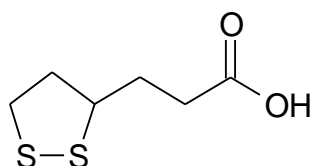
Na rysunku 10 przedstawiono przykładowe produkty przemian metabolicznych kwasu liponowego.



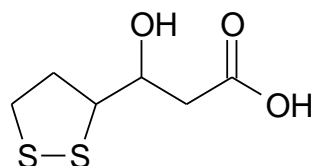
kwas 3-hydroksyliponowy



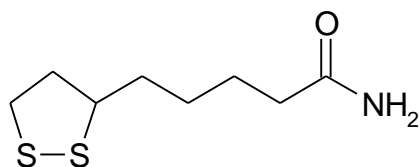
kwas 3-ketoliponowy



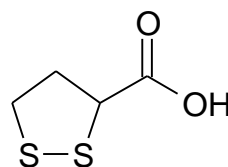
kwas bisnorliponowy (BNLA)



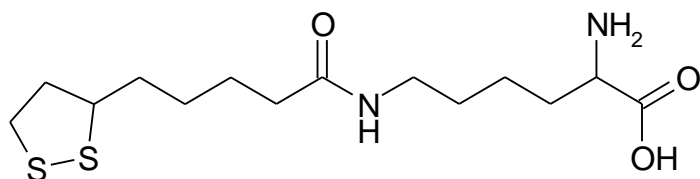
kwas 3-hydroksybisnorliponowy (HOBN)



lipoamid (LAM)



kwas tetranorliponowy (TNLA)



lipoilolizyna (LLys)

Rys. 10. Przykładowe pochodne kwasu liponowego (21,44,120).

Kwas liponowy znalazł szerokie zastosowanie w kosmetologii i farmakologii. Jako mała cząsteczka wnika z łatwością w głąb skóry, gdzie ulega przekształceniu do formy zredukowanej DHLA (37,121). Wykazuje on działanie nawilżające, ujędrniające, przeciwzapalne oraz łagodzi podrażnienia skóry wywołane promieniowaniem UV (112). Wygładza i ujędrnia skórę, przeciwdziała powstawaniu zmarszczek (2,44). W preparatach kosmetycznych stosuje się kwas liponowy w stężeniach od 3% do 5% (44). Występuje w kremach, maseczkach, balsamach, tonikach oraz preparatach do pielęgnacji skóry, a także w płynach do kąpieli.

Kwas liponowy również znalazł zastosowanie w produkcji suplementów diety. Produkty te w ostatnich latach w Polsce cieszą się rosnącą popularnością. Wg raportu Zespołu ds. Suplementów Diety działającego w ramach Rady Sanitarno – Epidemiologicznej z dn. 13 stycznia 2016 r., zawartość kwasu liponowego

w suplementach diety w poszczególnych formach nie powinna przekraczać 600 mg racematu (R,S) i 300 mg dla formy aktywnej enancjomeru (R).

Kwas liponowy cieszy się dużym zainteresowaniem sportowców, ponieważ zwiększa wrażliwość tkanki mięśniowej na insulinę, nasila transport glukozy do włókien mięśniowych oraz zwiększa mięśniowe zasoby tego cukru w postaci glikogenu. Związek ten chętnie jest stosowany przez sportowców siłowych i kulturystów oraz osoby uprawiające fitness lub trenujące rekreacyjnie. Jeśli celem ćwiczeń jest poprawa muskulatury, to spożywanie białek w większych ilościach pomaga w szybkim uzyskaniu efektów. Przyjmowanie dużych ilości białek prowadzi do aktywizacji insuliny, jednak z czasem, organizm ludzki stopniowo uodparnia się na jej działanie. Kwas liponowy ponownie uwrażliwia organizm na insulinę, zwiększa również ilość glikogenu w mięśniach i wątrobie. Dlatego też, kulturyści doceniają podobne do insuliny działanie kwasu liponowego ułatwiające wnikanie kreatyny i aminokwasów do komórek mięśniowych. Dzięki temu proces budowy masy mięśniowej przebiega szybciej. Kwas liponowy pomaga również w przyswajaniu składników odżywczych. Kulturyści wykorzystują go jako osłonę w trakcie tzw. cykli z zastosowaniem sterydów anabolicznych. Kwas liponowy wzmacnia ponadto układ krążenia i pracę serca sportowca poprawiając jego kondycję psychofizyczną. Jest on także pożądanym składnikiem ergogenicznym, czyli doprowadzającym do wzrostu sprawności, szybszej regeneracji oraz lepszej wydajności całego organizmu (2,49,80,90). Wiele firm produkujących odżywki zawierające kwas liponowy sugeruje przyjmowanie kwasu liponowego razem z kreatyną, ponieważ ułatwia jej wchłanianie i nasila procesy anaboliczne. Może też stanowić dodatek suplementacyjny podczas redukcji nadmiaru tkanki tłuszczowej (2,122,123).

Właściwości kompleksotwórcze kwasu liponowego są wykorzystywane w detoksykacji zatruc jonami rtęci, arsenu, kadmu, ołowiu i innymi metalami ciężkimi (13,52,55,65,124,125). Zaobserwowano, że pod wpływem kwasu liponowego następuje spowolnienie wchłaniania jonów arsenu z przewodu pokarmowego, usuwanie zakumulowanej w nerkach rtęci oraz zwiększone wydalanie tego metalu z żółcią (22,55,60,61). Kwas liponowy chroni komórki nerwowe przed peroksydacją lipidów wywołowaną obecnością rtęci oraz metylortęci (16,43,57). Zmniejsza też toksyczne działanie jonów kadmu (II) na wątrobę (22,52), ponadto chroni komórki przed działaniem ołowiu (16,43,126).

Podawany doustnie kwas liponowy jest dobrze przyswajalny. Ze względu na swój amfifilowy charakter z łatwością pokonuje barierę krew-mózg (16,22,57,59,62,74,105).

Udowodniono, że suplementacja kwasem liponowym działa korzystnie w leczeniu schorzeń związanych ze stresem oksydacyjnym np. cukrzycy (zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę, przeciwdziała polineuropatii cukrzycowej), zespołu metabolicznego (korzystnie wpływa w leczeniu chorób serca, miażdżycy, nadwadze i otyłości poprzez pobudzenie metabolizmu) (11,22,37,38,41,48,51,62,66,78,87,127–129). Kwas liponowy znalazł zastosowanie przy leczeniu wielu dysfunkcji narządu wzroku, gdyż chroni przed promieniowaniem UV, przeciwdziała katarakcie, zaćmie i jaskrze (11,13,41,74). Jest wykorzystywany w leczeniu hepatopatii (usprawnia pracę wątroby, przeciwdziała kamicy żółciowej, wspomaga organizm przy zatruciach grzybami) (2,22,30,38,52,65,69,105,130,131). Prawdopodobnie wspomaga leczenie stwardnienia rozsianego (59,78,79,128). Może być pomocny przy leczeniu nadciśnienia tętniczego i chorób autoimmunologicznych (70,132). Powoduje zwiększenie wydatku energetycznego przy jednoczesnym obniżeniu apetytu. Zmniejsza ryzyko nowotworzenia i łagodzi skutki chemioterapii (11,16,92,112,133–137). Wykazano pozytywne działanie kwasu liponowego w hiperbarycznej terapii tlenowej - w leczeniu zaburzeń gojenia się ran (138). Prowadzone są również badania nad wpływem kwasu liponowego na przebieg AIDS, choroby wywoływanej przez wirus HIV, który powoduje uszkodzenia limfocytów T_H. Stwierdzono, że kwas liponowy przerywa replikację tego wirusa przez całkowite blokowanie aktywacji czynnika jądrowego NF- κ B, który jest odpowiedzialny za ekspresję genów wirusa (32,66,73,84,139,140).

Zalecane dawkowanie, w przypadku stosowania kwasu liponowego jako ogólnego środka przeciwutleniającego, wynosi 300-600 mg dziennie (81). Sportowcy przyjmują go w większych ilościach od 600 mg do nawet 1200 mg dziennie, w kilku porcjach.

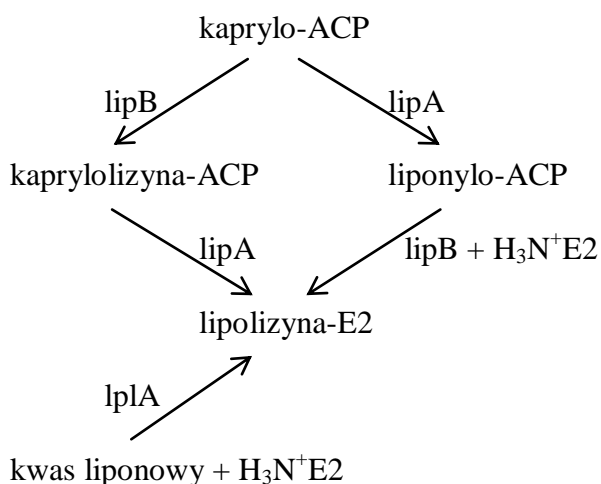
W literaturze dotyczącej badań klinicznych można odnaleźć również informacje dotyczące doustnego podawania kwasu liponowego w ilościach od 300 mg do 1800 mg dziennie (1,22,51,66,70,79,83,93,103,123). Dawki te w większości przypadków były dobrze tolerowane, ale zaobserwowano nieliczne skutki uboczne. Przy dawkach 600 mg/dobę odnotowano objawy alergicznych chorób skóry, a nawet hipoglikemii u chorych na cukrzycę (konsekwencja zwiększenia zużycia glukozy przy wysokich dawkach kwasu liponowego) (66,83,113). Warto też zauważyć, że przeprowadzone badania dowiodły, że dla kotów toksyczne dawki kwasu liponowego są 10 razy niższe, niż dla ludzi, psów czy szczurów (60,63).

Ilość kwasu liponowego oraz dihydroliponowego w organizmie musi być ściśle kontrolowana, gdyż wykazuje on działanie prooksydacyjne. Zdolność do uszkodzania innych związków chemicznych i ich zmiany w wolne rodniki wykazuje kwas dihydroliponowy. Zaobserwowano w niektórych układach doświadczalnych, że w obecności jonów Fe^{3+} i Cu^{2+} może wzrastać stężenie rodnika hydroksylowego (2,63,64). Prawdopodobnie jest to wynikiem redukcji związanego jonu przez kwas dihydroliponowy. Właściwości przeciwutleniające przeważają jednak nad niepożądanym działaniem prooksydacyjnym (2,16). Nadmiar kwasu liponowego w organizmie powoduje spadek potencjału transbłonowego mitochondriów i aktywację tzw. megakanału, przez który swobodnie mogą przepływać nawet wielkocząsteczkowe substancje z cytoplazmy komórki do wnętrza mitochondrium. Może to wywołać reakcję w postaci wyrzutu neurotransmitterów bądź hormonów doprowadzając do wielu zaburzeń (np. fosforylacji oksydacyjnej). W związku z powyższym w organizmie dochodzi do utraty kontroli nad produkcją reaktywnych form tlenu (RFT).

Zredukowana forma kwasu liponowego, kwas dihydroliponowy powoduje redukcję Fe^{3+} do Fe^{2+} . Prowadzi to do zwiększenia stężenia rodników OH^{\cdot} w wyniku reakcji Fentona (21). Kwas liponowy może nasilać działanie doustnych leków hipoglikemizujących oraz insuliny. Może osłabiać działanie cisplatyny. Dodatkowo kwas liponowy przyjmowany w zbyt dużych ilościach może spowodować skutki uboczne, przede wszystkim gastrojelitowe: biegunkę, nudności, bóle brzucha, wymioty, a także alergie skórne (pokrzywka, świąd) (49,52,60,79). Stwierdzono również, że kwas liponowy poprawia pamięć i odwraca wskaźniki procesu oksydacyjnego u bardzo starych myszy, ale zmniejsza długość ich życia (4,141). Przedawkowanie może powodować działania niepożądane, takie jak zmęczenie, lęk i dezorientację (81). Znany jest przypadek samobójczej śmierci w wyniku przedawkowania kwasu liponowego przez 14-letnią dziewczynę, która spożyła, według ustaleń, co najmniej 10 tabletek, każda po 600 mg kwasu liponowego (13,82).

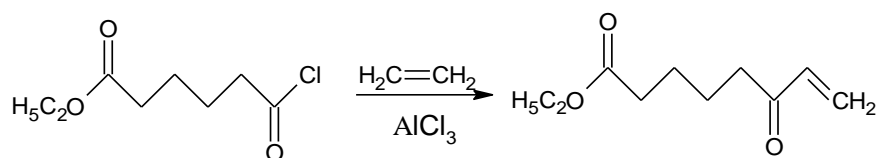
1.4. Otrzymywanie kwasu liponowego - procesy naturalne i syntetyczne

Jak już wcześniej wspomniano kwas liponowy uważany był początkowo za witaminę, później okazało się, że zarówno organizmy roślinne, jak i zwierzęce oraz człowiek, mają możliwość samodzielnej syntezy kwasu liponowego. Organizm ludzki wytwarza ten związek w komórkach wątroby, a dokładniej w mitochondriach (12,106). Mitochondrium jest również miejscem, gdzie kwas liponowy ulega rozkładowi (15,40). Prawdopodobnie syntetyzowany jest z kwasu oktanowego oraz cysteiny (5,25,68,81). Lepiej poznany i dokładniej zbadany został szlak biosyntezy przez komórki *Escherichia coli*, co przedstawiono na rysunku 11. Badania pozwoliły na zidentyfikowanie enzymu katalizującego powstawanie wiązań C-S – syntazę liponianową (lipA) oraz dwie ligazy (lipB oraz lplA). Ligazy te są odpowiedzialne za włączanie liponianu w jego docelowe miejsce w enzymie. Syntaza liponianowa (lipA) jest zdolna do przekształcania kaprylo-ACP w liponylo-ACP. Uważa się, że bezpośrednim źródłem siarki wykorzystywanej w tym procesie jest centrum Fe-S syntazy liponianowej. Nie jest jednak znany mechanizm regeneracji enzymu. Powstały w wyniku reakcji liponylo-ACP jest następnie substratem dla ligazy lipB, która przenosi ugrupowanie liponianowe z ACP na docelową lizynę w białku enzymatycznym. Przeprowadzone badania wykazały, że substratem dla syntazy liponianowej może być również podjednostka E2 dehydrogenazy pirogronianowej (acetylotransferaza dihydroliponianowa) z kaprylanem przyłączonym wcześniej w miejscu liponianu. Może to sugerować, że synteza liponianu odbywa się już na docelowym białku, a w centra aktywne możliwe jest włączenie egzogenego liponianu. W komórkach *Escherichia coli* proces ten katalizowany jest przez lplA (16,86,88,121,140,142).

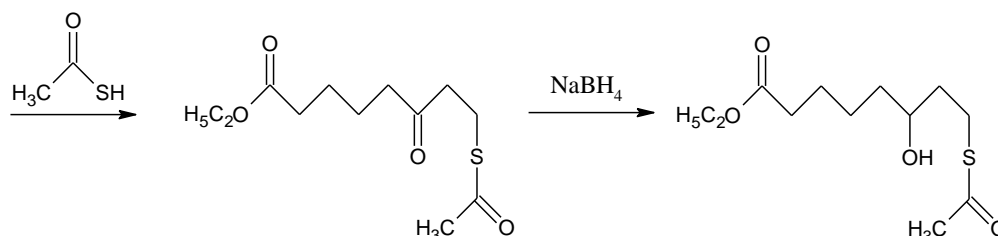


Rys. 11. Szlak biosyntezy kwasu liponowego przez *Escherichia coli* (16,142).

Na skalę przemysłową kwas liponowy otrzymuje się w wyniku syntezy chemicznej. Jedną z najstarszych metod jest reakcja monochlorku adypinianu monoetylu z etylenem pod wpływem chlorku glinu (11). Metoda ta polega na wykorzystaniu pochodnej kwasu adypinowego, która w wyniku reakcji z etenem prowadzonej w nitrobenzenie w obecności bezwodnego AlCl_3 jako katalizatora, tworzy ester etylowy kwasu 6-keto-7-oktenowego. Produkt ten przyłącza kwas tiooctowy, wskutek czego otrzymuje się ester etylowy kwasu 8-tioacetylo-6-ketooktanowego. Następnie, w wyniku działania borowodorkiem sodu, redukcji ulega grupa ketonowa w pozycji C(6) i powstaje ester etylowy kwasu 8-tioacetylo-6-hydroksyoktanowego. Poprzez hydrolizę alkaliczną odblokowaniu ulega grupa hydroksylowa w obrębie ugrupowania karboksylowego oraz grupa tiolowa w pozycji C(8). Produktem przekształcenia jest kwas 6-hydroksy-8-tiooktanowy. Otrzymany produkt ogrzewany z tiomocznikiem tworzy kwas dihydroliponowy. Ostatni etap polega na utlenianiu kwasu dihydroliponowego gazowym tlenem, w obecności chlorku żelaza (III). Metoda ta cechuje się małą wydajnością reakcji, a stosowane odczynniki są drogie i niebezpieczne (11). Schemat otrzymywania kwasu liponowego przedstawiono na rysunku 12.



ester etylowy kwasu 6-keto-7-oktenowego

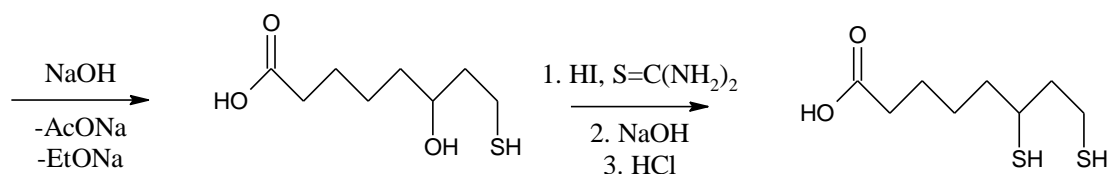


ester etylowy kwasu

8-tioacetylo-6-ketooktanowego

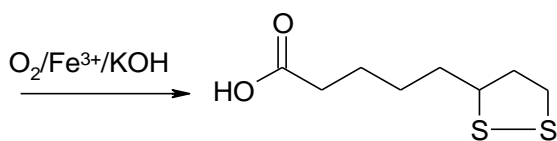
ester etylowy kwasu

8-tioacetylo-6-hydroksyoktanowego



kwas 6-hydroksy-8-tiooktanowy

kwas dihydroliponowy

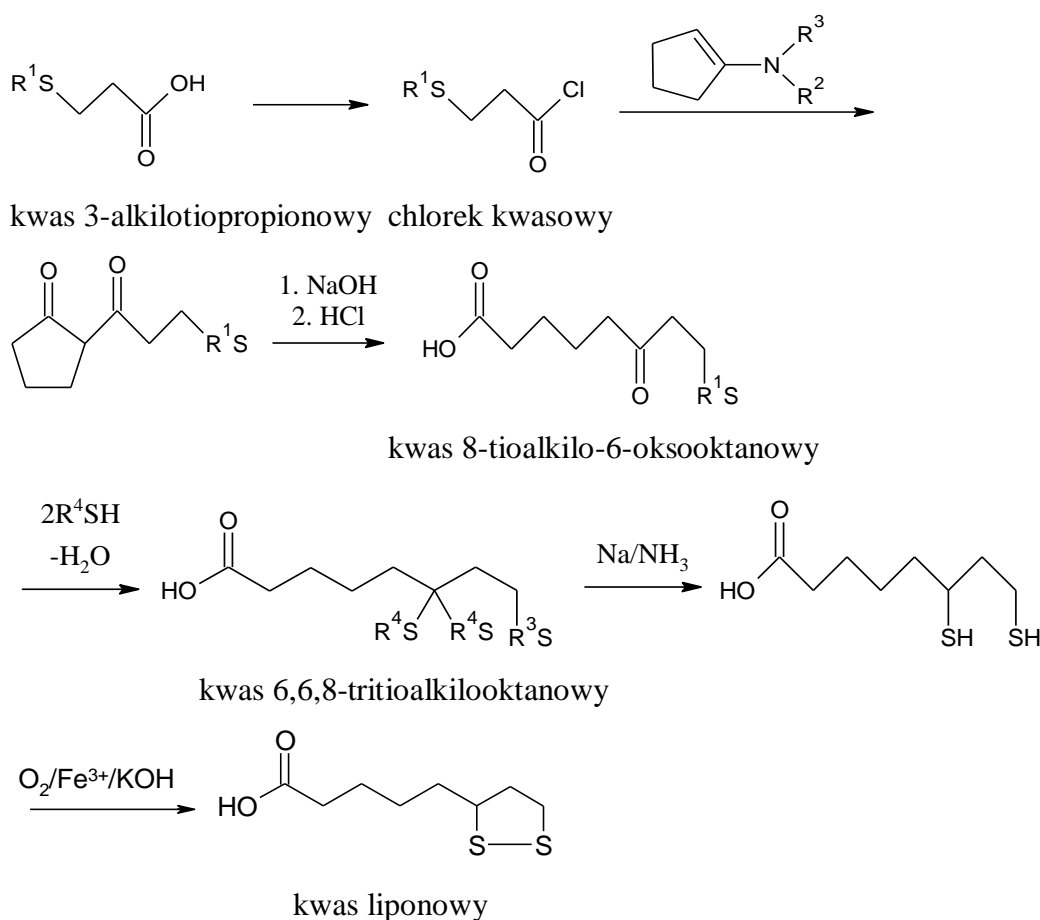


kwas liponowy

Rys. 12. Synteza kwasu liponowego z monochlorku adypinianu monoetylu (11,56).

W 1989 roku opracowano nową procedurę syntezy kwasu liponowego z kwasu 3-alkilotiopropionowego (11). Kwas 3-alkilotiopropionowy w reakcji z chlorkiem tionylu daje chlorek kwasowy. Następnie, w reakcji z enaminą cyklopentanonu powstaje produkt, który w reakcji z wodorotlenkiem sodu w podwyższonej temperaturze i odpowiednim pH przekształca się w kwas 8-tioalkilo-6-oksooktanowy. Kolejno, pod wpływem małowcząsteczkowego merkaptanu tworzy się kwas 6,6,8-tritioalkilooktanowy, który w wyniku działania sodu w obecności ciekłego amoniaku, tworzy kwas dihydroliponowy. Podobnie jak w wyżej opisanej metodzie, ostatnim etapem jest utlenienie chlorkiem żelaza (III) oraz tlenem w środowisku

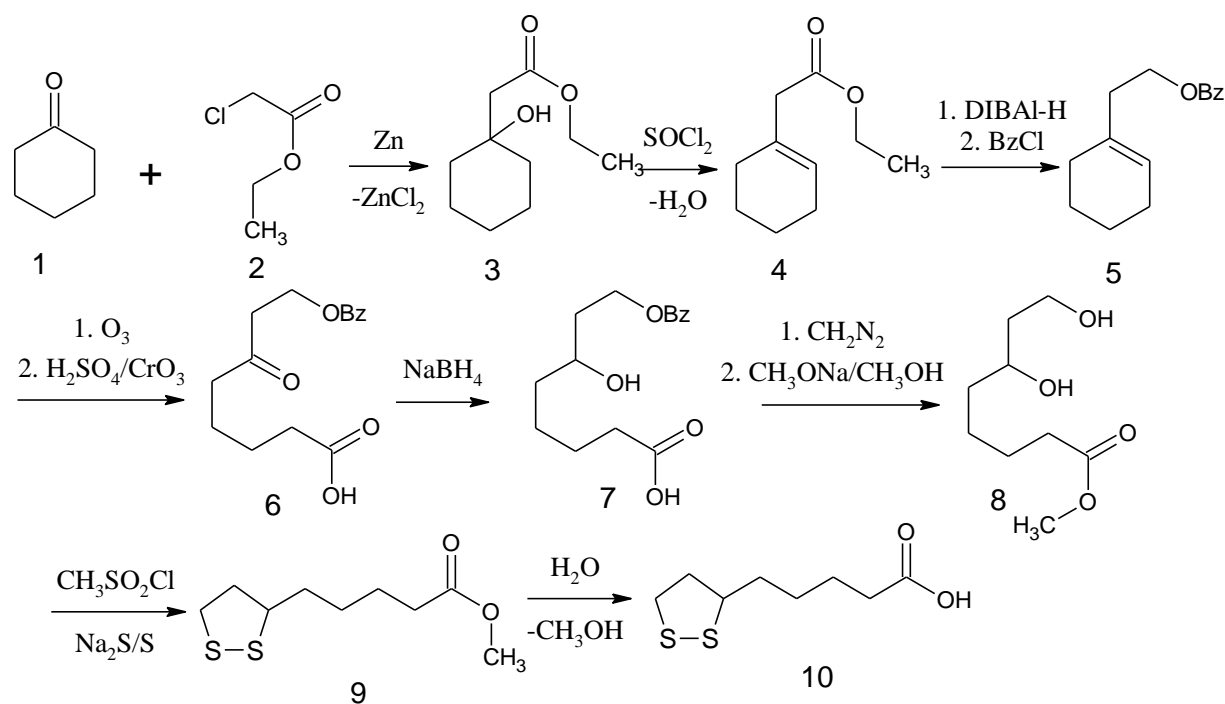
wodorotlenku sodu do kwasu liponowego (11). Schemat opisanej procedury przedstawiono na rysunku 13.



Rys. 13. Synteza kwasu liponowego z kwasu 3-alkilotiopropionowego (11).

Kolejną i jednocześnie najnowszą, opisaną w literaturze, metodą jest synteza oparta na reakcji Reformatskiego. Polega ona na reakcji chlorooctanu etylu z cykloheksanonem pod wpływem cynku. W wyniku reakcji addycji powstaje hydroksyester, który następnie ulega odwodnieniu do cykloheksenylooctanu etylu. Kolejnym etapem jest redukcja grupy estrowej za pomocą DIBAL-H, a utworzona grupa hydroksylowa jest blokowana chlorkiem benzylu (BzCl). Następnie powstały produkt zostaje poddany ozonolizie oraz utlenianiu. Powstałą ketopochodną redukuje się za pomocą $NaBH_4$. Następnie otrzymany hydroksykwas ulega estryfikacji i w wyniku reakcji z metanolanem sodu otrzymuje się dihydroksyester. Dalej zostaje przekształcony w ester metylowy kwasu liponowego, który poddany hydrolizie ulega

przekształceniu do kwasu liponowego (11). Schemat reakcji przedstawiono na rysunku 14.



Rys. 14. Synteza kwasu liponowego z cykloheksanonu (1-cykloheksanon, 2-chlorooctan etylu, 3-hydroksyester, 4-cykloheksenylooctan etylu, 5-benzyl 2-(cykloheks-1-en-1-yl)etyl eter, 6-ketopochodna, 7-hydroksykwas, 8-dihydroksyester, 9-ester metylowy kwasu liponowego, 10-kwas liponowy) (11).

Powyżej opisane metody syntez kwasu liponowego nie są pozbawione wad. Syntezy te odznaczają się małą wydajnością reakcji oraz niskim stopniem czystości otrzymanego związku. W ich wyniku powstaje mieszanina racemiczna izomerów R i S kwasu liponowego. Mieszanina ta była powszechnie stosowana w preparatach medycznych w Europie i Japonii w latach 60-tych XXw. mimo wczesnego odkrycia, że różne formy kwasu liponowego nie są równoważne biologicznie. Postęp w dziedzinie syntezy chiralnej doprowadził do bardziej efektywnych, aczkolwiek nadal skomplikowanych, technologii wytwarzania pojedynczych enancjomerów. Dotychczasowe badania udowadniają, iż lepsze właściwości odżywcze oraz korzystniejsze działanie terapeutyczne wykazuje enancjomer R. Mimo to, obecnie poza izomerem R kwasu liponowego, również mieszanina izomerów R i S jest szeroko dostępna w postaci suplementów diety. Największa ilość kwasu liponowego

produkowana jest w Chinach, w mniejszych ilościach we Włoszech, Niemczech i Japonii.

1.5. Występowanie kwasu liponowego w produktach spożywczych

Dostępne doniesienia literaturowe pokazują dość wybiórcze podejście do oceny zawartości poziomu kwasu liponowego w żywności. Badania wykazały, że głównym źródłem kwasu liponowego są produkty pochodzenia roślinnego (szpinak, brokuły, pomidory, groszek, szparagi). Zawartość tego związku jest rzędu kilku mikrogramów na gram produktu. Nieco mniej tego związku zawierają produkty pochodzenia zwierzęcego (mięso, podroby) oraz drożdże. Prowadzono badania oznaczania zawartości kwasu liponowego w: zielonym grochu, ziemniakach, majonezie (23), mleku, pszenicy (143,144), szpinaku i brokułach (105) oraz wątróbce drobiowej (145). Dużą uwagę skupiono na badaniu zawartości omawianego związku w mięsie wołowym, cielęcym, wieprzowym, owczym (58,105,144), jajach (145,146) oraz w suplementach diety (22,55,70,147,148). Kwas liponowy oznaczano również w mikroorganizmach np. *Escherichia coli B* (44,149), *Bacillus subtilis* (44,150), *Pseudomonas fluorescens* (44), *Lactobacillus* (150), *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Clostridium perfringens* (44,151), *Streptococcus faecalis* (151).

W produktach spożywczych kwas liponowy występuje najczęściej pod postacią ϵ -amidu lizyny. W połączeniu z aminokwasami, poprzez wiązania peptydowe, tworzy reszty lipoilowe. Ugrupowania te występują w mitochondriach i chloroplastach roślin (12,68). Natomiast w przypadku zwierząt, duże ilości tego związku występują w organach wykazujących wysoką aktywność metaboliczną, posiadających dużą liczbę mitochondriów, które dostarczają energię w postaci ATP (nerki, serce oraz wątroba) (43,152). Zawartość kwasu liponowego oraz lipolizyny w żywności pochodzenia zwierzęcego i roślinnego oraz w bakteriach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Źródła kwasu liponowego oraz lipolizyny w wybranych produktach pochodzenia zwierzęcego i roślinnego oraz bakteriach.

Rodzaj próbek	Zawartość kwasu liponowego [μg/g]	Literatura	Rodzaj próbek	Zawartość lipolizyny [mg/g]	Literatura
Ziemniak	1,5-4,20	(16)	Wątroba wołowa	0,86	(105,114)
Majonez	0,5-0,6	(23)	Pomidor	0,56	(105)
Żółtko jaja kurzego	0,05-1,24	(44,105)	Zielony groszek	0,39	(105)
Pszenica	0,1	(44)	Brukselka	0,39	(16)
Wątroba kurczęca	5-10	(145)	Szpinak	3,15-4,31	(16,26,105)
<i>Bacillus subtilis</i> (laseczka sienna)	17,65	(44,150)	Nerki wołowe	2,64-3,67	(26,105,114)
<i>Aerobacter vinelandii</i> (pałeczka jelitowa)	34,96	(152)	Serce wołowe	0,86	(105,114)
<i>Escherichia coli B</i> (pałeczka okrężnicy)	2,3-11,8	(44,149)	Brokuł	0,94	(105)

2. Analityka kwasu liponowego

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się szerszemu poznaniu roli jaką pełni kwas liponowy w organizmie człowieka, a także możliwości wzbogacania w ten związek produktów spożywczych, szczególnie tych o specjalnych zastosowaniach. Dlatego niezbędna staje się wiedza dotycząca jego zawartości w różnych produktach zawierających ten związek (produktach farmaceutycznych, suplementach diety, kosmetykach). Kontrola zawartości omawianego związku w produktach spożywczych jest niezwykle ważna z punktu widzenia oceny prozdrowotnych walorów diety, jak również pozwala na oszacowanie poziomu dziennego pobrania.

Oznaczanie kwasu liponowego jest złożonym zadaniem analitycznym. Można go oznaczać w postaci wolnej lub w formie związanej w lipolizynę. Analiza ilościowa z wykorzystaniem technik separacyjnych wymaga starannego przygotowania próbek: oddzielenia od matrycy, wyeliminowania czynników przeszkadzających, oczyszczenia oraz zagęszczenia.

Kwas liponowy w swojej budowie nie zawiera silnych grup chromoforowych, które absorbowałyby w zakresie UV-VIS ani też fluoroforowych. W związku z tym rzadko wykorzystuje się bezpośrednie oznaczanie spektrofotometryczne (59). Stosowanie detekcji spektrofotometrycznej lub fluorymetrycznej wymaga modyfikacji cząsteczki kwasu liponowego poprzez zastosowanie procesu derywatywacji.

2.1. Ekstrakcja/wydzielanie kwasu liponowego z materiału biologicznego oraz z produktów spożywczych

Przegląd literatury wykazał, że nie ma jednej doskonałej metody wydzielenia kwasu liponowego. Ze względu na różnorodność towarzyszących matryc oraz formę występowania kwasu liponowego do ilościowego oznaczania tego analitu zaproponowano szereg różnych procedur. Dobór kolejnych etapów przygotowania próbek zależy od rodzaju badanej matrycy. Nie bez znaczenia jest również uzyskanie formy zgodnej z końcową techniką analityczną oraz spodziewane stężenie oznaczanego związku.

Podczas analizy materiału biologicznego (krwi, osocza) ważnym jest, aby nie dopuścić do krzepnięcia próbek. Dlatego też w takich przypadkach dodaje się antykoagulanty, np. uwodniony cytrynian trisodowy (59).

Otrzymane ekstrakty powinny być pozbawione substancji przeszkadzających, a także maskujących oznaczane składniki.

Trudności w wydzielaniu poszczególnych składników z próbek może powodować zawartość białka. Dlatego też wielu autorów sugeruje włączenie etapu odbiałczania do procedury przygotowania próbek. W analizie kwasu liponowego do wytrącenia przeszkadzających białek z próbek osocza (72,73,148,149), krwi oraz tkanek szczura (153) stosowano acetonitryl. Inne rozwiązanie zaproponował Inoue i wsp. Po ekstrakcji metanolem próbek suplementu oraz moczu w celu pozbycia się białek zastosowano wirowanie 1000xg, 5 min, 4°C (70).

W przypadku próbek zawierających niewielkie ilości tłuszczu np. środki farmaceutyczne lub niskotłuszczowe środki spożywcze, kwas liponowy ekstrahowano metanolem (70,148) lub 0,5-1,0% roztworem kwasu octowego (146) z wykorzystaniem łązki ultradźwiękowej. Ultradźwięki stosowano również podczas wydzielania kwasu liponowego z próbek krwi szczura oraz tkanek mózgu. Ekstrakcję ciecz-ciecz prowadzono za pomocą eteru tert-butylo-metylowego, octanu etylu oraz dichlorometanu (153).

W przypadku oznaczania całkowitej zawartości kwasu liponowego konieczne jest rozerwanie obecnego w cząsteczce wiązania peptydowego z lizyną. Wówczas niezbędne jest włączenie do procesu przygotowania próbki etapu hydrolizy. Do tego celu najczęściej stosuje się kwas siarkowy (VI), solny (55,58,154,155). Można również zastosować hydrolizę enzymatyczną subtylizyną A i pronazą E w odpowiednich proporcjach (15,156). Hydroliza enzymatyczna pozwala na oznaczenie całkowitego stężenia kwasu liponowego na poziomie 98,9 - 107%. Jednak przy tym należy pamiętać, że hydroliza enzymatyczna jest procesem wymagającym długiego czasu inkubowania, nawet do 24 godzin. Pomimo możliwości utraty części oznaczanego analitu częściej wybierany jest, znacznie szybszy, proces hydrolizy kwasowej. Zastosowanie drastycznych warunków niesie ze sobą niebezpieczeństwo strat w związku z rozkładem analitu.

Hydrolizę kwasową za pomocą 2 mol/l roztworu kwasu siarkowego (VI) zastosowano w procedurze oznaczania kwasu liponowego w próbkach surowego mięsa. Optymalne warunki uzyskano podczas ogrzewania próbki w 120°C w czasie 7 godzin (58). Natomiast kwas chlorowodorowy zastosowano do hydrolizy próbek preparatu multiwitaminowego. Analizowane próbki ogrzewano w temperaturze 60±5°C aż do całkowitego rozpuszczenia badanego preparatu (55).

Wydzielanie kwasu liponowego z próbek biologicznych jest przeprowadzane najczęściej za pomocą technik ekstrakcyjnych tj. ekstrakcji ciecz-ciało stałe, czy ekstrakcji ciecz-ciecz.

Ekstrakcję ciecz-ciało stałe wykorzystano w analizie kwasu liponowego w próbkach biologicznych (osocze, mocz). Do wydzielenia kwasu liponowego z próbek moczu ludzkiego wykorzystano sorbenty fenyłowe w układzie SPE. Jako eluentu używano dichlorometanu (157). Osocze krwi oczyszczano nanosząc próbki na kolumnienki z wypełnieniem oktadecylowym C-18 (72), fenyłowym (59,148,158). Do wymywania analitu stosowano jako eluent: dichlorometan (72,157) oraz metanol (59). We wszystkich przypadkach użyto 1 ml eluentu, a uzyskane wartości odzysku mieściły się w przedziale 82,5 - 97,4%.

Równie popularną techniką rozdziału jest ekstrakcja ciecz-ciecz. Metoda jest bardzo szybka i łatwa. Standardowo przeprowadzana jest w temperaturze pokojowej (159). Korzystny wpływ na przebieg tego procesu może mieć podniesienie temperatury, zastosowanie energii mikrofal czy też ultradźwięków (160). Najbardziej popularnym ekstrahentem używanym do ekstrakcji kwasu liponowego jest dichlorometan. Stosowano go do wydzielania kwasu liponowego m.in. z próbek osocza (72,161,162), krwi (153), moczu (162) oraz tkanek mózgu szczura (153). Eter dietylowy stosowano do ekstrakcji z osocza (163), mięsa (58), preparatu multiwitaminowego (55). Benzenu użyto do izolacji kwasu liponowego z tkanek zwierzęcych (wątroby pobrane od jednotygodniowych piskląt) oraz jaj (145). 1% roztwór lodowatego kwasu octowego w metanolu zastosowano do ekstrakcji z próbek jaj, majonezu, ziemniaków oraz konserwowanego zielonego groszku (23). Mieszanie eter etylowy/etanol (5/10-15, v/v) (55) oraz metanol (70,147,148) wykorzystano do przygotowania próbek suplementów diety. Z próbek krwi i tkanek mózgu szczura kwas liponowy ekstrahowano tert-butyloeterem, octanem etylu (153) lub dichlorometanem (72,153). Etanolu użyto do wydzielania kwasu liponowego z próbek tkanek zwierzęcych, szpinaku oraz brokułu (105). Jako ekstrahenty stosowano również acetonitryl (164), oraz chlorek metylenu (143). Tsai i wsp. do ekstrakcji kwasu liponowego z próbek moczu ludzkiego zaproponowali procedurę dyspersyjnej ekstrakcji cieczowej wykorzystującą chloroform jako rozpuszczalnik ekstrahujący, zaś acetonitryl jako fazę dyspersyjną (117).

Po zakończeniu etapu izolacji analitu, nadmiar rozpuszczalnika jest odparowywany w atmosferze gazu obojętnego. Celem tego etapu jest zapewnienie kompatybilności z kolejnym etapem procesu przygotowania próbki lub techniką oznaczenia końcowego,

a także zwiększenie stężenia analitów w próbce (165). Ekstrakty próbek biologicznych tj: osocza (59,72,162,163,166), moczu (162), krwi (153) oraz środków spożywczych (15), zawierające kwas liponowy odparowywano w łagodnym strumieniu azotu w temperaturze 40°C. Odparowywanie pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze nie przekraczającej 40°C zastosowano do zagęszczenia ekstraktów z próbek mięsa (144).

2.2. Przykłady metod wydzielenia kwasu liponowego

Poniżej przedstawiono kilka literaturowych procedur wydzielenia kwasu liponowego (LA).

Prostą, nie wymagającą drogiego i skomplikowanego sprzętu metodę wydzielenia kwasu liponowego zaproponowano dla próbek ziaren pszenicy (155). Pierwszym etapem analizy była liofilizacja ziarna. Następnie frakcje białkowe ekstrahowano wodą dejonizowaną oraz przeprowadzano hydrolizę kwasową, do której stosowano roztwór kwasu solnego o stężeniu 6 mol/l. Proces ten prowadzono przez 2 godziny. Po hydrolizie próbki ekstrahowano chlorkiem metylenu. Uzyskaną frakcję organiczną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Tak przygotowane próbki analizowano techniką chromatografii cienkowarstwowej (155).

Inną, ciekawą procedurę oznaczania zawartości kwasu liponowego w produktach spożywczych zaproponował Durrani i wsp. (23). Próbki kurzych jaj, majonezu, ziemniaków oraz konserwowanego zielonego groszku o masie 50-150 mg rozpuszczano w 1 ml 0,5% lodowatego kwasu octowego w metanolu. Całość poddawano działaniu ultradźwięków przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę odwirowywano (10000 obr/min w czasie 10 min). Do analizy próbek wykorzystano technikę chromatografii cieczowej z jonizacją metodą elektrorozpylania sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas (ESI-MS/MS).

Metodę wydzielenia kwasu liponowego z próbek mięsa dostępnego komercyjnie, zaproponował A. Mattulat i W. Baltes (58). Próbki o masie 50 - 100 g homogenizowano, a następnie poddawano hydrolizie kwasowej, do której stosowano roztwór kwasu solnego o stężeniu 2 mol/l. Proces ten prowadzono przez 7 godzin w temperaturze 120°C. Hydrolizat ekstrahowano trzema porcjami eteru dietylowego, który w późniejszym etapie ekstrahowano nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu o pH 8,5.

Inny sposób wydziałania kwasu liponowego z próbek mięsa opracował Arshad i wsp. 5 g mięsa homogenizowano z roztworem 50 ml buforu fosforanowego o pH 7,4. Następnie pobrano 200 µl próbki i dodano 2 ml 20% roztworu kwasu metafosforowego (V). Kolejno ekstrahowano z 3 ml heksanu. Następnie próbkę wirowano (1500xg przez 30 minut). Zebrano górną warstwę heksanową. Etap ten powtarzano dwukrotnie. Tak zebraną warstwę organiczną suszono w łagodnym strumieniu azotu. Kwas liponowy oznaczono techniką HPLC z detekcją fluorescencyjną (144).

Oryginalną metodykę wydziałania kwasu liponowego z próbek biologicznych zaproponował Khan i wsp. (72). Do przygotowania próbek ludzkiego osocza autor zaproponował procedurę wydziałania omawianego związku przy pomocy ekstrakcji ciec-ciało stałe. W tym celu zastosowano kolumnienki ekstrakcyjne SPE C-18. Analit wymywano 1 ml dichlorometanu. Rozpuszczalnik organiczny odparowano w delikatnym strumieniu azotu w 40°C, a następnie rozpuszczano w fazie ruchomej. Z tak przygotowanej próbki pobrano 20 µl i analizowano techniką HPLC z detektorem elektrochemicznym (ECD) (72).

Inny sposób przygotowania próbek zaproponował Haj-Yehia. Do badanych próbek osocza i moczu dodawano 0,2 ml roztworu kwasu solnego o stężeniu 2 mol/l oraz 1,25 ml dichlorometanu. W celu pozbycia się białek zastosowano wirowanie (4000 g, 4°C, 5 min). Po odwirowaniu warstwę dichlorometanu oddzielono i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Do suchej pozostałości dodano 0,4 ml chloromrówczanu etylu i 1 ml roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,05 mol/l. Następnie mieszaninę zakwaszono kwasem solnym o stężeniu 2 mol/l do pH 1,0 i ekstrahowano dwukrotnie 3 ml n- heksanu. Ostatnim etapem procedury była analiza próbek techniką HPLC z detekcją fluorymetryczną (162).

Do oznaczania kwasu liponowego techniką elektroforezy kapilarnej, próbki biologiczne (komórki nerkowe) odbiałczano dodając 100 µl acetonitrylu, następnie wirowano przez 15 minut (10000xg). Nadsącze mieszano z roztworem chlorku sodu i buforem boranowym uzyskując końcowe stężenia reagentów: chlorku sodu – 40 mmol/l, buforu boranowego – 3 mmol/l (pH 9,1). Przesączone ekstrakty poddawano analizie (167).

W literaturze można odnaleźć również prostą procedurę wydziałania kwasu liponowego z próbek krwi z zastosowaniem ekstrakcji ciec-ciecz zaproponowaną przez Khan i wsp. Na wstępie próbki odbiałczano dodając 0,5 ml acetonitrylu. Następnie wirowano przez 1 minutę i ekstrahowano stosując 1 ml dichlorometanu. Otrzymaną

mieszaninę wytrząsano i wirowano przez 10 minut (1860xg, 10°C). Warstwę organiczną oddzielono i suszono w strumieniu azotu w 40°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 250 µl fazy ruchomej, ponownie próbki wytrząsano i wirowano. Zebrany ekstrakt analizowano techniką HPLC z detektorem elektrochemicznym (ECD) (166).

Inna metoda została zaproponowana przez A.I. Durrani i wsp. W celu wstępnego przygotowania próbek suplementów diety do oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem techniki HPLC z detekcją kulometryczną (CEAD) oraz techniki HPLC z jonizacją poprzez elektrorozpylanie z tandemowym spektrometrem mas (148), próbki rozpuszczano w 8 ml metanolu i zastosowano ultradźwięki (30 min, temperatura pokojowa). Uzyskane mieszaniny dopełniono wodą destylowaną do objętości 25 ml. Z tak przygotowanych roztworów pobrano 2 ml i odwirowano (10000 obr/min, 10 minut), a następnie nanoszono na kolumnę chromatograficzną.

Do analizy próbek suplementów diety i farmaceutyków wykorzystano również analizę przepływową (22). Próbki o masie równoważnej jednej tabletki przygotowywano poprzez rozpuszczenie w roztworze wodorotlenku sodu o stężeniu $C = 0,1 \text{ mol/l}$. Po przefiltrowaniu roztwór zakwaszano roztworem kwasu siarkowego (VI) o stężeniu $0,1 \text{ mol/l}$, aż do wytrącenia żółtych kryształów kwasu liponowego. Następnie odpowiednią ilość suchego osadu rozpuszczano w buforze o pH 8,5 i oznaczano bezpośrednio techniką przepływowej analizy wstrzykowej z detektorem potencjometrycznym (22).

Inny ciekawy sposób przygotowania próbek suplementów diety zaproponował Kozlov i wsp. (55). Do odpowiedniej ilości próbki dodano 7,5 ml roztworu kwasu solnego o stężeniu 0,05% i wytrząsano na łaźni wodnej w temperaturze $60 \pm 5^\circ\text{C}$. Do ochłodzonej próbki dodano 5 ml eteru etylowego i wytrząsano przez 2 - 3 minuty. Następnie dodano 10 - 15 ml 96% etanolu. Po odwirowaniu próby przesączono przez sącze (grubość porów $0,2 - 0,4 \text{ }\mu\text{m}$) i oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym.

Procedurę wydzielenia kwasu liponowego z suplementów diety zaproponował Inoue i wsp. (70). 0,25 g próbki rozpuszczano w 3 ml metanolu. Całość mieszano, a następnie w celu pozbycia się białek odwirowano (1000xg, 5 min, 4°C). Roztwór z osadu przefiltrowano przez sącze celulozowy ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$). Do końcowego oznaczenia zawartości kwasu liponowego zastosowano technikę chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym.

2.3. Reakcja derywatywacji

Ze względu na budowę oznaczanych cząsteczek, często procedurę analityczną należy uzupełnić o etap modyfikacji właściwości fizykochemicznych analitów. Reakcja taka, zwana jest derywatyzacją chemiczną, w wyniku której powstaje pochodna zawierająca w swojej strukturze ugrupowanie dające sygnał analityczny kompatybilny z detektorem. Modyfikacja chemiczna analitu może być przeprowadzana przed etapem rozdzielania na kolumnie chromatograficznej, lub też bezpośrednio po nim, co pozwala na wyróżnienie derywatywacji przedkolumnowej (ang. *pre-column derivatisation*), pokolumnowej (ang. *post-column derivatisation*) lub na kolumnie (168). Ponieważ reakcja modyfikacji kwasu liponowego trwa kilkanaście minut, z punktu widzenia analityka wygodniejsze jest zastosowanie pierwszego typu derywatywacji. Podejście to nie wymaga stosowania dodatkowej aparatury np. pompy, która umożliwiłaby precyzyjne dozowanie roztworu odczynnika derywatyzującego tuż za kolumną chromatograficzną.

Nie każdy związek może być używany jako odczynnik derywatyzujący. Musi on spełniać szereg warunków. Przede wszystkim powinien szybko i całkowicie reagować z analitem, tworzyć z nim tylko jedną pochodną, która będzie stabilna w warunkach chromatografowania i podobnie jak nowopowstały związek, musi być dobrze rozpuszczalny w fazie ruchomej. Głównym zadaniem derywatywacji jest uzyskanie zmodyfikowanego analitu kompatybilnego z aktualnie stosowaną techniką analityczną. Reakcja derywatywacji, powinna być wolna od zakłóceń spowodowanych przez matrycę, przebiegać w łagodnych warunkach, poprawiając właściwości chromatograficzne pochodnej w stosunku do niezmodyfikowanego analitu (169). Odpowiedź detektora zaś powinna być liniowa przy liniowym wzroście stężeń, a sygnał analityczny odczynnika derywatyzującego nie może interferować z sygnałem analitu.

Odczynniki derywatyzujące można podzielić na kilka grup z uwzględnieniem spektroskopowych właściwości otrzymanych modyfikacji, a także budowy chemicznej odczynnika. Pierwszą grupę stanowią związki, które w wyniku reakcji z analitem tworzą derywaty, o odpowiedniej charakterystyce spektralnej umożliwiające wykorzystanie detekcji w zakresie UV-VIS lub też związki tworzące pochodne fluoryzujące. Stosowanie odczynników derywatyzujących tworzących z analitem fluoryzujące związki pozwala na uzyskanie dużo niższych granic wykrywalności niż w przypadku zastosowania detektora UV- VIS. Jednak ich wadą jest niewielka reaktywność przejawiająca się m.in. małą

szybkością reakcji, niską wydajnością lub brakiem selektywności. Natomiast uwzględnienie budowy chemicznej pozwala na dokonanie podziału według klas związków, gdzie można wyróżnić np. związki zawierające aktywny halogen, disiarczki, enony, aziridyny (pochodne etylenoiminy), chinony, dialdehydy i maleimidy (170).

Estryfikację można zastosować w przypadku oznaczania kwasów karboksylowych lub innych związków zawierających karboksylowe grupy funkcyjne. Proces ten pozwala na wprowadzenie do cząsteczki fragmentów o dużym powinowactwie elektronowym – fluorowanych alkoholi.

Proces acylacji stosuje się dla związków zawierających ugrupowania: –OH, –NH, –SH. Do reakcji stosuje się bezwodniki kwasowe, halogenki oraz imidki acylowe. Do przeprowadzenia reakcji konieczna jest obecność zasad, takich jak: pirydyna, trimetyloamina, tetraetyloamina. W celu poprawy czułości przy zastosowaniu detektora wychwytu elektronów (ECD) stosuje się odczynniki halogenowane.

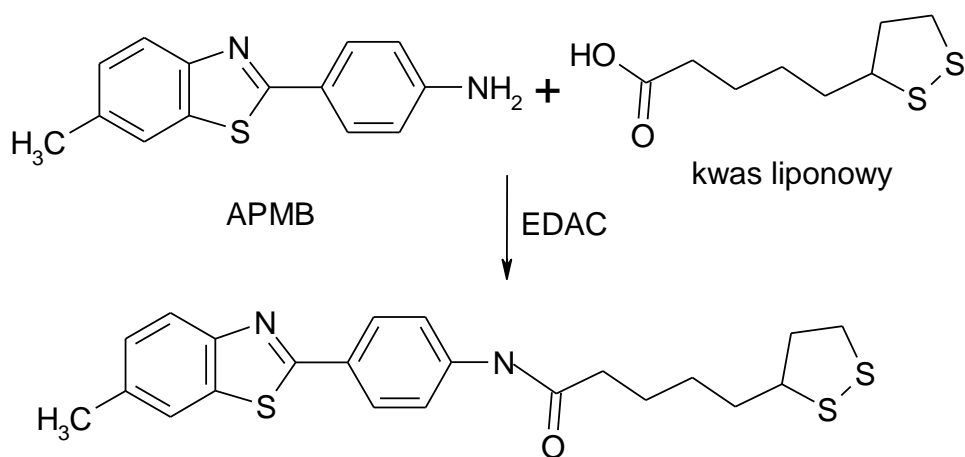
2.4. Derywatywacja kwasu liponowego

Grupę znacznikową do cząsteczki kwasu liponowego można wprowadzić w dwojaki sposób. Poprzez podstawienie w grupie karboksylowej przekształcając kwas liponowy w ester lub amid. Jednak analityczne wykorzystanie reakcji grupy karboksylowej jest trudne, a proces musi być przeprowadzany w środowisku niewodnym, najlepiej w atmosferze gazu obojętnego (152). Bardziej reaktywne są ugrupowania tiolowe. Aby wprowadzić ugrupowanie znacznikowe, należy przeprowadzić reakcję redukcji wiązania disiarczkowego prowadzącą do otwarcia pierścienia.

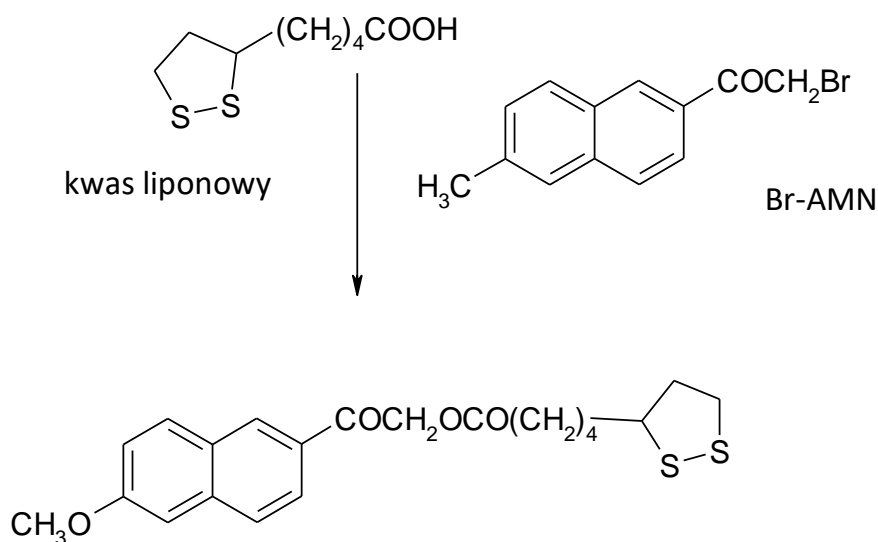
2.4.1. Derywatywacja grupy karboksylowej kwasu liponowego

Występująca w cząsteczce kwasu liponowego grupa karboksylowa może być przekształcona w ester na drodze wymiany atomu wodoru z grupy –OH z grupą funkcyjną nie tworzącą wiązań wodorowych. Dobór grupy podstawionej do grupy karboksylowej zależy od stosowanej metody detekcji. W wyniku reakcji powstają związki o odmiennych właściwościach fizycznych oraz chemicznych. W literaturze można odnaleźć przykłady stosowanych odczynników derywatywujących:

N-metylo-N-tert-butyldimetylosilotrifluoroacetamidu (MTBSTFA) (58,157), N-(1-pyreno)jodoacetamidu (PIAA), N-(1-pyrenometylo)jodoacetamid (PMIA) (70), N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (171), 2-bromoacetylo-6-metoksynaftalenu (Br-AMN) (44). Reakcje 2-(4-aminofenylo)-6-metylobenzotiazolu (APMB) sprzężonego z 1-etylo-3-(dimetyloaminopropylo)karbodiiminą (EDAC) z powodzeniem zastosowano do derywatywacji próbek ludzkiego osocza oraz moczu. Tak uzyskaną pochodną oznaczano techniką HPLC z detektorem fluorescencyjnym przy długości fali 343 nm (157). Reakcje kwasu liponowego z 2-(4-aminofenylo)-6-metylobenzotiazolu (APMB) sprzężonego z 1-etylo-3-(dimetyloaminopropylo)karbodiiminą (EDAC) oraz z 2-bromoacetylo-6-metoksynaftalenu (Br-AMN) przedstawiono na rysunkach 15 i 16.



Rys. 15. Reakcja derywatywacji grupy karboksylowej kwasu liponowego z 2-(4-aminofenylo)-6-metylobenzotiazolu (APMB) sprzężonego z 1-etylo-3-(dimetyloaminopropylo)karbodiiminą (EDAC) (157).



Rys. 16. Reakcja derywatywacji grupy karboksylowej kwasu liponowego z 2-bromoacetylo-6-metoksynaftalenem (Br-AMN) (44).

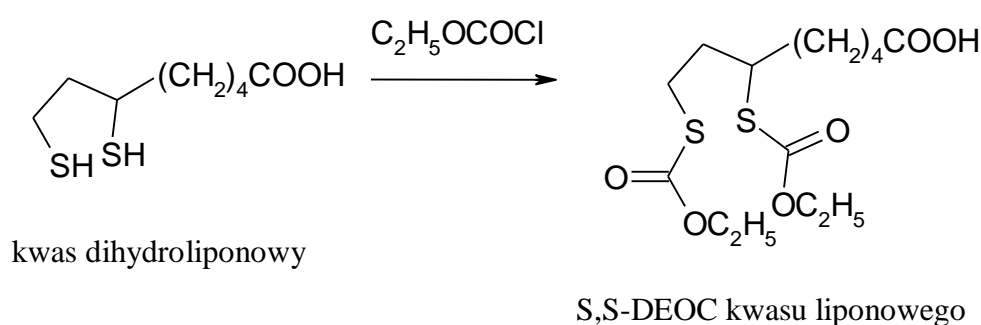
2.4.2. Derywatywacja grup tiolowych kwasu liponowego

Proces derywatywacji grup tiolowych kwasu liponowego jest wieloetapowy. W pierwszym etapie przeprowadza się redukcję wiązań disiarczkowych do grup tiolowych. Wiązanie ditiolowe/disiarczkowe jest wiązaniem dość trwałym, które można zredukować tylko silnym reduktorem. Do redukcji wiązań ditiolowych wykorzystywano: borowodurek sodu (163,169,172,173), 2-merkaptoetanol, ditiotreitól (169), tri-n-butylofosfinę (70,162,174). Proces redukcji kwasu liponowego borowodorkiem sodu przedstawiono na rysunku 3.

Wybór odpowiedniego reduktora jest najczęściej uwarunkowany jego skutecznością i wygodą stosowania, ale przede wszystkim rodzajem użytego odczynnika derywatyzującego. Stosowanie odczynników, takich jak 2-merkaptoetanol, ditiotreitól, jest niemal niemożliwe w przypadku wykorzystania wysoce reaktywnego odczynnika derywatyzującego w stosunku do grupy tiolowej. Utworzone pochodne generują dodatkowe, często bardzo duże, sygnały na chromatogramie, utrudniając, a niekiedy uniemożliwiając jego interpretację (2). Ograniczenia związane z zastosowaniem tri-n-butylofosfiny dotyczą przede wszystkim jej toksyczności, ale także drażniącego i ostrego zapachu. Najbardziej optymalny wydaje się być borowodurek sodu. Jest on nietoksyczny, łatwo dostępny, a jego nadmiar można łatwo usunąć poprzez

dodanie kilku kropel kwasu solnego lub acetonu. Dodatkowo, uwolnione grupy tiolowe pozostają stabilne i chronione przed utlenianiem (157).

Po otwarciu wiązania disulfidowego, w kolejnym etapie analizy powstały produkt poddaje się reakcji derywatywacji chemicznej. Do modyfikacji grup tiolowych stosuje się odczynniki derywatyżujące np.: 4-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolo-7-sulfonian amonu (SBD-F) (15,72,175), 4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol (ABD-F) (175), monobromobiman (mBBr) (163), 2-(4-aminofenilo)-6-metylobenzotiazol (APMB) (162), 2-bromoacetylo-6-metoksynaftalen (Br-AMN) (176), aldehyd ftalowy (177), 6,8-di-(benzylotio)oktanian (154), 4-bromometylo-6,7-dimetoksykumarynę (Br-DMC) (167,178), chloromrówczan etylu (ECF) (44). W wyniku procesu derywatywacji grup tiolowych z chloromrówczanem etylu powstaje dietoksykarbonyl kwasu liponowego (S,S-DEOC kwasu liponowego), co przedstawiono na rysunku 17.



Rys. 17. Reakcja derywatywacji kwasu dihydroliponowego z chloromrówczanem etylu ECF (44).

Wprowadzenie etapu derywatywacji do procedury analitycznej pozwoliło na oznaczenie zawartości kwasu liponowego w próbkach: osocza (72,107,162,179), tkanek mięśnia sercowego szczura (163), w preparatach farmaceutycznych i suplementach diety (44,70,117,176), w wybranych produktach spożywczych (15,44,58), a także w produktach przemiany materii takich jak mocz (162,180). Wprowadzenie do cząsteczki analitu chromoforu, elektroforu lub fluoroforu poprawia właściwości detekcyjne (169). Ponadto zabezpiecza bardzo reaktywną grupę tiolową przed niepożądanymi reakcjami zarówno w czasie oczekiwania na analizę jak i w czasie samej analizy (169). Niepożądane reakcje to najczęściej reakcje utleniania prowadzące do powstania disiarczków (181).

2.5. Techniki analityczne wykorzystywane do rozdziału kwasu liponowego

Do ilościowego oznaczania kwasu liponowego najczęściej wykorzystywano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z różnymi rodzajami detekcji (elektrochemiczną, fluorescencyjną, chemiluminescencyjną, spektrofotometryczną UV-VIS, spektrometrię mas (MS)) oraz chromatografię gazową (GC) połączoną ze spektrometrią mas (GC-MS). W literaturze można znaleźć przykłady zastosowań kulometrii oraz woltamperometrii z zastosowaniem elektrod pracujących z różnych materiałów, elektroforezy kapilarnej (CE) z detekcją UV, a także analizy przepływowej (FI, FIA) z detekcją potencjometryczną oraz chemiluminescencyjną. Metody te wykorzystywano do oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych i środowiskowych, a także w kosmetykach.

2.5.1. Wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC)

Najczęściej stosowaną i najbardziej popularną metodą oznaczania zawartości kwasu liponowego jest chromatografia cieczowa (HPLC) z różnymi technikami detekcji, najczęściej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC). Jak powszechnie wiadomo, ten rodzaj chromatografii wykorzystuje niespecyficzne oddziaływania pomiędzy hydrofobowymi analitami i niepolarną fazą stacjonarną. Do rozdziału wykorzystywane są kolumny C-18, C-8 (182). Jako fazy ruchome najczęściej stosowane są mieszaniny wody (z dodatkiem kwasu octowego lub trifluorooctowego) i acetonitrylu lub/i metanolu w różnych proporcjach. Kwas liponowy oznaczano stosując mieszaniny acetonitryl:metanol:woda (70), metanol:woda:kwas octowy (58). Elucję gradientową mieszaniną woda:acetonitryl (95:5 oraz 5:95, v/v) z dodatkiem 0,1% roztworu kwasu trifluorooctowego zastosowano do oznaczania kwasu liponowego i dihydroliponowego w suplementach diety i próbkach biologicznych (175).

Siangproh i wsp. (183) zaproponowali procedurę oznaczenia kwasu liponowego wykorzystującą jako fazę ruchomą równoobjętościową mieszaninę acetonitryl:bufor fosforanowy o pH 2,5. Uzyskane wyniki dla próbek suplementów diety wykazały dużą zgodność z danymi deklarowanymi przez producentów. W swojej pracy Durrani i wsp. (148) zastosował dwa rodzaje faz ruchomych. Mieszaninę acetonitryl:metanol:bufor

fosforanowy o pH 3,0 (350:65:585, v/v) użyto w przypadku zastosowania wielokanałowego detektora kulometrycznego (CEAD). Natomiast detekcja przez elektrorozpylanie sprzężona ze spektrometrią mas (ESI-MS) wymagała jako eluentu mieszaniny acetonitrylu z 0,1% lodowatym kwasem octowym (45:55, v/v).

Optymalne natężenie przepływu fazy ruchomej jest związane z fizycznymi właściwościami stosowanej kolumny (długość, średnica, wielkość ziaren wypełnienia). Najczęściej stosowana prędkość przepływu eluentu wynosi 1 ml/min (15,58,59,70,156,161,163,164,175,180,183,184). Jednak w literaturze można znaleźć przykłady modyfikacji prędkości przepływu – 1,5 ml/min w przypadku oznaczania kwasu liponowego techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej HPLC z detektorem elektrochemicznym (72,166) oraz 1,7 ml/min w przypadku oznaczania kwasu liponowego techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej HPLC z detektorem fluorescencyjnym (177). Mniejsze prędkości przepływu zastosowano podczas oznaczania metodą HPLC z wielokanałowym detektorem kulometrycznym (HPLC-CEAD) oraz metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej z jonizacją przez elektrorozpylanie sprzężoną ze spektrometrią mas (HPLC-ESI-MS) – 0,2 ml/min (148) oraz 0,45 ml/min (146). Chen i wsp. (107,179) zaproponowali procedurę oznaczania kwasu liponowego techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej z jonizacją przez elektrorozpylanie sprzężoną ze spektrometrią mas (HPLC-ESI-MS). Optymalna prędkość przepływu eluentu wynosiła 0,3 i 0,35 ml/min. Prędkość przepływu – 0,7 ml/min zastosowano do oznaczania kwasu liponowego w próbkach krwi i tkanek mózgu szczura techniką chromatografii ciekowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas LC-MS/MS (153).

Sprzężenie HPLC z najbardziej popularnymi rodzajami detekcji umożliwiło opracowanie szeregu precyzyjnych i dokładnych metod oznaczania. Najczęściej stosowanymi detektorami są detektory fluorometryczne (15,44,162,163,175–177) i spektrofotometryczne (117,178,180,184). W literaturze można odnaleźć procedury oznaczania kwasu liponowego przy użyciu detekcji chemiluminescencyjnej (164). Detektor kulometryczny wykorzystano do analizy wyekstrahowanego kwasu liponowego z próbek biologicznych (185) oraz żywności (146). Rzadziej stosowane są detektory wychwyty elektronów (72,146,166).

W ostatnich latach coraz większą popularnością cieszy się chromatografia ciekowa sprzężona ze spektrometrią mas (107,146,153,161). Za pomocą tej metody oznaczano kwas liponowy w próbkach ludzkiego osocza, krwi oraz tkanek szczura,

a także w suplementach diety (107,148,153). Mimo, że zastosowanie chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrem mas jest bardzo interesującym rozwiązaniem analitycznym, to koszt samego detektora MS jest bardzo wysoki. Powoduje to ograniczenia w dostępności tego rozwiązania w rutynowych analizach laboratoryjnych (186).

Najczęściej stosowane metody chromatografii ciekowej w analizie kwasu liponowego przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Metody chromatografii ciekowej w analizie kwasu liponowego.

Rodzaj detekcji	Rodzaj matrycy	Odczynnik derywatyzujący	Literatura
FL	tkanki myszy oraz szczura, szpinak	4-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolo-7-sulfonian amonu (SBD-F)	(15)
FL	czyste substancje wzorcowe, ślina	4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazol (ABD-F), 4-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolo-7-sulfonian amonu (SBD-F)	(175)
FL	mięsień sercowy szczura	monobromobiman (mBBr)	(163)
FL	ludzkie osocze, mocz ludzki	2-(4-aminofenylo)-6-metylobenzotiazol (APMB)	(162)
FL	preparaty farmaceutyczne	2-bromoacetylo-6-metoksynaftalen (Br-AMN)	(176)
FL	ludzkie osocze	aldehyd ftalowy	(177)
FL	bakterie, tkanki, preparaty farmaceutyczne, produkty spożywcze	2-bromoacetylo-6-metoksynaftalen (Br-AMN)	(44)
UV	ludzkie osocze	chlorowodorek tris(2-karboksyetylo)fosfina (TCEP)	(180)
		bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy (BCPB)	(180,184,187)
		-	(188)
UV	mięso dostępne w handlu (wołowina, cielęcina, baranina oraz wieprzowina)	N-metylo-N-tert-butylodimetylosilotrifluoroacetamid (MBDSTFA)	(58)
UV	suplement diety	-	(189,190)
UV-VIS	multiwitaminowy suplement diety	-	(55)

Metoda analityczna	Rodzaj matrycy	Odczynnik derywatyzujący	Literatura
UV-VIS	preparaty farmaceutyczne, mocz ludzki	-	(22)
DAD	suplement diety	-	(191)
ECD	ludzkie osocze	4-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolo-7-siarczan amonu (SBD-F)	(72)
ECD	krew ludzka	-	(192)
EC	ludzkie osocze	-	(59)
EC	ludzkie osocze, mocz ludzki	-	(120)
CEAD, ESI – MS	jaja kurze, majonez, ziemniaki, groszek w puszkach	-	(146)
	suplementy diety		(148)
CEAD	ludzkie osocze	-	(158)
ESI – MS	ludzkie osocze, osocze szczura	kwasy 3-pirydylokarboksylowe (niacyna)	(107,179)
ESI – MS	krew ludzka	N,N-dicykloheksylokarbodiimid (DCC)	(171)
ESI – MS/MS	surowica ludzka	-	(193)
FIA - CL	ziemniaki, pomidory, brokuły, suplementy diety	-	(164)
MS/MS	krew i tkanki mózgu szczura	-	(153)
MS/MS	ludzkie osocze	-	(97,99,100)
MS/MS	osocze szczura	chlorowodorek heksahydro-1-(5-isochinolino-sulfonylo)-1H-1,4-diazepina (fasudil)	(194)
MS/MS	osocze szczura	-	(161)
FL, MS	suplementy diety, mocz ludzki	N-(1-pyreno)jodoacetamid (PIAA) N-(1-pyrenometylo)jodoacetamid (PMIA)	(70)

2.5.2. Chromatografia gazowa (GC)

Ze względu na trwałość termiczną oraz wystarczającą lotność, kwas liponowy może być bezpośrednio oznaczany techniką chromatografii gazowej (GC). Kwas liponowy w swojej budowie zawiera między innymi polarną grupę karboksylową. Jej obecność negatywnie wpływa na czułość analizy powodując znaczne ogonowanie piku (152). Dlatego, w celu poprawy czułości metody stosuje się derywatyzację. Otrzymane w ten sposób pochodne charakteryzują się większą lotnością, stabilnością, a przede wszystkim mniejszą polarnością niż substancje wyjściowe (44). Do rozdziału chromatograficznego mieszanin substancji współwystępujących z kwasem liponowym

najczęściej wykorzystuje się kolumny wypełnione silikażelem lub kolumny kapilarne wykonane z topionej krzemionki wypełnione polimerem (58,145,154,195–197). W analizie kwasu liponowego stosowano kolumny o różnej długości. Kolumnę o długości 15 m z topionej krzemionki wykorzystywano w analizie próbek biologicznych (195). 30 m kolumnę użyto w badaniach próbek bakterii (197). Znacznie krótszą, bo o długości 7 m stosowano do oznaczenia kwasu liponowego wydzielonego z próbek mięsa (58). Jako gazy nośne stosuje się zazwyczaj hel (154,195,197), azot (145,195), rzadziej wodór. W technice chromatografii gazowej prędkość przepływu azotu wynosiła 10 ml/min (195) oraz 40 ml/min (145). W przypadku rozdziału techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas zastosowano hel - 1,2 ml/min (197).

Do detekcji omawianego związku używany jest najczęściej detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) (44,145,196) oraz detektor płomieniowo – fotometryczny (FPD) (195). Obecnie dużą popularnością cieszy się technika chromatografii gazowej sprzężona ze spektrometrem mas (44,154,195,197). Za pomocą techniki chromatografii gazowej oznaczono kwas liponowy w próbkach biologicznych (195,196), mikroorganizmach (154,197) oraz w produktach spożywczych (58,145).

2.5.3. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Procedurę analizy zawartości kwasu liponowego za pomocą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC) zaproponował Ravanić (198). Jako sorbent zastosowano żel krzemionkowy 60 RP-18 F254, eluentem była mieszanina: 2-propanol:metanol:aceton:woda:kwas octowy w stosunku objętościowym 6:4:2:8:0,2. Po rozwinięciu, chromatogram wywoływano roztworem chlorku palladu (II), a pojawiające żółte ślady były wizualizowane światłem przy długości fali 375 nm. Droga rozwijania dla kwasu liponowego i dihydroliponowego wynosiła odpowiednio 43,0 oraz 34,2 mm. Wykazano ilościową zależność między polem powierzchni plamki a stężeniem substancji naniesionej. Wyznaczono granice wykrywalności i oznaczalności, które zdecydowanie były wyższe w porównaniu do chromatografii kolumnowej. W związku z powyższym opracowaną metodę można było zastosować do próbek zawierających wysokie stężenia analitu. Stosując tę metodę kwas liponowy oznaczano w suplementach diety oraz farmaceutykach (198).

2.5.4. Elektroforeza kapilarna (CE)

W literaturze do rozdziału, identyfikacji oraz oznaczania kwasu liponowego oprócz technik HPLC oraz GC zaproponowano wysokosprawną elektroforezę kapilarną. Satysfakcjonujące wyniki otrzymano stosując różne procedury przygotowania próbek. Do bezpośredniego oznaczenia kwasu liponowego wykorzystywano detektory UV przy długościach fali 208, 214 nm (44,147,167). Autorzy nie zaobserwowali sygnałów pochodzących od innych składników analizowanych próbek. Jednak wadą stosowanej metody jest adsorpcja kwasu liponowego na ściankach kapilary, co wiąże się z potrzebą jej częstego przemywania (2).

Elektroforezę kapilarną z detekcją spektrofotometryczną zastosował Sitton i wsp. (22,147) do oznaczania kwasu liponowego w próbkach suplementów diety. Metodą tą z powodzeniem oznaczano kwas liponowy również w żywności (44) oraz w próbkach biologicznych (22,44). Do oznaczania kwasu liponowego zastosowano elektroforezę kapilarną z zatężaniem przy użyciu mieszaniny acetonitrylu i chlorku sodu (167).

2.5.5. Metody elektrochemiczne

Procesy elektrodowe są najczęściej realizowane na klasycznych elektrodach wykonanych z platyny (199) lub węgla szklatego (200,201). Jednak coraz większą popularnością cieszą się elektrody o modyfikowanych powierzchniach (202–205). Przygotowanie próbek do badań elektrochemicznych jest znacznie prostsze niż w przypadku metod chromatograficznych. Niejednokrotnie ogranicza się do rozpuszczenia próbki w odpowiednim rozpuszczalniku. Taki sposób przygotowania próbek suplementów diety zaproponował Corduneanu i wsp. (200). Próbki rozpuszczano w mieszaninie woda:metanol (1:1, v/v). Jako elektrolit podstawowy stosowano bufor fosforanowy o stężeniu $C = 0,1 \text{ mol/l}$ i pH 6,9. Elektroda pracująca wykonana była z węgla szklatego, a do oznaczeń ilościowych zastosowano voltamperometrię pulsową różnicową (DPV). Ograniczenie wstępnego przygotowania próbek tylko do etapu rozpuszczania może powodować możliwość powstania interferencji sygnałów pochodzących od innych składników badanej matrycy, dających sygnały w podobnym zakresie potencjałów. Granica wykrywalności oraz oznaczalności metody wynosiła odpowiednio 1,8 i 6,1 $\mu\text{mol/l}$ (200).

Marin i wsp. (199) zaproponowali do wstępnego przygotowania rozpuszczenie próbek w roztworze buforu octanowego o stężeniu $C = 0,2 \text{ mol/l}$ i pH 4,5. Pomiary prowadzono w układzie trójelektrodowym (elektroda pracująca – dysk platynowy, elektroda pomocnicza – drut platynowy), a potencjał mierzono względem elektrody chlorosrebrowej (Ag/AgCl). Jako elektrolit podstawowy zastosowano bufor octanowy o stężeniu $C = 0,2 \text{ mol/l}$ i pH 4,5. Do badanych roztworów dodawano 0,9% roztworu chlorku sodu w celu zapobiegania utlenianiu składników (np. glukozy). Zakres liniowości metody mieści się w zakresie $10 \div 800 \text{ } \mu\text{mol/l}$. Granica wykrywalności wynosiła $13,15 \text{ } \mu\text{mol/l}$. Do oznaczeń ilościowych zastosowano woltamperometrię pulsową różnicową (DPV).

Kwas liponowy oznaczano woltamperometrycznie przy pomocy szklanej elektrody węglowej o powierzchni $3,14 \text{ mm}^2$, modyfikowanej wielowarstwowo nanorurkami węglowymi. Zastosowanie modyfikacji pozwoliło zredukować przepięcie ($\Delta m_i = 0,1 \text{ V}$) i zwiększyć prąd oksydacyjny kwasu liponowego. Potencjał mierzono względem elektrody chlorosrebrowej (Ag/AgCl) z liniowym przemiataciem potencjału od 0 do $1,2 \text{ V}$ z prędkością 25 mV/s . Granica oznaczalności dla kwasu liponowego wynosiła $1,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$. Badane próbki farmaceutyków przygotowywano poprzez rozpuszczenie w wodzie destylowanej (205).

Detekcję elektrochemiczną kwasu liponowego wykorzystano w układzie przepływowym, w którym wykorzystano selektywną wobec kwasu liponowego elektrodę. Dzięki temu oznaczono kwas liponowy w preparatach farmaceutycznych i moczu (22). Metoda pozwoliła na oznaczenie kwasu liponowego w zakresie $10^{-7} \text{ mol/l} \div 10^{-2} \text{ mol/l}$. Elektrodę przygotowano przez pokrycie PVC oraz plastyfikatorem powierzchni elektrody grafitowej. Wykazano szybką i stabilną reakcję, dobrą powtarzalność, długoterminową stabilność, możliwość zastosowania w zakresie pH 8,0-9,5. Zaproponowana elektroda ma czas reakcji $\leq 12 \text{ s}$ i może być używana przez co najmniej 6 tygodni bez znacznego obniżenia czułości. Elektroda charakteryzuje się dobrą selektywnością względem nieorganicznych i organicznych anionów (22). Wyżej opisaną elektrodę wykorzystano również jako elektrodę wskaźnikową do potencjometrycznego miareczkowania kwasu liponowego.

Detekcję woltamperometryczną i biamperometryczną wykorzystywano do miareczkowego oznaczania kwasu liponowego (206). Metoda ta pozwoliła na oznaczanie obu form utlenionej jak i zredukowanej kwasu liponowego. Do oznaczenia kwasu

liponowego w roztworach modelowych wykorzystano elektrodę z węgla szklistego (206,207). Uzyskany zakres analityczny kwasu liponowego oznaczanego techniką woltamperometrii na elektrodzie szklisto-węglowej wynosił od $1,15 \cdot 10^{-5}$ do $1,73 \cdot 10^{-4}$ mol/l, zaś granica wykrywalności kwasu liponowego wynosiła $5,75 \cdot 10^{-6}$ mol/l (100).

2.5.6. Spektrofotometria

Metody spektrofotometryczne są stosowane nie tylko do detekcji w technikach chromatograficznych, ale mogą stanowić podstawę bezpośrednich procedur oznaczania. Mimo wielu ograniczeń, opracowano metodę spektrofotometrycznego oznaczania kwasu liponowego w próbkach suplementów diety (208,209). Próbki rozpuszczano w metanolu, a analizie poddawano widma UV-VIS zerowego rzędu i ich pierwszej pochodnej. Wartość odzysku oscylowała w zakresie 99,5 - 100,8%.

W celu zwiększenia czułości metody zaproponowano pośrednią metodę spektrofotometrycznego oznaczania kwasu liponowego. W procedurze zaproponowanej przez Walsh'a (210) wykorzystano pomiar absorbancji produktu reakcji kwasu liponowego z nadmanganianem (VII) potasu. Absorbancja tworzącego się jonu Mn (VI) była proporcjonalna do zawartości kwasu liponowego w próbce. Metodą tą oznaczano kwas liponowy w suplementach diety w zakresie $1 \div 10 \mu\text{g/ml}$. Średnia wartość uzyskanych odzysków wynosiła $100,41 \pm 0,63\%$.

Najczęściej stosowane metody oznaczania kwasu liponowego z wyłączeniem technik chromatografii cieczowej przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Zestawienie innych metod oznaczania kwasu liponowego.

Metoda analityczna	Rodzaj matrycy	Odczynnik derywatyzujący	Literatura
FIA z detekcją potencjometryczną	preparaty farmaceutyczne, mocz ludzki	-	(22)
GC - MS	bakterie <i>Escherichia coli</i>	6,8-di-(benzylotio)oktanian	(154)
GC - FPD	bakterie, tkanki, preparaty farmaceutyczne, produkty spożywcze	chloromrówczan etylu (ECF)	(44)
GC - MS	próbki biologiczne	N-metylo-N-tert-butylodimetylosilotrifluoroacetamid (MBDSTFA)	(157)
CE	próbki biologiczne	-	(167)
CE	mocz ludzki	bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy (BCPB)	(134)
CE - UV, MALDI - TOF MS	kosmetyki, suplementy diety	4-bromometylo-6,7-dimetoksykumaryna (Br-DMC)	(178)
CE - GCE	preparaty farmaceutyczne	4-bromometylo-6,7-dimetoksykumaryna (Br-DMC)	(167)
Spektrofotometria UV-VIS	suplementy diety	-	(208,209,211)
Woltamperometria	suplementy diety	-	(201)

III. CEL I ZAKRES PRACY

Kwas liponowy, uważany jest za „super” lub „uniwersalny” przeciwutleniacz, gdyż posiada unikalną zdolność regeneracji niezbędnych egzogennych i endogennych przeciwutleniaczy takich jak witamina C, witamina E i glutation. Niektóre badania sugerują, że może uczestniczyć w procesach naprawy utlenionych białek (114). Biorąc pod uwagę tak wiele korzystnych właściwości komórkowych i molekularnych, suplementacja kwasem liponowym może mieć kluczowe znaczenie dla utrzymania stężenia tego związku w organizmie na odpowiednim poziomie. Wzrost zainteresowania stosowaniem kwasu liponowego, zarówno jako suplementu diety, jak i środka farmakoterapii powoduje konieczność kontroli jego stężenia w żywności czy w preparatach farmaceutycznych (np.: Neurex 600, Neurolipon MIP 600, Thiogamma 600 - leki stosowane w przebiegu polineuropatii cukrzycowej oraz w leczeniu parestezji).

Z przeglądu literatury wynika, że do oznaczania kwasu liponowego stosowane są różne techniki pomiarowe. Taka różnorodność sugeruje, że nie ma jednej znormalizowanej procedury analitycznej (tzw. normy) oznaczania kwasu liponowego.

W zależności od stosowanej metody pomiarowej w analizie kwasu liponowego możemy spotkać się z charakterystycznymi dla niej trudnościami. Stosując detekcję spektrofotometryczną lub fluorymetryczną problemem jest brak w budowie cząsteczki kwasu liponowego ugrupowań fluoroforowych i chromoforowych. W przypadku oznaczania techniką chromatografii gazowej obecność grupy karboksylowej powoduje ogonowanie piku. Opracowanie nowej prostej procedury oznaczania kwasu liponowego powinno nieść wiele korzyści związanych z redukcją zużycia odczynników, a także skróceniem czasu analizy.

W związku z tym podjęto próbę wykorzystania nowych reakcji derywatywacji do oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych. Zastosowano nowe, wcześniej nie wykorzystywane w analizie kwasu liponowego odczynniki derywatyzujące tj: jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI), 2,4'-dibromoacetofenon (DBAF), tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinoliowy (CMQT) oraz alkohol 4-metoksybenzylowy (4-MBA). Praktyczną użyteczność opracowanych metod sprawdzono badając zawartość analitu w próbkach wybranych produktów spożywczych oraz suplementach diety.

Przedstawiona praca doktorska wymagała zrealizowania następujących celów (zakres pracy):

1. Zbadanie przebiegu reakcji derywatywacji kwasu liponowego z jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI), 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF), tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) oraz alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA);
2. Identyfikację otrzymanych produktów reakcji derywatywacji z zastosowaniem analizy spektralnej ^1H NMR, IR, UV oraz MS;
3. Opracowanie nowych procedur oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem wymienionych odczynników derywatywujących techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV i chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS);
4. Ocenę analitycznej przydatności opracowanych procedur. Ustalenie: zakresu liniowości, współczynnika determinacji, powtarzalności, granicy wykrywalności (LOD), granicy oznaczalności (LOQ);
5. Sprawdzenie praktycznego wykorzystania opracowanych procedur do oznaczania kwasu liponowego w produktach spożywczych oraz w suplementach diety.

IV. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. APARATURA, ODCZYNNIKI I MATERIAŁ BADAWCZY

1.1. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

W trakcie wykonywanych badań wykorzystano następujące urządzenia i elementy wyposażenia analitycznego:

- spektrofotometr UV-VIS, U-1900, U-2800A, *Hitachi (Japonia)* wraz z kuwetami kwarcowymi i szklanymi o długości drogi optycznej 10 mm,
- wysokosprawny chromatograf cieczerw, *Thermo Separation (USA)*, składający się z niskogradentowej pompy binarnej P2000, detektora UV 3D Spectra System UV 3000, zaworu dozującego Rheodyne wyposażonego w pętlę dozującą o objętości 20 μ l, prędkość przepływu fazy ruchomej - 1 ml/min, zawartość oznaczanych związków wyznaczono na podstawie zależności pola powierzchni od stężenia analitu,
- kolumny chromatograficzne: Supelcosil LC-8, o wymiarach 150x4,6 mm, 5 μ m, *Supelco*, LiChrospher RP-18 o długości 150x4,6mm, 5 μ m, *LiChroCart, Merck (Niemcy)*,
- chromatograf gazowy HP 6890 *Agilent Technologies (USA)*, z elektroniczną kontrolą ciśnienia (EPC) 59864B, wyposażony w detektory: FID i MS 5973, kolumny kapilarne ZB-5MSi (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) oraz w automatyczny podajnik próbek HP 7683, jako gaz nośny zastosowano hel o czystości 99,999%, temperatura źródła jonów + 230°C przy energii elektronów 70 eV, temperatura kwadrupola + 150°C, temperatura linii transferowej + 280°C,
- spektrometr Ultrashield Plus 400, *Brucker (USA)* o częstotliwości podstawowej 400 MHz. Widma NMR wykonano w chloroformie deuterowanym (CDCl_3) oraz metanolu deuterowanym (MeOD) stosując tetrametylosilan (TMS) jako wzorzec wewnętrzny,
- spektrometr Magna IR 550, *Nicolet (Kanada)*,
- spektrometr Q-TOF LC-MS Accurate-Mass 6530 z jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI), *Agilent Technologies (USA)*,

- waga analityczna AB204-S, dokładność wagi 0,1mg, *Mettler Toledo (Polska)*,
- waga analityczna AS 160/X, dokładność wagi 0,1mg, *Radwag (Polska)*,
- wirówka laboratoryjna MPW-54, MPW-251, *MPW Med. Instruments (Polska)*,
- wytrząsarka Vibramax110, *Heidolph (Niemcy)*,
- łaźnia ultradźwiękowa Sonorex RK 31, *Bandelin (Polska)*,
- łaźnia wodna typ 356P, *Unipan (Polska)*,
- koncentrator blokowy do odparowania próbek z ręcznym podnośnikiem EVA-EC-1S, *VLM (Niemcy)*,
- wyparka obrotowa Rotavapor R-210, *Buchi Labortechnik AG (Szwajcaria)*,
- pH-metr CP-401, *ELMETRON (Polska)*,
- zestaw do SPE *J.T Baker spe-12G* prod. No. 7018-94 (*Niemcy*),
- kolumny do SPE: Oasis MCX Cartridge, Bakerbond Octadecyl C18, Bakerbond Silica Gel, Octadecyl SPE, Oasis HLB, J.T. Baker Cyano, J.T. Baker Diol, J.T. Baker,
- homogenizator *IKA, A11B*, (*Niemcy*),
- mikropipety 10-100 µl, 100-1000 µl, *Eppendorf (Niemcy)*,
- mikrostrzykawki o pojemności 10, 50, 100, 250 i 500 µl, produkcja *Agilent Technologies (Australia)*,
- fiołki chromatograficzne o pojemności 2 ml,
- szklane wkładki o pojemności 150 µl do fiołek chromatograficznych,
- płytki aluminiowe do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) pokryte żelazem krzemionkowym 60 F 254 o grubości 0,2 mm, *Merck (Niemcy)*,
- drobny sprzęt laboratoryjny: kolby miarowe, naczynka wagowe, lejki, zlewki, bagietki, itp.

1.2. Odczynniki chemiczne

Odczynniki wykorzystane w trakcie wykonywania eksperymentów:

Wzorce:

- kwas liponowy (LA) 98,0%, CAS 62-46-4, *Sigma-Aldrich (Niemcy)*.

Odczynniki derywatyzujące:

- jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI), CAS 14338-32-0, *Sigma-Aldrich (Niemcy)*,

- 2,4-dibromoacetofenon (DBAF), CAS 99-73-0, *Sigma-Aldrich (Niemcy)*,
- alkohol 4-metoksybenzylowy (4-MBA) 98,0%, CAS 105-13-5, *Sigma-Aldrich (Niemcy)*,
- tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (CMQT) – przygotowano w następujący sposób (212): odważono 1 g 2-chlorochinoliny, 1 g 3-metoksytetrafluoroboranu oraz odmierzone 1,2 ml nitrometanu. Składniki zmieszano ze sobą do całkowitego rozpuszczenia substancji stałych, po czym dodano 4 ml eteru dietylowego. Wytrącone białe kryształy odsączono z użyciem próżni i przemyto dwukrotnie 2 ml eteru dietylowego. Osuszono w eksykatorze w obecności CaCl₂.

Rozpuszczalniki:

- metanol 99,9%, CAS 67-56-1, *Merck, Sigma-Aldrich (Niemcy)*,
- acetonitryl 99,9%, CAS 75-05-8, *Merck (Niemcy), J.T.BAKER (Holandia)*,
- dichlorometan 99,8%, CAS 75-09-2, *Merck, Sigma-Aldrich (Niemcy)*,
- octan etylu 99,8%, CAS 141-78-6, *Sigma-Aldrich (Niemcy)*,
- nitrometan 99,0%, CAS 75-52-5, *Sigma-Aldrich (Niemcy)*,
- eter dietylowy 99,5% , CAS 60-29-7, *Merck (Niemcy)*.

Pozostałe odczynniki:

- borowodorek sodu NaBH₄, *POCH, (Polska)*,
- wodorowęglan sodu NaHCO₃, *POCH, (Polska)*,
- N,N'-dicykloheksylokarbodiimid (DCC), CAS 538-75-0, *Merck (Niemcy)*,
- trietyloamina (TEA), CAS 121-44-8, *Merck (Niemcy)*,
- wodorotlenek sodu NaOH, *POCH, (Polska)*,
- kwas solny HCl, *POCH, (Polska)*,
- 4-dimetyloaminopirydyna (DMAP) 99,0%, CAS 1122-58-3, *Sigma-Aldrich (Niemcy)*,
- lodowaty kwas octowy 99,5%, CAS 64-19-7, *POCH, (Polska)*,
- 2-chlorochinolina C₉H₆ClN, CAS 612-62-4, *Merck (Niemcy)*,
- 3-metoksytetrafluoroboran (CH₃)₃O(BF₄), CAS 420-37-1, *Merck (Niemcy)*,
- woda destylowana i redestylowana.

1.3. Roztwory

Roztwory kwasu liponowego:

Podstawowy:

- roztwór kwasu liponowego o stężeniu 0,1 mol/l przygotowano przez odważenie 2,064 g kwasu liponowego i rozpuszczenie w 100 ml metanolu.

Roboczy:

- roztwory kwasu liponowego o stężeniach 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} mol/l sporządzono przez rozcieńczenie odpowiedniej objętości roztworu podstawowego. Do rozcieńczenia roztworów roboczych kwasu liponowego, w zależności od potrzeb użyto metanolu, octanu etylu, acetonitrylu lub dichlorometanu.

Wzorcowy:

- roztwory kwasu liponowego do przygotowania krzywych wzorcowych sporządzono w kolbach miarowych o pojemności 10 ml. W tym celu odmierzone odpowiednie objętości roztworu podstawowego kwasu liponowego i uzupełniono do kreski właściwymi rozpuszczalnikami: metanolem, octanem etylu lub acetonitrylem.

Roztwory odczynników derywatyzujących:

- tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (CMQT) - roztwór podstawowy o stężeniu 10^{-2} mol/l przygotowano przez odważenie 0,066 g osuszonej czystej substancji i rozpuszczenie w 25 ml wody redestylowanej,
- jodek 2-chloro-1-metylopirydynowy (CMPI) - roztwór podstawowy o stężeniu 10^{-2} mol/l przygotowano przez odważenie 0,064 g czystej substancji i rozpuszczenie w 25 ml wody redestylowanej,
- 2,4-dibromoacetofenon (DBAF) - roztwór podstawowy o stężeniu $4,3 \cdot 10^{-2}$ mol/l przygotowano przez odważenie 0,012 g czystej substancji i rozpuszczenie w 10 ml metanolu,
- alkohol 4-metoksybenzylowy (4-MBA) - roztwór podstawowy o stężeniu 10^{-4} mol/l przygotowano przez odważenie 0,370 mg czystej substancji i rozpuszczenie w 25 ml dichlorometanu.

Roztwory buforowe:

- **Bufor EDTA/NaOH, 0,9% roztwór NaCl** o następujących pH: 7,85; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 - roztwór o stężeniu 5 mmol/l przygotowano przez odważenie

0,73 g EDTA, 0,1 g NaOH oraz 0,45 g NaCl i rozpuszczenie w 500 ml wody redestylowanej; roztwór doprowadzono do pH 7,00; 7,50; 7,85; 8,00; 8,50; 9,00; 9,50; 10,00 za pomocą NaOH (1 mol/l) oraz HCl (1 mol/l) (163),

- **Bufor kwasu trichlorooctowego (TCA)** – roztwór o stężeniu 10^{-2} mol/l przygotowano przez odważenie 0,33 g TCA i rozpuszczenie w 200 ml wody redestylowanej; roztwór doprowadzono do pH 2,0.
- **Wodorofosforan (V) disodu (Na_2HPO_4)** - roztwór o stężeniu $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l przygotowano przez odważenie 1,420 g Na_2HPO_4 i rozpuszczenie w 200 ml wody redestylowanej; roztwory doprowadzono do pH 2,5; 2,7 i 3,0 za pomocą kwasu fosforowego (V) (3 mol/l).

Fazy ruchome:

- metanol:woda w następujących stosunkach objętościowych: 50:50; 80:20; 30:70; 70:30; 60:40; 25:75; 75:25,
- metanol:0,1% kwas mrówkowy (95:5),
- etanol:woda (70:30),
- n-heksan:octan etylu (70:30),
- acetonitryl:woda w następujących stosunkach objętościowych: 65:35; 80:20; 50:50 (pH 9,5); 80:20 (pH 8,0; 6,5; 9,5); 90:10 (pH 9,5),
- acetonitryl:woda:kwas trichlorooctowy w następujących stosunkach objętościowych: 50:49,88:0,12; 60:39,88:0,12,
- acetonitryl:metanol:woda:kwas trichlorooctowy (35:35:29:1),
- acetonitryl:octan amonu (50:50),
- kwas mrówkowy:acetonitryl (80:20),
- kwas mrówkowy:metanol (20:80),
- kwas trichlorooctowy:acetonitryl w następujących stosunkach objętościowych: 95:5; 60:40,
- kwas trichlorooctowy:woda (50:50),
- kwas trichlorooctowy:metanol w następujących stosunkach objętościowych: 75:25; 90:10; 80:20,
- wodorofosforan (V) disodu:acetonitryl w następujących stosunkach objętościowych: 35:65 (pH 2,5; 3,0; 6,0); 55:45 (pH 2,5; 3,0); 65:35 (pH 2,5); 80:20 (pH 2,5),
- wodorofosforan (V) disodu:acetonitryl:metanol (50:30:20) (pH 2,7).

Pozostałe roztwory:

- borowodorek sodu (NaBH_4), roztwór podstawowy o stężeniu 0,3 mol/l przygotowano przez odważenie 0,114 g czystej substancji i rozpuszczenie w 10 ml wody redestylowanej,
- wodorowęglan sodu (NaHCO_3), roztwór podstawowy o stężeniu 5% przygotowano przez odważenie 2,5 g czystej substancji i rozpuszczenie w 50 ml wody redestylowanej,
- N,N'-dicykloheksylokarbodiimid (DCC), roztwór podstawowy o stężeniu 0,363 mol/l przygotowano przez odważenie 750 mg czystej substancji i rozpuszczenie w 10 ml dichlorometanu,
- trietyloamina (TEA), roztwór podstawowy o stężeniu 5% przygotowano przez pobranie 5 ml TEA i rozpuszczenie w 100 ml octanu etylu,
- wodorotlenek sodu (NaOH), roztwory podstawowe o stężeniach: 0,1, 0,2, 1 mol/l przygotowano przez odważenie odpowiednio: 0,2 g, 0,4 g i 2,0 g czystej substancji i rozpuszczenie w 50 ml metanolu,
- kwas solny (HCl), roztwory robocze o stężeniu 2 mol/l oraz 1 mol/l przygotowano przez rozcieńczenie stężonego roztworu wodą redestylowaną.

1.4. Materiał badawczy

Materiał do badań stanowiły produkty spożywcze ogólnie dostępne handlowo tj: surowe ziemniaki, szpinak, brokuły, błonnik jabłkowy, młody jęczmień, dwie odmiany piwa z lokalnego browaru oraz dwa rodzaje suplementów diety zawierające w składzie kwas liponowy:

Revitanerw – kapsułki twarde

Producent Glenmark Pharmaceuticals Sp. z o.o. (Polska)

Składniki: kwas alfa-liponowy, mikrokapsułkowany olej z nasion ogórecznika *Borago officinalis* L., zawierający 40% kwasu gamma-linolenowego, octan DL-alfa tokoferylu, amid kwasu nikotynowego, D-pantotnian wapnia, chlorowodorek pirydoksyny, substancję przeciwzbrylającą (sole magnezowe kwasów tłuszczowych – E 470b, ditlenek krzemu), ryboflawinę, monoazotan tiaminy, barwniki (ditlenek tytanu, tlenek żelaza żółty), selenian (IV) sodu.

Suplement diety zawiera 300 mg kwasu liponowego w jednej kapsułce.

Kwas alfa-liponowy – kapsułki

Producent A-Z MEDICA (Polska)

Składniki: Kwas alfa-liponowy, kapsułka (żelatyna, woda, barwniki: E 171, E 131), substancja wypełniająca (maltodekstryna), substancję przeciwzbrylającą (sole magnezowe kwasów tłuszczowych - E 470b).

Suplement diety zawiera 100 mg kwasu liponowego w jednej kapsułce.

1.4.1. Procedura przygotowania próbek do badań

Suplement Revitanerw - roztwór podstawowy o stężeniu $1,45 \cdot 10^{-2}$ mol/l przygotowano przez zhomogenizowanie dziesięciu kapsułek suplementu, odważenie naważki równej masie jednej kapsułki i rozpuszczenie w metanolu w kolbie miarowej o pojemności 100 ml. Roztwór wytrząsano przez 20 min. Następnie przesączono w celu pozbycia się masy tabletkowej. Roztwory robocze przygotowano poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu podstawowego.

Suplement Kwas alfa-liponowy - roztwór podstawowy o stężeniu $9,69 \cdot 10^{-3}$ mol/l przygotowano przez rozpuszczenie zawartości 10 kapsułek w metanolu w kolbie miarowej o pojemności 50 ml. Roztwór wytrząsano przez 20 minut. Następnie przesączono w celu pozbycia się masy tabletkowej. Roztwory robocze przygotowano poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu podstawowego.

Próbki produktów spożywczych przed przystąpieniem do właściwych badań, należało je wstępnie przygotować. Piwa odgazowano stosując przez 30 minut ultradźwięki. Szpinak i brokuły umyto, pokrojono nożem i zmielono. Próbki ziemniaka po obraniu starto na tarce z tworzywa sztucznego, w celu uzyskania jak największego rozdrobnienia próbki. Błonnik jabłkowy i młody jęczmień pozyskano do badań w postaci homogennego sypkiego proszku, więc próbki te nie wymagały wstępnego przygotowania.

W celu uzyskania czystych ekstraktów do analizy chromatograficznej z próbkami produktów spożywczych postępowano w sposób następujący: odmierzone 10 ml (w przypadku produktów płynnych) lub odważono 1 g (w przypadku zhomogenizowanych produktów stałych) próbki. W celu pozbycia się przeszkadzających białek wprowadzono 1 ml acetonitrylu, 2 ml dichlorometanu i wymieszano. Mieszaninę poddano działaniu ultradźwięków przez 60 minut.

Po ekstrakcji próbkę odwirowano (3500 obr/min w czasie 10 minut). Zebrano warstwę organiczną, a ekstrakcję powtórzono z użyciem kolejnej porcji 2 ml dichlorometanu. Mieszaninę kolejny raz poddano działaniu ultradźwięków przez 60 minut, a następnie próbkę odwirowano (3500 obr/min w czasie 10 minut). Uzyskane ekstrakty połączono, przesączono przez sączek z bibuły, przemyto 0,5 ml dichlorometanu i odparowano na wyparce próżniowej do minimalnej objętości końcowej (ok. 1 ml). Po odparowaniu próbkę poddano reakcji derywatywacji stosując odpowiednie odczynniki.

Próbki z dodatkiem wzorca przygotowano w identyczny sposób. Ilość dodawanego kwasu liponowego zależna była od spodziewanej zawartości analitu w badanych próbkach.

2. SPOSÓB WYZNACZANIA PARAMETRÓW STATYSTYCZNYCH

Ocenę statystyczną krzywych kalibracyjnych przeprowadzono obliczając odchylenie standardowe (SD) oraz względne odchylenie standardowe (RSD). Wyznaczono granicę wykrywalności i oznaczalności metody oraz współczynnik zmienności metody na podstawie powtarzalności, co jest zgodne z wytycznymi opisanymi w przewodniku dotyczącym walidacji metod analitycznych w badaniach żywności Państwowego Zakładu Higieny (213).

Odchylenie standardowe jest miarą rozproszenia uzyskanych wartości wokół wartości średniej. Wyznaczenie wartości odchylenia standardowego (SD) umożliwia ocenę błędu przypadkowego jakim może być obarczone oznaczenie. W niniejszej pracy odchylenie standardowe wyznaczono wg wzoru:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

gdzie: n - liczba pomiarów,

x_i - wartość absorbancji lub pola powierzchni pod pikiem chromatograficznym dla pojedynczego wyniku,

\bar{x} - wartość średnia absorbancji lub pola pod pikiem chromatograficznym.

Powtarzalność metody wyznaczono jako względne odchylenie standardowe dla jednego punktu krzywej, sporządzonego w powtórzeniach zarejestrowanych w krótkich odstępach czasu. Wartość RSD wyznaczono jako stosunek wartości odchylenia standardowego do wartości średniej uzyskanych wyników wyrażony w procentach. Względne odchylenie standardowe wyznaczono wg wzoru:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

gdzie: SD - odchylenie standardowe,

\bar{x} - wartość średnia absorbancji lub pola powierzchni pod pikiem chromatograficznym.

Granice oznaczalności (LOQ) zdefiniowaną jako najniższe stężenie analitu, jakie można oznaczyć na akceptowalnym poziomie powtarzalności i dokładności (precyzji i poprawności) wyznaczono wg wzoru:

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{a}$$

gdzie: a - współczynnik kierunkowy prostej,

SD - odchylenie standardowe.

Granica wykrywalności (LOD) jest to najmniejsze stężenie substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej metody analitycznej, którą można wyznaczyć z określoną pewnością statystyczną

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{a}$$

gdzie: a - współczynnik kierunkowy prostej,

SD - odchylenie standardowe.

Badanie odzysku analitów jest bardzo ważnym elementem udokumentowania wiarygodności metody analitycznej, powszechnie znanym i stosowanym w chemii analitycznej sposobem kontroli dokładności wyników. W celu wyznaczenia odzysków do próbki dodano ściśle znane ilości wzorca, a następnie poddano identycznej procedurze przygotowania, jak próbki niewzbogacone. Takie postępowanie pozwoliło na ocenę potencjalnych strat oznaczanego związku, które mogły powstać w czasie przeprowadzania całej procedury analitycznej.

Średni błąd oznaczenia wyznaczono na podstawie budżetu niepewności (wiarygodności pomiaru). Przeanalizowano źródła błędów z uwzględnieniem wzajemnych oddziaływań, co pozwoliło ocenić i wytypować zasadnicze czynniki wpływające w istotny sposób na wielkość mierzoną.

3. STOSOWANE PROCEDURY

3.1. Redukcja wiązania disiarczowego

Do 1 ml buforu EDTA/NaOH/NaCl o pH 9,5 dodano 100 μ l metanolowego roztworu kwasu liponowego o stężeniu $C = 10^{-3}$ mol/l i 250 μ l roztworu borowodoru sodu (NaBH_4) o stężeniu $C = 0,3$ mol/l. Próbkę ogrzewano przez 13 minut w 60°C w łaźni wodnej.

Po reakcji otwarcia pierścienia ditiolowego próbkę ochłodzono do temperatury pokojowej. W celu usunięcia nadmiaru nieprzereagowanego reduktora dodano 150 μ l roztworu kwasu solnego (HCl) o stężeniu $C = 2$ mol/l i 3 ml roztworu wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) o stężeniu $C = 5\%$. Następnie w celu zubożenia środowiska reakcji dodano 40 μ l roztworu wodorotlenku sodu (NaOH) o stężeniu $C = 0,1$ mol/l. W ten sposób otrzymano roztwór kwasu dihydroliponowego o stężeniu $C = 2,2 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

3.2. Derywatywacja grupy tiolowej 2,4-dibromoacetofenonem (DBAF)

Po otwarciu pierścienia i usunięciu nadmiaru nieprzereagowanych odczynników dodano 0,5 ml roztworu 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF) w metanolu o stężeniu $C = 4,3 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Próbkę ogrzewano przez 1 godzinę w 70°C w łaźni wodnej. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej, roztwór dopełniono metanolem do objętości 10 ml.

3.3. Derywatywacja grupy tiolowej tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT)

Po otwarciu pierścienia i usunięciu nadmiaru nieprzereagowanych odczynników wprowadzono 50 μ l wodnego roztworu tetrafluoroboranu 2-chloro-1-etylocholinowego (CMQT) o stężeniu $C = 10^{-2}$ mol/l i ogrzewano przez 22 minuty w 60°C w łaźni wodnej. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej dopełniono do objętości 10 ml wodą

redestylowaną lub fazą ruchomą w zależności od zastosowanej techniki końcowego oznaczania.

3.4. Derywatywacja grupy tiolowej jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI)

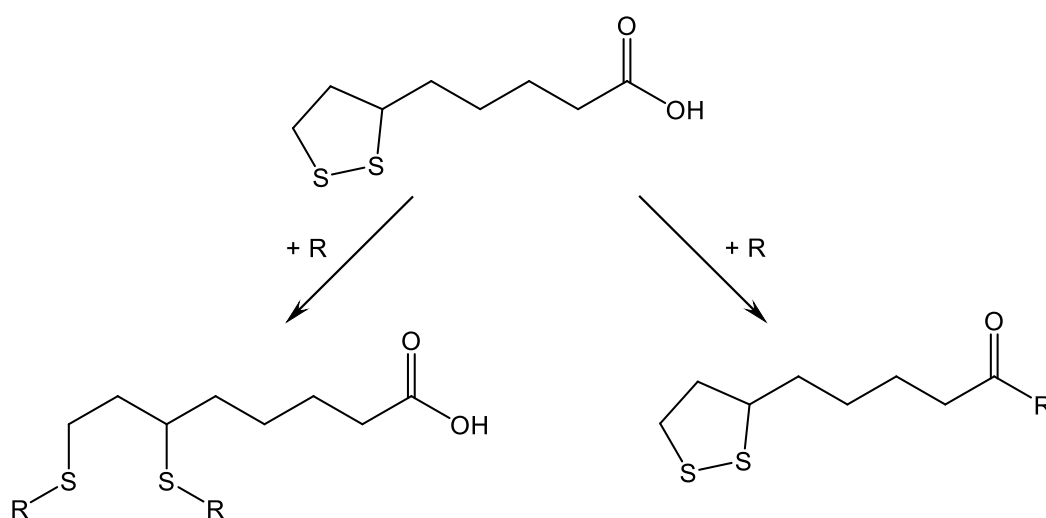
Do otrzymanego roztworu kwasu dihydroliponowego dodano 100 μl wodnego roztworu jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) o stężeniu $C = 10^{-2}$ mol/l i ogrzewano 5 minut w 60°C w łaźni wodnej. Na koniec próbkę odstawiono w ciemnym miejscu do ochłodzenia na 20 minut, a następnie uzupełniono próbkę do objętości 10 ml wodą redestylowaną lub acetonitrylem w zależności od zastosowanej techniki końcowego oznaczania.

3.5. Derywatywacja grupy karboksylowej alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA), procedura preparatywna

Ester kwasu liponowego z alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA) przygotowano w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych (ZChPN) Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Wykorzystano następującą procedurę preparatywną (214): do kolby o pojemności 200 ml wprowadzono 400 mg kwasu liponowego. Następnie dodano 10 ml osuszonego dichlorometanu, 155 μl alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) o stężeniu $C = 10^{-4}$ mol/l, 2 ml N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) o stężeniu $C = 3,63 \cdot 10^{-1}$ mol/l jako czynnika kondensującego i niewielką ilość (około 5 mg) katalizatora 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP). Proces zachodził w warunkach beztlenowych, dlatego reakcję prowadzono w atmosferze azotu, w łaźni lodowej przez 25 minut. Po tym czasie osad odsączono i prowadzono dwukrotną ekstrakcję kwasem octowym (2 x ok. 10 ml). Następnie porcjami po 2 ml dodawano roztwór NaHCO_3 o stężeniu $C = 5\%$ aż do zaniku pęcherzyków gazu. W celu pozbycia się wody roztwór przesączono przez sącdek bibułowy zawierający Na_2SO_4 , a następnie przepłukano roztworem osuszonego dichlorometanu. Rozpuszczalnik odparowano na wyparce do minimalnej objętości. W celu uzyskania czystego estru zastosowano kolumnę chromatograficzną z podłożem krzemionkowym 60. Fazę ruchomą stanowił n-heksan:octan etylu (70:30).

4. WYNIKI I DYSKUSJA

Jak wspomniano w rozdziale 2.4. grupę znacznikową do cząsteczki kwasu liponowego (LA) można wprowadzić w dwojaki sposób: poprzez estryfikację grupy karboksylowej przekształcając kwas liponowy w ester lub amid, bądź poprzez przyłączenie do grup tiolowych po wcześniejszej redukcji wiązania disiarczkowego i otwarciu pierścienia (rysunek nr 18).



Rys. 18. Schemat reakcji derywatywacji kwasu liponowego uwzględniający sposób wprowadzenia grupy znacznikowej (R).

Po rozerwaniu mostka disulfidowego, w miejsce nowopowstałych grup tiolowych przyłączano następujące odczynniki derywatyzujące: jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI), 2,4'-dibromoacetofenon (DBAF), tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (CMQT). Podstawienie w grupie karboksylowej alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA) nie wymagało wcześniejszego etapu modyfikacji pierścienia ditiolowego.

4.1. Identyfikacja otrzymanych produktów reakcji derywatywacji

Strukturę otrzymanych produktów reakcji derywatywacji potwierdzono za pomocą analizy spektralnej z zastosowaniem ^1H NMR, IR, UV oraz MS. Położenie sygnałów podano w ppm w skali δ , a stałe sprzężenia J w hercach. W opisie widm

¹H NMR użyto następujących skrótów: s – singlet, bs – szeroki singlet, d – dublet, t – tryplet, m – multiplet. W przypadku widm IR wartości liczb falowych promieniowania ν podano w jednostkach (cm⁻¹). W zamieszczonych opisach widm podano tylko wybrane sygnały.

Do reakcji wymagających bezwodnych warunków stosowano rozpuszczalniki suszone i destylowane, reakcje prowadzono w atmosferze argonu o czystości 99,999%. Postęp reakcji oraz czystość produktów kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Jako wywoływacz do płytek TLC stosowano jod.

Produkty reakcji zredukowanego kwasu liponowego z odczynnikami derywatyżującymi do analizy spektralnej uzyskano w następujący sposób: do zredukowanego kwasu liponowego dodano odpowiednią ilość poszczególnych roztworów odczynników derywatyżujących w stosunku molowym 1:2, z zastosowaniem 0,5 mola nadmiaru odpowiedniego odczynnika derywatyżującego. Pozostałe warunki przebiegu poszczególnych reakcji przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Warunki otrzymania próbek do analizy spektralnej.

Parametr	Warunki reakcji derywatyżacji grup tiolowych			
	CMPI	CMQT	DBAF	4-MBA
Środowisko reakcji derywatyżacji	zasadowe	kwasowe	zasadowe	zasadowe
Czas i temperatura reakcji derywatyżacji	20 min, 60°C	22 min, 60°C	60 min, 70°C	25 min, łaźnia lodowa
Rozpuszczalnik	deuterowany metanol	deuterowany metanol	deuterowany chloroform	deuterowany metanol

LA: ¹H NMR (CDCl₃): δ 3.58 (m, 1H), 3.16 (m, 2H), 2.47 (m, 1H), 2.38 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 1.92 (m, 1H), 1.70 (m, 4H), 1.51 (m, 2H); **IR ATR, ν_{\max} (cm⁻¹):** 2926, 2865, 1693, 1428, 668.

DHLA: ¹H NMR (CDCl₃): δ 3.74 (s, 3H), 2.89 (m, 1H), 2.67 (m, 2H), 2.34 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 1.87 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.69-1.39 (m, 6H), 1.34 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 1.30 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz); **IR ATR, ν_{\max} (cm⁻¹):** 2926, 2671, 2559, 1700, 1419;

ESI-MS 207 (m/z). HRMS obliczone dla $C_8H_{15}O_2S_2$ $[M-H]^-$ 207.0513; znalezienie 207.0519.

DHLA-DBAF: 1H NMR ($CDCl_3$): δ 7.83 (m, 4H), 7.62 (m, 4H), 3.74 (m, 4H), 3.73 (s, 3H), 2.79 (m, 1H), 2.62 (m, 2H), 2.32 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 1.82 (m, 2H), 1.66-1.35 (m, 6H); **IR ATR**, ν_{max} (cm^{-1}): 2924, 2859, 1674, 1578, 1400, 1273, 1189, 998, 758; **ESI-MS** 614 (m/z). HRMS obliczone dla $C_{25}H_{28}Br_2O_4S_2$ $[M-H]^-$ 613.9796; znalezienie 613.9821.

DHLA-CMQT: 1H NMR (MeOD): δ 7.91 (d, 2H, $J = 9.4$ Hz), 7.68 (m, 4H), 7.59 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.32 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz), 6.67 (d, 2H, $J = 9.4$ Hz), 3.74 (s, 3H), 3.60 (s, 6H), 2.90 (m, 1H), 2.66 (m, 2H), 2.30 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 1.88 (m, 2H), 1.72-1.30 (m, 6H); **IR ATR**, ν_{max} (cm^{-1}): 2924, 1715, 1639, 1575, 1453, 1034; **ESI-MS** 253 (m/z). HRMS obliczone dla $C_{29}H_{34}N_2O_2S_2^{2+}$: 506.2051, (m/z) 253.1026; znalezienie (m/z) 253.1251.

DHLA-CMPI: 1H NMR (MeOD): δ 8.30 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz), 8.21 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.44 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz), 7.26 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.81 (s, 6H), 3.74 (s, 3H), 3.04-2.81 (m, 3H), 2.20 (m, 2H), 1.90 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 1.39-1.32 (m, 4H), 1.20-1.18 (m, 2H); **IR ATR**, ν_{max} (cm^{-1}): 2925, 1723, 1652, 1569, 1462, 1013; **ESI-MS** 203 (m/z). HRMS obliczone dla $C_{21}H_{30}N_2O_2S_2^{2+}$: 406.1738, (m/z) 203.0869; znalezienie (m/z) 203.0877.

LA-4-MBA: 1H NMR (MeOD): δ 7.30 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.89 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 5.06 (bs, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.55 (m, 1H), 3.15 (m, 2H), 2.73 (m, 2H), 2.43 (m, 1H), 2.35 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 1.88 (m, 1H), 1.67 (m, 4H), 1.45 (m, 2H); **IR ATR**, ν_{max} (cm^{-1}): 1728, 1516, 1174; **EI-MS** 326 (M^+) znalezienie 326.0.

W obrazie widma 1H NMR zarejestrowanego dla kwasu liponowego występuje multiplet przy 3.58 ppm, multiplet odpowiadający intensywności dwóch protonów przy 3.16 ppm, kolejny multiplet przy 2.47 ppm, oraz tryplet o stałej sprzężenia 7.3 Hz przy 2.38 ppm jak również trzy multiplety przy 1.92, 1.70 oraz 1.51 ppm.

W wyniku przeprowadzonej reakcji redukcji kwasu liponowego rozerwaniu uległo wiązanie disiarczkowe S-S. Obecność nowych połączeń potwierdziło widmo 1H NMR

zredukowanego kwasu dihydroliponowego (DHLA), gdzie zaobserwowano tryplet o stałej sprzężenia 8.0 Hz oraz dublet o stałej sprzężenia 7.6 Hz odpowiednio przy 1.34 i 1.30 ppm. Dodatkowym potwierdzeniem uzyskanej struktury jest obecność pasma drgań rozciągających wiązań grup SH w zakresie 2671 – 2559 cm^{-1} widoczne w obrazie widma IR.

Analizując widma ^1H NMR wykonane dla związków otrzymanych w wyniku reakcji derywatyzacji kwasu liponowego z odpowiednimi odczynnikami derywatyzującymi, potwierdzono powstanie nowych produktów. W otrzymanych związkach elementem różnicującym były grupy funkcyjne związane z atomem siarki grupy tiolowej kwasu dihydroliponowego.

W obrazie widma ^1H NMR związku otrzymanego w wyniku reakcji zredukowanego kwasu liponowego z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF), zaobserwowano dwa powstałe multiplety przy 7.83 oraz 7.62 ppm o intensywności czterech protonów każdy odpowiadające protonom grupy fenylovej oraz multiplet przy 1.82 ppm. Dodatkowym potwierdzeniem uzyskania nowej pochodnej była obecność jonu molekularnego przy m/z 614 w widmie MS.

W widmie ^1H NMR produktu reakcji zredukowanego kwasu liponowego z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) pojawiły się charakterystyczne sygnały rezonansowe dla ugrupowania chinolinowego (dublet przy 7.91 ppm o intensywności 9.4 Hz, multiplet przy 7.68 ppm, dublet przy 7.59 ppm o intensywności 8.5 Hz, tryplet przy 7.32 ppm o intensywności 6.7 Hz oraz dublet przy 6.67 ppm o intensywności 9.4 Hz). Strukturę produktu potwierdzono również za pomocą spektroskopii mas. Uzyskana wartość m/z wynosiła 253.1251, a obliczona 253.1026.

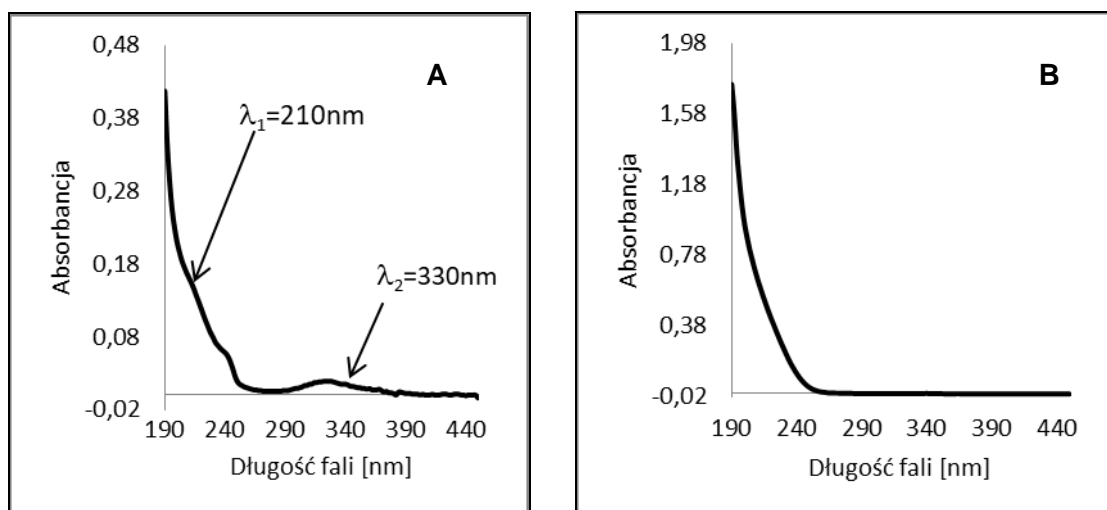
Przyłączenie ugrupowań pirydyniowych do grup tiolowych kwasu dihydroliponowego potwierdza analiza widm ^1H NMR produktu reakcji derywatyzacji z jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI). W obrazie widma występują: dublet o stałej sprzężenia 6.2 Hz przy 8.30 ppm, tryplet przy 8.21 ppm o stałej sprzężenia 7.5 Hz, dublet przy 7.44 ppm o stałej sprzężenia 8.8 Hz oraz tryplet przy 7.26 ppm o stałej sprzężenia 6.6 Hz. Dodatkowo zaobserwowano singlet przy 3.81 ppm odpowiadający protonom ugrupowania $-\text{CH}_3$. Potwierdzeniem powstania nowej cząsteczki była obecność jonu molekularnego przy m/z 203.0877 w widmie MS.

Strukturę produktu reakcji podstawienia w grupie karboksylowej kwasu liponowego alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA) potwierdza analiza widm ^1H NMR. W obrazie widma zaobserwowano powstanie dwóch dubletów o intensywności

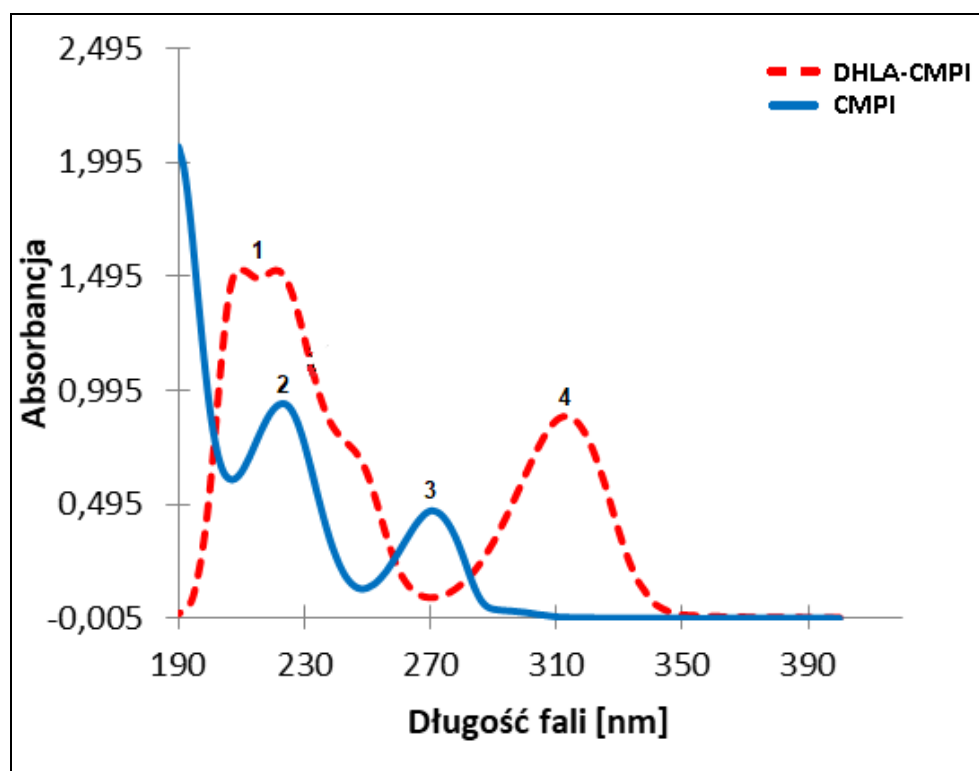
dwóch protonów przy 7.30 i 6.89 ppm o identycznej stałej sprzężenia 8.6 Hz oraz jeden szeroki singlet przy 5.06 ppm. Natomiast w widmie IR zaobserwowano, że pasmo grupy O-H (3463 cm^{-1}) pochodzące od alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA), pasmo rozciągające O-H (3444 cm^{-1}) oraz pasmo rozciągające C-O (1250 cm^{-1}) pochodzące od kwasu liponowego zanika, co świadczy o utworzeniu nowej struktury.

Przykładowe widma ^1H NMR oraz IR kwasu liponowego (LA), zredukowanego kwasu liponowego (DHLA), produktów reakcji derywatywacji z alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA), 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF), tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) oraz jodkiem 2-chloro-1-metylopirydynowym (CMPI) załączono na końcu niniejszej rozprawy w suplemencie.

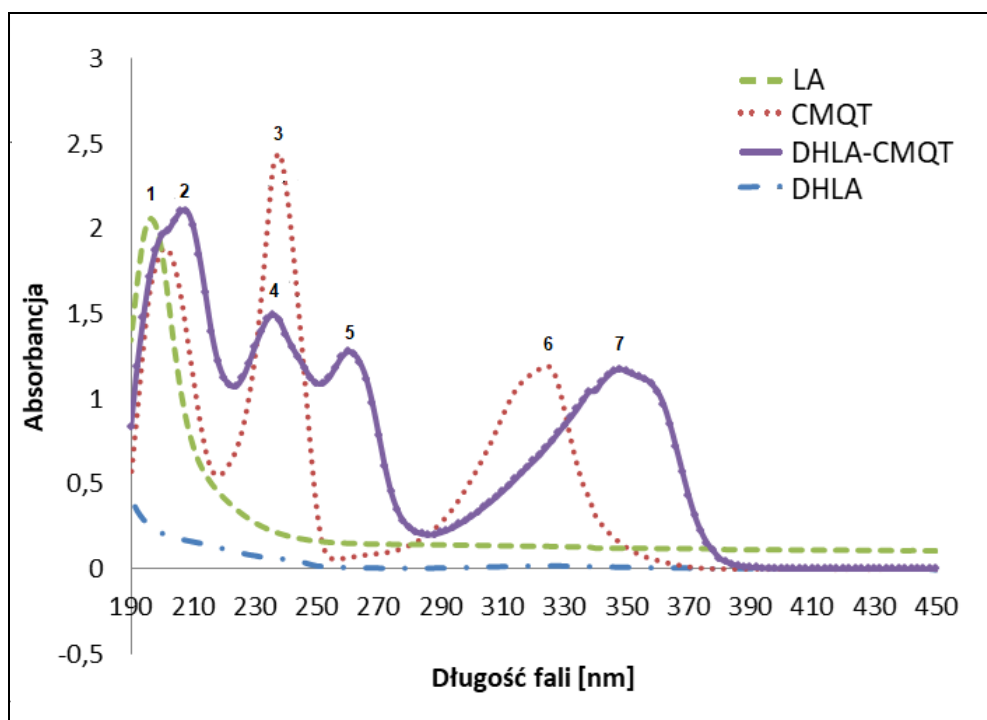
Analizę spektralną uzupełniono o widma absorpcyjne roztworów kwasu liponowego, kwasu dihydroliponowego oraz produktów reakcji derywatywacji kwasu liponowego z alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA), 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF), tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) oraz jodkiem 2-chloro-1-metylopirydynowym (CMPI). Pomiary wykonano na spektrofotometrze UV-VIS w zakresie długości fal od 190 do 440 nm. Poniżej przedstawiono widma absorpcyjne zarejestrowane dla alkoholowych roztworów kwasu liponowego o stężeniu $C = 10^{-4}\text{ mol/l}$ i kwasu dihydroliponowego o stężeniu $C = 10^{-4}\text{ mol/l}$ oraz przykładowe widmo odczynnika derywatyzującego i pochodnej uzyskanej w wyniku reakcji derywatywacji.



Rys. 19. Widma absorpcyjne zarejestrowane dla A) kwasu liponowego (LA), B) kwasu dihydroliponowego (DHLA).



Rys. 20. Widma absorpcyjne zarejestrowane dla wodnych roztworów jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) oraz produktu reakcji derywatywacji (DHLA-CMPI) o stężeniu $C = 10^{-4}$ mol/l.



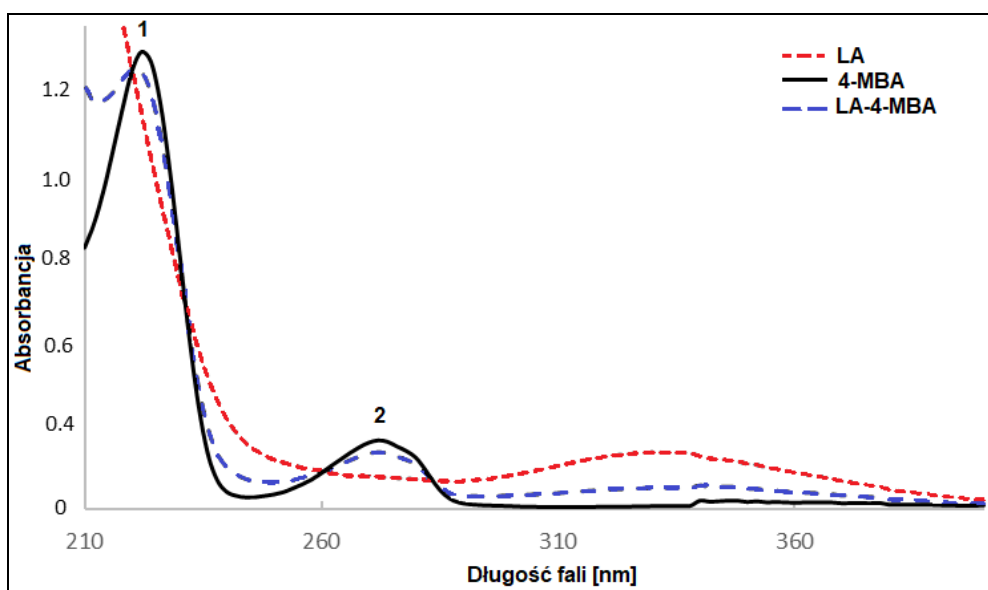
Rys. 21. Widma absorpcyjne zarejestrowane dla wodnych roztworów kwasu liponowego (LA), kwasu dihydroliponowego (DHLA), tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinolinyowego (CMQT) oraz produktu reakcji derywatywacji (DHLA-CMQT) o stężeniu $C = 10^{-4}$ mol/l.

Charakterystyczne pasma absorpcji badanych związków przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 5. Zestawienie charakterystycznych pasm absorpcji dla badanych związków.

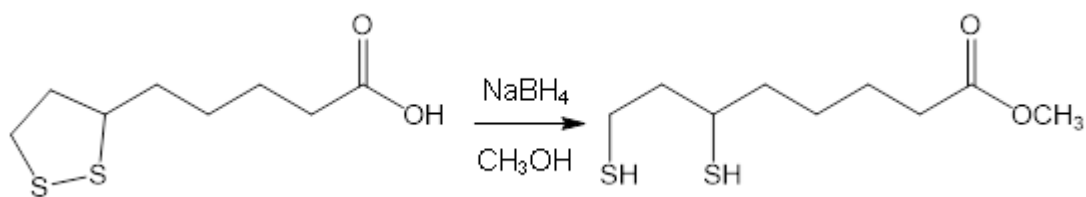
Odczynnik derywatyżujący	Charakterystyczna długość fali	
	odczynnika derywatyżującego	produktu reakcji derywatywacji
2,4'-dibromoacetofenon (DBAF) $C = 4,3 \cdot 10^{-2}$ mol/l	$\lambda_1=222\text{nm}$ $\lambda_2=260\text{nm}$	$\lambda_1=224\text{nm}$
tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinolinyowy (CMQT) $C = 10^{-4}$ mol/l	$\lambda_1=200\text{nm}$ $\lambda_2=238\text{nm}$ $\lambda_3=324\text{nm}$	$\lambda_1=348\text{nm}$
jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI) $C = 10^{-2}$ mol/l	$\lambda_1=224\text{nm}$ $\lambda_2=270\text{nm}$	$\lambda_1=210\text{nm}$ $\lambda_2=312\text{nm}$
alkohol 4-metoksybenzylowy (4-MBA) $C = 10^{-5}$ mol/l	$\lambda_1=222\text{nm}$ $\lambda_2=272\text{nm}$	$\lambda_1=220\text{nm}$ $\lambda_2=270\text{nm}$

Na podstawie zarejestrowanych widm można zauważyć, że widmo kwasu liponowego (LA) posiada dwa pasma absorpcji: słabsze przy 330 nm (λ_2) i intensywniejsze przy 210 nm (λ_1) pochodzące od grupy alifatycznej. Natomiast kwas dihydroliponowy (DHHLA) nie posiada maksimum absorpcji w zakresie bliskiego UV. Widma zarejestrowane dla produktów reakcji derywatywacji (DHHLA-DBAF, DHHLA-CMQT, DHHLA-CMPI) posiadały pasma absorpcji przesunięte w stosunku do sygnałów uzyskanych dla kwasu liponowego oraz kwasu dihydroliponowego. Dzięki temu można było wykorzystać pomiar spektrofotometryczny pasm charakterystycznych dla produktów derywatywacji do monitorowania przebiegu badanej reakcji. Widmo absorpcyjne roztworu alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) wykazuje dwa charakterystyczne pasma przy 222 nm i przy 272 nm. W wyniku analizy (LA-4-MBA) stwierdzono, że właściwości spektralne estru były identyczne z właściwościami spektralnymi alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA). Nie zaobserwowano powstania żadnych nowych pasm (rysunek 22). Dlatego zrezygnowano z monitorowania przebiegu reakcji estryfikacji za pomocą pomiarów spektrofotometrycznych. Dalsze badania prowadzono za pomocą technik chromatograficznych.



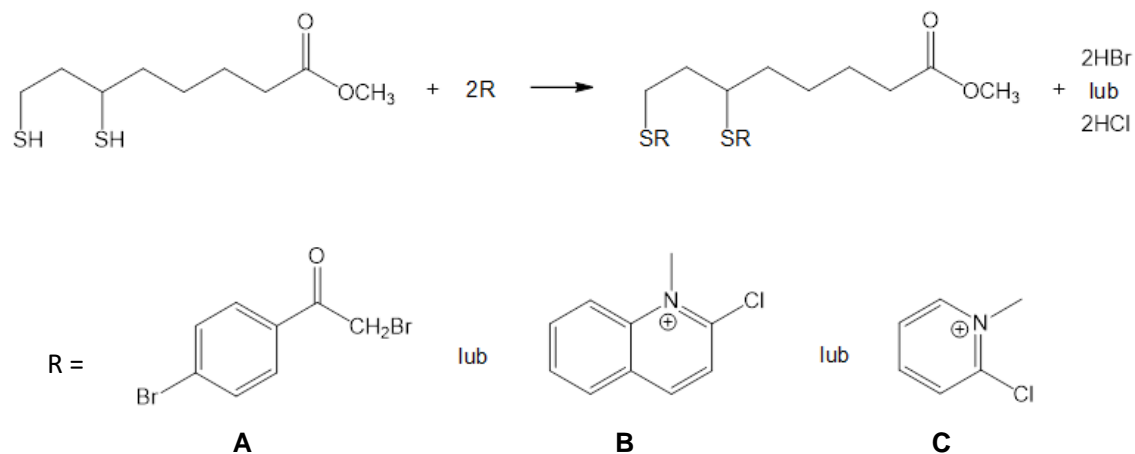
Rys. 22. Widma absorpcyjne zarejestrowane dla kwasu liponowego, alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) oraz produktu reakcji derywatywacji (LA-4-MBA) o stężeniu $C = 10^{-5}$ mol/l.

Analiza widm ^1H NMR, IR oraz MS kwasu liponowego, kwasu dihydroliponowego oraz produktów reakcji derywatywacji z alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA), 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF), tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) oraz jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI) pozwoliła stwierdzić, iż podczas reakcji redukcji w zastosowanych warunkach następowało rozerwanie wiązania disiarczkowego S-S oraz jednoczesna estryfikacja grupy karboksylowej. Podstawiona grupa metylowa pochodziła od cząsteczki alkoholu użytego jako rozpuszczalnik. Schemat reakcji przedstawiono na poniższym rysunku.



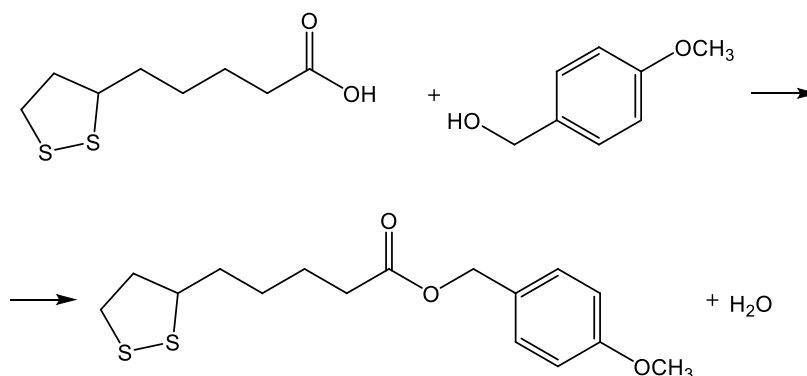
Rys. 23. Reakcja redukcji kwasu liponowego.

Na podstawie wyników analiz spektralnych zaproponowano następujący przebieg badanych reakcji derywatywacji.



Rys. 24. Schemat reakcji derywatywacji estru kwasu dihydroliponowego z A) 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF), B) tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT), C) jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI).

Reakcja kwasu liponowego z alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA) zachodziła zgodnie z poniższym schematem.



Rys. 25. Schemat reakcji derywatywacji kwasu liponowego z alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA).

4.2. Badanie przebiegu reakcji derywatywacji grupy karboksylowej

Obecność w budowie kwasu liponowego polarnej grupy hydroksylowej daje możliwość modyfikacji cząsteczki właśnie w tym miejscu. W tym rozdziale opisano podjętą próbę opracowania metody oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) jako odczynnika derywatyzującego. Należy podkreślić, iż proces ten nie wymaga wcześniejszego etapu redukcji wiązania disiarczkowego.

4.2.1. Optymalizacja i walidacja opracowanych procedur oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) jako odczynnika derywatyzującego

Jak stwierdzono w badaniach wstępnych, właściwości spektralne otrzymanego estru pochodzą od alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA). Uniemożliwia to wykorzystanie pomiarów spektrofotometrycznych do badania przebiegu reakcji oraz

optymalizacji warunków jej przebiegu. Trwałość otrzymanego estru kwasu liponowego i alkoholu 4-metoksybenzylowego (LA-4-MBA) pozwala na użycie techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem UV do monitorowania reakcji estryfikacji. Dobrano skład fazy ruchomej oraz rodzaj kolumny. W badaniach stosowano modyfikowane kolumny krzemionkowe: oktylową C-8 oraz oktadecylową C-18. Kolumny te mogą być stosowane w analizie związków niejonowych, umiarkowanie polarnych lub niepolarnych. Z danych literaturowych wynika, że w analizie kwasu liponowego najczęściej są stosowane jako fazy ruchome mieszaniny wody (z dodatkiem kwasu octowego lub trifluorooctowego) i acetonitrylu lub/i metanolu w różnych proporcjach (58,70). W celu dobrania najlepszej fazy ruchomej zarejestrowano chromatogramy roztworów metanolowych estru w różnych warunkach chromatograficznych. Wyniki zestawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Efektywność rozdziału mieszaniny poreakcyjnej kwas liponowy - alkohol 4-metoksybenzylowy (4-MBA) dla różnych faz ruchomych.

Faza ruchoma	Rodzaj kolumny	
	C-8	C-18
metanol : woda (50:50)	brak rozdziału	brak rozdziału
metanol : woda (80:20)	brak rozdziału	brak rozdziału
metanol : woda (30:70)	brak rozdziału	rozdziel pików
metanol : woda (70:30)	rozdziel pików	brak rozdziału
metanol : woda (60:40)	rozdziel pików	brak rozdziału
acetonitryl : woda (50:50)	brak rozdziału	brak rozdziału
acetonitryl : woda (20:80)	brak rozdziału	brak rozdziału
kwas mrówkowy : acetonitryl (80:20)	brak rozdziału	brak rozdziału
kwas mrówkowy : metanol (20:80)	brak rozdziału	brak rozdziału

Wyniki pokazały, że jedynie trzy z zastosowanych układów chromatograficznych: metanol:woda (30:70) i kolumna C-18; metanol:woda (70:30) i kolumna C-8 oraz metanol:woda (60:40) i kolumna C-8 pozwalały na uzyskanie rozdziału. Jednak najlepszą rozdzielczość otrzymano dla ostatniej - mieszaniny metanol:woda (60:40) jako fazy ruchomej oraz kolumny C-8 przy przepływie fazy ruchomej 1 ml/min. Dlatego też ten układ stosowano w dalszych badaniach. Optymalne warunki chromatograficznego

oznaczania kwasu liponowego w postaci estru z alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA) przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Optymalne warunki chromatograficznego oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) jako odczynnika derywatyzującego.

Faza ruchoma	metanol : woda (6:4)
Rodzaj kolumny	Supelcosil LC-8, 5 μ m, 150x4,6 mm
Rozpuszczalnik	metanol
Objętość nastrzyku	20 μ l
Temperatura	25°C
Prędkość przepływu	1 ml/min
Długość fali	230 nm
Czas analizy	10 min
Czas retencji	4,5 min

Pomiędzy grupą karboksylową kwasu liponowego i grupą hydroksylową alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) zachodzi reakcja estryfikacji. Aby proces zachodził z właściwą wydajnością niezbędne jest zastosowanie warunków beztlenowych. Konieczna jest również obecność N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) zastosowanego jako czynnika kondensującego oraz 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) użytej jako katalizatora. Produktem reakcji jest ester kwasu liponowego. Zoptymalizowano parametry, które wpływały na efektywność procesu derywatywacji takie jak: stężenie odczynnika derywatyzującego, stosunek molowy LA:odczynnik derywatyzujący, a także temperaturę i czas prowadzenia reakcji derywatywacji. W tym celu badano przebieg reakcji zmieniając jeden z parametrów przy zachowaniu stałych i optymalnych wartości pozostałych. Optymalizację prowadzono stosując roztwór kwasu liponowego o objętości 10 ml i stężeniu $C = 10^{-5}$ mol/l. Przebieg reakcji monitorowano stosując opracowaną metodę chromatografii cieczowej. Zastosowanie N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) ogranicza powstawanie kwasowych produktów ubocznych. Zbadano wpływ różnych objętości stosowanego czynnika kondensującego DCC na efektywność derywatywacji. W tym celu przygotowano serię próbek wg pkt IV.3.5. zmieniając objętość DCC w zakresie 0,5 - 2,5 ml. Następnie rejestrowano chromatogramy przygotowanych roztworów.

Stwierdzono, że największą efektywność reakcji derywatywacji uzyskuje się przy zastosowaniu 2 ml N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) o stężeniu $3,63 \cdot 10^{-1}$ mol/l. Stosowane większe objętości odczynnika kondensującego nie zwiększały wartości pola powierzchni rejestrowanego piku estru.

Ustalono stężenie użytego alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA). Sposób postępowania był analogiczny jak w wyżej opisanym eksperymencie, jednak tym razem zmieniano ilość dodawanego odczynnika derywatyżującego. Zarejestrowano chromatogramy uzyskanego produktu przy długości fali $\lambda=230$ nm. Z otrzymanych danych wynika, że największą efektywność reakcji derywatywacji uzyskuje się przy zastosowaniu 155 μ l alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) o stężeniu 10^{-4} mol/l (C końcowe = $4,96 \cdot 10^{-4}$ mol/l).

W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ czasu reakcji derywatywacji na efektywność procesu. W tym celu przygotowano serię próbek dodając zoptymalizowane wcześniej ilości odczynnika kondensującego (DCC) oraz derywatyżującego (4-MBA) modyfikując czas procesu w zakresie od 15 do 90 minut. Najwyższą wartość pola powierzchni uzyskano dla próbki, w której czas derywatywacji wynosił 25 minut, który uznano za optymalny.

Poniżej zestawiono uzyskane optymalne parametry reakcji kwasu liponowego z alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA) jako odczynnikiem derywatyżującym grupę karboksylową.

Tabela 8. Zestawienie optymalnych parametrów oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) jako odczynnika derywatyżującego.

alkohol 4-metoksybenzylowy (4-MBA)	V = 155 μ l C = 10^{-4} mol/l
N,N'-dicykloheksylokarbodiimid (DCC) [ml]	V = 2 ml C = $3,63 \cdot 10^{-1}$ mol/l
Temperatura	T = $0^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
Czas termostatowania	25 min
Rozpuszczalnik	dichlorometan

Stosując optymalne warunki chromatograficzne zarejestrowano krzywą wzorcową przygotowaną w następujący sposób: w kolbach o pojemności 10 ml sporządzono serię roztworów o stężeniach estru LA-4-MBA od 10^{-7} do 10^{-5} mol/l. Próbki uzupełniono

dichlorometanem do objętości 10 ml, a następnie zarejestrowano chromatogramy. Każdy z roztworów wzorcowych analizowano trzykrotnie. Do wyznaczenia stężenia analitu wykorzystano zależność pola powierzchni pod pikiem od stężenia estru, która była liniowa w zakresie stężeń kwasu liponowego od 10^{-7} do 10^{-5} mol/l. Wyznaczono pozostałe parametry walidacyjne takie jak granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ). Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 9.

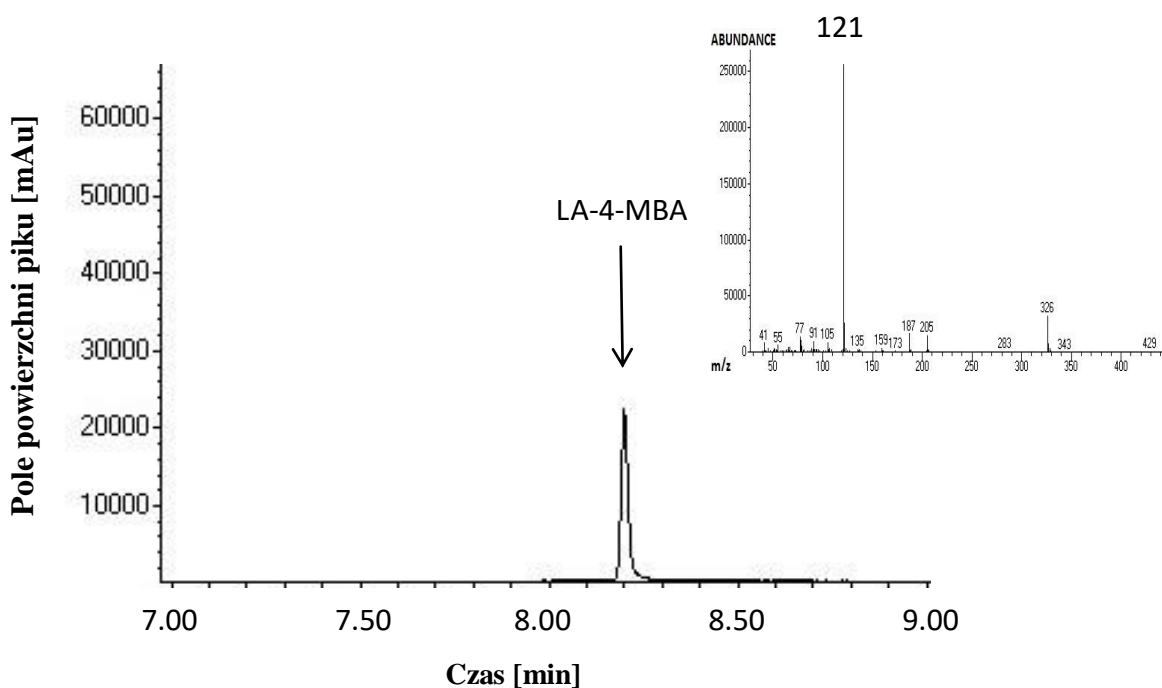
W próbkach rzeczywistych kwas liponowy występuje w bardzo niskich stężeniach. Jego zawartość w produktach pochodzenia zwierzęcego mieści się w przedziale $1,2 \cdot 10^{-9}$ - $1,1 \cdot 10^{-8}$ mol/g produktu (20). Nieco wyższe stężenia stwierdzono w produktach pochodzenia roślinnego $7,3 \cdot 10^{-9}$ - $2,4 \cdot 10^{-8}$ mol/g (44). Parametry analityczne opracowanej metody HPLC-UV opartej o reakcję tworzenia estru wskazują, że nie jest możliwe wykorzystanie jej do oznaczania kwasu liponowego w produktach roślinnych. Detektor spektrofotometryczny nie pozwala na uzyskanie niższej granicy wykrywalności (LOD). Dlatego też postanowiono wykorzystać technikę chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem mas. W tym celu zarejestrowano chromatogramy metanolowego roztworu wzorcowego czystego estru kwasu liponowego i alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) o stężeniu 5 µg/ml. Jako gaz nośny zastosowano hel o czystości 99,999%. Temperatura źródła uderzenia elektronów wynosiła 230°C przy energii elektronów 70 eV. Temperatura kwadrupola wynosiła 150°C, a temperatura linii transferowej 280°C. Temperatura pieca została zaprogramowana od 160°C, zwiększana z przyrostem 20°C/min do 320°C i utrzymywana przez 5 minut w maksymalnej temperaturze. Czas trwania analizy wynosił 13 minut, zaś czas retencji estru wynosił 8,20 minuty. Oznaczenie estru kwasu liponowego przeprowadzono za pomocą zestawu GC-MS pracującego w trybie Selected Ion Monitoring (SIM). Do oznaczeń ilościowych kwasu liponowego wybrano na podstawie widm masowych zarejestrowanych w trybie skanowania jon o m/z 121 (rysunek 26).

Stwierdzono, że zależność pola powierzchni pod pikiem od stężenia kwasu liponowego jest liniowa w zakresie stężeń 10^{-7} - $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Wyznaczono pozostałe parametry walidacyjne, które zamieszczono w tabeli 9.

Tabela 9. Parametry walidacyjne metod oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) jako odczynnika derywatyzującego.

Parametry analityczne metody	Oznaczenie HPLC-UV po reakcji derywatywacji (4-MBA)	Oznaczenie GC-MS po reakcji derywatywacji (4-MBA)
Równanie krzywej wzorcowej	$y=3 \cdot 10^9 x + 7956$	$y=9 \cdot 10^9 x - 6122$
Współczynnik determinacji	0,9943	0,9939
Zakres liniowości [mol/l]	$10^{-7} - 10^{-5}$	$10^{-7} - 1,5 \cdot 10^{-5}$
Granica oznaczalności LOQ [mol/l]	$8,60 \cdot 10^{-6}$	$2,16 \cdot 10^{-7}$
Granica wykrywalności LOD [mol/l]	$2,61 \cdot 10^{-6}$	$7,13 \cdot 10^{-8}$
Powtarzalność* [%] pole pow. pod pikiem czas retencji	0,107 % 0,720 %	0,026 0,012
Współczynnik zmienności [%] pole powierzchni pod pikiem czas retencji	10,70 7,14	2,45 1,37
Odchylenie standardowe SD	15650,13	1382,50
Względne odchylenie standardowe RSD [%]	0,802	0,106

* Powtarzalność wyznaczono dla stężenia: $C = 10^{-7}$ mol/l, $n = 10$ (oznaczenie HPLC-UV); $C = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/l, $n = 10$ (oznaczenie GC-MS).



Rys. 26. Chromatogram i widmo mas estru LA-4-MBA zarejestrowane za pomocą GC-MS w trybie skanowania.

Stwierdzono, że opracowane metody chromatograficzne były liniowe w badanych zakresach. W oparciu o wykreślone krzywe wzorcowe wyznaczono zakresy liniowości, równania regresji oraz współczynnik determinacji (R^2). Otrzymane wartości współczynników korelacji krzywych wynosiły 0,9943 oraz 0,9939. Współczynnik determinacji oznaczenia chromatograficznego HPLC-UV jest minimalnie większy (0,9943) niż w przypadku metody chromatograficznej GC-MS (0,9939). Dużo niższe wartości granicy wykrywalności i oznaczalności uzyskano dla metody oznaczania techniką GC-MS (odpowiednio $7,13 \cdot 10^{-8}$ i $2,16 \cdot 10^{-7}$ mol/l), co świadczy o wysokiej czułości metody. Powtarzalność opracowanej metody (wyrażoną jako RSD) wyznaczano poprzez przeprowadzenie serii analiz składających się z 10 powtórzeń badań roztworów o stężeniach $C = 10^{-7}$ mol/l (oznaczenie HPLC-UV) oraz $C = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/l (oznaczenie GC-MS). Stwierdzono, że w przypadku zastosowania metody GC-MS wartość RSD była niższa niż w przypadku zastosowania HPLC-UV i wynosiły odpowiednio 0,106% i 0,802%.

Podjęto próbę oznaczenia analitu w próbkach produktów spożywczych oraz w suplementach diety.

4.2.2. Przydatność analityczna nowo opracowanych metod

W zastosowanych technikach chromatograficznych uzyskano niskie granice wykrywalności i oznaczalności, co stworzyło możliwość oznaczenia kwasu liponowego w próbkach produktów spożywczych oraz w suplementach diety. Produkty spożywcze oraz suplementy diety, poza nielicznymi wyjątkami stanowią zbiór niejednorodnych substancji chemicznych, co w konsekwencji powoduje trudności związane z oznaczeniem pojedynczych składników. W ramach prowadzonych badań podjęto próbę zastosowania opracowanych metod do badania zawartości kwasu liponowego w tych produktach stosując zoptymalizowane wcześniej procedury oznaczania. Zawartość analitu oznaczano metodą dodatku wzorca. Badano takie produkty jak: ziemniaki, brokuły, błonnik jabłkowy, młody jęczmień oraz dwa gatunki piwa. Przed przystąpieniem do właściwych badań, niektóre próbki należało przygotować zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale IV.1.4.1. Stosując tę samą procedurę, równolegle przygotowano próbki wzbogacane z dodatkiem 10 µl kwasu liponowego o stężeniu $C = 10^{-5}$ mol/l. Tak przygotowane próbki rozpuszczono w 5 ml dichlorometanu i poddano analizie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV lub w 5 ml metanolu i analizowano techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Praktyczną użyteczność opracowanej metody GC-MS oznaczania zawartości kwasu liponowego potwierdzono również poprzez badanie zawartości analitu w próbce suplementu diety. Próbki suplementu diety *Revitanerw* (deklarowana zawartość kwasu liponowego: 300 mg/kapsułka) przygotowano zgodnie z pkt IV.1.4.1. oraz IV.3.5. Suchą pozostałość wstępnie przygotowanych próbek rozpuszczono w 5 ml metanolu i analizowano techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Uzyskane wyniki zawartości kwasu liponowego przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Wyniki oznaczenia zawartości kwasu liponowego w wybranych próbkach środków spożywczych i suplementie diety.

Matryca	Technika oznaczania	Oznaczona zawartość kwasu liponowego		Odzysk [%]	Wartość literaturowa [µg/g]	Literatura	
		[mol/l] n=3	[µg/g] n=3				
Piwo Krasna Jędrza	HPLC-UV	<LOD	<LOD	90,40	-	-	
Piwo Wesole ziele	HPLC-UV	<LOD	<LOD	99,68	-	-	
Blonnik jablkowy	HPLC-UV	<LOD	<LOD	104,13	-	-	
Mlody jęczmień	HPLC-UV	<LOD	<LOD	84,41	-	-	
Ziemniak surowy	HPLC-UV	<LOD	<LOD	105,52	1,5-4,2	(146)	
Ziemniak surowy	GC-MS	$7,82 \cdot 10^{-6} \pm 2 \cdot 10^{-8}$	1,56±0,12	91,60	1,5-4,2	(146)	
Brokuł	GC-MS	$1,50 \cdot 10^{-6} \pm 2 \cdot 10^{-8}$	0,30±0,01	95,15	<1,0	(2)	
Matryca	Technika oznaczania	Zawartość kwasu liponowego [mg]					Zgodność z zawartością deklarowaną [%]
		oznaczona	SD	RSD [%]	średni błąd oznaczenia [%]	deklarowana	
Suplement diety Revitanerw	GC-MS	275,34	7,5	2,72	2,99	300	99,09

<LOD – wartość poniżej granicy wykrywalności

W przypadku zastosowania techniki HPLC do oznaczania zawartości kwasu liponowego (LA) w badanych próbkach uzyskano wyniki poniżej granicy wykrywalności metody ($LOD = 2,61 \cdot 10^{-6}$ mol/l). Na podstawie wyników uzyskanych z badań z zastosowaniem techniki GC-MS można stwierdzić, że kwas liponowy jest naturalnym składnikiem każdej badanej próbki, występującym w bardzo niewielkiej ilości. Dostępna literatura nie dostarcza informacji nt. badań, a tym samym ilości kwasu liponowego zawartego w produktach spożywczych pochodzących z terenu Polski. Dane literaturowe dotyczące zawartości kwasu liponowego w warzywach: ziemniakach, brokułach pochodzą z badań prowadzonych w innych krajach niż Polska, dlatego w analizie wyników mogą występować rozbieżności. Uzyskana doświadczalnie zawartość kwasu liponowego w próbce ziemniaków wynosi 1,56 µg/g, natomiast wartość literaturowa 1,5 - 4,2 µg/g (146). Zaś w próbce brokułów uzyskana zawartość kwasu liponowego wynosi 0,30 µg/g, natomiast wartość literaturowa - poniżej 1,0 µg/g. Należy

też pamiętać, że w przypadku analizy żywności wpływ na zawartość oznaczanego analitu może mieć odmienna partia produktu, długość czasu przechowywania, a także warunki środowiskowe i klimatyczne rejonu, z którego pochodzą składniki środków spożywczych.

Na podstawie otrzymanych wyników analizy suplementu diety techniką GC-MS stwierdzono, że w badanej próbce uzyskano wyniki zbliżone do wartości deklarowanej przez producenta badanego suplementu (99,09%). Uzyskane wyniki cechowały się dobrą powtarzalnością.

Grupa karboksylowa kwasu liponowego jest grupą mało reaktywną, co potwierdzają dane literaturowe. Niewiele jest prac opisujących metody derywatywacji grupy $-COOH$. Mimo, że proces derywatywacji nie wymagał wcześniejszego etapu redukcji wiązania disiarczkowego, modyfikacja cząsteczki była bardzo trudna do przeprowadzenia. Na przebieg tego procesu, wpływało wiele czynników. Między innymi utrzymanie bezwodnego środowiska reakcji, ze względu na zachodzący proces hydrolizy cząsteczki. Dodatkową trudność stwarzała konkurencyjna reakcja estryfikacji zachodząca między kwasem liponowym a stosowanym rozpuszczalnikiem. Ze względu na uciążliwość związane z przebiegiem reakcji derywatywacji grupy karboksylowej, podjęto próbę zastosowania, do tej pory nie wykorzystywanych odczynników derywatywujących grupy tiolowe, obecne w zredukowanej formie kwasu liponowego.

4.3. Badanie przebiegu reakcji derywatywacji grup tiolowych

4.3.1. Optymalizacja reakcji redukcji wiązania disiarczkowego S-S

Do zredukowania wiązań ditiolowych wykorzystano silny reduktor jakim jest borowodorek sodu ($NaBH_4$). Na przebieg reakcji redukcji wpływa szereg czynników takich jak: środowisko reakcji, ilość dodanego odczynnika redukującego i czas. W celu dobrania najlepszych warunków redukcji przeprowadzono serię eksperymentów zmieniając badany parametr a zachowując stałe wartości pozostałych.

Optymalizując poszczególne parametry brano pod uwagę wartość zmiany absorbancji. Wpływ środowiska reakcji redukcji sprawdzono stosując bufor EDTA/NaOH/NaCl o pH 8,5; 9,0; 9,5 oraz 10,0. Ilość dodanego reduktora zmieniano dodając różne objętości (50 - 300 μ l) borowodoru sodu ($NaBH_4$) o stężeniu $C = 0,3$ mol/l. Optymalny czas reakcji redukcji dobrano sprawdzając długość

czasu ogrzewania w zakresie 0 – 20 minut. Pomiar absorpcji w poszczególnych eksperymentach wykonano przy długości fali $\lambda=330$ nm, ponieważ przy tej długości fali rejestrowano pasmo absorpcji dla kwasu liponowego, natomiast kwas dihydroliponowy (DHLA) nie posiada żadnego charakterystycznego pasma absorpcji w zakresie UV.

Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że reakcja redukcji wiązania disiarczkowego zachodzi w środowisku o pH 9,5 w temperaturze 60°C. Po 13 minutach stwierdzono całkowitą konwersję kwasu liponowego w kwas dihydroliponowy. Do dalszych badań stosowano objętość 250 μ l roztworu borowodoru sodu (NaBH_4) o stężeniu $C = 0,3$ mol/l. W celu usunięcia nadmiaru użytego reduktora stosowano 150 μ l roztworu kwasu solnego (HCl) o stężeniu $C = 2$ mol/l oraz 3 ml wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) o stężeniu $C = 5\%$. Nadmiar nieprzereagowanego kwasu solnego zobojętniano wodorotlenkiem sodu (NaOH) o stężeniu $C = 0,2$ mol/l. W celu optymalizacji ilości dodawanego roztworu wodorotlenku sodu przygotowano serię próbek postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. IV.3.2. Modyfikowano objętość dodawanego wodorotlenku sodu (NaOH) o stężeniu $C = 0,2$ mol/l w zakresie od 20 do 200 μ l. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dodatek 40 μ l wodorotlenku sodu wystarcza do zobojętnienia nadmiaru użytego kwasu solnego (HCl).

4.3.2. Optymalizacja procesu derywatywacji grup tiolowych

W następnym etapie badań, zredukowany kwas liponowy poddano reakcji derywatywacji nowymi, do tej pory nie wykorzystywanymi w analizie kwasu liponowego, odczynnikami. Sprawdzono przydatność wykorzystania jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI), tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinoliowego (CMQT) oraz 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF). Badania przebiegu reakcji z wymienionymi odczynnikami prowadzono spektrofotometrycznie.

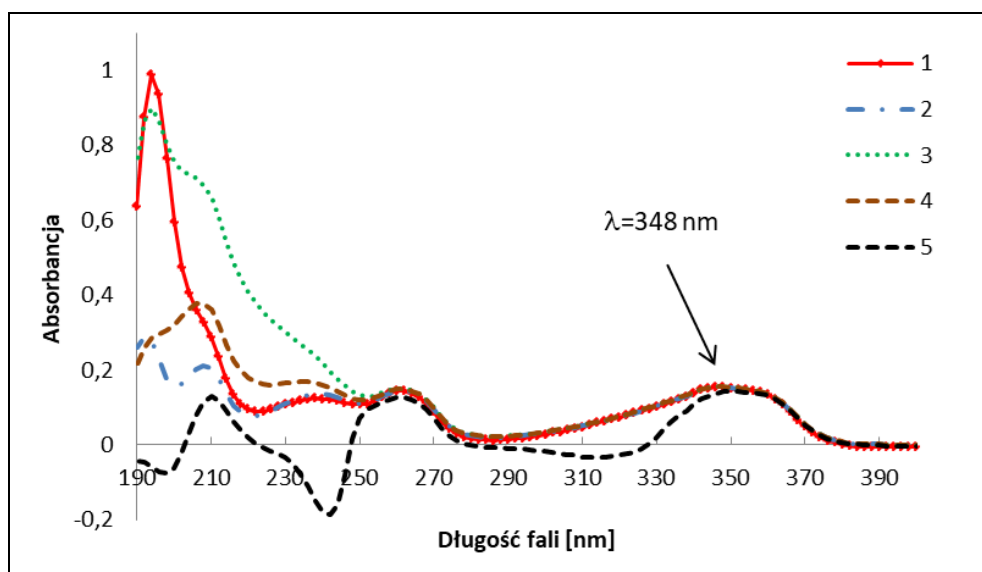
W analizie spektrofotometrycznej bardzo duże znaczenie ma odnośnik/roztwór odniesienia, ponieważ właściwie dobrany umożliwia usunięcie wpływu czynników przeszkadzających. Dobór właściwego składu roztworu odniesienia sprawdzono dla reakcji derywatywacji zredukowanego kwasu liponowego ze wszystkimi badanymi odczynnikami derywatyżującymi. Wyniki przedstawione poniżej dotyczą badania reakcji derywatywacji zredukowanego kwasu liponowego z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinoliowym (CMQT). Aby dobrać właściwy odnośnik

przygotowano próbkę oraz zestawy roztworów odniesienia o różnym składzie. Próbkę zawierającą kwas liponowy przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt. IV.3.3. Kolejno przygotowano roztwory odnośników według danych zawartych w tabeli 11. Wszystkie próbki dopełniono do objętości 10 ml wodą redestylowaną i wykonano pomiary absorbancji.

Tabela 11. Skład analizowanych roztworów odniesienia sprawdzanych dla reakcji derywatazacji zredukowanego kwasu liponowego z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT).

	Skład roztworu odniesienia	Ogrzewanie	Po ochłodzeniu
1.	1 ml buforu 5 mmol EDTA/NaOH, 0,9 % NaCl	-	-
2.	1 ml buforu 5 mmol EDTA/NaOH, 0,9 % NaCl, 66,8 µl NaBH ₄ (0,075 mol/l)	T=60°C, t=22 min	-
3.	1 ml buforu 5 mmol EDTA/NaOH, 0,9 % NaCl, 66,8 µl NaBH ₄ (0,075 mol/l)	T=60°C, t=22 min	66,8 µl HCl (0,5 mol/l)
4.	1 ml buforu 5 mmol EDTA/NaOH, 0,9 % NaCl, 66,8 µl NaBH ₄ (0,075 mol/l)	T=60°C, t=22 min	66,8 µl HCl (0,5 mol/l), 85 µl NaHCO ₃ (6%)
5.	1 ml buforu 5 mmol EDTA/NaOH, 0,9 % NaCl, 66,8 µl NaBH ₄ (0,075 mol/l)	T=60°C, t=22 min	66,8 µl HCl (0,5 mol/l), 85 µl NaHCO ₃ (6%), 50 µl CMQT (C=10 ⁻³ mol/l)

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że skład oraz sposób przygotowania odnośnika znacząco wpływa na intensywność pasma absorpcji co przedstawiono na poniższym rysunku (numery uzyskanych widm odpowiadają odnośnikom zawartym w powyższej tabeli).



Rys. 27. Widma absorpcji produktu deprotywacji kwasu liponowego z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) w zależności od zastosowanego odczynnika. Skład analizowanych roztworów odniesienia zamieszczono w tabeli 11.

Interferencje spowodowane nadmiarem odczynnika derywatyizującego tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) udało się usunąć poprzez zastosowanie odczynnika oznaczonego nr 5.

W podobny sposób przygotowano roztwór ślepej próby w przypadku badania przebiegu pozostałych reakcji derywatyizacji zredukowanego kwasu liponowego z jodkiem 2-chloro-1-metylopirydynowym (CMPI) oraz z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF).

W celu ustalenia optymalnych parametrów reakcji derywatyizacji sprawdzono wpływ objętości i stężenia dodawanego odczynnika derywatyizującego na przebieg procesu. Określono stosunek molowy reagentów kwas liponowy : odczynnik derywatyizujący, a także czas i temperaturę procesu oraz pH reakcji.

W celu ustalenia optymalnej ilości dodawanych odczynników derywatyizujących przeprowadzono reakcję kwasu dihydroliponowego ze zmiennymi objętościami roztworu derywatyizującego o stężeniu początkowym 10^{-2} mol/l dla jodku 2-chloro-1-metylopirydynowego (CMPI) i tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) oraz $4,3 \cdot 10^{-2}$ mol/l dla 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF) (tabela 12).

Tabela 12. Ilości użytych odczynników derywatyzujących.

Odczynnik derywatyzujący	C _{pocz.} odcz. der. [mol/l]	Długość fali [nm]	Badany zakres V [μl]	Optymalne wartości		Nadmiar odcz. der.
				V [μl]	C [mol/l]	
jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI)	10 ⁻²	312	300-1800	500	10 ⁻²	1:5
tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy (CMQT)	10 ⁻²	348	50-500	50	10 ⁻²	1:5
2,4'-dibromoacetofenon (DBAF)	4,3·10 ⁻²	224	10-1000	500	4,3·10 ⁻²	1:5

Próbki przygotowano zgodnie z procedurami opisanymi w pkt. IV.3. Kolejno zarejestrowano widma absorpcyjne w zakresie UV.

Z uzyskanych wartości absorbancji wynika, że dodatek 0,5 ml jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) o stężeniu $C = 10^{-2}$ mol/l jest wystarczający do przeprowadzenia reakcji derywatywacji. Dodatek większej ilości nie wpływał znacząco na wzrost wartości absorbancji. Powyżej 5-krotnego nadmiaru reagenta obserwowano ustalenie się plateau. W związku z powyższym w dalszych badaniach stosowano objętość 0,5 ml jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI). W przypadku zastosowania 2,4'-dibromoacetofenu (DBAF) stwierdzono, że najwyższą wartość absorbancji zarejestrowano dla dodatku 0,5 ml o stężeniu $C = 4,3 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy (CMQT) reaguje z kwasem liponowym w stosunku molowym 2:1. Powyżej 3-krotnego nadmiaru reagenta obserwowano ustalenie się plateau. Zastosowanie 5-krotnego nadmiaru odczynnika derywatyzującego w stosunku do kwasu liponowego było wystarczające do zarejestrowania maksymalnej wartości absorbancji.

Kolejnym etapem optymalizacji było zbadanie wpływu temperatury oraz czasu reakcji na wydajność procesu derywatywacji. Przygotowano serię roztworów postępując wg procedur opisanych w pkt IV.3. Temperaturę zmieniano w zakresie od 0°C do 90°C przy zachowaniu stałych wartości pozostałych parametrów. W celu sprawdzenia wpływu czasu reakcji na wydajność derywatywacji przygotowano serię roztworów postępując w taki sam sposób jak podczas optymalizacji temperatury zmieniając czas w przedziale od 0 do 90 minut. Wszystkie pozostałe parametry nie uległy zmianie. Otrzymane wartości umieszczono w tabeli 13.

Tabela 13. Temperatura i czas ogrzewania podczas reakcji derywatywacji.

Odczynnik derywatyzujący	Badany zakres		Długość fali [nm]	Optymalne wartości	
	[min]	[°C]		[min]	[°C]
jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI)	0-20	0-90	312	5	60
2,4'-dibromoacetofenon (DBAF)	15-90		224	60	70
tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (CMQT)	0-32		348	22	60

Na podstawie powyższych danych stwierdzono, że dla każdego z zastosowanych odczynników derywatyzujących czas ogrzewania podczas reakcji derywatywacji był inny. W przypadku użycia jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) wynosił 5 minut w temperaturze 60°C. Podczas derywatywacji z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) etap ten należało wydłużyć do 22 minut przy zastosowaniu takiej samej temperatury. Najdłuższego czasu (60 minut) wymagał proces derywatywacji z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF). Zaobserwowano, że w przypadku reakcji derywatywacji z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF) lepszą wydajność procesu uzyskano podnosząc temperaturę do 70°C. Uzyskane wartości uznano za optymalne i stosowano w dalszych badaniach.

Na przebieg reakcji ma wpływ stężenie jonów wodorowych. W celu sprawdzenia wpływu środowiska na wydajność reakcji derywatywacji zoptymalizowano ilość dodawanego roztworu kwasu solnego (HCl) o stężeniu $C = 2 \text{ mol/l}$, roztworu wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) o stężeniu $C = 5\%$ oraz roztworu wodorotlenku sodu (NaOH) o stężeniu $C = 1 \text{ mol/l}$. Przygotowano serię próbek zgodnie z procedurą opisaną w pkt. IV.3. pH badano w zakresie 4,5 – 10,0 dla wszystkich układów redukcyjnych. Uzyskane pH mierzono przy pomocy pH-metru. Po ustaleniu środowiska do każdej próbki dodano odpowiedniego odczynnika derywatyzującego. Zarejestrowano widma absorpcyjne w zakresie UV.

Tabela 14. Wpływ środowiska reakcji na wydajność procesu derywatywacji.

Odczynnik derywatyzujący	Badany zakres pH	Długość fali [nm]	Optymalne środowisko
jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI)	4,5-10,0	312	8,0
2,4'-dibromoacetofenon (DBAF)		224	8,0
tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (CMQT)		348	6,0

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że najwyższą wartość absorbancji produktu reakcji derywatywacji kwasu liponowego z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) uzyskano doprowadzając środowisko reakcji do pH 6,0. Natomiast najwyższą wartość absorbancji produktu reakcji derywatywacji z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) oraz 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF) jako odczynnika derywatyzującego zarejestrowano w środowisku reakcji pH 8,0 (tabela 14). Wyniki te znajdują potwierdzenie w literaturze (169).

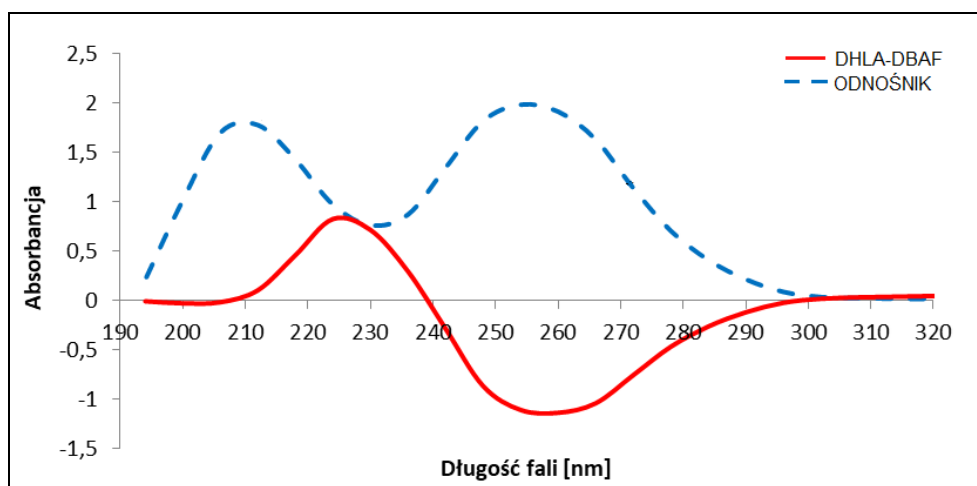
4.3.3. Porównanie warunków przebiegu reakcji derywatywacji opracowanych metod

W tabeli 15 przedstawiono optymalne wartości parametrów przebiegu reakcji derywatywacji kwasu liponowego z zastosowaniem odczynników derywatyzujących grupę tiolową po wcześniejszej redukcji wiązania S-S.

Tabela 15. Porównanie warunków przebiegu reakcji redukcji oraz reakcji derywatywacji kwasu liponowego.

Parametr	Reakcja redukcji wiązania disiarczowego S-S		
Objętość i stężenie reduktora NaBH ₄	V = 250 μl C = 0,3 mol/l		
Temperatura i czas reakcji redukcji	T = 60°C, t = 13 min		
Środowisko reakcji redukcji	pH 9,5		
	Reakcja derywatywacji grup tiolowych po otwarciu pierścienia		
	CMPI	CMQT	DBAF
Objętość i stężenie dodanego odczynnika derywatyzującego	V = 500 μl C = 10 ⁻² mol/l	V = 50 μl C = 10 ⁻² mol/l	V = 500 μl C = 4,3·10 ⁻² mol/l
Nadmiar odczynnika derywatyzującego	1:5	1:5	1:5
Czas i temperatura reakcji derywatywacji	5 min, 60°C	22 min, 60°C	60 min, 70°C
Środowisko reakcji derywatywacji	pH 8,0	pH 6,0	pH 8,0

Produkty reakcji grup tiolowych (po wcześniejszej redukcji wiązania disiarczowego) z jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI) oraz tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinoliowym (CMQT) były trwałe. Cechowały się lepszymi właściwościami spektralnymi i chromatograficznymi, co pozwala na wykorzystanie ich w analizie kwasu liponowego. W związku z powyższym mogły stać się podstawą opracowania spektrofotometrycznych i chromatograficznych metod oznaczania kwasu liponowego. Zauważono, że w przypadku zastosowania 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF) jako odczynnika derywatyzującego rejestrowano wysoką wartość absorpcji odnośnika przy $\lambda=260$ nm (rysunek 28), która była wynikiem obecności nieprzereagowanego 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF). W związku z tym zrezygnowano z opracowania spektrofotometrycznej metody oznaczania kwasu liponowego z użyciem 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF) jako odczynnika derywatyzującego. Natomiast podjęto próbę oceny przydatności pochodnej DHLA-DBAF w analizie chromatograficznej techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).



Rys. 28. Widmo absorpcji produktu reakcji estru kwasu dihydroliponowego z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF) względem odośnika oraz roztworu odośnika względem wody.

4.3.4. Walidacja opracowanych procedur spektrofotometrycznego oznaczania zawartości kwasu liponowego po zastosowaniu derywatywacji grup tiolowych

Otrzymane pochodne pirydyniowe i chinolinowe kwasu liponowego postanowiono wykorzystać do opracowania spektrofotometrycznych metod oznaczania tego związku. W związku z tym zarejestrowano krzywe wzorcowe stosując optymalne warunki przebiegu reakcji derywatywacji. W tym celu przygotowano dwie serie roztworów kwasu liponowego o stężeniach od $5 \cdot 10^{-6}$ do 10^{-4} mol/l dla CMPI oraz od 10^{-6} do 10^{-5} mol/l dla CMQT. Każdą serię poddano reakcji derywatywacji w optymalnych, wyznaczonych warunkach stosując odpowiedni odczynnik derywatywujący: jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI) lub tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy (CMQT). Wyznaczono granicę wykrywalności i oznaczalności oraz określono precyzję i powtarzalność metod wyrażoną jako względne odchylenie standardowe. W celu określenia powtarzalności metody przygotowano serię 10 roztworów o jednakowym stężeniu. Na podstawie zarejestrowanych wartości absorbancji wyznaczono odchylenie standardowe oraz względne odchylenie standardowe. Podstawowe parametry walidacyjne wyznaczone zgodnie z wzorami podanymi w rozdziale IV.2. przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 16. Parametry walidacyjne spektrofotometrycznych metod oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) oraz tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinoliowego (CMQT) jako odczynnika derywatyzującego.

Parametry analityczne metody	Oznaczenie spektrofotometryczne	
	po reakcji derywatywacji CMPI ($\lambda=312\text{nm}$)	po reakcji derywatywacji CMQT ($\lambda=348\text{ nm}$)
Równanie krzywej wzorcowej	$y=1,8 \cdot 10^4 x - 0,0094$	$y=1,5 \cdot 10^4 x + 0,0040$
Współczynnik determinacji	0,9999	0,9999
Zakres liniowości [mol/l]	$5 \cdot 10^{-6} - 10^{-4}$	$10^{-6} - 10^{-5}$
Granica oznaczalności LOQ [mol/l]	$1,17 \cdot 10^{-6}$	$7,84 \cdot 10^{-7}$
Granica wykrywalności LOD [mol/l]	$3,60 \cdot 10^{-7}$	$2,58 \cdot 10^{-7}$
Powtarzalność*	0,012	0,030
Współczynnik zmienności [%]	1,2	3,0
Odchylenie standardowe SD	0,0048	0,0012
Względne odchylenie standardowe RSD [%]	1,1	1,4

* Powtarzalność wyznaczono dla stężenia $C = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $n = 10$ (CMPI), $C = 5 \cdot 10^{-6}$ mol/l, $n = 10$ (CMQT).

Obie metody charakteryzowały się dobrą liniowością, o czym świadczą współczynniki determinacji krzywych wzorcowych wynoszące 0,9999. Obie wyżej omówione metody oznaczania z zastosowaniem związków chinolinowych jako odczynników derywatyzujących posiadają porównywalną wartość granicy wykrywalności i oznaczalności. Nieco niższą granicę wykrywalności i oznaczalności (odpowiednio $2,58 \cdot 10^{-7}$ i $7,84 \cdot 10^{-7}$ mol/l) charakteryzuje się metoda z zastosowaniem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinoliowego (CMQT) jako odczynnika derywatyzującego.

Jednak lepszą powtarzalnością charakteryzowała się procedura wykorzystująca jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI) jako odczynnik derywatyzujący. Dodatkowym jego atutem jest to, że nie trzeba generować go w laboratorium co ma miejsce w przypadku tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinoliowego (CMQT), gdyż

jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI) jest dostępny handlowo w formie gotowej do użycia.

4.3.5. Przydatność analityczna nowo opracowanych metod

Opracowane spektrofotometryczne metody oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem pochodnej chinolinowej (CMQT) i pirydyniowej (CMPI) jako odczynników derwatyzujących wykorzystano do oznaczenia badanego związku w kapsułkach suplementu diety *Revitanerw*. Badania te miały na celu sprawdzenie praktycznej przydatności opracowanych metod do oznaczania kwasu liponowego w preparatach farmaceutycznych, które zawierają dokładnie znaną ilość substancji oznaczanej. W tym celu przygotowano trzy równoległe próbki o tych samych stężeniach i na podstawie równania krzywej wzorcowej obliczono zawartość kwasu liponowego w badanym preparacie. Ślepą próbę stanowiła użyta w oznaczeniach mieszanina reagentów bez próbki suplementu przygotowana w identyczny sposób jak próbki suplementu. Uzyskane wyniki zestawiono w poniższej tabeli.

Tabela 17. Wyniki oznaczenia zawartości kwasu liponowego metodą spektrofotometryczną w próbkach suplementu diety *Revitanerw*.

Technika oznaczania	Abs n=3	SD	RSD [%]	Średni błąd oznaczenia [%]	Zawartość kwasu liponowego [mg]		Zgodność z wartością deklarowaną [%]
					oznaczona	deklarowana	
CMQT ($\lambda=348$ nm)	0,960	0,20	0,21	2,5	300,74	300	100,25
CMPI ($\lambda=312$ nm)	1,289	0,60	0,47	6,6	302,00		100,67

W tabeli 17 przedstawiono wyniki spektrofotometrycznego oznaczania kwasu liponowego w kapsułkach suplementu diety *Revitanerw*. Wskazują one, że zaproponowane metody są precyzyjne i dokładne, o czym świadczy niewielki średni błąd oznaczenia (poniżej 1%). Zaobserwowano dużą zgodność wyników z wartością deklarowaną przez producentów (100,25% oraz 100,67%). Wyniki uzyskane dla wszystkich nowo opracowanych procedur, cechowały się dobrą powtarzalnością, o czym świadczy obliczona wartość względnego odchylenia standardowego 0,21% oraz 0,47%.

Obecne w preparatach dodatkowe składniki tj. kwas linolenowy, witamina E, niacyna, kwas pantotenowy, witamina B₆, maltodekstryna oraz substancje dodatkowe: przeciwzbrylające i barwiące znajdują się w mniejszej ilości w stosunku do kwasu liponowego. W celu eliminacji ewentualnych zakłóceń powodowanych przez wyżej wymienione składniki, otrzymane próbki suplementu przesączano przez sącdek bibułowy.

Podsumowując powyższe dane można stwierdzić, że do oznaczenia kwasu liponowego w suplemencie diety można zastosować nowoopracowane metody spektrofotometryczne, w których wykorzystano CMPI oraz CMQT jako odczynniki derywatyzujące. Metody te odznaczają się dobrą powtarzalnością oraz dokładnością oznaczenia analitu w analizowanych próbkach. Zakres liniowości oraz granice oznaczalności i wykrywalności są wystarczające do zarejestrowania sygnałów pochodzących od badanego analitu w suplementach diety.

4.3.6. Optymalizacja parametrów chromatograficznego oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem derywatyzacji grup tiolowych

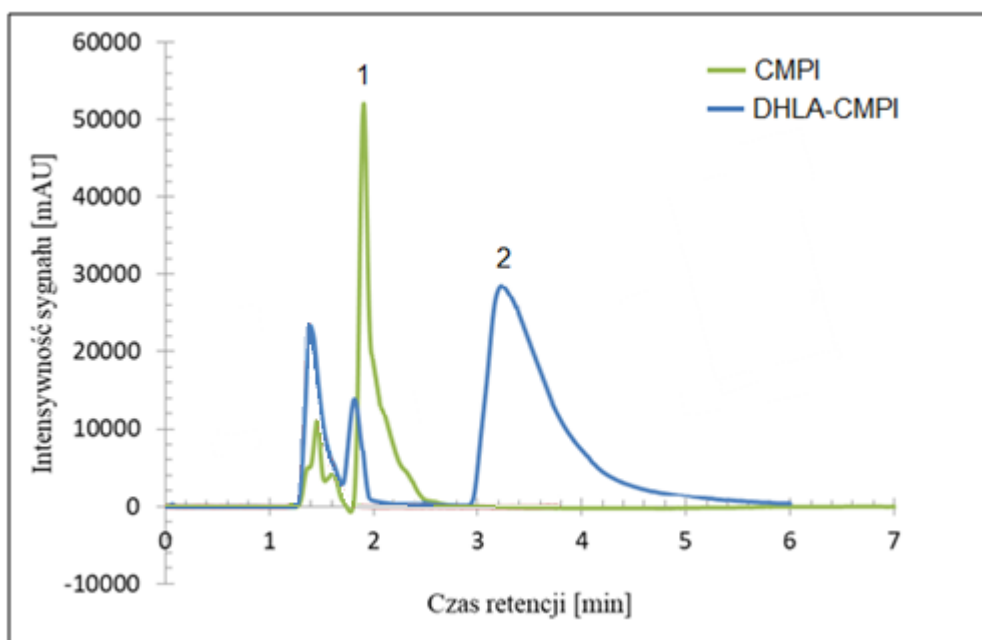
Trwałe produkty uzyskane w wyniku reakcji derywatyzacji kwasu dihydroliponowego z odczynnikiem derywatyzującym: jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI), tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinoliowym (CMQT), 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF) stały się podstawą wykorzystania tych odczynników do przedkolumnowej modyfikacji cząsteczki kwasu liponowego w oznaczeniu techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją w nadfiolecie (UV). Przeprowadzono optymalizację następujących parametrów: skład i pH fazy ruchomej, rodzaj kolumny oraz rodzaj użytego rozpuszczalnika do końcowego rozpuszczenia próbki.

Doboru składu fazy ruchomej oraz rodzaju kolumny dokonano biorąc pod uwagę rozpuszczalność pochodnej kwasu liponowego oraz stopnia rozdziału piku otrzymanej pochodnej i pozostałości reagentów (215–217). W badaniach stosowano kolumny krzemionkowe modyfikowane grupami: oktylową C-8 oraz oktadecylową C-18. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min. Zarejestrowano chromatogramy, a uzyskane wyniki przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 18. Efektywność rozdzielania mieszaniny poreakcyjnej ester kwasu dihydroliponowego – odczynnik derywatyzujący (CMPI, CMQT, DBAF) dla różnych faz ruchomych.

Faza ruchoma	Rodzaj kolumny	
	C-8	C-18
jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI)		
kwasy trichlorooctowy : acetonitryl (95:5), (60:40)	brak rozdzielania	brak rozdzielania
kwasy trichlorooctowy : woda (50:50)	brak rozdzielania	brak rozdzielania
wodorofosforan (V) disodu: acetonitryl : metanol (50:30:20) (pH 2,7)	rozdzielanie pików	brak rozdzielania
wodorofosforan (V) disodu: acetonitryl (55:45) (pH 2,5), (pH 3,0)	rozdzielanie pików	brak rozdzielania
wodorofosforan (V) disodu: acetonitryl (65:35) (pH 2,5)	rozdzielanie pików	brak rozdzielania
wodorofosforan (V) disodu: acetonitryl (35:65) (pH 2,5)	rozdzielanie pików	brak rozdzielania
wodorofosforan (V) disodu: acetonitryl (80:20) (pH 2,5)	rozdzielanie pików	brak rozdzielania
tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (CMQT)		
kwasy trichlorooctowy : acetonitryl (95:5)	-	brak rozdzielania
kwasy trichlorooctowy : metanol (75:25), (90:10), (80:20)	brak rozdzielania	brak rozdzielania
metanol : woda (25:75), (50:50), (75:25)	-	brak rozdzielania
acetonitryl : woda (80:20) (pH 8,0), (pH 6,5), (pH 9,5)	brak rozdzielania	brak rozdzielania
acetonitryl : woda (50:50) (pH 9,5)	brak rozdzielania	-
acetonitryl : woda (90:10) (pH 9,5)	brak rozdzielania	-
acetonitryl : metanol : woda : kwasy trichlorooctowy (35:35:29:1)	brak rozdzielania	brak rozdzielania
wodorofosforan (V) disodu : acetonitryl (55:45) (pH 3,0)	brak rozdzielania	brak rozdzielania
wodorofosforan (V) disodu : acetonitryl (35:65) (pH 3,0), (pH 6,0)	rozdzielanie pików	brak rozdzielania
2,4'-dibromoacetofenon (DBAF)		
etanol : woda (70:30)	-	brak rozdzielania
octan amonu : acetonitryl (50:50)	-	brak rozdzielania
acetonitryl : woda : kwasy trichlorooctowy (50:49,88:0,12)	brak rozdzielania	-
acetonitryl : woda : kwasy trichlorooctowy (60:39,88:0,12)	rozdzielanie pików	-

Niezależnie od zastosowanego odczynnika derywatyzującego, kolumna C-18 nie dała oczekiwanych rezultatów. Na uzyskanych chromatogramach nie zaobserwowano idealnego rozdzielania produktu reakcji derywatywacji od nadmiaru użytego odczynnika derywatyzującego obecnego w mieszaninie poreakcyjnej. Piki na chromatogramie cechowały się słabym rozdziałem i były mało intensywne. Lepszy rozdział produktu reakcji derywatywacji oraz pozostałego w nadmiarze odczynnika derywatyzującego zaobserwowano przy użyciu kolumny C-8 i przepływie fazy ruchomej 1 ml/min. W przypadku wykorzystania jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI), najlepszy rozdział pików otrzymano stosując fazę ruchomą wodorofosforan (V) disodu : acetonitryl w stosunku objętościowym (55:45) o pH 3,0. Ta sama mieszanina – wodorofosforan (V) disodu : acetonitryl o stosunku objętościowym (35:65) i pH 3,0 pozwoliła uzyskać najlepszy rozdział w przypadku badania oznaczenia produktu procesu derywatywacji z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT). W przypadku analizy zarejestrowanych chromatogramów dla produktu reakcji derywatywacji z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF), spośród sprawdzanych mieszanin najlepszy wynik uzyskano dla mieszaniny acetonitryl : woda : kwas trichlorooctowy w stosunku objętościowym (60:39,88:0,12). Zmiana pH tej fazy nie wpłynęła na parametry rozdziału. Uzyskane chromatogramy na przykładzie układu kwas dihydroliponowy - jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (DHLA-CMPI) przedstawiono na rysunku 29.



Rys. 29. Przykładowe chromatogramy zarejestrowane dla roztworów jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) $t \approx 1,9$ min oraz produktu reakcji derywatywacji zredukowanego kwasu liponowego z jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI) $t \approx 3,2$ min.

Na podstawie uzyskanych chromatogramów wyznaczono czasy retencji poszczególnych pochodnych. Optymalne warunki chromatograficznego oznaczania kwasu liponowego w postaci pochodnych przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Optymalne warunki oznaczania kwasu liponowego metodą HPLC-UV.

	Oznaczenie chromatograficzne		
	po reakcji derywatywacji CMPI	po reakcji derywatywacji CMQT	po reakcji derywatywacji DBAF
Faza ruchoma	wodorofosforan (V) disodu : acetonitryl (55:45), pH 3,0	wodorofosforan (V) disodu : acetonitryl (35:65), pH 3,0	acetonitryl : woda : TCA (60:39,88:0,12)
Rodzaj kolumny	Supelcosil LC-8, 5µm, 150x4,6 mm	Suspelcosil LC-8, 5µm, 150x4,6mm	LiChrospher®100 LC-8, 5µm, 150x4,6mm
Rodzaj rozpuszczalnika użyty do końcowego rozpuszczenia próbki	acetonitryl	wodorofosforan (V) disodu : acetonitryl (35:65), pH 3,0	metanol
Objętość nastrzyku	20 µl	20 µl	20 µl
Temperatura	temperatura pokojowa	temperatura pokojowa	temperatura pokojowa
Prędkość przepływu	1 ml/min	1 ml/min	1 ml/min
Długość fali	312 nm	348 nm	340 nm
Czas analizy	6 min	6 min	6 min
Czas retencji	3,20 min	3,22 min	3,26 min

4.3.7. Walidacja opracowanych procedur oznaczania zawartości kwasu liponowego z zastosowaniem derywatywacji grup tiolowych metodą HPLC-UV

Zarejestrowano krzywe wzorcowe oznaczania kwasu liponowego w postaci pochodnych DHLA-CMPI, DHLA-CMQT i DHLA-DBAF. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono liniową zależność pola powierzchni pod pikiem od stężenia analitu w badanym zakresie (tabela 20). Wyznaczono granice wykrywalności i oznaczalności badanego analitu dla poszczególnych metod oraz określono precyzję i powtarzalność wyrażoną jako względne odchylenie standardowe. W celu określenia powtarzalności metody przygotowano 10 roztworów o jednakowym stężeniu. Charakterystykę analityczną opracowanych chromatograficznych metod oznaczania zawartości kwasu liponowego z zastosowaniem odczynników derywatywujących przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 20. Parametry walidacyjne chromatograficznych metod oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI), tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) oraz 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF) jako odczynnika derywatyizującego.

Parametry analityczne metody	Oznaczenie chromatograficzne HPLC		
	po reakcji derywatyizacji CMPI	po reakcji derywatyizacji CMQT	po reakcji derywatyizacji DBAF
Równanie krzywej wzorcowej	$y=2,76 \cdot 10^{10} x - 75597$	$y=4 \cdot 10^7 x - 110,75$	$y=4 \cdot 10^6 x - 29,356$
Współczynnik determinacji	0,9998	0,9994	0,9988
Zakres liniowości [mol/l]	$5 \cdot 10^{-6} - 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-4} - 10^{-2}$
Granica oznaczalności LOQ [mol/l]	$2,32 \cdot 10^{-6}$	$6,47 \cdot 10^{-7}$	$5,70 \cdot 10^{-5}$
Granica wykrywalności LOD [mol/l]	$7,65 \cdot 10^{-7}$	$2,14 \cdot 10^{-7}$	$1,88 \cdot 10^{-5}$
Powtarzalność*[%] pole pow. pod pikiem czas retencji	1,4 0,6	2,1 0,1	9,5 5,1
Współczynnik zmienności [%] pole pow. piku czas retencji	1,35 0,63	2,10 0,07	9,50 5,10
Odchylenie standardowe SD	26628,17	754,23	2477,133
Względne odchylenie standardowe RSD [%]	1,86	1,30	7,4

* Powtarzalność wyznaczono dla stężenia $C = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $n = 10$ (CMPI), $C = 10^{-5}$ mol/l, $n = 10$ (CMQT), $C = 10^{-2}$ mol/l, $n = 10$ (DBAF).

Wszystkie opracowane metody były liniowe w badanych zakresach. Charakteryzowały się dużą zgodnością, o czym świadczą współczynniki determinacji krzywych wzorcowych wynoszące od 0,9994 do 0,9998. Najlepszy współczynnik determinacji krzywej wzorcowej uzyskano dla metody z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) jako odczynnika derywatyizującego. W metodach z zastosowaniem CMPI oraz CMQT uzyskano porównywalne niskie granice oznaczalności i wykrywalności. Minimalnie niższe granice wykrywalności

i oznaczalności uzyskano w metodzie z zastosowaniem CMQT jako odczynnika derywatyzującego (odpowiednio $2,14 \cdot 10^{-7}$, $6,47 \cdot 10^{-7}$ mol/l). Stwarza to możliwość oznaczania kwasu liponowego w skomplikowanych matrycach jakimi są produkty spożywcze. Jednak ze względu na fakt, że CMQT nie jest dostępny w handlu, a proces przygotowania odczynnika jest kłopotliwy, podjęto próbę oznaczenia kwasu liponowego w produktach spożywczych metodą z zastosowaniem CMPI jako odczynnika derywatyzującego.

Wyznaczona granica wykrywalności i oznaczalności (odpowiednio $1,88 \cdot 10^{-5}$ mol/l; $5,70 \cdot 10^{-5}$ mol/l) metody z zastosowaniem DBAF jako odczynnika derywatyzującego jest zbyt wysoka, co eliminuje wykorzystanie tego odczynnika w oznaczaniu kwasu liponowego w próbkach żywności.

4.3.8. Przydatność analityczna nowo opracowanych metod

Próbki produktów spożywczych oraz suplementów diety stanowią bogatą matrycę stwarzającą wiele problemów podczas optymalizacji procedury analitycznej. Z przeglądu dostępnej literatury wynika, że proces analitycznego przygotowania próbki często zawiera etap wstępnego jej oczyszczania. Najlepszym sposobem oczyszczania próbki ze składników przeszkadzających jest ekstrakcja ciecz-ciecz lub ciecz-ciało stałe z wykorzystaniem kolumnienek SPE. Sprawdzono przydatność mieszaniny metanol : 0,5% kwas octowy oraz dichlorometanu jako ekstrahentów do wydzielania kwasu liponowego z próbek rzeczywistych.

W tym celu przeprowadzono ekstrakcję ciecz-ciecz dodając do 1 g homogenatu próbki surowego ziemniaka 1 ml roztworu metanolowego kwasu liponowego ($C = 10^{-2}$ mol/l) oraz 1 ml mieszaniny metanol : 0,5% kwas octowy. Proces wspomagano ultradźwiękami (25°C, 60 minut częstotliwość 35kHz). Następnie próbkę wirowano (3500 obr/min, 10 min), przeprowadzono proces upochodnienia z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) jako odczynnika derywatyzującego i oznaczano zawartość kwasu liponowego.

Sprawdzono również przydatność dichlorometanu do wydzielania kwasu liponowego z próbek rzeczywistych dodając do 1 g homogenatu próbki surowego ziemniaka 1 ml metanolowego roztworu kwasu liponowego ($C = 10^{-2}$ mol/l) oraz 1 ml acetonitrylu. Wirowano (3500 obr/min, 10 minut) a następnie ekstrahowano dwukrotnie

porcjami 2,5 ml dichlorometanu. Po kolejnym wirowaniu, warstwę organiczną przeniesiono do probówki o pojemności 10 ml, przeprowadzono proces upochodnienia z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) jako odczynnika derywatyzyjnego, kolejno suszono do całkowitego odparowania rozpuszczalnika. Suchą pozostałość rozpuszczono w fazie ruchomej acetonitryl : woda w stosunku objętościowym (65:35) i oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 21.

Drugi ze sposobów oczyszczania próbki to ekstrakcja ciecz – ciało stałe (SPE). Dobór zastosowanego wypełnienia kolumnienek zależał od stopnia zatrzymania analitu na wypełnieniu oraz od łatwości wymywania analitu z kolumnienki. Do badań zastosowano kolumnienki ekstrakcyjne o następujących wypełnieniach: oktadecylowym (C-18), fenylovym (Ph), oktylovym (C-8), diolowym (2OH), silikażelowym oraz polimerowe: SDB, Narc-2, MAX, HLB. Wszystkie kolumnienki kondycjonowano metanolem i wodą. Następnie nanoszono 1 ml roztworu kwasu liponowego ($C = 10^{-2}$ mol/l). Prędkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Kolejno na kolumnienki nanoszono 5 ml wody dejonizowanej, 10 μ l stężonego kwasu solnego oraz 6 ml wody z dodatkiem kwasu fosforowego (V) o pH 3,0. Kolumnę wysuszono powietrzem. Do wymycia zatrzymanego analitu zastosowano 3 ml dichlorometanu. Następnie przeprowadzono proces upochodnienia z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) jako odczynnika derywatyzyjnego. Próbkę wysuszono w łagodnym strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w fazie ruchomej acetonitryl : woda w stosunku objętościowym (65:35) i oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym. W poniższej tabeli przedstawiono uzyskane wyniki.

Tabela 21. Procentowa ilość odzyskanego wzorca podczas etapu ekstrakcji ciecz-ciecz oraz ekstrakcji ciecz-ciało stałe na różnych kolumnach SPE.

	Ekstrahent	Odzysk [%] n = 5
Ekstrakcja ciecz-ciecz	metanol:0,5% lodowaty kwas octowy	43
	dichlorometan	95
	Wypełnienie kolumnienki	
Ekstrakcja ciecz-ciało stałe	oktadecylowe (C-18)	20
	fenyłowe (Ph)	51
	oktyłowe (C-8)	63
	diolowe (2OH)	32
	SDB (kopolimer styrenu i diwinylobenzenu)	100
	Narc-2 (estry karboksylowe)	11
	MAX (polimer)	100
	HLB (polimer)	100
	silikażelowe	85

W przypadku ekstrakcji ciecz-ciecz najlepsze wyniki uzyskano dla dichlorometanu jako ekstrahenta (95%). Natomiast w przypadku ekstrakcji ciecz-ciało stałe najlepsze wyniki uzyskano dla kolumn polimerowych SDB, MAX, HLB. Dla tych rodzajów wypełnień uzyskano całkowite (100%) zatrzymanie wzorca. Sprawdzono również wpływ środowiska ekstrakcji. W przypadku wyżej wymienionych kolumnienek zakwaszenie próbki do pH 3,0 nie miało wpływu na wartość odzysku. Dla kolumnienek z wypełnieniem polimerowym SDB (kopolimer styrenu i diwinylobenzenu), MAX oraz HLB odzyskano 100% naniesionego wzorca. Jednak najlepsza spośród badanych okazała się kolumnienka z wypełnieniem SDB, ponieważ piki na chromatogramach ekstraktów z kolumn MAX oraz HLB były niesymetryczne i słabo rozdzielone.

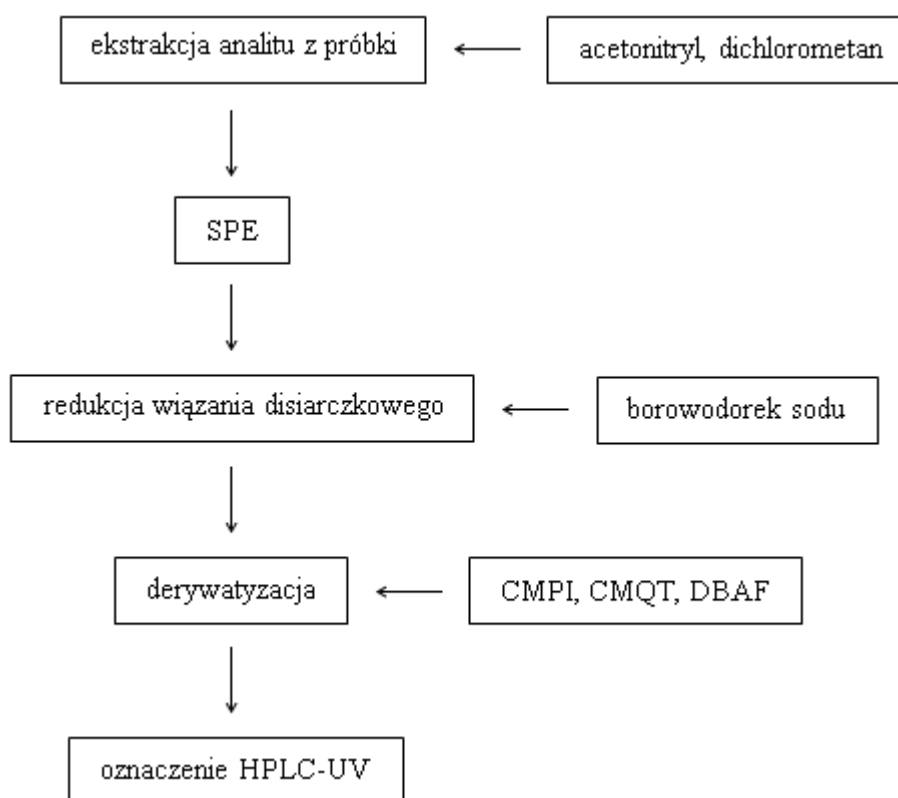
Zoptymalizowano również takie parametry jak: ilość rozpuszczalnika do kondycjonowania kolumny, ilość rozpuszczalnika stosowanego do wymycia analitu z kolumny. Do aktywowania złoża sorbentu zastosowano kondycjonowanie metanolem i wodą dejonizowaną w różnych proporcjach. Najlepsze wyniki uzyskano stosując 5 ml metanolu i 5 ml wody dejonizowanej.

W celu zoptymalizowania objętości rozpuszczalnika wykorzystywanego do wymycia zaadsorbowanego analitu stosowano różne ilości dichlorometanu. Po przeprowadzeniu

eksperymentu stwierdzono, że całkowite wymycie analitu następuje po zastosowaniu objętości 3 ml rozpuszczalnika.

W dalszych badaniach do oczyszczania próbek wykorzystywano kolumnienki z wypełnieniem SDB.

Podjęto próbę zastosowania nowo opracowanych metod do oznaczania kwasu liponowego w środkach spożywczych (ziemniaki, szpinak) oraz w suplementach diety. Ilość kwasu liponowego oznaczono metodą dodatku wzorca. Przed przystąpieniem do właściwych badań, próbki ziemniaków oraz szpinaku wstępnie przygotowano i poddano ekstrakcji (pkt. IV.1.4.1). Natomiast próbki suplementów diety *Revitanerw* (deklarowana zawartość kwasu liponowego: 300 mg/kapsułka) oraz *Kwas alfa-liponowy* (deklarowana zawartość kwasu liponowego: 100 mg/kapsułka) przygotowano zgodnie z procedurą (pkt. IV.1.4.1). Przygotowując badane próbki postępowano zgodnie ze schematem przedstawionym na poniższym rysunku.



Rys. 30. Schemat sposobu postępowania podczas przygotowywania próbek rzeczywistych.

Przeprowadzono reakcję redukcji wiązania disiarczowego S-S oraz derywatazację przy pomocy odpowiedniego odczynnika derywatazującego (CMPI, CMQT, DBAF) (pkt. IV.3.). Następnie oczyszczono próbki przy pomocy kolumnienek SPE z wypełnieniem polimerowym SDB. Na koniec próbki uzupełniono do objętości 10 ml odpowiednim rozpuszczalnikiem i analizowano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV. Próbki z dodatkiem wzorca przygotowano w identyczny sposób, stosując dodatek 10 μ l kwasu liponowego o stężeniu $C = 10^{-5}$ mol/l. Dokładne ilości roztworu próbek suplementów użyte do analizy oraz rodzaj rozpuszczalnika końcowego przedstawiono w poniższej tabeli. Jedynie metody z zastosowaniem CMPI oraz CMQT jako odczynników derywatazujących charakteryzowały się odpowiednią czułością, wystarczającą do oznaczania kwasu liponowego w próbkach produktów spożywczych.

Tabela 22. Warunki przygotowania próbek rzeczywistych do oznaczenia zawartości kwasu liponowego metodą chromatograficzną (HPLC-UV) po reakcji derywatazacji.

Odczynnik derywatazujący	Próbki suplementów		$V_{\text{końcowa}}$ [ml]	Rozpuszczalnik
	V [μ l]	C [mol/l]		
CMQT	200	$1,45 \cdot 10^{-4}$	10	faza ruchoma wodorofosforan (V) disodu : acetonitryl (35:65), pH 3,0
DBAF	725	10^{-3}	10	metanol
CMPI	100	$1,45 \cdot 10^{-2}$	10	acetonitryl
	Próbki środków spożywczych			
CMPI	100	$1,45 \cdot 10^{-2}$	10	acetonitryl

Przygotowano po 3 równoległe próbki i na podstawie równania krzywej wzorcowej w badanych preparatach obliczono zawartość kwasu liponowego. Warunki aparaturowe stosowane podczas analizy przedstawiono w rozdziale IV.1.1. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 23.

Tabela 23. Wyniki oznaczenia zawartości kwasu liponowego metodą chromatograficzną (HPLC-UV) w wybranych próbkach środków spożywczych i suplementach diety.

Matryca	Odczynnik derywujący	Oznaczona zawartość kwasu liponowego		Odzysk [%]	Wartość literaturowa [µg/g]	Literatura	
		[mol/l] n=3	[µg/g] n=3				
Ziemiak surowy	CMPI	$2,43 \cdot 10^{-5} \pm 2 \cdot 10^{-7}$	5,02±0,19	103,18	1,5-4,2	(146)	
Szpinak	CMPI	$1,06 \cdot 10^{-5} \pm 2 \cdot 10^{-7}$	2,18±0,16	103,27	3,15	(43)	
Matryca	Odczynnik derywujący	Zawartość kwasu liponowego [mg]					Zgodność z wartością deklarowaną [%]
		oznaczona	SD	RSD [%]	średni błąd oznaczenia [%]	deklarowana	
Suplement diety <i>Revitanerw</i>	CMPI	305,67	2,90	0,95	0,97	300	101,89
Suplement diety <i>Revitanerw</i>	CMQT	301,44	0,44	0,15	0,16		100,51
Suplement diety <i>Kwas alfa-liponowy</i>	DBAF	103,54	3,41	3,29	3,30	100	103,54

Uzyskane wyniki potwierdzają obecność kwasu liponowego w każdej badanej próbce, zarówno w ziemniakach jak i szpinaku. Oznaczone stężenie kwasu liponowego uzyskane doświadczalnie w próbkach ziemniaków wynosi 5,02±0,19 µg/g, natomiast wartość literaturowa zawiera się w przedziale 1,5 - 4,2 µg/g (146). W przypadku analizy próbek szpinaku, oznaczono zawartość kwasu liponowego na poziomie 2,18±0,16 µg/g, natomiast wartość oznaczona przez innych badaczy wynosi 3,15 µg/g (43).

W tabeli przedstawiono wyniki chromatograficznego oznaczania kwasu liponowego w suplementach diety. Wskazują one, że zaproponowane metody są precyzyjne i dokładne. Zaobserwowano dużą zgodność wyników w odniesieniu do wartości deklarowanej przez producentów (100,51 - 103,54%). Wyniki uzyskane dla wszystkich metod cechowały się dobrą powtarzalnością. Podobnie jak w przypadku metod spektrofotometrycznych obecne w preparatach dodatkowe składniki tj. kwas linolenowy, witamina E, niacyna, kwas pantotenowy, witamina B₆, maltodekstryna oraz substancje dodatkowe: przeciwzbrylające i barwiące nie powodowały zakłóceń pomiarów.

Podsumowując, nowo opracowana metoda chromatograficznego oznaczania zawartości kwasu liponowego z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) jako odczynnika derywatyzującego jest odpowiednia do oznaczenia badanego analitu w próbkach środków spożywczych. Metoda ta jest niedroga, szybka, charakteryzuje się niskimi wartościami granicy oznaczalności i wykrywalności oraz zadowalającą selektywnością, a stosowany odczynnik derywatyzujący nie wymaga przygotowywania w laboratorium. Natomiast wszystkie opracowane metody umożliwiają oznaczenie zawartości kwasu liponowego w suplementach diety. Świadczy o tym dobra powtarzalność oraz dokładność oznaczenia analitu w analizowanych próbkach. Zakres liniowości metod oraz granice oznaczalności i wykrywalności są wystarczające do zarejestrowania sygnałów pochodzących od badanego analitu.

V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Kwas liponowy przedstawia szerokie spektrum zastosowań terapeutycznych. Wspomaga leczenie neuropatii, infekcji wywołanych wirusem ludzkiego upośledzenia odporności (HIV) i patologiami wątroby różnego pochodzenia, od alkoholizmu do zatrucia chemicznego. Ma wyjątkową zdolność do wzmacniania obrony antyoksydacyjnej żywych organizmów przed stresem oksydacyjnym. Jego zredukowana forma regeneruje inne przeciwutleniacze (witamina C, witamina E, glutation). Biorąc pod uwagę powyższe, w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem kwasu liponowego (suplementy diety, środki farmakoterapii). W związku z tym, że kwas liponowy może być również dostarczany do organizmu ludzkiego z pokarmem, niezwykle istotna jest informacja dotycząca zawartości omawianego związku w produktach spożywczych. Dlatego w niniejszej pracy podjęto próbę opracowania prostych metod oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych z wykorzystaniem technik spektrofotometrycznych i chromatograficznych.

Budowa cząsteczki kwasu liponowego stwarza możliwość przeprowadzenia procesu derywatywacji w dwojaki sposób: 1) poprzez rozerwanie wiązania między grupą acylową a atomem tlenu i przekształcenie kwasu liponowego w ester lub amid, lub 2) poprzez modyfikację grup tiolowych. Drugi sposób wymaga uprzedniej redukcji wiązania disiarczkowego w celu otwarcia pierścienia. Do redukcji pierścienia stosowano silny reduktor - borowodorek sodu (NaBH_4). Jest on nietoksyczny, łatwo dostępny, a jego nadmiar łatwo usuwalny poprzez dodanie kilku kropel kwasu solnego (HCl). Dobrano: objętość i stężenie reduktora, czas i temperaturę reakcji oraz środowisko procesu.

W prezentowanej pracy zastosowano po raz pierwszy odczynniki derywatyzujące nie wykorzystywane do tej pory w analizie kwasu liponowego (LA): jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI), tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (CMQT), 2,4'-dibromoacetofenon (DBAF) oraz alkohol 4-metoksybenzylowy (4-MBA). Sprawdzono przebieg redukcji kwasu liponowego (LA) / kwasu dihydroliponowego (DHLA) z tymi odczynnikiemami oraz przeprowadzono ocenę przydatności analitycznej nowo otrzymanych pochodnych.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że grupa karboksylowa kwasu liponowego jest grupą mało reaktywną. Na wydajność tego procesu, wpływało wiele czynników takich jak: temperatura, pH próbki, ilość dodanego

odczynnika derywatyzującego oraz stosowany rozpuszczalnik. Dodatkową trudność sprawiała konkurencyjna reakcja estryfikacji zachodząca między kwasem liponowym a rozpuszczalnikiem (np. metanolem). Zmiana rozpuszczalnika na acetonitryl nie przyniosła zadowalających efektów. Ponieważ właściwości chromoforowe otrzymanego estru pochodziły wyłącznie od alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) nie było możliwe spektrofotometryczne monitorowanie przebiegu reakcji. Dopiero zastosowanie metod chromatograficznych (HPLC-UV oraz GC-MS) do obserwowania przebiegu reakcji okazało się być znacznie efektywniejsze. Napotkano trudności również w procesie przygotowania próbki. Kłopotliwe było przeprowadzenie etapu derywatywacji wynikające z konieczności zachowania beztlenowych warunków reakcji (reakcję prowadzono w atmosferze azotu). Dlatego w kolejnym etapie badań uwagę skupiono na wykorzystaniu drugiego sposobu upochodnienia, po wcześniejszej redukcji wiązania disiarczkowego. Reakcje z grupami tiolowymi zachodziły szybko i ilościowo, w łagodnych warunkach. W tym przypadku uzyskany produkt reakcji cechował się: dużą trwałością, lepszymi właściwościami detekcyjnymi i chromatograficznymi. W związku z powyższym stało się to podstawą opracowania spektrofotometrycznych i chromatograficznych metod oznaczania kwasu liponowego.

Nowoopracowane procedury spektrofotometrycznego oraz chromatograficznego oznaczania kwasu liponowego poddano walidacji. Sporządzono krzywe wzorcowe, wyznaczono liniowość, zakres oznaczania oraz równania regresji, a także współczynniki determinacji. Wyznaczono granice oznaczalności i wykrywalności, powtarzalność oraz współczynniki zmienności metod.

Porównując metody spektrofotometryczne, na podstawie równań krzywych kalibracyjnych można stwierdzić, że wszystkie metody spektrofotometryczne charakteryzowały się dobrą liniowością, o czym świadczą współczynniki determinacji krzywych wzorcowych wynoszące 0,9999. Najniższe granice wykrywalności i oznaczalności (odpowiednio $2,58 \cdot 10^{-7}$ mol/l, $7,84 \cdot 10^{-7}$ mol/l) uzyskano w metodzie z zastosowaniem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) jako odczynnika derywatyzującego.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że metody oznaczania kwasu liponowego wykorzystujące jego chinolinową lub pirydyniową pochodną odznaczają się lepszymi parametrami analitycznymi niż metoda oparta na zastosowaniu 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF) jako odczynnika derywatyzującego. Właściwości

spektralne pochodnej dibromoacetofenonowej nie pozwalały na uzyskanie dobrej czułości, a przez to wartość granicy oznaczalności była wysoka.

Wszystkie opracowane metody chromatograficzne z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA), jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI), tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinoliowego (CMQT) oraz 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF) były liniowe w badanych zakresach (odpowiednio 10^{-7} - 10^{-5} mol/l, $5 \cdot 10^{-6}$ - 10^{-4} mol/l, $2,5 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $2,5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-2} mol/l). Charakteryzowały się dużą zgodnością, o czym świadczą współczynniki determinacji krzywych wzorcowych wynoszące od 0,9943 do 0,9998. Najlepszy współczynnik determinacji krzywej wzorcowej uzyskano dla metody z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) jako odczynnika derywatyzyjnego. Najniższe granice wykrywalności i oznaczalności (odpowiednio $2,14 \cdot 10^{-7}$ mol/l, $6,47 \cdot 10^{-7}$ mol/l) uzyskano w metodzie z zastosowaniem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinoliowego (CMQT).

Niskie stężenie kwasu liponowego w próbkach produktów spożywczych podobnie jak w próbkach materiału biologicznego (tkanki, płyny ustrojowe) (169) oraz różnorodność fizykochemiczna składników matrycy sprawiają duże trudności w oznaczaniu tego analitu. W celu eliminacji niedogodności związanych ze składem matrycy przy jednoczesnym uzyskaniu niższych granic wykrywalności i oznaczalności podjęto próbę opracowania metody oznaczania kwasu liponowego techniką chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS), wykorzystując derywatyzację grupy karboksylowej alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA). W tym przypadku uzyskano zadowalające rezultaty, sporządzono krzywą wzorcową, współczynnik determinacji wynosił 0,9939, zaś granica wykrywalności i oznaczalności wynosiła odpowiednio $7,13 \cdot 10^{-8}$ mol/l oraz $2,16 \cdot 10^{-7}$ mol/l.

Przydatność nowo opracowanych metod potwierdzono poprzez oznaczenie zawartości kwasu liponowego w próbkach suplementów diety oraz w próbkach produktów spożywczych. Procedury z wykorzystaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA), jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI), tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinoliowego (CMQT) oraz 2,4'-dibromoacetofenonu (DBAF) są selektywne w stosunku do substancji, które obok analitu mogą być obecne w preparatach farmaceutycznych. Badano dwa suplementy diety oraz produkty spożywcze takie jak: ziemniaki, szpinak, brokuły, błonnik jabłkowy, młody jęczmień oraz dwie odmiany piwa. Równoległe z próbkami rzeczywistymi badano próbki wzbogacone

w oznaczony analit. We wszystkich przypadkach uzyskano zadowalające wartości odzysków (84,41 – 105,52%).

Zoptymalizowano etap ekstrakcji (rodzaj kolumnienki SPE, ilość rozpuszczalnika wymywającego zaadsorbowany analit), derywatywacji (stężenie odczynnika derywatyżującego, stosunek molowy kwas liponowy : odczynnik derywatyżujący, czas i temperaturę procesu oraz środowisko reakcji) oraz etap oznaczenia chromatograficznego (skład fazy ruchomej, rodzaj kolumny, rozpuszczalnik). Uzyskanie nowych związków potwierdzono wykonując analizę spektralną: ^1H NMR, IR, UV oraz MS.

Optymalizując etap ekstrakcji, dobrą wydajność ok. 95% uzyskano dla ekstrakcji ciecz-ciecz, jednak najlepsze wyniki osiągnięto w przypadku zastosowania ekstrakcji ciecz-ciało stałe i kolumnienek z wypełnieniem polimerowym SDB (kopolimer styrenu i diwinylobenzenu). Połączenie kolumnienki SDB oraz 5 ml metanolu i 5 ml wody dejonizowanej do aktywowania złoża sorbentu spowodowało odzyskanie 100% naniesionego wzorca.

Porównano otrzymane wyniki oznaczania kwasu liponowego z dostępnymi wartościami literaturowymi. Rozbieżność wyników eksperymentalnych i literaturowych może wynikać z różnych źródeł pochodzenia materiału do badań, różnic gatunkowych oraz różnych warunków wegetacji.

VI. STRESZCZENIE

Kwas liponowy jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Niestety, ilość wytwarzana przez człowieka nie zawsze jest wystarczająca, dlatego kwas liponowy powinien być dostarczany do organizmu z zewnątrz. Pokarm jest drugim, oprócz syntezy *de novo*, źródłem tego związku. Niezwykle ważna jest informacja dotycząca zawartości omawianego związku w spożywanych produktach. W dostępnej literaturze nie znaleziono danych dotyczących badań polskich produktów spożywczych.

W części literaturowej przedstawiono charakterystykę badanego związku, jego właściwości fizyczne oraz chemiczne. Oddzielny rozdział poświęcono omówieniu funkcji biologicznych, metabolizmowi oraz wykorzystaniu kwasu liponowego m.in. w medycynie i kosmetologii. Omówiono naturalne procesy syntezy i laboratoryjne sposoby otrzymywania badanego analitu oraz jego występowanie w produktach spożywczych. Szczególną uwagę zwrócono na metody wydzielenia oraz techniki oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych, środkach spożywczych, a także w suplementach diety. Opisano również proces modyfikacji cząsteczki kwasu liponowego w celu uzyskania kompatybilności formy oznaczanej substancji ze stosowanym detektorem.

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury stwierdzono, że nie ma jednej doskonałej metody oznaczania kwasu liponowego, dlatego też w niniejszej pracy podjęto próbę opracowania prostej metody oznaczania tego związku w próbkach produktów spożywczych oraz suplementach diety. Opracowana procedura składa się z następujących etapów: homogenizacji, ekstrakcji, derywatywacji oraz końcowego oznaczenia. Ze względu na brak w budowie cząsteczki kwasu ugrupowań fluoroforowych i chromoforowych, kwas liponowy wymagał modyfikacji poprzez zastosowanie procesu derywatywacji. Sprawdzone analityczną przydatność odczynników derywatywujących takich jak: tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy (CMQT), jodek 2-chloro-1-metylopirydyniowy (CMPI), 2,4'-dibromoacetofenon (DBAF) oraz alkohol 4-metoksybenzylowy (4-MBA) nie wykorzystywanych do tej pory w analityce kwasu liponowego (LA). Do otrzymania zredukowanej formy kwasu liponowego zastosowano borowodorek sodu (NaBH_4). Zarejestrowano widma ^1H NMR, IR, MS oraz widma absorpcyjne analizowanych związków. Zoptymalizowano parametry poszczególnych

etapów metod oznaczania. Dobrano najlepsze warunki tworzenia produktu reakcji derywatywacji tj.: środowisko reakcji, czas i temperaturę prowadzenia procesu, ilość dodawanego odczynnika derywatyżującego. Otrzymane pochodne wykorzystano do opracowania nowych spektrofotometrycznych i chromatograficznych metod oznaczania kwasu liponowego. Określono zakresy liniowości, współczynniki determinacji, powtarzalność, granicę oznaczalności oraz wykrywalności poszczególnych metod. Praktyczną użyteczność opracowanych metod sprawdzono oznaczając zawartość kwasu liponowego w próbkach spożywczych oraz suplementach diety w oparciu o techniki spektrofotometryczne i chromatograficzne z detekcją UV (HPLC-UV) oraz GC-MS.

VII. SPIS RYSUNKÓW

Rys. 1. Kwas liponowy z zaznaczonym asymetrycznym atomem węgla (*) (11).....	15
Rys. 2. Izomery S i R kwasu liponowego (28).	15
Rys. 3. Reakcja redukcji kwasu liponowego (31,32).	16
Rys. 4. Schemat reakcji redoks LA/DHLA (43).	17
Rys. 5. Kwas liponowy z grupą tiosulfonową (A) oraz tiosulfonową (B).	18
Rys. 6. Reakcja dezaktywacji rodnika hydroksylowego (16).	18
Rys. 7. Schemat kompleksu kwasu liponowego z jonem metalu (M) (16).	19
Rys. 8. Wzajemne oddziaływanie kwasu liponowego i dihydroliponowego z innymi antyoksydantami (2,16,82–84).	20
Rys. 9. Produkty β -oksydacji oraz S-metylacji kwasu liponowego oraz kwasu dihydroliponowego (16,117).	23
Rys. 10. Przykładowe pochodne kwasu liponowego (21,44,120).	25
Rys. 11. Szlak biosyntezy kwasu liponowego przez <i>Escherichia coli</i> (16,142).....	30
Rys. 12. Synteza kwasu liponowego z monochloroku adypinianu monoetylu (11,56).	31
Rys. 13. Synteza kwasu liponowego z kwasu 3-alkilotiopropionowego (11).	32
Rys. 14. Synteza kwasu liponowego z cykloheksanonu (1-cykloheksanon, 2-chlorooctan etylu, 3-hydroksyester, 4-cykloheksenylooctan etylu, 5-benzyl 2-(cycloheks-1-en-1-yl)etyl eter, 6-ketopochodna, 7-hydroksykwas, 8-dihydroksyester, 9-ester metylowy kwasu liponowego, 10-kwas liponowy) (11).....	33
Rys. 15. Reakcja derywatywacji grupy karboksylowej kwasu liponowego z 2-(4-aminofenyl)-6-metylobenzotiazolu (APMB) sprzężonego z 1-etylo-3-(dimetyloaminopropyl)karbodiiminą (EDAC) (157).	44
Rys. 16. Reakcja derywatywacji grupy karboksylowej kwasu liponowego z 2-bromoacetylo-6-metoksynaftalenem (Br-AMN) (44).	45
Rys. 17. Reakcja derywatywacji kwasu dihydroliponowego z chloromrówczanem etylu ECF (44).	46
Rys. 18. Schemat reakcji derywatywacji kwasu liponowego uwzględniający sposób wprowadzenia grupy znacznikowej (R).	71
Rys. 19. Widma absorpcyjne zarejestrowane dla A) kwasu liponowego (LA), B) kwasu dihydroliponowego (DHLA).	76
Rys. 20. Widma absorpcyjne zarejestrowane dla wodnych roztworów jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) oraz produktu reakcji derywatywacji (DHLA-CMPI) o stężeniu $C = 10^{-4}$ mol/l.	76
Rys. 21. Widma absorpcyjne zarejestrowane dla wodnych roztworów kwasu liponowego (LA), kwasu dihydroliponowego (DHLA), tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinolinyowego (CMQT) oraz produktu reakcji derywatywacji (DHLA-CMQT) o stężeniu $C = 10^{-4}$ mol/l.	77
Rys. 22. Widma absorpcyjne zarejestrowane dla kwasu liponowego, alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) oraz produktu reakcji derywatywacji (LA-4-MBA) o stężeniu $C = 10^{-5}$ mol/l.	78
Rys. 23. Reakcja redukcji kwasu liponowego.	79

Rys. 24. Schemat reakcji derywatywacji estru kwasu dihydroliponowego z A) 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF), B) tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT), C) jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI).....	79
Rys. 25. Schemat reakcji derywatywacji kwasu liponowego z alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA).....	80
Rys. 26. Chromatogram i widmo mas estru LA-4-MBA zarejestrowane za pomocą GC-MS w trybie skanowania.	86
Rys. 27. Widma absorpcji produktu deprzywatywacji kwasu liponowego z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) w zależności od zastosowanego odczynnika. Skład analizowanych roztworów odniesienia zamieszczono w tabeli 11.....	92
Rys. 28. Widmo absorpcji produktu reakcji estru kwasu dihydroliponowego z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF) względem odczynnika oraz roztworu odczynnika względem wody.	97
Rys. 29. Przykładowe chromatogramy zarejestrowane dla roztworów jodku 2-chloro-1-metylopirydyniowego (CMPI) $t \approx 1,9$ min oraz produktu reakcji derywatywacji zredukowanego kwasu liponowego z jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI) $t \approx 3,2$ min.	103
Rys. 30. Schemat sposobu postępowania podczas przygotowywania próbek rzeczywistych.	109
Rys. 31. Widmo IR kwasu liponowego (LA).	143
Rys. 32. Widmo IR kwasu dihydroliponowego (DHHLA).	143
Rys. 33. Widmo IR produktu reakcji estryfikacji kwasu dihydroliponowego (DHHLA) z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF).	144
Rys. 34. Widmo IR produktu reakcji estryfikacji kwasu dihydroliponowego (DHHLA) z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT).	144
Rys. 35. Widmo IR produktu reakcji estryfikacji kwasu dihydroliponowego (DHHLA) z jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI).	145
Rys. 36. Widmo IR produktu reakcji estryfikacji kwasu liponowego z 4-metoksybenzylowym (4-MBA).	145
Rys. 37. Widmo NMR kwasu liponowego (LA).	146
Rys. 38. Widmo NMR kwasu dihydroliponowego (DHHLA).	146
Rys. 39. Widmo NMR produktu reakcji estryfikacji kwasu dihydroliponowego (DHHLA) z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF).	147
Rys. 40. Widmo NMR produktu reakcji estryfikacji kwasu dihydroliponowego (DHHLA) z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT).	147
Rys. 41. Widmo NMR produktu reakcji estryfikacji kwasu dihydroliponowego (DHHLA) z jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI).	148

VIII. SPIS TABEL

Tabela 1. Źródła kwasu liponowego oraz lipolizyny w wybranych produktach pochodzenia zwierzęcego i roślinnego oraz bakteriach.	35
Tabela 2. Metody chromatografii cieczowej w analizie kwasu liponowego.....	49
Tabela 3. Zestawienie innych metod oznaczania kwasu liponowego.....	55
Tabela 4. Warunki otrzymania próbek do analizy spektralnej.....	72
Tabela 5. Zestawienie charakterystycznych pasm absorpcji dla badanych związków.	77
Tabela 6. Efektywność rozdziału mieszaniny poreakcyjnej kwas liponowy - alkohol 4-metoksybenzylowy (4-MBA) dla różnych faz ruchomych.	81
Tabela 7. Optymalne warunki chromatograficznego oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) jako odczynnika derywatyzującego.....	82
Tabela 8. Zestawienie optymalnych parametrów oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) jako odczynnika derywatyzującego.....	83
Tabela 9. Parametry walidacyjne metod oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem alkoholu 4-metoksybenzylowego (4-MBA) jako odczynnika derywatyzującego.	85
Tabela 10. Wyniki oznaczenia zawartości kwasu liponowego w wybranych próbkach środków spożywczych i suplemente diety.	88
Tabela 11. Skład analizowanych roztworów odniesienia sprawdzanych dla reakcji derywatacji zredukowanego kwasu liponowego z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT).....	91
Tabela 12. Ilości użytych odczynników derywatyzujących.	93
Tabela 13. Temperatura i czas ogrzewania podczas reakcji derywatacji.	94
Tabela 14. Wpływ środowiska reakcji na wydajność procesu derywatacji.	95
Tabela 15. Porównanie warunków przebiegu reakcji redukcji oraz reakcji derywatacji kwasu liponowego.....	96
Tabela 16. Parametry walidacyjne spektrofotometrycznych metod oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydynowego (CMPI) oraz tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) jako odczynnika derywatyzującego.	98
Tabela 17. Wyniki oznaczenia zawartości kwasu liponowego metodą spektrofotometryczną w próbkach suplementu diety <i>Revitanerw.</i>	99
Tabela 18. Efektywność rozdziału mieszaniny poreakcyjnej ester kwasu dihydroliponowego – odczynnik derywatyzujący (CMPI, CMQT, DBAF) dla różnych faz ruchomych.....	101
Tabela 19. Optymalne warunki oznaczania kwasu liponowego metodą HPLC-UV.	104
Tabela 20. Parametry walidacyjne chromatograficznych metod oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem jodku 2-chloro-1-metylopirydynowego (CMPI), tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT) oraz 2,4'- dibromoacetofenonu (DBAF) jako odczynnika derywatyzującego.....	105

Tabela 21. Procentowa ilość odzyskanego wzorca podczas etapu ekstrakcji ciecz-ciecz oraz ekstrakcji ciecz-ciało stałe na różnych kolumnach SPE.....	108
Tabela 22. Warunki przygotowania próbek rzeczywistych do oznaczenia zawartości kwasu liponowego metodą chromatograficzną (HPLC-UV) po reakcji derywatywacji.....	110
Tabela 23. Wyniki oznaczenia zawartości kwasu liponowego metodą chromatograficzną (HPLC-UV) w wybranych próbkach środków spożywczych i suplementach diety.....	111

IX. LITERATURA

1. Krakowiecki A, Jasik M, Rosiński G, Stawicki S, Karnafel W. Ocena leczenia kwasem liponowym u chorych z obwodową polineuropatią cukrzycową. *Diabetol Dośw Klin.* 2005;4(6):412–13.
2. Skorupa A, Michałkiewicz S. Kwas α -liponowy – antyutleniacz antyutleniaczy – właściwości i metody oznaczania α -lipoic acid – antioxidant of antioxidants – properties and determination methods. *Wiad Chem.* 2017;71(11-12),817–42.
3. Pai V, Shukla P, Kikkeri N. Antioxidants in dermatology. *Indian Dermatol Online J.* 2014;5(2):210.
4. Farr SA, Price TO, Banks WA, Ercal N, Morley JE. Effect of Alpha-Lipoic Acid on Memory, Oxidation, and Lifespan in SAMP8 Mice. *J Alzheimers Dis.* 2012;32(2):447–55.
5. Bilaska A, Włodek L. Biologiczne właściwości kwasu liponowego. *Postępy Hig Med Dośw.* 2002;56(2):201–19.
6. Morrissey PA, O'Brien NM. Dietary Antioxidants in Health and Disease. *Int Dairy J.* 1998;8(5):463–72.
7. Stolarzewicz IA, Ciekot J, Fabiszewska AU, Białecka-Florjańczyk E. Plant and microbial sources of antioxidants. *Postępy Hig Med Dośw.* 2013;67:1359–73.
8. Ponczek M Błażej, Wachowicz B. Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Postępy Biochem.* 2005;51(2):140–44.
9. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense: *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9–19.
10. Moini H, Packer L, Saris N-EL. Antioxidant and Prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;182(1):84–90.
11. Bednarczyk-Cywina B, Zaprutko L. Kwas liponowy w kosmetyce i dermatologii. *Pol J Cosmetol.* 2007;10(1):2–12.
12. Ateyya H, Nader MA, Attia GM, El-Sherbeeney NA. Influence of alpha-lipoic acid on nicotine-induced lung and liver damage in experimental rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95(5):492–500.
13. Rola antyoksydantów żywnościowych w stanie zdrowia i choroby - Wydawnictwo medyczne Cornetis. [cytowane 2 czerwiec 2017]. Dostępne na: <http://cornetis.pl/arttykul/1371.html>
14. Je Lee W, Lee K-U, Park J-Y. α -Lipoic Acid Prevents Diabetes Mellitus and Endothelial Dysfunction in Diabetes-Prone Obese Rats. W: Packer L, Sies H. *Oxidative Stress and Inflammatory Mechanisms in Obesity, Diabetes, and the Metabolic Syndrome* [Internet]. CRC Press; 2007 [cytowane 2 styczeń 2019]. s. 261–371. Dostępne na: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420043792.ch17>
15. Satoh S, Shindoh M, Min JZ, Toyo'oka T, Fukushima T, Inagaki S. Selective and sensitive determination of lipoyllsine (protein-bound α -lipoic acid) in biological specimens by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chim Acta.* 2008;618(2):210–7.

16. Malińska D, Winiarska K. Kwas liponowy – charakterystyka i zastosowanie w terapii. *Postępy Hig Med Dośw.* 2005;(60–59):535–43.
17. Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuźmicka L, Tarasiewicz M. Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu. *Bromat Chem Toksykol.* 2010;43(1):9–14.
18. Salehi B, Berkay Yılmaz Y, Antika G, Boyunegmez Tümer T, Fawzi Mahomoodally M, Lobine D, i in. Insights on the Use of α -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules.* 2019;9(8):356.
19. α -Lipoic acid T5625. Sigma-Aldrich. [cytowane 13 wrzesień 2017]. Dostępne na: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t5625>
20. Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol Biochem.* 2002;40(6–8):463–70.
21. Biewenga GPh, Haenen GRMM, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol Vasc Syst.* 1997;29(3):315–31.
22. Abbas MN, Radwan AA. Novel lipoate-selective membrane sensor for the flow injection determination of α -lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine. *Talanta.* 2008;74(5):1113–21.
23. Durrani AI, Schwartz H, Nagl M, Sontag G. Determination of free α -lipoic acid in foodstuffs by HPLC coupled with CEAD and ESI-MS. *Food Chem.* 2010;120(4):1143–8.
24. Zheng M, Tang W, Kong R, Zhu X. Inclusion Complex of alpha-Lipoic Acid Containing Alkalizer for Improving the Solubility and Stability Prepared by Co-grinding. *Indian J Pharm Sci.* 2017;79(4) [cytowane 5 styczeń 2019]. Dostępne na: <http://www.ijpsonline.com/articles/inclusion-complex-of-alpha-lipoic-acid-containing-alkalizer-for-improving-the-solubility-and-stability-prepared-by-cogrounding-3359.html>
25. Salinthon S, Schillace RV, Tsang C, Regan JW, Bourdette DN, Carr DW. Lipoic acid stimulates cAMP production via G protein-coupled receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2011;22(7):681–90.
26. Wang M-Y, Motafakkerazad R, Matsugo S, Wada N, Konishi T. Activity assay of Lipoamidase, an expected modulator of metabolic fate of externally administered lipoic acid. *Inflamm Regen.* 2011;31(1):88–94.
27. König WA, Lutz S, Evers P, Knabe J. Enantiomer separation of chiral barbiturates and of α -lipoic acid by capillary gas chromatography with modified cyclodextrins as chiral stationary phases. *J Chromatogr A.* 1990;503:256–9.
28. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2009;1790(10):1149–60.
29. Harvey JW. The Erythrocyte. W: *Clinical biochemistry of domestic animals.* Elsevier; 2008 [cytowane 2 styczeń 2019]. s. 173–240. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123704917000076>
30. Diesel B, Kulhanek-Heinze S, Höltje M, Brandt B, Höltje H-D, Vollmar AM, i in. α -Lipoic Acid as a Directly Binding Activator of the Insulin Receptor: Protection from Hepatocyte Apoptosis. *Biochemistry.* 2007;46(8):2146–55.

31. Kączkowski J. Podstawy Biochemii. 15. wyd. Warszawa: WNT; 2005.
32. Gomes MB, Negrato CA. Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetol Metab Syndr.* 2014;6. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4124142/>
33. Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2004;11(9):1135–46.
34. Krishnan CV, Garnett M. Electrochemical Behavior of the Super Antioxidant, α -Lipoic Acid. *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 (2011) 3607 - 3630
35. Biewenga GP, Guido RMM. An overview of lipoate chemistry. Lipoic acid in health and disease. 1997 [cytowane 19 czerwiec 2018]. s. 1–33. Dostępne na: https://books.google.pl/books?id=ksWdMbx5FkC&pg=PA13&lpg=PA13&dq=dihydrolipoic+acid+pKa&source=bl&ots=Wc12tTz9ky&sig=Vk7ihuZAMPVDVIdsjEFwCZtO5yg&hl=pl&sa=X&ved=0ahUKEwj2jd2akd_bAhXMGCwKHaKvB7oQ6AEIPzAB#v=onepage&q=dihydrolipoic%20acid%20pKa&f=false
36. Gorąca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep.* 2011;63(4):849–58.
37. Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;93(12):1021–7.
38. Bilska A, Kryczyk A, Włodek L. Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Postępy Hig Med Dośw.* 2007(61):438–53.
39. Dietz K-J. Redox control, redox signaling, and redox homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology.* Elsevier; 2003 [cytowane 2 styczeń 2019]. s. 141–93. Dostępne na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074769603280049>
40. Campos PM, Praça FSG, Bentley MVLB. Quantification of lipoic acid from skin samples by HPLC using ultraviolet, electrochemical and evaporative light scattering detectors. *J Chromatogr B.* 2016;1019:66–71.
41. Zembroń-Łacny A, Kasperska A. Zastosowanie związków siarkowych w sporcie: kwas α -liponowy. *Med Sport.* 2009;5(6)(25):289–98.
42. Moini H, Tirosh O, Park YC, Cho K-J, Packer L. R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2002;397(2):384–91.
43. Bednarczyk-Cywnar B, Zaprutko L. Naturalne i syntetyczne źródła kwasu liponowego. *Pol J Cosmetol.* 2007;10(2):91–9.
44. Kataoka H. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 1998;717(1–2):247–62.
45. Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, redaktorzy. *Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives.* New York: Marcel Dekker; 1996. 490 s. (Food science and technology).

46. Rochette L, Ghibu S, Richard C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(1):114–25.
47. Głód BK, Piszcz P, Kiersztyn I, Lamert A, Zarzycki P. Zastosowanie HPLC do oznaczania wolnych rodników, antyoksydantów oraz całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. *Camera Separatoria*. 2009 [cytowane 2 czerwiec 2017];Vol. 1, (monographs No. 111). Dostępne na: <http://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-62099530-0a99-423e-8dc5-8298cbf948f1>
48. Kucukgoncu S, Zhou E, Lucas KB, Tek C. Alpha-lipoic acid (ALA) as a supplementation for weight loss: results from a meta-analysis of randomized controlled trials: Alpha-lipoic acid (ALA) for weight loss. *Obes Rev*. maj 2017;18(5):594–601.
49. Boghdadi Ma, Afify He, Sabri N, Makboul K, Elmazar M. Comparative study of vitamin B complex combined with alpha lipoic acid versus vitamin B complex in treatment of diabetic polyneuropathy in type 2 diabetic patients. *Clin Exp Pharmacol*. 2017 [cytowane 5 styczeń 2019];07(04). Dostępne na: <https://www.omicsonline.org/open-access/comparative-study-of-vitamin-b-complex-combined-with-alpha-lipoic-acid-versus-vitamin-b-complex-in-treatment-of-diabetic-polyneuro-2161-1459-1000241.php?aid=91836>
50. Wang J, Tang J, Zhou X, Xia Q. Physicochemical characterization, identification and improved photo-stability of alpha-lipoic acid-loaded nanostructured lipid carrier. *Drug Dev Ind Pharm*. 2014;40(2):201–10.
51. Baicus C, Purcarea A, von Elm E, Delcea C, Furtunescu FL. Alpha-lipoic acid for diabetic peripheral neuropathy. *Cochrane Neuromuscular Group*, redaktor. *Cochrane Database Syst Rev*. [cytowane 5 styczeń 2019]; Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD012967>
52. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, i in. Dihyrolipoic acid-a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol*. 1992;44(8):1637–49.
53. Higuchi M. Antioxidant properties of wheat bran against oxidative stress. *Wheat and rice in disease prevention and health*. Elsevier; 2014 [cytowane 2 styczeń 2019]. s. 181–99. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124017160000155>
54. Luttseva LI, Maslov LG, Seredenko VI. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control, *Methods of control and standardization of drugs containing fat-soluble vitamins (a review)*. *Pharm Chem J*. 2001;35(10):567–72.
55. Kozlov ÉI, Solunina IA, Lyubareva ML, Nadtochii MA. HPLC determination of lipoic acid and vitamins A and E in multivitamin compositions. *Pharm Chem J*. 2004;38(11):642–3.
56. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the Metabolic Antioxidant α -Lipoic Acid. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(1–2):359–78.
57. Drisko JA. *Chelation Therapy*. *Integrative Medicine*. Elsevier; 2018 [cytowane 2 styczeń 2019]. s. 1004-1015.e3. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323358682001079>
58. Mattulat A, Baltes W. Determination of lipoic acid in meat of commercial quality. *Z Für Lebensm-Unters Forsch*. 1992;194(4):326–9.

59. Teichert J, Preiß R. Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 1995;672(2):277–81.
60. Sigel H, Prijs B, McCormick DB, Shih JC. Stability and structure of binary and ternary complexes of alpha-lipoate and lipoate derivatives with Mn²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ in solution. *Arch Biochem Biophys.* 1978;187:208–14.
61. Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochem Pharmacol.* 1995;50(1):123–6.
62. Müller L, Menzel H. Studies on the efficacy of lipoate and dihydrolipoate in the alteration of cadmium²⁺ toxicity in isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1990;1052(3):386–91.
63. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, i in. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res.* 1994;20(2):119–33.
64. Reed CJ, Douglas KT. Single-strand cleavage of DNA by Cu(II) and thiols: a powerful chemical DNA-cleaving system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;162(3):1111–7.
65. Nichols TW. alfa-Lipoic acid: biological effects and clinical implications. *Altern Med Rev.* 1997;2(3):177.
66. Zengion AH, Yarnell E. Herbal and nutritional supplements for painful conditions. *Pain procedures in clinical practice.* Elsevier; 2011 [cytowane 2 styczeń 2019]. s. 187–204. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978141603779810020X>
67. Adikwu E, Ebinyo NC, Bokolo B. Melatonin and alpha lipoic acid attenuate methotrexate/cisplatin-induced kidney toxicity in albino rats. *J Nephroarmacology.* 2020;2(9):1–8.
68. Xiao R, Wang X, Jiang L, Tang H. Research and application of lipoic acid in plants. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2018;108:042100.
69. Ardianto C, Wardani HA, Nurrahmi N, Rahmadi M, Khotib J. Alpha-lipoic acid ameliorates sodium valproate-induced liver injury in mice. *Vet World.* 2020;13(5):963–6.
70. Inoue T, Sudo M, Yoshida H, Todoroki K, Nohta H, Yamaguchi M. Liquid chromatographic determination of polythiols based on pre-column excimer fluorescence derivatization and its application to α -lipoic acid analysis. *J Chromatogr A.* 2009;1216(44):7564–9.
71. Harnett JJ, Auguet M, Viossat I, Dolo C, Bigg D, Chabrier P-E. Novel lipoic acid analogues that inhibit nitric oxide synthase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002;12(11):1439–42.
72. Khan A, Khan MI, Iqbal Z, Ahmad L, Shah Y, Watson DG. Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-ECD using liquid–liquid and solid-phase extraction: Method development, validation and optimization of experimental parameters. *J Chromatogr B.* 2010;878(28):2782–8.
73. Bilaska A, Włodek L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep PR.* 2005;57(5):570–7.

74. Polish Journal of Cosmetology - artykuł. [cytowane 18 listopad 2017]. Dostępne na: <http://www.kosmet.pl/pjc.php?opc=AR&lng=pl&art=341>
75. Bast A, Haenen GRMM. The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2002;11(3–4):251–8.
76. Gorąca A, Cieśla W. Ocena ochronnego działania kwasu liponowego w mózgu szczura w czasie stresu oksydacyjnego wywołanego lipopolisacharydem. *Pol Merk Lek.* 2008;XXIV(143):419–21.
77. Uchendu C, Ambali SF, Ayo JO, Esievo KA. The protective role of alpha-lipoic acid on long-term exposure of rats to the combination of chlorpyrifos and deltamethrin pesticides. *Toxicol Ind Health.* 2017;33(2):159–70.
78. Zuliani C, Baroni L. Antioxidants for the Prevention and Treatment of Multiple Sclerosis. *Bioactive nutraceuticals and dietary supplements in neurological and brain disease.* Elsevier; 2015 [cytowane 2 styczeń 2019]. s. 341–53. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124114623000357>
79. Spain R, Powers K, Murchison C, Heriza E, Wings K, Yadav V, i in. Lipoic acid in secondary progressive MS: A randomized controlled pilot trial. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2017;4(5):e374.
80. Portari GV, Moraes RCM de, Deminice R, Orsatti FL, Merino S. Effects of the supplementation with alpha-lipoic acid on muscular antioxidant biomarkers of trained mice. *Med Express.* 2017 [cytowane 5 styczeń 2019];4(1). Dostępne na: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/MedicalExpress.2017.01.05>
81. Santos Pereira LN dos, da Silva IS, Araújo TP, Tanaka AA, Angnes L. Fast quantification of α -lipoic acid in biological samples and dietary supplements using batch injection analysis with amperometric detection. *Talanta.* lipiec 2016;154:249–54.
82. Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE. Therapeutic perspectives on the combination of α -lipoic acid and vitamin E. *Nutr Res.* 2006;26(1):1–5.
83. Lukaski H, Wolinsky I, Driskell J. Lipoic Acid. *Nutritional Ergogenic Aids.* CRC Press; 2004 [cytowane 2 czerwiec 2017]. s. 411–29. Dostępne na: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9780203507704.ch21>
84. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition.* 2001;17(10):888–95.
85. Rucker RB, Morris J, Fascetti AJ. Vitamins. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* Elsevier; 2008 [cytowane 2 styczeń 2019]. s. 695–730. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123704917000234>
86. McCarthy EL, Booker SJ. Biochemical approaches for understanding iron–sulfur cluster regeneration in *Escherichia coli* lipoyl synthase during catalysis. *Methods in Enzymology.* Elsevier; 2018 [cytowane 3 styczeń 2019]. s. 217–39. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687918302210>
87. Brownlee M, Aiello LP, Cooper ME, Vinik AI, Plutzky J, Boulton AJM. Complications of Diabetes Mellitus. W: *Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition).* 2016. s. 1484–581.

88. Sun Y, Zhang W, Ma J, Pang H, Wang H. Overproduction of α -lipoic acid by gene manipulated *Escherichia coli*. Parish T. PLOS ONE. 2017;12(1):e0169369.
89. Zou H, Wang H, Liu T, Li X, Zhu X, Wang Z. Protective role of α -lipoic acid in hyperuricemia-induced endothelial dysfunction. *Exp Ther Med*. 2017;13(6):3047–54.
90. Lv C, Maharjan S, Wang Q, Sun Y, Han X, Wang S, i in. α -lipoic acid promotes neurological recovery after ischemic stroke by activating the Nrf2/HO-1 pathway to attenuate oxidative damage. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(3):1273–87.
91. Heinisch BB, Francesconi M, Mittermayer F, Schaller G, Gouya G, Wolzt M, i in. Alpha-lipoic acid improves vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized trial. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(2):148–54.
92. Tuncer S, Dalkilic N, Akif Dunbar M, Keles B. Comparative effects of alpha lipoic acid and melatonin on cisplatin-induced neurotoxicity. *Int J Neurosci*. 2010;120(10):655–63.
93. Bustamante J. α -lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(6):1023–39.
94. Teichert J, Hermann R, Ruus P, Preiss R. Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2003;43(11):1257–67.
95. Singh U, Jialal I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev*. 2008;66(11):646–57.
96. Sontag G, Schwartz H. Analytical methods for determination of α -lipoic acid, dihydrolipoic acid, and lipoyllysine in dietary supplements and foodstuffs. *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*. CRC Press; 2012 [cytowane 5 styczeń 2019]. s. 819–36. Dostępne na: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b11653-48>
97. Di Martino P. Human bioavailability and pharmacokinetic profile of different formulations delivering alpha lipoic acid. *J Clin Cell Immunol*. 2012 [cytowane 11 grudzień 2018];01(08). Dostępne na: <https://www.omicsonline.org/scientific-reports/srep418.digital/srep418.html>
98. Evans JL, Heymann CJ, Goldfine ID, Gavin LA. Pharmacokinetics, tolerability, and fructosamine-lowering effect of a novel, controlled-release formulation of alpha-lipoic acid. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol*. 2002;8(1):29–35.
99. Mignini F, Capacchietti M, Napolioni V, Reggiardo G, Fasani R, Ferrari P. Single dose bioavailability and pharmacokinetic study of a innovative formulation of α -lipoic acid (ALA600) in healthy volunteers. *Minerva Med*. 2011;102(6):475–82.
100. Mignini F, Nasuti C, Gioventu G, Napolioni V, Di Martino P. Human bioavailability and pharmacokinetic profile of different formulations delivering alpha lipoic acid. 2012;1(8):1–8.
101. Ziegler D, Low PA, Litchy WJ, Boulton AJM, Vinik AI, Freeman R. Efficacy and safety of antioxidant treatment with lipoic acid over 4 years in diabetic polyneuropathy: The NATHAN 1 trial. *Diabetes Care*. 2011;34(9):2054–60.

102. Agathos E, Tentolouris A, Eleftheriadou I, Katsaouni P, Nemtzas I, Petrou A. Effect of α -lipoic acid on symptoms and quality of life in patients with painful diabetic neuropathy. *J Int Med Res.* 2018;46(5):1779–90.
103. Fruzzetti F, Benelli E, Fidecicchi T, Tonacchera M. Clinical and metabolic effects of alpha-lipoic acid associated with two different doses of myoinositol in women with polycystic ovary syndrome. *Int J Endocrinol.* 2020;2020:1–8.
104. Yadav V, Marracci GH, Munar MY, Cherala G, Stuber LE, Alvarez L. Pharmacokinetic study of lipoic acid in multiple sclerosis: comparing mice and human pharmacokinetic parameters. *Mult Scler J.* 2010;16(4):387–97.
105. Lodge J, Youn H-D, Handelman G, Konishi T, Matsugo S, Mathur VV, i in. Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *J Appl Nutr.* 1997;49:3–11.
106. Saeed RMA, Ahmed HH, Saleh AAS, Ahmed YS. Curative role of lactulose, L-carnitine, alpha-lipoic acid and combination of L-carnitine and alpha-lipoic acid in a rat model of acute hepatic encephalopathy: Biochemical observations. *Trop J Pharm Res.* 2017;16(9):2161.
107. Chen J, Jiang W, Cai J, Tao W, Gao X, Jiang X. Quantification of lipoic acid in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2005;824(1–2):249–57.
108. Vadlapudi AD, Vadlapatla RK, Mitra AK. Sodium dependent multivitamin transporter (SMVT): a potential target for drug delivery. *Curr Drug Targets.* 2012;13(7):994–1003.
109. Passiatore M, Perna A, De-Vitis R, Taccardo G. The use of alfa-lipoic acid-R (ALA-R) in patients with mild-moderate carpal tunnel syndrome: a randomised controlled open label prospective study. *Malays Orthop J.* 2020;14(1):1–6.
110. Breithaupt-Grögler K, Niebch G, Schneider E, Erb K, Hermann R, Blume HH, i in. Dose-proportionality of oral thioctic acid coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 1999;8(1):57–65.
111. Hermann R, Mungo J, Cnota PJ, Ziegler D. Enantiomer-selective pharmacokinetics, oral bioavailability, and sex effects of various alpha-lipoic acid dosage forms. *Clin Pharmacol Adv Appl.* 2014;6:195–204.
112. Thiele JJ, Dreher F, Packer L. Antioxidant defense systems in skin. *J Toxicol Cutan Ocul Toxicol.* 2002;21(1–2):119–60.
113. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1995;19(2):227–50.
114. Wójcik M. Kwas liponowy - ważny antyoksydant pochodzenia zwierzęcego. *Przegląd Hod.* 2011 [cytowane 2 czerwiec 2017];79(01). Dostępne na: <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.dl-catalog-6d17a3dc-a285-41b8-8a0e-2f4bf7ad9054>
115. Hermann R, Niebch G, Borbe HO, Fieger-Büschges H, Ruus P, Nowak H. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic α -lipoic acid formulations in healthy volunteers. *Eur J Pharm Sci.* 1996;4(3):167–74.

116. Harrison EH, McCormick DB. The metabolism of dl-(1,6-14C)lipoic acid in the rat. *Arch Biochem Biophys.* 1974;160(2):514–22.
117. Tsai C-J, Chen Y-L, Feng C-H. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with microwave-assisted derivatization for determining lipoic acid and its metabolites in human urine. *J Chromatogr A.* 2013;1310:31–6.
118. Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H, Preiss R. Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1998;36(12):625–8.
119. Schupke H, Hempel R, Peter G, Hermann R, Wessel K, Engel J. New metabolic pathways of alpha-lipoic acid. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2001;29(6):855–62.
120. Teichert J, Preiss R. High-performance liquid chromatographic assay for α -lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B.* 2002;769(2):269–81.
121. Khanna S, Atalay M, Laaksonen DE, Gul M, Roy S, Sen CK. α -Lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J Appl Physiol.* 1999;86(4):1191–6.
122. Fernández-Galilea M, Pérez-Matute P, Prieto-Hontoria PL, Houssier M, Burrell MA, Langin D. α -Lipoic acid treatment increases mitochondrial biogenesis and promotes beige adipose features in subcutaneous adipocytes from overweight/obese subjects. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2015;1851(3):273–81.
123. Akbari M, Ostadmohammadi V, Tabrizi R, Mobini M, Lankarani KB, Moosazadeh M, i in. The effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammatory markers among patients with metabolic syndrome and related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metab.* 2018 [cytowane 5 styczeń 2019];15(1). Dostępne na: <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12986-018-0274-y>
124. Anuradha B, Varalakshmi P. Protective role of α -lipoic acid against mercury-induced neutral lipid peroxidation. *Pharmacol Res.* 1999;39(1):67–80.
125. Shila S, Kokilavani V, Subathra M, Panneerselvam C. Brain regional responses in antioxidant system to α -lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology.* 2005;210(1):25–36.
126. Gurer H, Ozgunes H, Oztezcan S, Ercal N. Antioxidant role of α -lipoic acid in lead toxicity. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(1–2):75–81.
127. Ruixia W, Jinlong C, Lianlong C, Zheng-hao F, Ai-min L, Quanxing Z. Study of adsorption of lipoic acid on three types of resin. *React Funct Polym.* 2004;59(3):243–52.
128. Shamsizadeh A, Roohbakhsh A, Ayoobi F, Moghaddamhamadi A. The role of natural products in the prevention and treatment of multiple sclerosis. *Nutrition and Lifestyle in Neurological Autoimmune Diseases.* Elsevier; 2017 [cytowane 2 styczeń 2019]. s. 249–60. Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128052983000256>
129. Panda P, Panda SK, Mishra T. Effect of alpha lipoic acid in treatment of type 2 diabetes. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(8):204.

130. Zhao L, Raval V, Briggs NEB, Bhardwaj RM, McGlone T, Oswald IDH. From discovery to scale-up: α -lipoic acid: nicotinamide co-crystals in a continuous oscillatory baffled crystalliser. *CrystEngComm*. 2014;16(26):5769–80.
131. Cil O, Perwad F. α -lipoic acid (ALA) improves cystine solubility in cystinuria: report of 2 cases. *Pediatrics*. 2020;145(5):e20192951.
132. Rosales-Martinez P, Garcia-Pinilla S, Arroyo-Maya IJ, Hernandez-Sanchez H, Cornejo-Mazon M. Optimization of the conditions for the elaboration of chitosan nanoparticles charged with alpha lipoic acid, ascorbic acid and alpha-tocopherol. 2017;16(1):321–37.
133. Li Y, Zhao Y, Yu W, Jiang S. Scavenging ability on ROS of alpha-lipoic acid (ALA). *Food Chem*. 2004;84(4):563–7.
134. Kubalczyk P, Głowacki R. Determination of lipoic acid in human urine by capillary zone electrophoresis: CE and CEC. *Electrophoresis*. 2017;38(13–14):1800–5.
135. Kothari IR, Italiya KS, Sharma S, Mittal A, Chitkara D. A rapid and precise liquid chromatographic method for simultaneous determination of alpha lipoic acid and docetaxel in lipid-based nanoformulations. *J Chromatogr Sci*. 2018;56(10):888–94.
136. Tudose M, Culita DC, Musuc AM, Somacescu S, Ghica C, Chifiriuc MC. Lipoic acid functionalized SiO₂ Ag nanoparticles. Synthesis, characterization and evaluation of biological activity. *Mater Sci Eng C*. 2017;79:499–506.
137. Aljaeid BM, El-Moselhy MA. Loading of gentamicin and alpha lipoic acid on a biodegradable polymer for more effective and less nephrotoxic formula. *Int J Pharmacol*. 2018;14(6):796–801.
138. Alleva R, Nasole E, Donato FD, Borghi B, Neuzil J, Tomasetti M. α -Lipoic acid supplementation inhibits oxidative damage, accelerating chronic wound healing in patients undergoing hyperbaric oxygen therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333(2):404–10.
139. Suzuki YJ, Aggarwal BB, Packer L. α -Lipoic acid is a potent inhibitor of NF- κ B activation in human T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;189(3):1709–15.
140. Ishii HM, Murakashi E, Igarashi-Takeuchi H, Shoji H, Numabe Y. Alpha-lipoic acid inhibits NF- κ B signal transduced inflammatory cytokines secretion in LPS-induced human gingival fibroblasts. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi J Jpn Soc Periodontol*. 2017;59(1):28–38.
141. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem*. 2003;14(5):288–94.
142. Zhang H, Luo Q, Gao H, Feng Y. A new regulatory mechanism for bacterial lipoic acid synthesis. *MicrobiologyOpen*. 2015;4(2):282–300.
143. Lucia D'Amico M, Navari-Izzo F, Sgherri C, Izzo R. The role of lipoic acid in the regulation of the redox status of wheat irrigated with 20% sea water. *Plant Physiol Biochem*. 2004;42(4):329–34.
144. Arshad MS, Anjum FM, Khan MI, Shahid M, Akhtar S, Sohaib M. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with α -lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids Health Dis*. 2013;12:164.

145. Shih JCH, Steinsberger SC. Determination of lipoic acid in chick livers and chicken eggs during incubation. *Anal Biochem.* 1981;116(1):65–8.
146. Durrani AI, Schwartz H, Nagl M, Sontag G. Determination of free α -lipoic acid in foodstuffs by HPLC coupled with CEAD and ESI-MS. *Food Chem.* 2010;120(4):1143–8.
147. Sitton A, Schmid MG, Gübitz G, Aboul-Enein HY. Determination of lipoic acid in dietary supplement preparations by capillary electrophoresis. *J Biochem Biophys Methods.* 2004;61(1–2):119–24.
148. Durrani AI, Schwartz H, Schmid W, Sontag G. α -Lipoic acid in dietary supplements: Development and comparison of HPLC-CEAD and HPLC-ESI-MS methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45(4):694–9.
149. Herbert AA, Guest JR. Lipoic acid content of *Escherichia coli* and other microorganisms. *Arch Microbiol.* 1975;106(3):259–66.
150. Noll KM, Barber TS. Vitamin contents of archaebacteria. *J Bacteriol.* 1988;170(9):4315–21.
151. Bothe H, Nolteersting U. Pyruvate dehydrogenase complex, pyruvate: ferredoxin oxidoreductase and lipoic acid content in microorganisms. *Arch Microbiol.* 1975;102(1):53–7.
152. Karpińska J, Kotowska U, Kapelewska J. Pułapki ilościowego oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych. Wybrane zagadnienia z zakresu chemii, biologii i fizyki. 2016. s. 152–64.
153. Chng HT, New LS, Neo AH, Goh CW, Browne ER, Chan ECY. A sensitive LC/MS/MS bioanalysis assay of orally administered lipoic acid in rat blood and brain tissue. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;51(3):754–7.
154. White RH. Stable isotope studies on the biosynthesis of lipoic acid in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1980;19(1):15–9.
155. Vianey-Liaud N, Kobrehel K, Sauvaire Y, Wong JH, Buchanan BB. Lipoic acid in wheat grains. *J Agric Food Chem.* 1994;42(5):1110–4.
156. Teichert J, Preiss R. High-performance liquid chromatography methods for determination of lipoic and dihydrolipoic acid in human plasma. *Methods Enzymol.* 1997;279:159–66.
157. Borowczyk K, Krawczyk M, Kubalczyk P, Chwatko G. Determination of lipoic acid in biological samples. *Bioanalysis.* 2015;7(14):1785–98.
158. Sechovcová S, Královcová P, Kand'ár R, Ventura K. The issue of HPLC determination of endogenous lipoic acid in human plasma. *Biomed Chromatogr.* 2018;32(5):e4172.
159. Kumirska J, Gołębiowski M, Paszkiewicz M, Bychowska A. Skrypt z Ochrony Środowiska. Analiza Żywności. 2010.
160. Obiedziński M. Wybrane zagadnienia z analizy żywności. 2009.
161. Trivedi RK, Kallem RR, Mamidi RNVS, Mullangi R, Srinivas NR. Determination of lipoic acid in rat plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization: Assay development, validation and application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 2004;18(9):681–6.

162. Haj-Yehia AI, Assaf P, Nassar T, Katzhendler J. Determination of lipoic acid and dihydrolipoic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr A*. 2000;870(1):381–8.
163. Witt W, Rüstow B. Determination of lipoic acid by precolumn derivatization with monobromobimane and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 1998;705(1):127–31.
164. Wołyniec E, Karpińska J, Łosiewska S, Turkowicz M, Klimczuk J, Kojło A. Determination of lipoic acid by flow-injection and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Talanta*. 2012;96:223–9.
165. Dąbrowska H, Dąbrowski Ł. Proces odparowania rozpuszczalnika jako istotny etap procedury przygotowania próbek środowiskowych do oznaczania wybranych zanieczyszczeń organicznych. *Ekol Tech*. 2012;R. 20, nr 3:153–61.
166. Khan A, Iqbal Z, Watson DG, Khan A, Khan I, Muhammad N. Simultaneous determination of lipoic acid (LA) and dihydrolipoic acid (DHLA) in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *J Chromatogr B*. 2011;879(20):1725–31.
167. Li H, Kong Y, Chang L, Feng Z, Chang N, Liu J. Determination of lipoic acid in biological samples with acetonitrile–salt stacking method in CE. *Chromatographia*. 2014;77(1–2):145–50.
168. Kalemekiewicz J, Ruman T. Zastosowanie derywatywacji w metodach chromatograficznych w analizie śladowej. *Wiad Chem*. 2004; 58,(3-4):263–76.
169. Głowacki R. Wykorzystanie derywatywacji w analizie próbek biologicznych na zawartość aminotioli techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-Vis. *Wiad Chem*. 2009; 63, (11-12):1049–71.
170. Furmaniak P, Wyszczelska-Rokiel M, Kubalczyk P, Głowacki R. Zastosowanie soli chinoliniowych i pirydyniowych do oznaczania wybranych związków siarki w próbkach biologicznych. *Wiad Chem*. 2014; 68, (3–4):211–32.
171. Gruzman A, Hidmi A, Katzhendler J, Haj-Yehie A, Sasson S. Synthesis and characterization of new and potent α -lipoic acid derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2004;12(5):1183–90.
172. Banel A, Zygmunt B. Zastosowanie połączenia mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej i chromatografii gazowej do oznaczania lotnych kwasów tłuszczowych w próbkach środowiskowych i pokrewnych. *Ecological Chem and Engineering*. 2008;(15):7–28.
173. Zhang S-J, Ge Q-F, Guo D-W, Hu W-X, Liu H-Z. Synthesis and anticancer evaluation of α -lipoic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20(10):3078–83.
174. Kaniowska E, Chwatko G, Głowacki R, Kubalczyk P, Bald E. Urinary excretion measurement of cysteine and homocysteine in the form of their S-pyridinium derivatives by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr A*. 1998;798(1–2):27–35.
175. Satoh S, Toyo'oka T, Fukushima T, Inagaki S. Simultaneous determination of α -lipoic acid and its reduced form by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B*. 2007;854(1–2):109–15.

176. Gatti R, Bousquet E, Bonazzi D, Cavrini V. Determination of carboxylic acid salts in pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography after pre-column fluorogenic labelling. *Biomed Chromatogr.* 1996;10(1):19–24.
177. Niebch G, Bechele B, Blome J, Grieb S, Brandt G, Kampa P, i in. Enantioselective high-performance liquid chromatography assay of R- and S-lipoic acid in human plasma. *Chirality.* 1997;9(1):32–6.
178. Tsai C-J, Lin Y-C, Chen Y-L, Feng C-H. Chemical derivatization combined with capillary LC or MALDI-TOF MS for trace determination of lipoic acid in cosmetics and integrated protein expression profiling in human keratinocytes. *Talanta.* 2014;130:347–55.
179. Chen X, Gao J, Jiang Y, Huang P, Xie Y, Pi R, i in. Determination of newly synthesized lipoic acid-niacin dimer in rat plasma by UPLC/electrospray ionization tandem mass spectrometry: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study: Determination of lipoic acid-niacin dimers in rat plasma. *Biomed Chromatogr.* 2014;28(2):213–7.
180. Chwatko G, Kubalczyk P, Bald E. Determination of Lipoic Acid in the form of 2-S-pyridinium Derivative by High-performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Curr Anal Chem.* 2014;10(3):320–5.
181. Kuśmierk K, Głowacki R, Bald E. Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2006;385(5):855–60.
182. C. Howard S, B. McCormick D. High-performance liquid chromatography of lipoic acid and analogues. *J Chromatogr A.* 1981;208(1):129–31.
183. Siangproh W, Rattanarat P, Chailapakul O. Reverse-phase liquid chromatographic determination of α -lipoic acid in dietary supplements using a boron-doped diamond electrode. *J Chromatogr A.* 2010;1217(49):7699–705.
184. Chwatko G, Krawczyk M, Iciek M, Kamińska A, Bilka-Wilkosz A, Marcykiewicz B. Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Arab J Chem.* 2016 [cytowane 1 styczeń 2019]; Dostępne na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187853521630185X>
185. Sen CK, Roy S, Khanna S, Packer L. Determination of oxidized and reduced lipoic acid using high-performance liquid chromatography and coulometric detection. *Methods in Enzymology.* Elsevier; 1999 [cytowane 1 czerwiec 2017]. s. 239–46. Dostępne na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687999990237>
186. Kołodziejczyk K. Cechy użytkowe i kryteria doboru detektorów wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC stosowanych do badań składników żywności. *Żywność Nauka Technol Jakość.* 2000;3(24):5–13.
187. Borowczyk K, Olejarz P, Chwatko G, Szyłberg M, Głowacki R. A simplified method for simultaneous determination of α -lipoic acid and low-molecular-mass thiols in human plasma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1049.
188. Sudha V EK. A Simple and specific method for estimation of lipoic acid in human plasma by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sep Tech.* 2014 [cytowane 5 styczeń 2019];05(06). Dostępne na: <http://omicsonline.org/open-access/a-simple-and->

specific-method-for-estimation-of-lipoic-acid-in-human-plasma-by-high-performance-liquid-chromatography-2157-7064.1000245.php?aid=34014

189. Revathi S, Gopi Reddy A, Narendra Naidu K, Kiran Kumar V. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of allopurinol and alphas-lipoic acid in bulk and tablet dosage form. 2016;5(4):602–12.
190. Anil Mohan J, Rajkumar B, Bhavya T, Ashok Kumar A. RP-HPLC method development and validation for the simultaneous quantitative estimation of pregabalin, mecobalamin and alpha lipoic acid in capsules. International J Pharm Pharm Sci. 2014;6(1):270–7.
191. Viana C, Maria Ribeiro S, L. Moreira AP, S. Müller L, J. Motta M, Monserrat J. Quantification of alpha lipoic acid in pharmaceutical products by HPLC with pulsed amperometric detection at a gold electrode. Curr Anal Chem. 2018 [cytowane 5 styczeń 2019];14. Dostępne na: <http://www.eurekaselect.com/161389/article>
192. Han D, Handelman GJ, Packer L. Analysis of reduced and oxidized lipoic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography. Methods Enzymol. 1995;251:315–25.
193. Montero O, Ramírez M, Sánchez-Guijo A, González C. Determination of lipoic acid, trolox methyl ether and tocopherols in human plasma by liquid-chromatography and ion-trap tandem mass spectrometry. Biomed Chromatogr. 2012;26(10):1228–33.
194. Hou W, Liu G, Sun X, Xie Z, Pi R, He W. Determination of newly synthesized lipoic acid–fasudil dimer in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetics study. Anal Methods. 2014;6(21):8675–81.
195. Kataoka H, Hirabayashi N, Makita M. Analysis of lipoic acid in biological samples by gas chromatography with flame photometric detection. J Chromatogr B Biomed Sci App. 1993;615(2):197–202.
196. White RH. A gas chromatographic method for the analysis of lipoic acid in biological samples. Anal Biochem. 1981;110(1):89–92.
197. Pratt KJ, Carles C, Carne TJ, Danson MJ, Stevenson KJ. Detection of bacterial lipoic acid. A modified gas-chromatographic-mass-spectrometric procedure. Biochem J. 1989;258(3):749–54.
198. Ravanić N, Filipić S, Nikolić K, Popović G, Vovk I, Simonovska B. Analysis of α -lipoic acid in drug formulations and dietary supplement preparations. Acta Chromatogr. 2009;21(3):433–41.
199. Marin M, Lete C, Manolescu BN, Lupu S. Electrochemical determination of α -lipoic acid in human serum at platinum electrode. J Electroanal Chem. 2014;729:128–34.
200. Corduneanu O, Garnett M, Brett AMO. Anodic oxidation of α -lipoic acid at a glassy carbon electrode and its determination in dietary supplements. Anal Lett. 2007;40(9):1763–78.
201. Skorupa A, Michałkiewicz S. Voltammetric determination of α -lipoic acid using carbon fiber microelectrode in acetic acid – acetonitrile solutions. Int J Electrochem Sci. 2020;1581–94.

202. Stankovic DM, Mehmeti E, Kalcher K. Development of sensitive analytical approach for the quantification of alpha-lipoic acid using boron doped diamond electrode. *Anal Sci.* 2016;32(8):847–51.
203. Ferreira APM, dos Santos Pereira LN, da Silva IS, Tanaka SMCN, Tanaka AA, Angnes L. Determination of α -lipoic acid on a pyrolytic graphite electrode modified with cobalt phthalocyanine. *Electroanalysis.* 2014;26(10):2138–44.
204. Miranda MP, del Rio R, del Valle MA, Faundez M, Armijo F. Use of fluorine-doped tin oxide electrodes for lipoic acid determination in dietary supplements. *J Electroanal Chem.* 2012;668:1–6.
205. Ziyatdinova GK, Grigor'eva LV, Budnikov GK. Electrochemical determination of unithiol and lipoic acid at electrodes modified with carbon nanotubes. *J Anal Chem.* 2009;64(2):185–8.
206. Ziyatdinova GK, Budnikov GK, Pogorel'tsev VI. Electrochemical determination of lipoic acid. *J Anal Chem.* 2004;59(3):288–90.
207. Budnikov GK, Ziyatdinova GK. Antioxidants as analytes in analytical chemistry. *J Anal Chem.* 2005;60(7):600–13.
208. Goti PP, Savsani JJ, Patel PB. Spectrofotometric method development and validation for estimation of α -lipoic acid in tablet dosage form. *Research & Reviews.* 2012;4(5):519–22.
209. Goti PP, Patel PB. Development and validation of ratio-derivative spectrophotometric method for simultaneous estimation of gabapentin, methylcobalamin and alpha lipoic acid in tablet formulation. *J Pharm Res.* 2013;6(6):609–14.
210. Walsh MI. Spectrophotometric and kinetic determination of some sulphur containing drugs in bulk and drug formulations. *Bull Korean Chem Soc.* 2004;25(4):517–24.
211. Korany MA, Gazy AA, Khamis EF, Ragab MAA, Kamal MF. Least median of squares and iteratively re-weighted least squares as robust linear regression methods for fluorimetric determination of α -lipoic acid in capsules in ideal and non-ideal cases of linearity. *Luminescence.* 2018 [cytowane 26 kwiecień 2018]; Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1002/bio.3471>
212. Bald E, Glowacki R. 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate as an effective and thiol specific UV-tagging reagent for liquid chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2001;24(9):1323–39.
213. Ludwicki J. Walidacja metod analitycznych i szacowanie niepewności wyników w badaniach chemicznych zanieczyszczeń żywności, Przewodnik. Warszawa: PZH; 2003.
214. Roux S, Garcia B, Bridot J-L, Salomé M, Marquette C, Lemelle L. Synthesis, characterization of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles, and functionalization by the electroluminescent luminol. *Langmuir.* 2005;21(6):2526–36.
215. Chwatko G. Determination of cysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection after pre-column derivatization with 2-chloro-1-methylpyridinium iodide. *Talanta.* 2000;52(3):509–15.
216. Carlson DA. Determination of free and total lipoic acid content. *GeroNova Res Inc.* 2013;(3.4):1–5.

217. Aboul-Encin HY, Hoenen H. Validated method for determination of α -lipoic acid in dietary supplement tablets by reversed phase liquid chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2004;27(19):3029–38.

X. OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

Publikacje:

1. M. Turkowicz, I. Jastrzębska, M. Hryniewicka, U. Kotowska, D. Gudalewska, J. Karpińska, Investigation of lipoic acid - 4-methoxybenzyl alcohol reaction and evaluation of its analytical usefulness, *Food Chem* 2020 Mar 23;309:125750. Epub 2019 Oct 23. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.125750 (IF2019: 5,399)
2. A. Odachowska, M. Godlewska, M.J. Turkowicz, J. Karpińska, Studies on reaction of reduced lipoic acid with Mukaiyama reagent and its application for pharmaceutical and food analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40(3), 126-132. DOI 10.1080/10826076.2017.1293548 (IF2016: 0,63)
3. M. Hryniewicka, A. Karpińska, M. Kijewska, M. J. Turkowicz, LC/MS/MS analysis of α -tocopherol and coenzyme Q10 content in lyophilized royal jelly, beebread and drone homogenate. *Journal of Mass Spectrometry* 51(11), 1023-1029 (2016). (IF2016: 2,541)
4. M. Turkowicz, N. Sleszynska, J. Karpińska, Content of coenzyme Q10 in selected food products and in daily food rations. *International Journal of Science Research* 4(10), 109-112 (2015) (IF2015: 0,23)
5. M. Godlewska, A. Odachowska, M. Turkowicz, J. Karpińska, Analysis of reaction between alfa-lipoic acid and 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate (CMQT) used as a precolumn derivatization technique in chromatographic determination of alfa-lipoic acid. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2015, Article ID 535387, 7 pages (2015) (IF2015: 1,369)
6. M. Godlewska, A. Odachowska, M. Turkowicz, J. Karpińska, Badanie i analityczne wykorzystanie reakcji kwasu alfa-liponowego z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT). *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*. Praca zbiorowa pod red. Z. Hubickiego Wydawnictwo UMCS tom 1, 191-194 (2014) (MNISW: 4)
7. A. Odachowska, M. Godlewska, M. Turkowicz, J. Karpińska, Wykorzystanie reakcji derywatyzacji kwasu liponowego. *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*. Praca zbiorowa pod red. Z. Hubickiego Wydawnictwo UMCS tom 1, 187-190 (2014) (MNISW: 4)
8. M. Turkowicz, J. Karpińska, Analytical problems with the determination of coenzyme Q10 in biological samples. *BioFactors* 39 (2), 176-185 (2013) (IF2013: 3,0; IF2016: 4,504)
9. M. Turkowicz, J. Karpińska, Analityczne problemy ilościowego oznaczania witamin A, E, koenzymu Q10 i kwasu liponowego w próbkach biologicznych. *Laboratoria, Aparatura, Badania* 4/2011, 24-32 (2011)
10. E. Dąbrowska, M. Letko*, W. Roszkowska-Jakimiec, R. Letko, J. Sadowski, Effect of chlorhexidine mouthrinse on cathepsin C activity of human saliva. *Advances in Medical Sciences* Vol. 51, Suppl. 1 (2006) (IF2015: 1,211)
11. E. Dąbrowska, M. Balunowska, A. Marczevska, R. Letko, K. Błahuszewska, M. Letko*, W. Stokowska, Bioavailability and Biological Effects of Fluorine, *Polish*

Journal of Environmental Studies 15 (2b), 1061-1064 (2006) (IF2006: 0,353; IF2015: 0,790)

12. E. Dąbrowska, M. Letko*, W. Roszkowska-Jakimiec, R. Letko, J. Jamiołkowski. Effect of fluoride preparations on the activity of human salivary cathepsin C. Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku Vol. 50, Suppl. 1 (2005)
13. E. Dąbrowska, M. Balunowska, M. Letko*, K. Błahuszevska, R. Letko, Fluorki a pożywienie. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna – Suplement, 213-215 (2005) (MNISW 2015: 6)
14. E. Dąbrowska, M. Balunowska, M. Letko*, A. Borkowska-Chwieśko, R. Letko, Wpływ preparatów fluorkowych i chlorheksydynowych używanych do codziennej higieny na środowisko jamy ustnej. Roczniki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie Vol.LX, Suppl. XVI, 73 (2005)

Granty:

1. Zawartość koenzymu Q10 i kwasu liponowego w wybranych produktach spożywczych oraz oszacowanie ich dziennego pobrania 2011/01/N/NZ9/01768 (kierownik projektu), NCN, Preludium, realizowanego w latach 2011-2016.

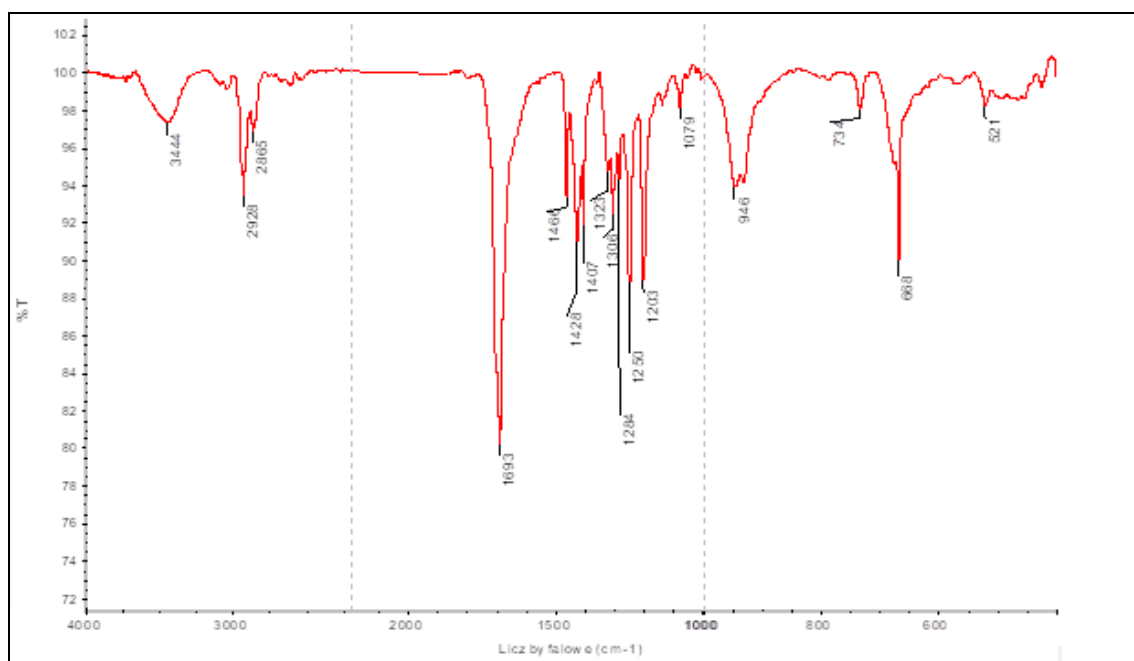
Wystąpienia w formie komunikatów lub posterów:

1. M. Turkowicz, J. Karpińska, Metody normatywne oznaczania zawartości metali szkodliwych w żywności, Konwersatorium Spektrometrii Atomowej; Białystok 2018.
2. M. Turkowicz, J. Karpińska, Zastosowanie reakcji derywatywacji w chromatograficznej analizie kwasu liponowego, III Podkarpacka Konferencja Młodych Naukowców; Rzeszów 2017.
3. J. Karpińska, M. Turkowicz, Analityczne problemy badania zawartości wybranych lipofilnych antyoksydantów w żywności, IX Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Chemia analityczna to ciągle wyzwania; Poznań 2015.
4. J. Karpińska, M. Turkowicz, Ocena zawartości koenzymu Q10 w wybranych produktach spożywczych, XXIII Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne, Bromatologia dla społeczeństwa XXI wieku; Kraków 2014.
5. M. Godlewska, A. Odachowska, M. Turkowicz, J. Karpińska, Badanie i analityczne wykorzystanie reakcji kwasu α -liponowego z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT), Nauka i przemysł; Metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości; Lublin 2014.
6. A. Odachowska, M. Godlewska, M. Turkowicz, J. Karpińska, Wykorzystanie reakcji derywatywacji w analizie kwasu liponowego, Nauka i przemysł; Metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości; Lublin 2014.
7. J. Karpińska, M. Turkowicz, Analityczne problemy ilościowego oznaczania koenzymu Q10 w próbkach biologicznych, Związki biologicznie czynne – aktywność, struktura, synteza; Białystok 2013.
8. J. Karpińska, M. Turkowicz, N. Śleszyńska, Chromatograficzne badanie zawartości koenzymu Q10 w wybranych produktach spożywczych, XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Farmacja – Nauka – Społeczeństwo; Białystok 2013.

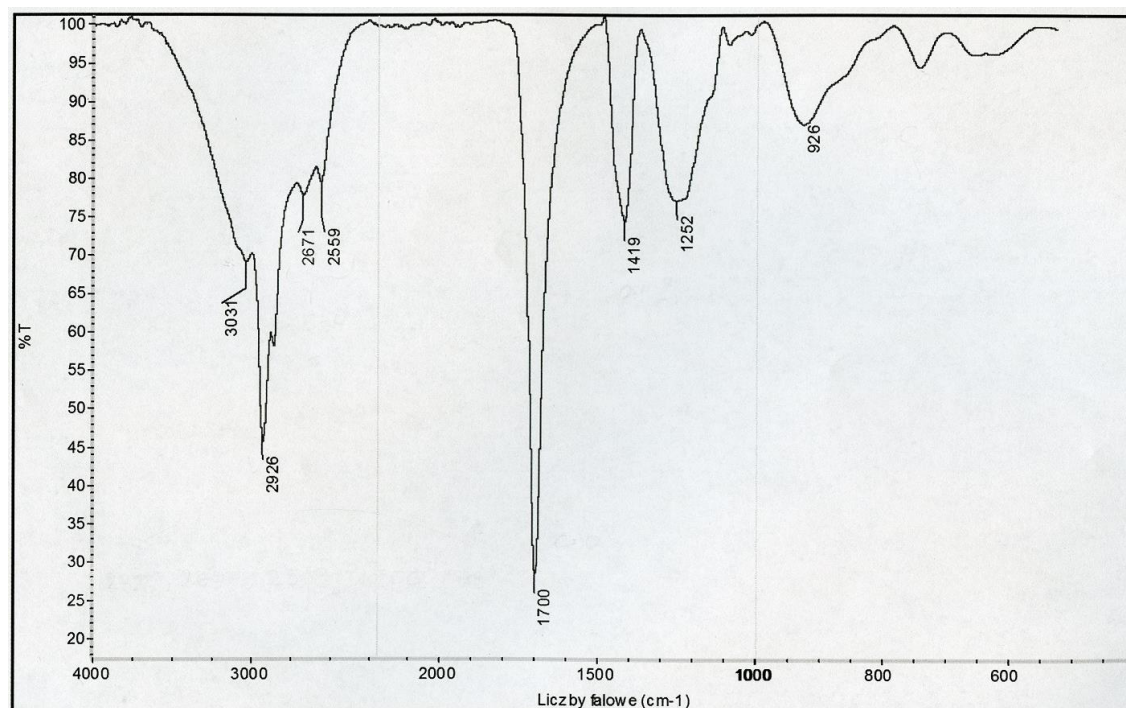
9. E. Dąbrowska, M. Balunowska, M. Letko*, K. Błahuszevska, R. Letko, Fluorki a pożywienie, Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne, Żywność, żywienie – nowe wyzwania; Białystok 2005.
10. M.E. Płońska, M. Turkowicz, K. Winkler, Elektrochemicznie aktywne polimery ferrocenylofullereno[C60]pirolidyny oraz palladu, PTChem; Kraków 2002.
11. M. Turkowicz, M.E. Płońska, Tworzenie oraz elektrochemiczne właściwości polimerów zawierających fullereny oraz pallad, PTChem; Kraków 2002.

* od września 2002 do lutego 2008 moje publikacje ukazywały się pod nazwiskiem Letko

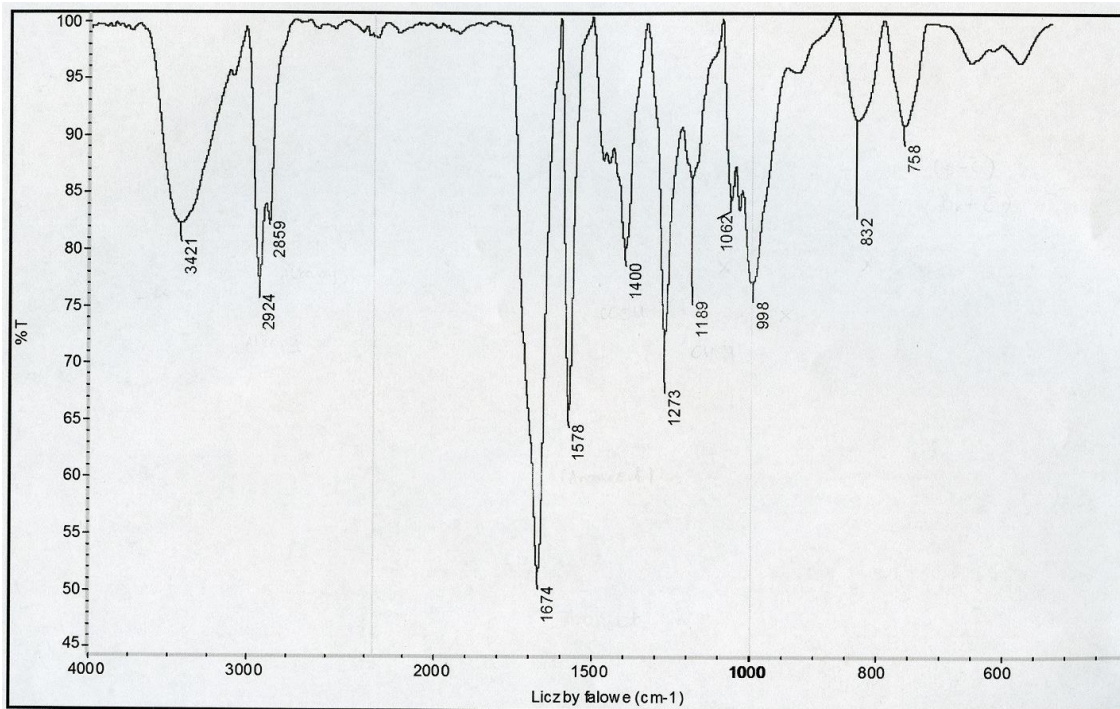
XI. SUPPLEMENT



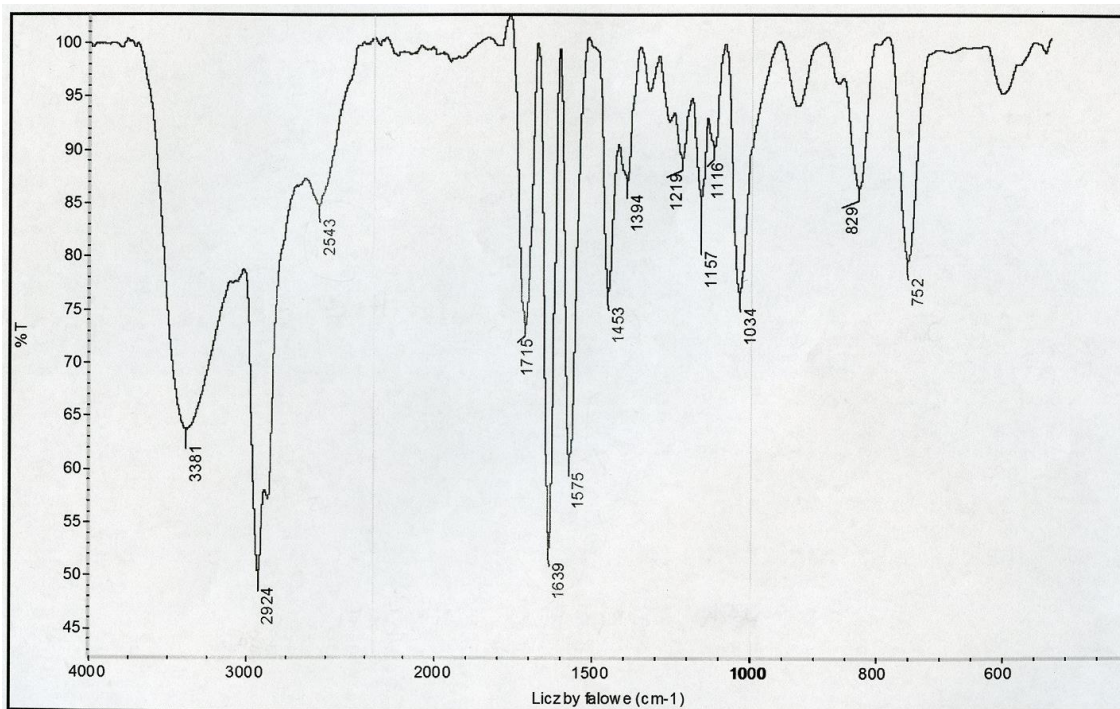
Rys. 31. Widmo IR kwasu liponowego (LA).



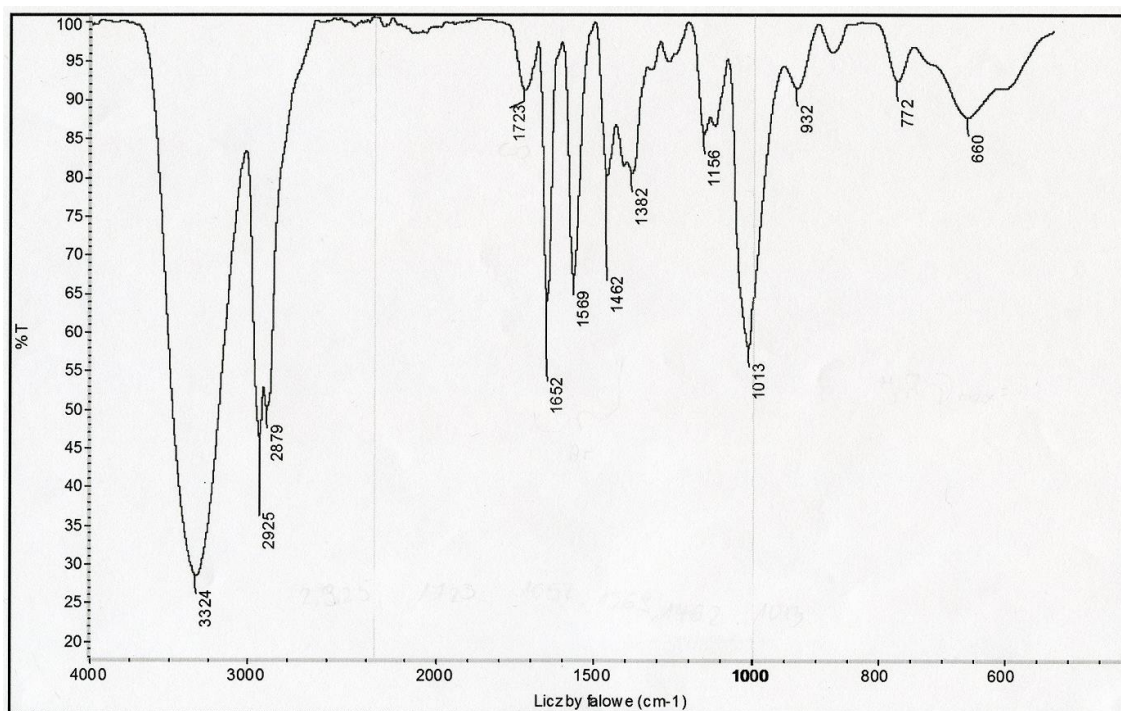
Rys. 32. Widmo IR kwasu dihydroliponowego (DHLA).



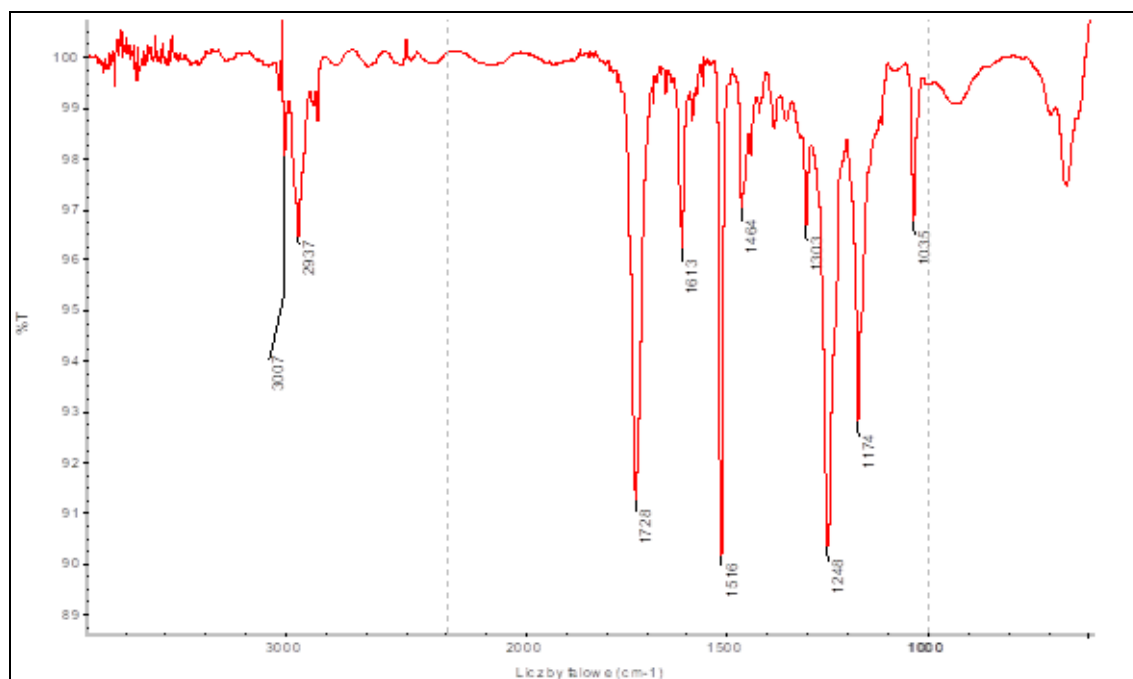
Rys. 33. Widmo IR produktu reakcji estryfikacji kwasu dihydroliponowego (DHLA) z 2,4'-dibromoacetofenem (DBAF).



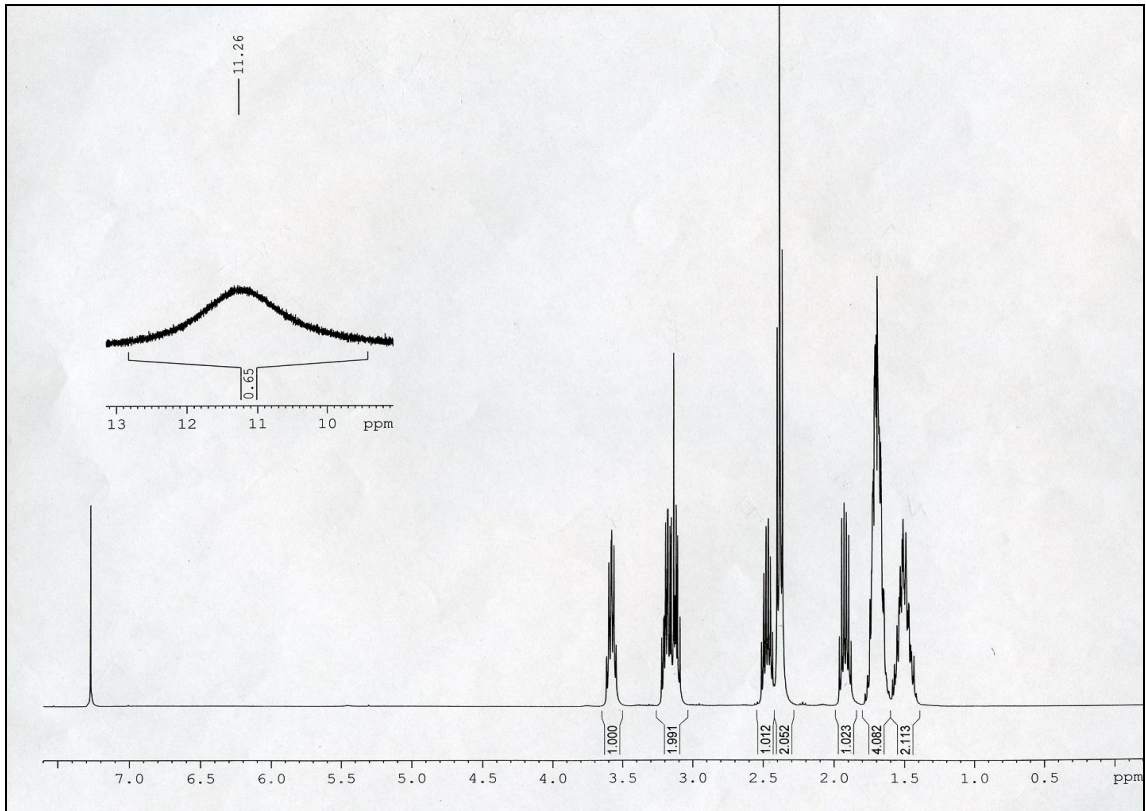
Rys. 34. Widmo IR produktu reakcji estryfikacji kwasu dihydroliponowego (DHLA) z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT).



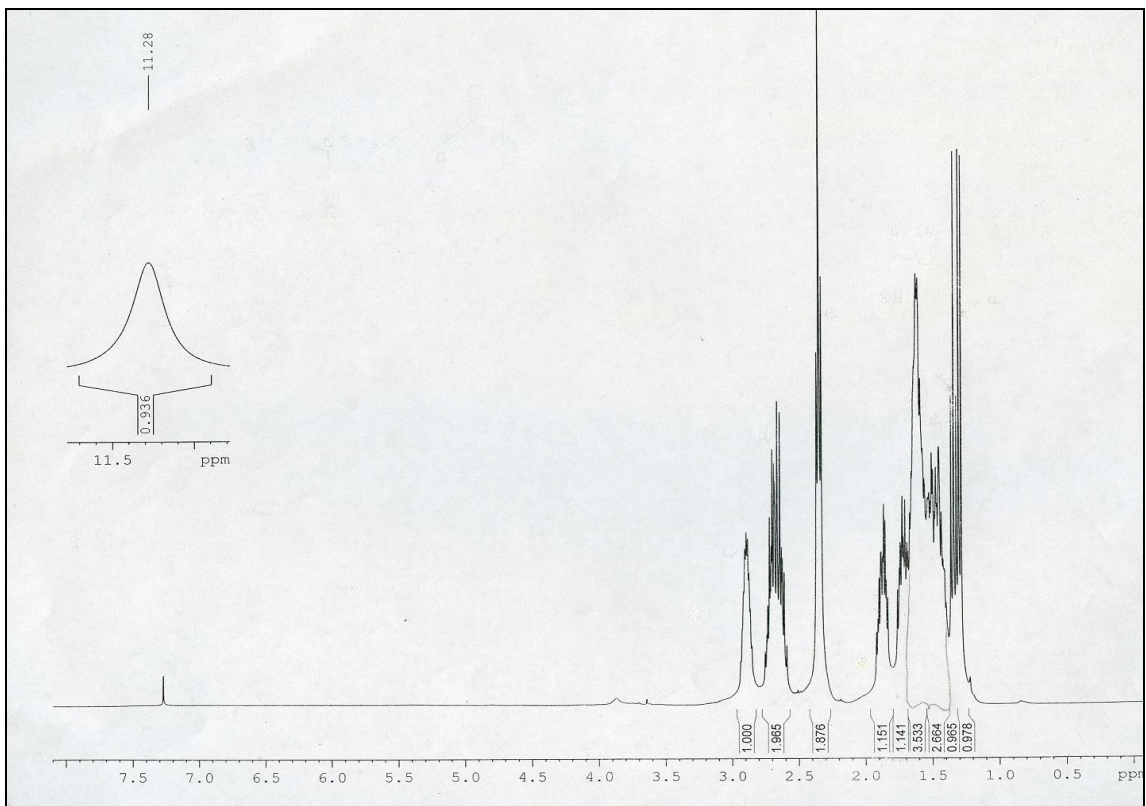
Rys. 35. Widmo IR produktu reakcji estryfikacji kwasu dihydroliponowego (DHLA) z jodkiem 2-chloro-1-metylopyrydyniowym (CMPI).



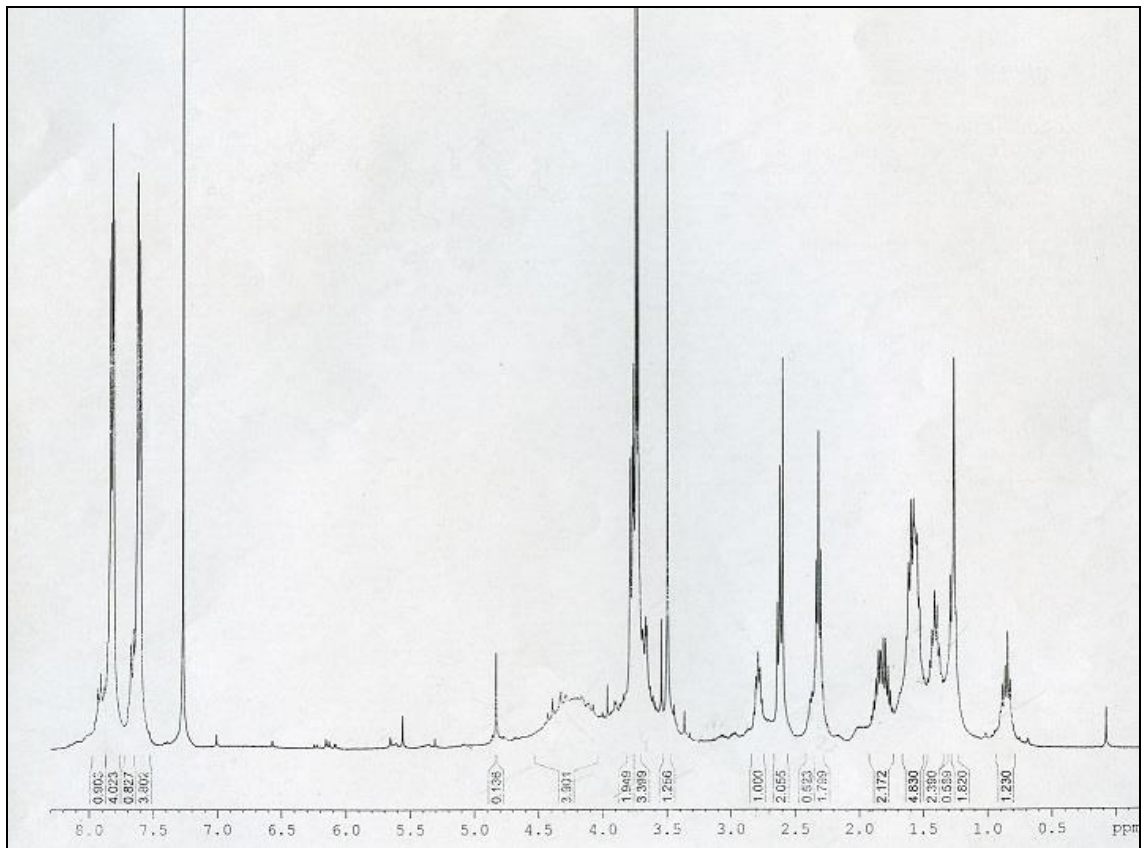
Rys. 36. Widmo IR produktu reakcji estryfikacji kwasu liponowego z 4-metoksybenzylowym (4-MBA).



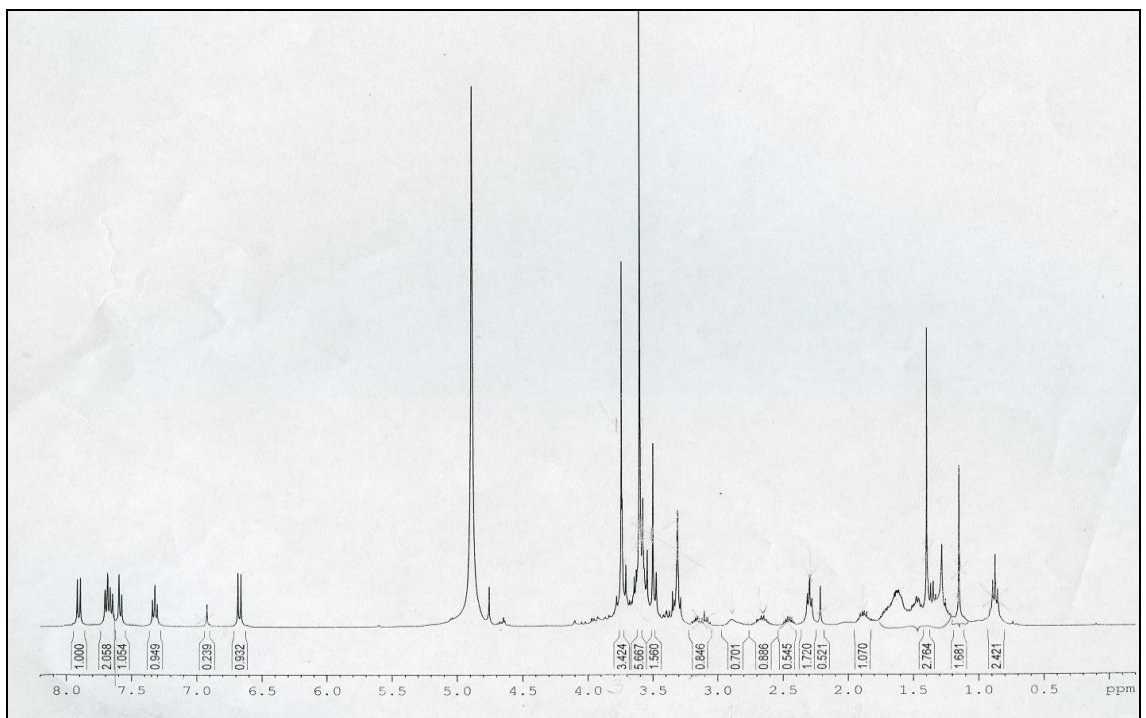
Rys. 37. Widmo NMR kwasu liponowego (LA).



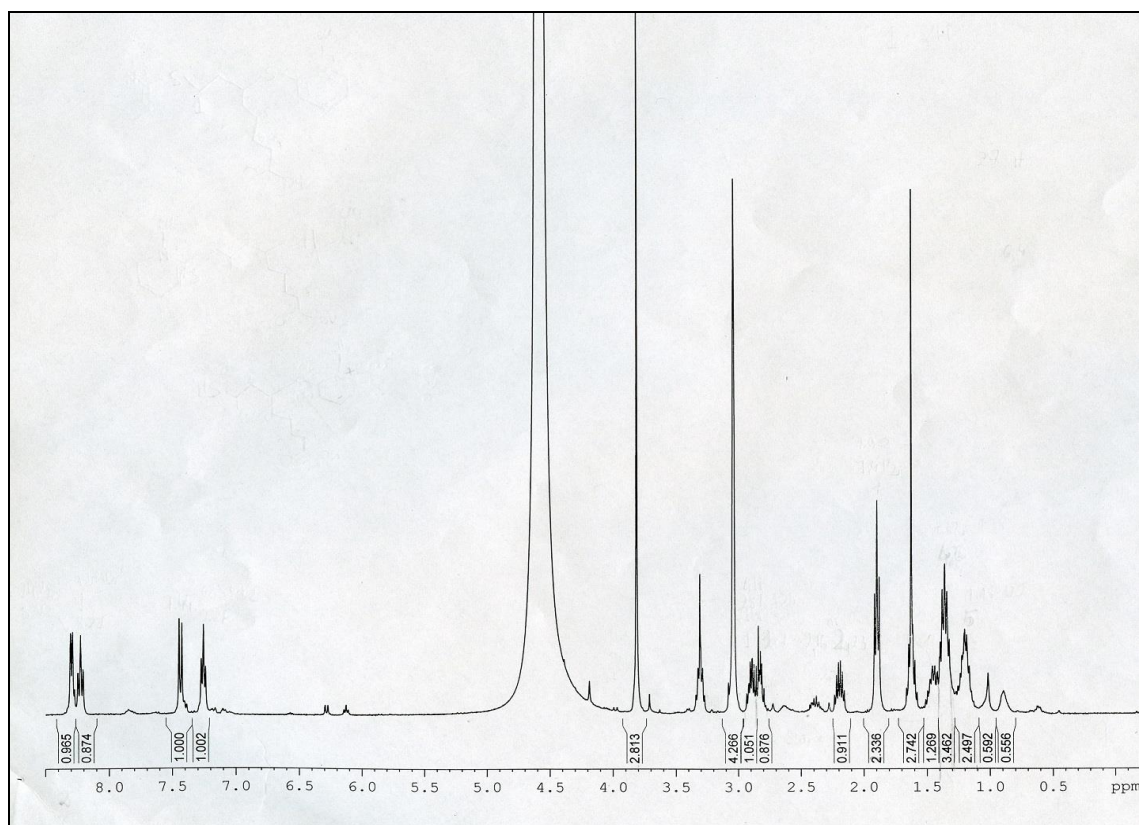
Rys. 38. Widmo NMR kwasu dihydroliponowego (DHLA).



Rys. 39. Widmo NMR produktu reakcji estyfikacji kwasu dihydroliponowego (DHLA) z 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF).



Rys. 40. Widmo NMR produktu reakcji estyfikacji kwasu dihydroliponowego (DHLA) z tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT).



Rys. 41. Widmo NMR produktu reakcji estyfikacji kwasu dihydroliponowego (DHLA) z jodkiem 2-chloro-1-metylopyrydyniowym (CMPI).