

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytetu Łódzkiego

Marta Agata Gaweł

Zastosowanie chromatografii cieczowej sprężonej z różnymi trybami detekcji do oznaczania wybranych małocząsteczkowych związków siarki

Application of liquid chromatography coupled with various
detection modes for the determination of selected low molecular
weight sulfur compounds

Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem promotora
prof. dr. hab. Rafała Głowackiego
oraz promotora pomocniczego
dr hab. Justyny Piechockiej, prof. UŁ
w Katedrze Chemii Środowiska
Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

Łódź 2026

*Panu **Profesorowi Rafałowi Głowackiemu** składam serdeczne podziękowania za opiekę naukową, cenne wskazówki merytoryczne oraz wsparcie na każdym etapie realizacji pracy. Dziękuję za zaufanie, możliwość rozwoju naukowego oraz stworzenie warunków sprzyjających prowadzeniu badań. Pańska wiedza i doświadczenie miały fundamentalne znaczenie dla powstania niniejszej rozprawy.*

*Szczególne podziękowania składam **Pani Profesor Justynie Piechockiej**, za codienne wsparcie, cierpliwość i życzliwość okazywane podczas realizacji badań. Dziękuję za niezliczone konsultacje, pomoc w rozwiązywaniu problemów badawczych, konstruktywną krytykę, motywację w chwilach zwątpienia oraz wsparcie – nieocenione nie tylko w wymiarze naukowym, ale również osobistym.*

*Serdeczne podziękowania składam wszystkim **Pracownikom oraz Doktorantom** Katedry Chemii Środowiska za wspólnie spędzone lata, liczne dyskusje naukowe, wymianę doświadczeń, życzliwą atmosferę oraz wszelką pomoc podczas realizacji badań.*

*Największe podziękowania składam moim **Rodzicom Małgorzacie i Tomaszowi** za bezwarunkową miłość, wsparcie i wiarę we mnie na każdym etapie życia oraz **Narzeczonemu Adrianowi** za cierpliwość, wyrozumiałość, troskę a przede wszystkim spokój, który w chwilach zwątpienia okazał się najcenniejszy.*

Tę pracę dedykuję Wam – z miłością, wdzięcznością i szacunkiem.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli.....	4
1. Biologicznie istotne małowartościowe związki siarki	7
1.1. Metabolizm małowartościowych związków siarki i ich pochodnych .	7
1.2. Rola małowartościowych związków siarki w stanach fizjologicznych i patologicznych	9
2. Charakterystyka badanych próbek.....	12
2.1. Osocze i mocz jako matryce biologiczne	12
2.2. Owoce jako materiał do badań analitycznych	14
3. Oznaczanie małowartościowych związków siarki	18
Cel i zakres pracy.....	21
Cykl publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej	22
Podsumowanie	40
Wnioski końcowe	47
Streszczenie w języku polskim	49
Streszczenie w języku angielskim (Abstract).....	51
Dorobek naukowy	53
Literatura	60

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

4-DPD	4-deoksyperydoksyna
AA	aldehyd octowy
ACN	acetonitryl
ATP	adenozynotryfosforan
BBCP	bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy
CMQT	tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy
Cys	cysteina
Cys-Gly	cysteinylglicyna
FA	kwask mrówkowy
GC	chromatografia gazowa
GSH	glutathion
Hcy	homocysteina
Homo-TCA	kwask 1,3-tiazyno-4-karboksylowy
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPLC-MS/MS	wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
HPLC-UV	wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detekcją spektrofotometryczną
HPLC-MS	wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
HPPTCA	kwask 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo) -1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy
HTL	tiolakton homocysteiny
IF	wskaźnik oddziaływania czasopisma
IS	wzorzec wewnętrzny
LLE	ekstrakcja ciecz-ciecz
MAT	adenozylotransferaza metioninowa
MEA	cysteamina
Met	metionina
MNiSW	Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
MRM	tryb monitorowania wielokrotnych przejść jonowych

MS	spektometria mas
MS/MS	tandemowa spektometria mas
MTCA	kwasy 2-metylo-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowe
MTR	syntaza metioninowa
NAC	<i>N</i> -acetylocysteina
PCA	kwas chlorowy(VII)
PES	polieterosulfon
PLP	fosforan 5'-pirydksalu
re-LLE	reekstrakcję
SAH	S-adenozylhomocysteina
SPE	ekstrakcja ciecz-ciało stałe
TCA	kwasy 1,3-tiazolidyno-4-karboksylowe
TCEP	<i>tris</i> (2-karboksyetylo) fosfina
UV	promieniowanie z zakresu ultrafioletu
UV-Vis	promieniowanie z zakresu ultrafioletu i światła widzialnego

Liczba punktów dla czasopism została określona na podstawie danych z wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych, wskazanych w komunikacie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) z dnia 05.01.2024 r.

W niniejszej rozprawie jako miarę oddziaływania czasopism naukowych zastosowano pięcioletni wskaźnik Impact Factor (IF_5), którego wartości zostały określone na podstawie danych z bazy Journal Citation Reports (dostęp dnia 20.06.2026 r.)

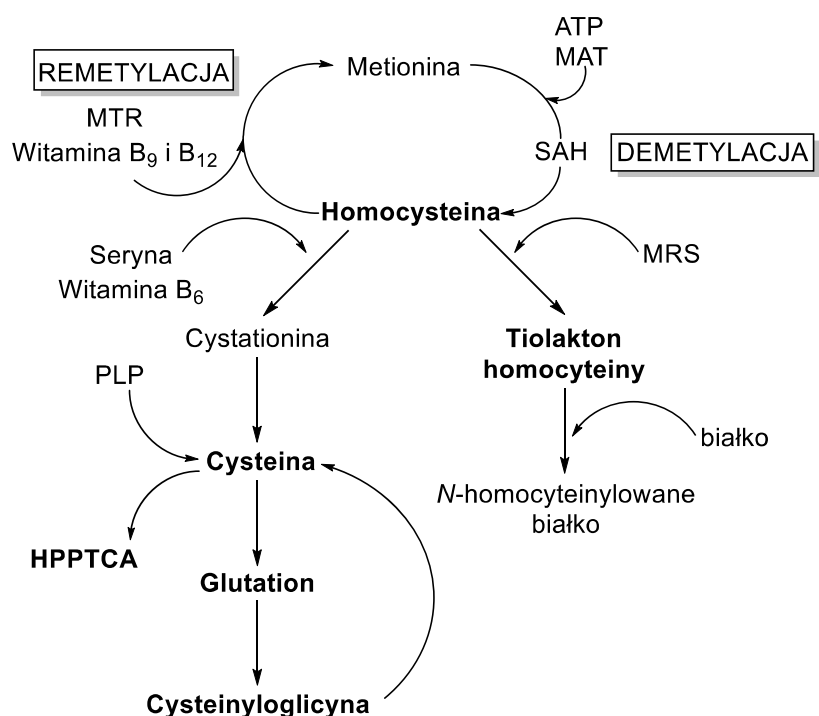
Wprowadzenie do tematyki badań

1. Biologicznie istotne małowcząsteczkowe związki siarki

1.1. Metabolizm małowcząsteczkowych związków siarki i ich pochodnych

Małowcząsteczkowe tiole, w dużym uproszczeniu, powstają w wyniku przemian metabolicznych metioniny (Met), która dostarczana jest do organizmu wraz z pożywieniem [1,2]. W warunkach fizjologicznych Met ulega demetylacji w reakcji katalizowanej przez adenozylotransferazę metioninową (MAT), zachodzącej w obecności adenozynotrifosforanu (ATP), czego efektem jest powstanie S-adenozylometioniny, a następnie S-adenozylohomocysteiny (SAH). W wyniku hydrolizy SAH dochodzi do wytworzenia homocysteiny (Hcy), stanowiącej istotny metabolit przemian związków tiolowych [3]. Dalszy metabolizm Hcy uzależniony jest od aktualnych potrzeb komórki oraz dostępności odpowiednich kofaktorów enzymatycznych. Hcy może podlegać dwóm podstawowym szlakom przemian metabolicznych. Pierwszy z nich obejmuje proces remetylacji, prowadzący do odtworzenia Met przy udziale syntazy metioninowej (MTR), wymagającej obecności witaminy B₁₂ oraz kwasu foliowego (witaminy B₉). Alternatywną drogę stanowi nieodwracalny proces transsulfuracji, w którym Hcy reaguje z seryną, prowadząc do powstania cystationiny, której to rozpad towarzyszy powstawaniu cysteiny (Cys) [2,3]. Kofaktorem tych przemian enzymatycznych jest witamina B₆. Powstała Cys uczestniczy następnie w syntezie glutationu (GSH), który stanowi jeden z najważniejszych wewnątrzcząsteczkowych przeciwutleniaczy [4]. Enzymatyczna degradacja GSH prowadzi do utworzenia cysteinyloglicyny (Cys-Gly), której dalszy rozpad umożliwia ponowne uwolnienie wolnej Cys. Aminokwas ten może zostać ponownie wykorzystany do syntezy γ -glutamylcysteiny, będącej bezpośrednim prekursorem GSH. Opisane tutaj pokrótce procesy biosyntezy i biodegradacji GSH stanowią element cyklu γ -glutamylowego, odgrywającego kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy oksydacyjno-redukcyjnej komórki [3]. Oprócz klasycznych, enzymatycznie kontrolowanych szlaków metabolicznych, wolna Cys może ulegać dodatkowym przemianom wynikającym z jej wysokiej reaktywności chemicznej. W obecności fosforanu 5'-pirydoksalu (PLP), aktywnej metabolicznie formy witaminy B₆, możliwe są reakcje kondensacji pomiędzy grupą aldehydową PLP a grupą aminową oraz reaktywnymi centrami Cys, prowadzące do powstania przejściowych struktur zasady Schiffa. W dalszych etapach dochodzi do cyklizacji,

czego efektem jest utworzenie kwasu 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksyowego (HPPTCA) [5,6]. Jego powstawanie odzwierciedla dodatkowy kierunek „przetwarzania” puli Cys, przy czym metabolizm aminokwasów siarkowych obejmuje nie tylko szlaki enzymatyczne, ale również reakcje nieenzymatyczne. Hcy z kolei, w niewielkim stopniu może ulegać również alternatywnym, niekorzystnym przemianom prowadzącym do powstania jej cyklicznej pochodnej, a mianowicie tiolaktonu homocysteiny (HTL). Związek ten charakteryzuje się wysoką reaktywnością względem białek, co skutkuje ich chemiczną modyfikacją, określaną jako *N*-homocysteinylacja. Mechanizm tego procesu polega na tworzeniu wiązania amidowego pomiędzy HTL a grupą aminową reszt lizyny obecnych w strukturze białek, co skutkuje powstawaniem struktur o trwale zmienionych właściwościach biologicznych [2,7]. Należy podkreślić, że opisane szlaki metaboliczne zachodzą fizjologicznie w organizmie człowieka, przy zachowaniu odpowiedniej podaży Met oraz witamin z grupy B, głównie B₁₂, B₆ i B₉, a także przy prawidłowej aktywności enzymów uczestniczących w metabolizmie Hcy. Zaburzenia tych procesów, wynikające zarówno z czynników genetycznych jak i środowiskowych, mogą prowadzić do nasilenia przemiany Hcy do HTL [8]. Konsekwencją tego zjawiska są nie tylko nieprawidłowości metabolizmu Hcy, lecz również upośledzenie szlaków przemian innych biologicznie istotnych związków siarki, co może mieć znaczenie w patogenezie wielu chorób. Opisany powyżej szlak przemian metabolicznych małowymagających tioli i ich pochodnych zobrazowano schematycznie na Rysunku 1.



Rysunek 1. Uproszczony schemat szlaku przemian metabolicznych małącząsteczkowych związków siarki i ich pochodnych, poglądowo obrazujący relacje między nimi. *Objaśnienia:* MTR - syntaza metioninowa; ATP - adenosynotrifosforan; MAT - adenosylotransferaza metioninowa; SAH - S-adenosylhomocysteina, MRS - syntetaza metionilo-tRNA, PLP - fosforan 5'-pirydoksalu, HPPTCA - kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy. Źródło: opracowanie własne na podstawie informacji zawartych w literaturze [2,3,5,7].

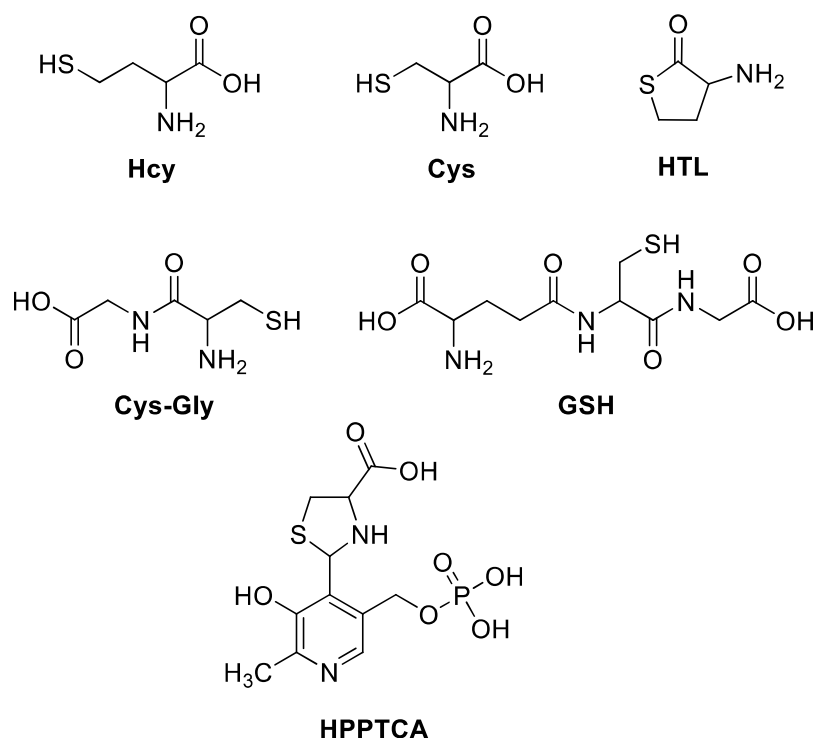
1.2. Rola małącząsteczkowych związków siarki w stanach fizjologicznych i patologicznych

Hcy oraz związane z nią metabolicznie związki tiolowe, takie jak Cys, GSH i Cys-Gly (Rysunek 2), pełnią istotną rolę w regulacji procesów metabolicznych oraz utrzymaniu homeostazy komórkowej. Ze względu na ich znaczenie biologiczne zaliczane są do grupy kluczowych związków siarki, obok takich substancji jak koenzym A, albumina czy siarkowodór oraz produkty jego przemian. Wspólną cechą wymienionych tioli jest obecność grupy tiolowej (-SH), determinującej ich właściwości redukujące oraz zdolność do neutralizacji wolnych rodników, w tym

reaktywnych form tlenu. W reakcjach zachodzących między utleniaczami a tiolami dochodzi do neutralizacji utleniacza do względnie mniej toksycznego produktu ubocznego, czemu towarzyszy powstawanie disiarczków. Proces ten ma charakter odwracalny, dzięki obecności w układach biologicznych reduktaz katalizujących redukcję disiarczków do wolnych tioli. Dzięki temu energia metabolizmu komórkowego pozostaje sprzężona z utrzymaniem prawidłowego stanu oksydacyjno-redukcyjnego (redoks) układów tiolowych [3,9]. Znaczenie małocząsteczkowych tioli nie ogranicza się jednak wyłącznie do ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym. Związki te uczestniczą również w procesach detoksykacji, transdukcji sygnału komórkowego, regulacji apoptozy i odpowiedzi immunologicznej, metabolizmie ksenobiotyków, a także w utrzymaniu prawidłowej struktury oraz aktywności białek i enzymów [3,4,10,11]. Pomimo ich fizjologicznie ochronnej funkcji, zaburzenia stężenia związków tiolowych mogą prowadzić do nasilenia procesów utleniania oraz uszkodzeń komórkowych. W konsekwencji, nieprawidłowości w metabolizmie tioli uznawane są za istotny element patogenezy wielu chorób cywilizacyjnych, szczególnie chorób układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy, chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworów [2,8,9,12–17].

Coraz większe zainteresowanie wśród naukowców budzą mniej poznane pochodne siarkowe, takie HTL czy HPPTCA (Rysunek 2), których aktywność biologiczna oraz potencjalne znaczenie diagnostyczne i patofizjologiczne pozostają przedmiotem licznych badań. W odniesieniu do HTL przeprowadzone dotychczas badania kliniczne jednoznacznie wykazały, że jego podwyższone stężenie w płynach ustrojowych towarzyszy przebiegowi chorób układu sercowo-naczyniowego (miażdżyca), zaburzeniom płodności, chorobom metabolicznym (cukrzyca) czy neurodegeneracyjnym (choroba Alzheimera) [2,7,18–21]. Ponadto wykazano, że wysokie stężenie HTL w moczu stanowi niezależny czynnik ryzyka wystąpienia ostrego zawału mięśnia sercowego u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca [22]. Z punktu widzenia znaczenia biologicznego HPPTCA jest nieporównywalnie mniej poznany związek. Należy on do grupy tiazolidyn, a możliwość jego powstawania w warunkach zbliżonych do fizjologicznych została potwierdzona m.in. w badaniach *in vitro* [5,6,23]. W kontekście endogennego powstawania tej pochodnej należy uwzględnić możliwość wykorzystania suplementacji witaminami z grupy B, w celu redukcji patologicznie podwyższonego stężenia Hcy lub Cys u człowieka [24–26]. Zasadnym

jest więc stwierdzenie, iż tworzenie się HPPTCA stanowi jedną z dróg eliminacji czy też neutralizacji Cys. Z drugiej strony proces powstawania tego związku wiąże się z wykorzystaniem aktywnej metabolicznie formy witaminy B₆, co potencjalnie może wpływać na zmniejszenie jej podaży i sprzyjać rozwojowi niedoborów. Obecność HPPTCA potwierdzono także *in vivo* [27–29], jednak jego dokładna rola biologiczna oraz znaczenie fizjologiczne i patofizjologiczne nie zostały jeszcze jednoznacznie określone. Z tego względu związek ten pozostaje ciekawym obiektem badań w kontekście metabolizmu związków tiolowych oraz potencjalnego znaczenia diagnostycznego.



Rysunek 2. Poglądowe struktury chemiczne małych cząsteczkowych tioli i ich pochodnych, stanowiących obiekty badań. *Objaśnienia:* Cys - cysteina; Cys-Gly - cysteinyloglicyna; GSH - glutation; Hcy - homocysteina; HTL - tiolakton homocysteiny; HPPTCA - kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy.

2. Charakterystyka badanych próbek

2.1. Osocze i mocz jako matryce biologiczne

Jednym z potencjalnych źródeł informacji o stanie zdrowia człowieka i występujących w jego organizmie stanach patologicznych jest analiza płynów biologicznych. Do najczęściej wykorzystywanych w diagnostyce medycznej zalicza się krew (osocze, surowica) oraz mocz. Pomimo że w ostatnich latach zwrócono większą uwagę na płyny ustrojowe, które uznawane są za niekonwencjonalne, np. ślinę [30,31], to nadal wspomniane wcześniej matryce stanowią złoty standard w badaniach klinicznych.

Płyny biologiczne stanowią wymagający materiał analityczny, głównie ze względu na mnogość tworzących je składników (tzw. matryca). Dodatkowym wyzwaniem jest konieczność prawidłowego pobrania płynu, zgodnie z określonymi procedurami, których ścisłe przestrzeganie ma kluczowe znaczenie dla ograniczenia ryzyka zanieczyszczenia próbki oraz przedwczesnej degradacji analitów. Skład chemiczny matrycy determinuje sposób jej dalszego przygotowania, zwłaszcza w przypadku metod wykorzystujących techniki separacyjne, w tym chromatograficzne. Etap przygotowania próbki do analizy stanowi kluczowy element całego procesu analitycznego, gdyż w jego obrębie generowana jest największa liczba błędów. W związku z tym projektowanie procedur przygotowania materiału badawczego wymaga pogłębionej znajomości właściwości, w tym składu analizowanej matrycy, co pozwala na ograniczenie potencjalnych źródeł niepewności (Tabela 1).

Osocze stanowi płynną frakcję krwi, obejmującą około 55% jej objętości. Jego skład w przeważającej części, tj. w około 90-92%, stanowi woda, natomiast pozostałe składniki obejmują zarówno związki organiczne jak i nieorganiczne [32,33]. Największą frakcję składników osocza stanowią białka, wśród których wyróżnia się przede wszystkim albuminy, globuliny oraz fibrynogen. Albuminy pełnią kluczową rolę transportową, wykazując zdolność wiązania licznych analitów, w tym leków oraz ich metabolitów. Oprócz białek stale obecnych w osoczu, mogą w nim okresowo występować również białka związane z procesami patologicznymi, takie jak białka wydzielane przez komórki, a także te pochodzące z rozpadu tkanek i komórek [34]. W osoczu obecne są ponadto fosfolipidy, trójglicerydy oraz

cholesterol. Dodatkowo matryca ta zawiera liczne związki małocząsteczkowe, takie jak glukoza, aminokwasy, mocznik, kreatynina, hormony oraz metabolity leków, jak również elektrolity, w tym kationy sodu, potasu i wapnia oraz aniony chlorkowe [32,33]. W kontekście wykorzystania osocza w badaniach opartych o techniki chromatograficzne, szczególnie problematyczna w procedurze przygotowania próbek jest, wspomniana wcześniej, obecność białek. Wprowadzenie ich do kolumny w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub chromatografii gazowej (GC) może skutkować pogorszeniem rozdzielania składników oraz obniżeniem efektywności układu chromatograficznego. W skrajnych przypadkach może to skutkować uszkodzeniem aparatury analitycznej, np. w wyniku zablokowania kolumny chromatograficznej lub kapilar, toteż bardzo często na etapie przygotowania próbki stosuje się odbiałczanie. Duża zawartość białek i fosfolipidów w osoczu wymaga zastosowania wieloetapowego oczyszczania próbki, nierzadko z wykorzystaniem technik ekstrakcyjnych. Składniki te mogą bowiem powodować tzw. efekt matrycowy, szczególnie problematyczny w analizach prowadzonych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-MS).

Mocz, podobnie jak osocze, składa się głównie z wody, stanowiącej około 95% jego objętości. Pozostałe składniki obejmują m.in. mocznik, kreatyninę, kwas moczowy, sole nieorganiczne oraz liczne metabolity pochodzenia endogennego i egzogennego. U zdrowego człowieka mocz pozbawiony jest cukrów, białek, krwinek białych i czerwonych oraz bakterii [35]. W przeciwieństwie do osocza, jego podstawowy skład cechuje się jednak znacznie większą zmiennością, uzależnioną od wielu czynników fizjologicznych i środowiskowych, takich jak stopień nawodnienia organizmu, aktywność fizyczna, pora dnia czy sposób odżywiania [36]. Badanie tego płynu wiąże się z licznymi trudnościami, wynikającymi przede wszystkim z dużej zmienności jego pH oraz rozcieńczenia, a także wysokiej zawartości soli. W przeciwieństwie do osocza, którego pH utrzymuje się w stosunkowo wąskim zakresie od 7,4 do 7,8 [32], odczyn moczu może podlegać znacznym wahaniom, co istotnie wpływa na przebieg i wiarygodność analiz laboratoryjnych. Prawidłowe pH moczu może mieścić się w stosunkowo szerokim zakresie, wynoszącym od 4,5 do 8,0. Oznaczanie analitów w tej matrycy wymaga zatem najczęściej opracowania procedury umożliwiającej ujednolicenie odczynu próbki, niezależnie od pochodzenia materiału biologicznego. Z tego względu

konieczne jest zastosowanie odpowiednich warunków pH, które umożliwią optymalny przebieg analizy, co najczęściej czyni się przy wykorzystaniu różnego rodzaju buforów. Ponadto mocz stanowi matrycę biologiczną, w której badane związki występują najczęściej w bardzo niskich stężeniach, co wynika między innymi z jego zmiennego rozcieńczenia. Z tego względu konieczne jest stosowanie procedur normalizacyjnych, umożliwiających uzyskanie porównywalnych wyników oznaczeń. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu przeliczenie stężenia oznaczanych analitów względem stężenia kreatyniny, której wydalanie z organizmu poprzez nerki pozostaje na względnie stałym poziomie. Takie podejście pozwala ograniczyć wpływ nawodnienia organizmu oraz objętości wydalanego moczu na końcowy wynik oznaczenia [37]. Co ważne, mocz charakteryzuje się również wysokim stężeniem soli nieorganicznych, co może istotnie utrudniać prowadzenie analiz z wykorzystaniem technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas (MS) oraz detekcją rozpraszania światła z odparowaniem fazy ruchomej. Obecność składników nieorganicznych sprzyja bowiem procesom krystalizacji oraz może prowadzić do zakłóceń procesu jonizacji, wpływając negatywnie na czułość i powtarzalność oznaczeń. Dodatkowym utrudnieniem jest występowanie licznych związków endo- i egzogennych wydalanych z organizmu, które mogą pełnić rolę interferentów i prowadzić do efektu matrycowego, w szczególności zakłócając analizy z wykorzystaniem techniki HPLC-MS. Z tego względu podczas przygotowania próbek moczu dla potrzeb technik chromatograficznych często stosuje się procedury rozcieńczania, odsalania oraz selektywnej ekstrakcji analitów.

2.2 Owoce jako materiał do badań analitycznych

Rozważania dotyczące przygotowania próbek nie ograniczają się wyłącznie do klasycznych matryc biologicznych. Coraz większe znaczenie w badaniach analitycznych przypisuje się materiałowi pochodzenia roślinnego, w szczególności owocom, które stanowią bogate źródło związków bioaktywnych. Podobnie jak w przypadku moczu i osocza, podstawowym składnikiem owoców jest woda, stanowiąca nawet do 90% ich masy. W porównaniu z płynami biologicznymi owoce charakteryzują się jednak znacznie większą różnorodnością składu chemicznego (Tabela 1). Zawierają między innymi węglowodany (fruktozę, glukozę i sacharozę), kwasy organiczne, witaminy, związki polifenolowe, naturalne barwniki, błonnik,

minerały, pektyny oraz metabolity wtórne, których stężenie zależy od gatunku, stopnia dojrzałości, a także warunków uprawy i przechowywania [38]. Należy jednak zaznaczyć, że w owocach mogą występować również pozostałości substancji pochodzenia antropogenicznego, związane ze środowiskiem i sposobem uprawy. Do najczęściej spotykanych należą herbicydy i pestycydy, stosowane w ochronie roślin przed szkodnikami i chorobami. Odpowiedni dobór metod homogenizacji, ekstrakcji i oczyszczania próbek pozwala ograniczyć wpływ substancji interferujących oraz zwiększyć dokładność i powtarzalność uzyskiwanych wyników analitycznych. Jest on jednak ściśle związany z formą, w jakiej występuje analizowany owoc, ponieważ próbkę może stanowić zarówno surowy, nieprzetworzony owoc, jak i uzyskany z niego sok czy dżem. Ponadto, rozważając owoce jako potencjalną matrycę badawczą, należy uwzględnić, czy analizie podlega cały owoc, czy jedynie wybrane jego części, takie jak skórka, miąższ lub nasiona.

Materiał roślinny stanowi próbkę stałą, która przed analizą z wykorzystaniem technik chromatograficznych wymaga odpowiedniego upłynnienia. Kluczowym etapem przygotowania próbek owoców do analizy jest zatem homogenizacja. Proces ten jest jednocześnie jednym z najbardziej problematycznych, ponieważ podczas niszczenia struktur komórkowych dochodzi do uwalniania nie tylko analitów, lecz także enzymów mogących prowadzić do ich częściowej lub całkowitej degradacji. Stąd też powszechnie stosowanym zabiegiem jest przeprowadzanie homogenizacji na lodzie, przy wykorzystaniu zimnych roztworów, zamrażanie próbek owoców chociażby w strumieniu ciekłego azotu i rozcieranie zamrożonych tkanek lub liofilizacja [39–45]. Problemy związane z analizą owoców nie ograniczają się jednak wyłącznie do obecności enzymów. Istotnym wyzwaniem jest również wysoka zawartość cukrów, która może powodować tłumienie jonizacji w technikach HPLC-MS oraz utrudniać zatężanie próbek, np. poprzez ich odparowanie do sucha. Duże znaczenie mają także związki fenolowe i naturalne barwniki, zwłaszcza antocyjany obecne w owocach jagodowych. Związki te wykazują silną absorpcję promieniowania z zakresu ultrafioletu i światła widzialnego (UV-Vis) i mogą interferować podczas oznaczeń chromatograficznych. Podobnie jak mocz, owoce stanowią materiał badawczy o zróżnicowanym pH i składzie chemicznym, zależnym między innymi od gatunku oraz stopnia dojrzałości czy fazy wzrostu owocu, dlatego kluczowe znaczenie ma zapewnienie stałych warunków ekstrakcji analitów

z matrycy poprzez odpowiedni dobór układów buforujących. Podobnie jak w przypadku moczu czy osocza, zastosowanie w analizie owoców znajdują techniki ekstrakcji, zarówno ciecz-ciecz (LLE) jak i ciecz-ciało stałe (SPE), ale również technika QuEChERS [46–48].

Tabela 1. Charakterystyka wybranych matryc - konsekwencje w kontekście przygotowania próbek.

Parametr	Osocze	Mocz	Owoce
Charakter matrycy	płyn biologiczny o wysokiej zawartości białek i lipidów	płyn biologiczny o zmiennym składzie metabolicznym	złożona matryca roślinna bogata w związki organiczne
Główne składniki (oprócz wody)	albuminy, globuliny, fosfolipidy, cholesterol,	mocznik, kreatynina, sole mineralne, metabolity endogenne	cukry, polifenole, kwasy organiczne, barwniki, pektyny
Zawartość białek	wysoka	niska	śladowa
Zawartość lipidów	wysoka	niska	zależna od rodzaju owocu
Dominujące związki interferujące	fosfolipidy i białka	sole oraz metabolity endogenne	cukry, polifenole i pigmenty
Podatność na efekt matrycowy	bardzo wysoka	umiarkowana	wysoka
Najczęściej stosowane techniki przygotowania próbek	wytrącanie białek, SPE, LLE	filtracja, rozcieńczanie, SPE	homogenizacja, LLE, SPE
Wymagana homogenizacja próbki	nie	nie	tak
Stabilność pH matrycy	stabilne	zmienne	zmienne
Główne zalety matrycy	wysoka wartość diagnostyczna	łatwość pobierania i duża dostępność, materiał niezakaźny	bogactwo związków bioaktywnych, łatwa dostępność materiału biologicznego
Główne ograniczenia	złożoność matrycy, silny efekt matrycowy, wiązanie analitów z białkami	duża zmienność składu i pH, obecność licznych metabolitów egzo- i endogennych, konieczność normalizacji wyników	złożoność matrycy, silny efekt matrycowy

Objaśnienia: SPE - ekstrakcja ciecz-ciało stałe; LLE - ekstrakcja ciecz-ciecz

3. Oznaczanie małowcząsteczkowych związków siarki

Ze względu na szereg konsekwencji wynikających z właściwości fizykochemicznych tioli, w tym stabilności, ich oznaczanie w próbkach biologicznych stanowi istotne wyzwanie analityczne. Jednym z najważniejszych problemów jest duża reaktywność grupy -SH, która sprzyja procesom utleniania oraz alkiłowania. W konsekwencji stężenie tioli może ulegać zmianom już na etapie przygotowania materiału badawczego, pomiędzy pobraniem próbki a końcową analizą [3]. Dodatkową trudność stanowi ich znaczna polarność oraz dobra rozpuszczalność w wodzie, co drastycznie ogranicza efektywność ekstrakcji z matryc biologicznych i utrudnia rozdzielanie chromatograficzne z zastosowaniem techniki HPLC w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) [11]. Wpływa ona również na gorszą jonizację w kontekście wykorzystania detekcji MS. Związki te nie posiadają zazwyczaj właściwości umożliwiających bezpośrednią detekcję przy użyciu powszechnie stosowanych w technikach separacyjnych, klasycznych detektorów [11]. Z kolei niska lotność oraz ograniczona stabilność termiczna uniemożliwiają ich oznaczanie w postaci niezmienionej z wykorzystaniem GC [3]. Stąd też bardzo częstym podejściem, podczas oznaczeń tioli, jest zastosowanie derywatyzacji chemicznej, między innymi po to, aby uzyskane pochodne charakteryzowały się większą hydrofobowością, absorbowały promieniowanie z zakresu UV-Vis lub wykazywały fluorescencję. Innym znaczącym utrudnieniem jest występowanie związków tiolowych w różnych formach, wśród których wskazuje się tiole utlenione, zredukowane, związane z białkami czy też różnego rodzaju disiarczki mieszane [49]. Mnogość form tioli, a także brak naturalnych chromoforów oraz fluoroforów w ich strukturze, powodują konieczność stosowania złożonych procedur analitycznych. Dotyczy to w szczególności oznaczania tioli całkowitych, definiowanych jako suma związków zawierających zarówno wolne, jak i związane grupy -SH. W tego rodzaju analizach, oprócz etapu derywatyzacji, niezbędne jest przeprowadzenie redukcji wiązań disiarczkowych w celu uwolnienia wszystkich oznaczanych form. Dodatkową trudność stanowi dobór odpowiednich czynników redukujących i derywatyzujących, od których w znacznym stopniu zależą skuteczność przygotowania próbki oraz wiarygodność uzyskiwanych wyników. Także stosunkowo niskie stężenie tioli w płynach biologicznych, rzędu $\mu\text{mol/l}$ [49] często pociąga za sobą konieczność zateżnienia próbek, np. poprzez odparowywanie

do sucha. Wieloetapowość procesów przygotowania próbki stosowanych podczas oznaczania związków tiolowych stanowi jeden z istotnych czynników wpływających na ocenę ich „uciążliwości środowiskowej” zgodnie z zasadami zielonej chemii. Konieczność przeprowadzania licznych operacji przygotowania próbki, wiąże się ze zwiększonym zużyciem odczynników, rozpuszczalników i energii oraz generowaniem większej ilości odpadów. Dodatkowo, rozbudowane procedury wydłużają czas analizy i zwiększają ryzyko błędów na poszczególnych etapach postępowania. Pomimo wskazanych utrudnień, dotychczas opracowano wiele wartościowych i wiarygodnych metod oznaczania Hcy, Cys, GSH i Cys-Gly przy wykorzystaniu technik separacyjnych takich jak HPLC, GC oraz elektroforeza kapilarna [11,30,50–54]. W przeciwieństwie do nich, liczba metod opracowanych dla potrzeb oznaczania HTL oraz HPPTCA pozostaje dość skromna [27–29,55–57]. Jest to zapewne spowodowane niższymi stężeniami wspomnianych związków, mniejszą stabilnością, ale także relatywnie późniejszym rozpoznaniem ich znaczenia biologicznego i klinicznego. Najslabiej scharakteryzowanym związkiem jest HPPTCA, co znajduje odzwierciedlenie w niewielkiej liczbie dostępnych metod oznaczania [27–29]. Dotychczas w literaturze opisano jedynie pojedyncze procedury analityczne umożliwiające jego oznaczanie, podczas gdy dla klasycznych tioli opracowano szerokie spektrum metod wykorzystujących różne techniki detekcji. Najczęściej wykorzystywana w oznaczeniach małocząsteczkowych związków siarki jest technika HPLC-UV, jednakże w ostatnich latach coraz większą popularność zyskują metody oparte na sprzężeniu HPLC-MS. Te ostatnie charakteryzuje bardzo wysoka czułość, pozwalająca na wykrywanie substancji na poziomie śladowym, wysoka selektywność i specyficzność oraz możliwość jednoczesnego oznaczania wielu analitów bez konieczności ich dokładnego rozdzielania. Dodatkową zaletą jest w tym przypadku brak konieczności przeprowadzania czasochłonnych procedur derywatyzacji, wymaganych podczas stosowania technik HPLC-UV czy GC. Jednak nawet ta najbardziej selektywna i czuła technika posiada istotne ograniczenia. Największe spośród nich stanowi występowanie silnych efektów matrycowych, których wyeliminowanie bądź minimalizacja wymaga indywidualnego podejścia w zależności od oznaczanego analitu lub grupy analitów. Jest to szczególnie widoczne podczas oznaczeń w matrycach biologicznych [58]. Występowanie wspomnianych niedogodności wiąże się zatem z koniecznością oczyszczania materiału poddawanego badaniom.

Najprostszym rozwiązaniem jest zastosowanie odpowiedniego rozcieńczenia próbki, jednakże podejście to nie zawsze przynosi oczekiwany efekt i konieczne jest przeprowadzenie selektywnej ekstrakcji analitu. Ostatecznie, efekty matrycowe pozostają często niemożliwe do wyeliminowania, a jedynym rozwiązaniem jest ich minimalizacja. Z tego powodu w badaniach ilościowych techniką HPLC-MS często stosuje się procedury oparte na dodatku wzorca wewnętrznego (IS). Odpowiednio dobrany IS powinien mieć możliwie zbliżone do analitu właściwości fizykochemiczne, a w konsekwencji chromatograficzne (tj. powinien być eluowany w zbliżonym czasie retencji). Powinien również wykazywać podobną charakterystykę w kontekście jonizacji i fragmentacji. Jednocześnie jego masa cząsteczkowa powinna się różnić od masy analitu, a sam związek nie powinien być naturalnym składnikiem próbki [59]. Najlepszym wyborem są zatem wzorce znakowane izotopowo, które często nie są dostępne komercyjnie (np. HPPTCA) lub są bardzo drogie, co znacznie zmniejsza aplikacyjność metod opracowanych z ich udziałem. W przypadku analiz dotyczących małych cząsteczek tioli także fakt, że jonizują one znacznie łatwiej w trybie jonów dodatnich niż ujemnych, może okazać się problematyczny, ponieważ analiza jonów dodatnich jest bardziej podatna na interferencje pochodzące od tzw. szumu chemicznego. Pomimo wymienionych ograniczeń techniki HPLC-MS są obecnie uznawane za jedno z najbardziej perspektywicznych narzędzi do oznaczania związków tiolowych w materiale biologicznym.

Cel i zakres pracy

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie narzędzi analitycznych, opartych na wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z różnymi trybami detekcji, dedykowanych oznaczaniu wybranych, ważnych biologicznie związków siarki, w płynach ustrojowych oraz tzw. superowocach. Osiągnięcie celu nadrzędnego było możliwe dzięki realizacji szeregu celów szczegółowych, które obejmowały:

- opracowanie i optymalizację etapów przygotowania próbek osocza, moczu i owoców jagodowych do analizy chromatograficznej, uwzględniających specyfikę badanych matryc, ze szczególnym naciskiem na zapewnienie wysokiego odzysku analitów oraz minimalizację wpływu składników matrycy,
- dobór oraz optymalizację warunków rozdzielania chromatograficznego i parametrów detekcji, zapewniających wysoką czułość i selektywność oznaczeń,
- przeprowadzenie pełnej walidacji opracowanych metod zgodnie z obowiązującymi wytycznymi, ale także ocenę stabilności oznaczanych analitów,
- zastosowanie zwalidowanych metod do analizy tzw. próbek rzeczywistych w celu potwierdzenia ich przydatności praktycznej.

**Cykl publikacji
stanowiących podstawę
rozprawy doktorskiej**

Publikacja [D1]:

M Gawęł, J. Piechocka, R. Głowacki, Tiazynowe i tiazolidynowe pochodne aminokwasów siarkowych i wybranych endogennych aldehydów. *Wiad. Chem.* 78 (2024), 1607-1625.

(punktacja MNiSW₂₀₂₄=20)

Ważną grupę związków aktywnych biologicznie, obecnych w organizmie człowieka, stanowią aminokwasy siarkowe, takie jak homocysteina (Hcy) i cysteina (Cys). Istotne znaczenie mają również aldehydy, dość powszechnie występujące w środowisku naturalnym, które do organizmu człowieka dostają się głównie poprzez drogi oddechowe. Aldehydy powstają również endogennie na skutek przemian metabolicznych aminokwasów, węglowodanów, witamin, steroidów, amin biogennych czy też w procesach komórkowych, takich jak peroksydacja lipidów. Jednym z głównych czynników decydujących o powstawianiu wysoce reaktywnych aldehydów jest stres oksydacyjny. Wykazano ponadto, że aminokwasy tiolowe oraz aldehydy mogą ze sobą reagować tworząc tiazynowe i tiazolidynowe pochodne. Szczególnie te, będące wynikiem reakcji pomiędzy Cys lub Hcy a aldehydem mrówkowym, aldehydem octowym (AA) czy fosforanem 5'-pirydoksalu (PLP), wydają się istotne z biologicznego punktu widzenia. W organizmie człowieka, w wyniku reakcji kondensacji pomiędzy Cys a aldehydem mrówkowym powstaje kwas 1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy (TCA). Związek ten wykazuje aktywność przeciwutleniającą oraz zdolność do neutralizacji wolnych rodników, co może ograniczać uszkodzenia błon komórkowych oraz przyczyniać się do spowolnienia procesów starzenia. TCA stosowany jest szeroko jako suplement diety o potencjalnym działaniu hepatoprotekcyjnym, przeciwzapalnym i przeciwcukrzycowym. Dotychczas opracowane metody jego oznaczania w matrycach biologicznych oparte są na technikach LC-MS/MS, HPLC-UV oraz GC-MS [60–62]. Dzięki nim wykazano, że stężenie TCA w moczu może wzrastać w warunkach ekspozycji na FA, co sugeruje jego potencjalne zastosowanie jako biomarkera takiego narażenia.

Wykazano natomiast, że w reakcji Cys z AA powstaje kwas 2-metylo-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy (MTCA), który uznawany jest za związek nietoksyczny, a jego oznaczanie w płynach biologicznych realizowano głównie z wykorzystaniem

technik HPLC-MS/MS oraz GC-MS. Potwierdzono również, że w wyniku reakcji Cys z PLP powstaje stosunkowo nietrwała pochodna, a mianowicie kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy (HPPTCA). Proces ten zachodzi w warunkach fizjologicznych i wydaje się, że może wpływać na metabolizm witaminy B₆. Opracowane dotychczas nieliczne metody, służące oznaczaniu HPPTCA opierają się o techniki HPLC-UV oraz GC-MS. W ramach niniejszej rozprawy opracowałam pierwszą metodę bazującą na technice HPLC-MS/MS [D3].

Wśród pochodnych aldehydów i Hcy dotychczas najlepiej poznaną jest pochodna powstająca w wyniku kondensacji tego tiolu z aldehydem mrówkowym - kwas 1,3-tiazyno-4-karboksylowy (homo-TCA). W badaniach wykorzystano technikę GC-MS, dzięki której oznaczono i potwierdzono obecność homo-TCA w moczu człowieka [63]. Jak dotąd nie opracowano metod umożliwiających potwierdzenie obecności pochodnych Hcy z AA i PLP w płynach biologicznych człowieka.

Tiazynowe i tiazolidynowe pochodne aminokwasów tiolowych oraz endogennych aldehydów stanowią bardzo interesujące obiekty badań. Ich rola w organizmach żywych pozostaje w dużej mierze niewyjaśniona, dlatego kluczowe znaczenie ma opracowanie odpowiednich metod analitycznych umożliwiających zarówno potwierdzenie ich obecności w płynach biologicznych człowieka, jak i monitorowanie stężeń.

TIAZYNOWE I TIAZOLYDYNOWE POCHODNE AMINOKWASÓW SIARKOWYCH I WYBRANYCH ENDOGENNYCH ALDEHYDÓW

THIAZINE AND THIAZOLIDINE DERIVATIVES OF SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS AND SELECTED ENDOGENIC ALDEHYDES

**Marta Gawel^{1,2*}, Justyna Piechocka¹,
Rafał Głowacki¹**

¹*Katedra Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki*

²*Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Łódzki*

**e-mail: marta.gawel@edu.uni.lodz.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Charakterystyka przedmiotu badań

1.1. Aminokwasy tiolowe - cysteina i homocysteina

1.2. Wybrane endogenne aldehydy

1.3. Reaktywność aldehydów względem cysteiny i homocysteiny

1.4. Aminokwasy tiolowe i wybrane aldehydy w stanach (pato)fizjologicznych
w organizmie człowieka

2. Oznaczanie wybranych tiazolidynowych pochodnych

2.1. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i formaldehydu

2.2. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i acetaldehydu

2.3. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i fosforanu 5'-pirydoksalu

3. Metody oznaczania wybranych tiazynowych pochodnych

3.1. Tiazynowa pochodna homocysteiny i formaldehydu

3.2. Tiazynowa pochodna homocysteiny i acetaldehydu

3.3. Tiazynowa pochodna homocysteiny i fosforanu 5'-pirydoksalu

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Marta Gawel jest studentką drugiego roku w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego. W 2022 roku uzyskała tytuł magistra w zakresie chemii na podstawie przedstawionej pracy „Optymalizacja procedury przygotowania próbek owoców jagodowych do oznaczania całkowitej zawartości wybranych aminokwasów tiolowych techniką LC-DAD”, którą przygotowała pod kierunkiem prof. dra hab. Rafała Głowackiego. Obecnie prowadzi badania dotyczące opracowywania metod umożliwiających oznaczanie związków biologicznie ważnych w różnych matrycach biologicznych z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Badania realizuje w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod opieką prof. dra hab. Rafała Głowackiego oraz dr Justyny Piechockiej.



<https://orcid.org/0009-0006-2241-6877>

Dr Justyna Piechocka jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Rozprawę doktorską zatytułowaną „Wysokosprawna chromatografia cieczowa wybranych pochodnych endogennych tioli” obroniła w 2018 roku. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się na opracowywaniu metod analizy próbek biologicznych (mocz, ślina, osocze) na zawartość istotnych z biologicznego punktu widzenia endo- i egzogennych związków siarki. Metody te, opierają się na wykorzystaniu technik separacji w fazie ciekłej i gazowej. Dodatkowy aspekt badawczy stanowi poszukiwanie związków, które mogłyby pełnić rolę nowych markerów wybranych chorób cywilizacyjnych, w szczególności nieznanych metabolitów homocysteiny i spokrewnionych z nią w szlaku przemian metabolicznych związków siarki.



<https://orcid.org/0000-0002-1160-3160>

Prof. dr hab. Rafał Głowacki jest pracownikiem Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Od roku 2011 kieruje Katedrą Chemii Środowiska, w której realizowane są interdyscyplinarne badania z pogranicza chemii analitycznej, biochemii oraz medycyny. Jego zainteresowania naukowe dotyczą rozwoju nowoczesnych metod analitycznych, bazujących na różnych odmianach technik separacyjnych i ich aplikacji do próbek biologicznych, m.in. osocza krwi, moczu, śliny, tkanek stałych, a także próbek środowiskowych. W obszarze badań biomedycznych specjalizuje się w analizie związków siarki, spośród których szczególne miejsce zajmuje tiolakton homocysteiny i produkty jego przemian metabolicznych. Główne techniki badawcze stanowią wysokosprawna chromatografia cieczowa oraz chromatografia gazowa, sprzężone z różnymi trybami detekcji, w tym z detekcją mas, a także wysokosprawna elektroforeza kapilarna. Profesor Rafał Głowacki jest autorem/współautorem ponad 120 publikacji, w tym 107 notowanych w bazie JCR.



<https://orcid.org/0000-0003-0071-1470>

ABSTRACT

Sulfur-containing amino acids, including cysteine (Cys) and homocysteine (Hcy), as well as aldehydes such as formaldehyde (FA), acetaldehyde (AA), pyridoxal 5'-phosphate (PLP), acrolein (ACR), malondialdehyde (MDA), croton aldehyde (CA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) widely occur in the human body. As indicated in the literature, abnormal (elevated) concentrations of these compounds in humans may result in or even be the cause of the occurrence/development of some civilization diseases. At the same time, the literature provides the evidence that Cys and Hcy are highly reactive towards aldehydes resulting in formation of substituted thiazolidine and thiazine carboxylic acids, respectively. Importantly, it has been shown that these adducts are formed in vitro and in vivo, while chromatographic techniques are suitable for their monitoring in biological samples. In this work, the above-mentioned issues are discussed. In particular, Cys and Hcy as well as selected endogenous aldehydes are characterized, and their role in human body in health and disease is discussed. Moreover, chromatographic methods enabling determination of selected adducts of Cys and Hcy with the above-mentioned aldehydes in biological samples are described.

Keywords: homocysteine, cysteine, 1,3-thiazolidine-4-carboxylic acids, 1,3-thiazine-4-carboxylic acids, chromatography

Słowa kluczowe: homocysteina, cysteina, kwasy 1,3-tiazolidyno-4-karboksylowe, kwasy 1,3-tiazyno-4-karboksylowe, chromatografia

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AA	– aldehyd octowy
ACN	– acetonitryl
ACR	– akroleina
CA	– aldehyd krotonowy
- COOH	– grupa karboksylowa
Cys	– cysteina
GC-MS	– chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
Glu	– glutation
FA	– aldehyd mrówkowy
Hcy	– homocysteina
Hcy-PLP	– kwas 2-pirydoksylo-1,4-tiazyno-4-karboksylowy
homo-MTCA	– kwas 2-metylo-tetrahydro-1,3-tiazyno-4-karboksylowy
homo-TCA	– kwas 1,3-tiazyno-4-karboksylowy
HPLC-UV	– wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem spektrofotometrycznym
HPPTCA	– kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy
LC-MS/MS	– chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas
MDA	– dialdehyd malonowy
Met	– metionina
MTCA	– kwas 2-metylo-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy
-NH ₂	– grupa aminowa
PLP	– fosforan 5'-pirydoksalu
-SH	– grupa sulfhydrylowa
TCA	– kwas 1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy
4-HNE	– 4-hydroksynonenal

WPROWADZENIE

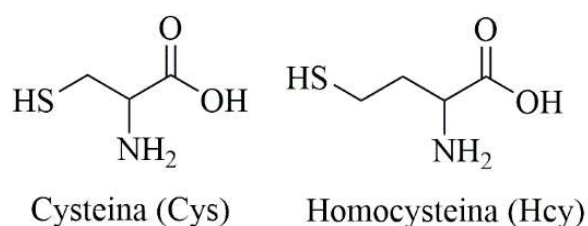
W organizmie człowieka zachodzi szereg skomplikowanych przemian metabolicznych, w wyniku których powstają rozmaite związki chemiczne, odpowiedzialne często za jego prawidłowe funkcjonowanie. Niekiedy jednak dochodzi do zachwiania fizjologicznej równowagi, wskutek czego następuje rozwój różnego rodzaju patologii. Zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu przyczyniają się do wygenerowania szeregu schorzeń zaliczanych do chorób cywilizacyjnych, których geneza z roku na rok zdaje się być coraz lepiej poznana. Do wspomnianych patologii można zaliczyć np. choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Parkinsona i choroba Alzheimera, choroby układu krążenia czy choroby nowotworowe. Niewątpliwie ważnymi z biologicznego punktu widzenia związkami, które występują w organizmie człowieka są aminokwasy siarkowe, do których zalicza się m.in. homocysteinę (Hcy) i cysteinę (Cys). Inną istotną grupę stanowią aldehydy. Wykazano, że w wielu przypadkach związki te są w stanie ze sobą reagować, a produktami tych reakcji są tiazynowe oraz tiazolidynowe pochodne. Z racji ich potencjalnej roli w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu człowieka zasadnym jest ich badanie, w tym opracowywanie metod oznaczania w płynach biologicznych. Niniejsze opracowanie jest poświęcone pochodnym Hcy oraz Cys z formaldehydem (FA), aldehydem octowym (AA), fosforanem 5'-pirydoksalu (PLP), akroleiną (ACR), dialdehydem malonowym (MDA), aldehydem krotonowym (CA) oraz 4-hydroksynonenalem (4-HNE).

1. Charakterystyka przedmiotu badań

1.1. Aminokwasy tiolowe – cysteina i homocysteina

Małocząsteczkowe związki siarki, takie jak Cys, Hcy (Rysunek 1) czy glutation (Glu) należą do szerokiej i różnorodnej grupy związków – przeciwutleniaczy. Ich charakterystyczną cechą strukturalną jest posiadanie trzech grup funkcyjnych, tj. grupy aminowej (-NH₂), karboksylowej (-COOH) i sulfhydrylowej (-SH). Jedną z ich ról jest natomiast ochrona organizmu przed negatywnymi skutkami działania stresu oksydacyjnego. Szczególną rolę w tym obszarze odgrywa Glu. W warunkach fizjologicznych aminotiole pełnią szereg innych ważnych funkcji, a zakłócenia w ich metabolizmie wiązane są z rozwojem szeregu tzw. chorób cywilizacyjnych, do których należą choroby układu krążenia, choroby neurodegeneracyjne czy nowotwory. Cys oraz Hcy powstają w wyniku przemian metabolicznych metioniny (Met), aminokwasu dostarczanego do organizmu wraz z pokarmem. W pierwszym etapie wspomnianych przemian Met ulega demetylacji, w wyniku której powstaje Hcy. Ta z kolei ulega reakcji transsulfuracji, która prowadzi do powstania Cys.

Źródłem Cys w organizmie człowieka jest przede wszystkim pełnowartościowa żywność, między innymi mięso, ryby, jaja, orzechy, nasiona oraz warzywa i owoce. W przypadku niedoboru może być dostarczana do organizmu w postaci suplementów diety [1]. W przeciwieństwie do Cys, Hcy nie występuje w produktach spożywczych, więc powstaje ona jedynie w wyniku przemian Met. Zarówno Cys jak i Hcy posiadają w swojej strukturze niezwykle reaktywną grupę -SH, której obecność w dużo większym stopniu niż grupy -COOH i -NH₂ determinuje właściwości fizykochemiczne. Tym samym określa rolę jaką pełnią one w organizmach żywych.



Rysunek 1. Poglądowe struktury chemiczne cysteiny i homocysteiny
Figure 1. Chemical structures of cysteine and homocysteine

1.2. Wybrane endogenne aldehydy

Aldehydy są to związki chemiczne dość powszechnie występujące w środowisku. Ekspozycja organizmu człowieka na czynniki środowiskowe przyczynia się zatem do ich wchłaniania, głównie poprzez drogi oddechowe [2]. Na obszarach uprzemysłowionych aldehydy powstają w większości w wyniku spalania ropy naftowej i jej pochodnych. Dzieje się to bezpośrednio lub też poprzez przekształcanie węglowodorów w wyniku fotochemicznych reakcji utleniania [3]. Źródłem aldehydów w środowisku jest także dym papierosowy [3]. Co ciekawe wykazano, że źródłem szkodliwych aldehydów są także popularne w ostatnich latach tzw. e-papierosy, uważane za bezpieczniejszą alternatywę dla tradycyjnego palenia tytoniu. Endogenne aldehydy powstają również w organizmie człowieka na skutek przemian metabolicznych aminokwasów, węglowodanów, witamin, steroidów, amin biogennych czy procesów komórkowych, takich jak peroksydacja lipidów [4]. Jednym z głównych czynników przyczyniających się do powstawania w organizmie wysoce reaktywnych aldehydów jest stres oksydacyjny. Związki te reagują bezpośrednio z DNA, czego skutkiem jest doprowadzenie do jego uszkodzeń, co z kolei przyczynia się do rozwoju różnych stanów patofizjologicznych, takich jak nowotwory, stany zapalne czy choroby neurodegeneracyjne [4,5]. Grupa aldehydów występujących w organizmie człowieka jest dość liczna, a wśród nich możemy

wymienić MDA, ACR, CA, 4-HNE – stanowiące główne produkty peroksydacji lipidów, a także PLP, FA i AA (Rysunek 2).

Spośród endogennych aldehydów najprostszym pod względem budowy jest FA (metanal, formaldehyd). Powstaje on podczas metabolizmu wielu substancji, zarówno endo- jak i egzogennych, np. Met, seryny, glicyny, choliny oraz podczas demetylacji związków, które w swojej budowie posiadają grupy: *N*-, *O*- oraz *S*-metylowe. Jest związkiem, który ze względu na znaczną rozpuszczalność w wodzie łatwo wchłania się do organizmu poprzez drogi oddechowe lub przez skórę. Ponieważ jest on popularnym odczynnikiem używanym w wielu gałęziach przemysłu, jego obecność stanowi niepodważalnie o ryzyku zawodowym [6]. Stosowany jest powszechnie w produkcji klejów, barwników, farb oraz lakierów. Wykorzystywany jest także w przemyśle papierniczym, fotograficznym, garbarskim, rafineryjnym i w budownictwie [7]. FA zyskał popularność także w branży kosmetycznej, a jego 37% roztwór w wodzie (formalina) jest powszechnie stosowany do dezynfekcji oraz jako konserwant. Do organizmu może dostać się także w wyniku spożycia owoców, surowych warzyw, mięsa, ryb czy mleka [8]. FA w środowisku powstaje między innymi w wyniku utleniania metanu a także związków występujących naturalnie takich jak terpenoidy [3].

AA (etanal, acetaldehyd) powstaje w organizmie człowieka, a konkretnie jest on wytwarzany w wątrobie, głównie wskutek przemian metabolicznych spożytego alkoholu etylowego [9]. Podobnie jak FA może także zostać wprowadzony do organizmu drogą pokarmową [8]. Jego zwiększone stężenie w organizmie człowieka wiąże się z rozwojem szeregu powikłań związanych z nadmiernym spożywaniem alkoholu etylowego, takich jak rak przełyku, wątroby czy gardła [5]. Również wdychanie oparów acetaldehydu, których źródłem mogą być np. spaliny samochodowe, może wywołać skutki podobne do zatrucia alkoholem etylowym (ból głowy, nudności, wymioty).

PLP określany jest mianem aktywnej formy witaminy B₆. W organizmie człowieka powstaje na skutek metabolizmu pirydoksyny pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Zwierzęta oraz człowiek wykorzystują także pirydoksynę syntezowaną w niewielkich ilościach przez bakterie jelitowe oraz dostarczaną do organizmu w postaci suplementów diety. Szczególnie bogate źródło witaminy B₆ stanowią mięso, warzywa oraz owoce [10].

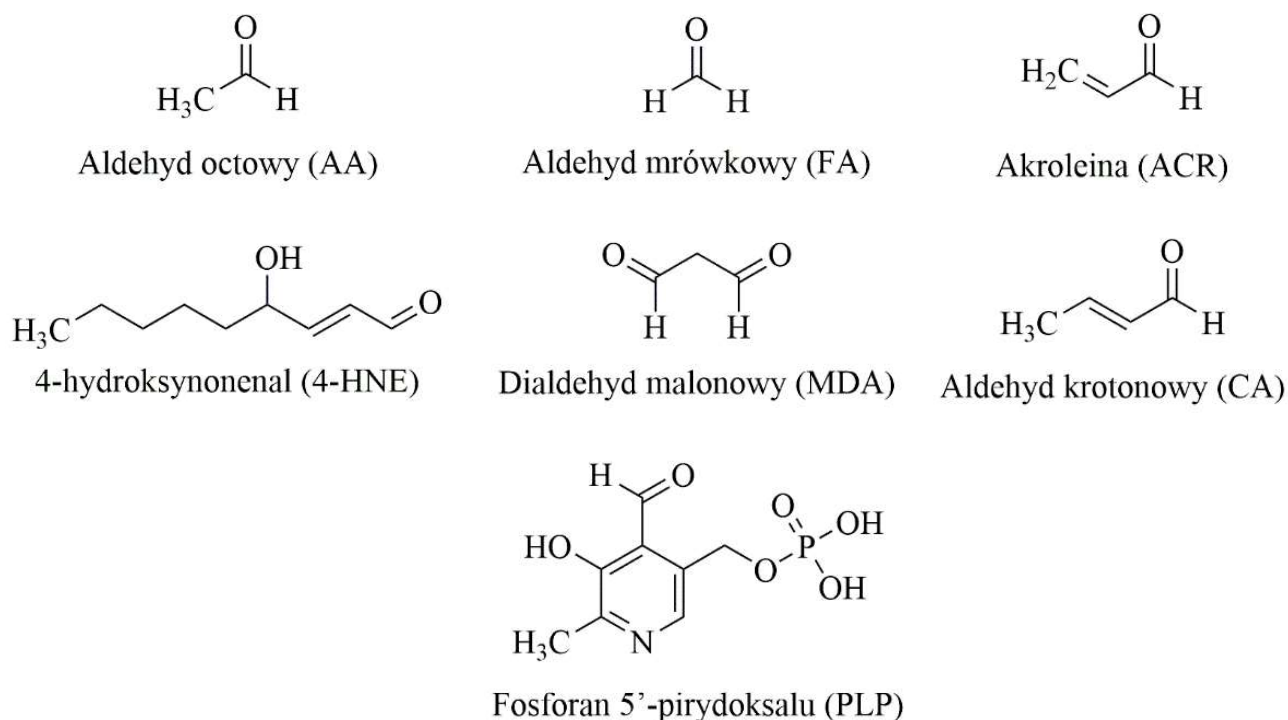
ACR (propenal, akroleina) to aldehyd, który produkowany jest przez organizm człowieka podczas peroksydacji lipidów i na skutek metabolizmu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Może także do niego trafić w wyniku

narażenia na czynniki zewnętrzne, takie jak wdychanie oparów kuchennych, dymu papierosowego czy spalin samochodowych. ACR powstaje również w wyniku biotransformacji cyklofosfaminu – powszechnie stosowanego leku przeciwnowotworowego [11]. Źródłem ACR jest także żywność [12]. Obecność ACR potwierdzono w warzywach, owocach oraz różnego rodzaju popularnych napojach, takich jak piwo, wino, kawa czy herbata [8]. Ponieważ jest ona najsilniejszym elektrofilem spośród wszystkich α,β -nienasyconych aldehydów, do których zalicza się także 4-HNE i CA, wykazuje największą reaktywność w stosunku do nukleofilowej grupy tiolowej Cys [11].

4-HNE jest silnie reaktywną cząsteczką, stanowiącą jeden z głównych czynników przyczyniających się do powstawania stresu oksydacyjnego. Jedną z najważniejszych dróg prowadzących do jego usunięcia z komórek jest zawarta w szlaku metabolicznym reakcja z Glu [5].

MDA stanowi jeden z najważniejszych markerów stresu oksydacyjnego [5,13]. Wprowadzony może zostać do organizmu poprzez przewód pokarmowy, np. po spożyciu ryb, mięsa czy mleka, a jego szczególnie wysoką zawartość odnotowano w zjełczalej żywności [8]. Stanowi główny i najczęściej badany produkt peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Występuje w olejach, szczególnie roślinnych, lub żywności zawierającej te oleje.

CA pochodzi zarówno ze źródeł endogennych (peroksydacja lipidów) jak i egzogennych – wdychanie dymu papierosowego [5]. W środowisku głównym jego źródłem są spaliny samochodowe. Do atmosfery dostaje się także na skutek spalania drewna czy polimerów. Występuje także w niewielkich ilościach w warzywach, owocach, mleku, mięsie i rybach [8].



Rysunek 2. Poglądowe struktury chemiczne wybranych endogennych aldehydów

Figure 2. Chemical structures of selected endogenic aldehydes

1.3.Reaktywność aldehydów względem cysteiny i homocysteiny

W literaturze opisane są reakcje Hcy oraz Cys z aldehydami, prowadzące do powstawania odpowiednio kwasów 1,3-tiazyno-4-karboksylowych oraz kwasów 1,3-tiazolidyno-4-karboksylowych (Rysunek 3). Mechanizm ich tworzenia obejmuje przyłączenie grupy aminowej Cys lub Hcy do grupy karbonylowej aldehydu. Pierwszym etapem jest utworzenie zasady Schiffa (iminy), stanowiącej produkt pośredni. W kolejnym kroku dochodzi do ataku nukleofilowego wysoce reaktywnej grupy -SH na wiązanie C=N w iminie. Ostatnim etapem reakcji jest kondensacja aminotiolu z odpowiednim aldehydem, w wyniku której powstaje pięcioczłonowy pierścień tiazolidynowy (w przypadku reakcji z Cys) lub sześcioczłonowy pierścień tiazynowy (w przypadku reakcji z Hcy) [14]. Reakcje te są proste, szybkie i zachodzą w środowisku wodnym. Zauważono, że otrzymane pochodne charakteryzuje różna trwałość, uzależniona od pH i rodzaju środowiska reakcji [15]. W literaturze można znaleźć informacje, iż wspomniane pochodne mogą powstawać zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [16,17]. Jak dotąd opisano zaledwie kilka metod umożliwiających oznaczanie tiazolidynowych czy tiazynowych pochodnych endogennych aminotiolu i aldehydów w próbkach biologicznych.

W literaturze istnieją doniesienia o występowaniu tiazolidynowej pochodnej, będącej produktem reakcji pomiędzy Cys i ACR [18,19]. Synteza *in vitro* tego

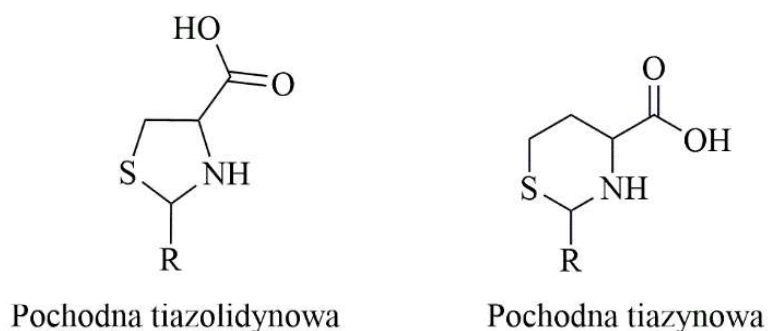
związku odbyła się w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, w środowisku wodnym, w temperaturze pokojowej, bez udziału dodatkowych katalizatorów [20]. Struktura otrzymanego produktu została potwierdzona przy użyciu technik chromatografii cienkowarstwowej, spektrometrii mas oraz magnetycznego rezonansu jądrowego. Wykazano, że otrzymany produkt to kwas 2-[2-(2-amino-2-karboksyetylo)sulfanyloetylo]-1,3-tiazolidyno-4-karboksyowy, gdzie Cys i ACR występują w stosunku molowym 2:1. Jak wskazują autorzy tego odkrycia, kwas ten powstaje poprzez nukleofilową addycję Michaela jednej grupy -SH do wiązania podwójnego C=C w ACR i drugiej grupy -SH do grupy aldehydowej, a następnie cyklizację poprzez dehydratację. Przeprowadzono badania w celu poszukiwania odpowiedzi na pytanie czy wiązanie Cys z ACR może zmniejszać cytotoksyczność aldehydu. W tym celu przeprowadzono eksperyment na liniach komórkowych oskrzeli oraz jelit człowieka (komórki HBE oraz Caco-2), które poddawano działaniu ACR oraz powstałej pochodnej i mierzono m.in. ich żywotność. W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że powstała pochodna wykazuje dużo mniejszą cytotoksyczność niż sam aldehyd [20]. Autorzy pracy poczynili dodatkową obserwację dotyczącą stabilności otrzymanego diadduktu w warunkach fizjologicznych. Poddali go inkubacji w buforze fosforanowym o pH 7,4 oraz temperaturze 37°C i stwierdzili, że w tych warunkach jest on niestabilny. Zaobserwowali również, że ostatecznie tworzy się pochodna tiazolidynowa posiadająca jedną cząsteczkę Cys w swojej strukturze. Autorzy pracy wskazali, że oba addukty ulegały wzajemnej konwersji, a równowagę reakcji w kierunku tworzenia jedynie diadduktu przesuwają dodatek Cys. Badania wykazały także, że monoaddukt był bardziej cytotoksyczny niż diaddukt. Udowodniona wysoka toksyczność ACR w stosunku do organizmu człowieka, może wskazywać na korzyści płynące z suplementacji lub diety bogatej w Cys, która tworzy z ACR pochodną o znacznie mniejszej toksyczności. Niestety nie zostały przeprowadzone dodatkowe badania w tym zakresie.

Dość dawno, bo w roku 1969, pojawiło się w literaturze doniesienie o uzyskaniu adduktu Cys i MDA [21]. Autor pracy zauważył, iż masa molowa pozyskanego związku odpowiada strukturze składającej się z dwóch cząsteczek Cys oraz trzech cząsteczek MDA. Kilkanaście lat później przeprowadzono reakcję pomiędzy MDA oraz Cys w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (37°C, pH 7). Stwierdzono wówczas, że obie grupy funkcyjne występujące w Cys (-NH₂ i -SH) biorą udział w tworzeniu pochodnej. Niestety nie zostały przeprowadzone żadne dodatkowe badania, które jednoznacznie potwierdziłyby strukturę uzyskanej pochodnej [22]. Została ona potwierdzona za pomocą analizy elementarnej, MS oraz NMR dopiero

w roku 1991 [19]. Wykazano wówczas, że stosunek MDA do Cys w pochodnej wynosi 3:2. Kilkanaście lat później inna grupa badaczy ustaliła, że uzyskane przez nich w wyniku reakcji Cys z MDA, żółte ciało stałe jest mieszaniną izomerów, w których stosunek MDA do Cys wynosi 2:2 oraz 3:2. Reakcja została przeprowadzona w pH 7 i temperaturze 25°C, a struktury izomerów, w których zidentyfikowano także pierścień tiazolidynowy, zostały potwierdzone metodami spektroskopowymi [32].

4-HNE w swojej strukturze posiada trzy ugrupowania, które potencjalnie mogą wchodzić w reakcje z innymi cząsteczkami. Są to: grupa aldehydowa, wiązanie podwójne C=C oraz grupa hydroksylowa. To, która z wymienionych grup ulegnie reakcji zależy od rodzaju reagenta oraz środowiska. Wykazano m.in., że Glu łatwo reaguje w obojętnych roztworach wodnych z 4-HNE, a produkt reakcji ulega wewnątrzcząsteczkowemu przegrupowaniu do pięcioczłonowego cyklicznego hemiacetalu, który stanowi główny produkt końcowy. Analogiczna reakcja zachodzi w przypadku gdy obojętny roztwór Cys zostanie zmieszany z równomolową ilością 4-HNE. Jeżeli natomiast Cys znajdzie się w roztworze w nadmiarze to grupa aldehydowa kondensuje z drugą cząsteczką aminokwasu, a produktem tej reakcji jest pochodna tiazolidynowa [19]. Addukty tiolowe 4-hydroksyalkenali w pierwszym etapie generują cykliczne półacetale, które mogą następnie tworzyć pochodne tiazolidynowe, jednak reakcja ich tworzenia zachodzi wolniej [23].

Produktem reakcji pomiędzy CA oraz Cys, w przeciwieństwie do pochodnej Cys i ACR oraz 4-HNE, jest jedynie diaddukt, czyli pochodna tiazolidynowa. Nie tworzy się hemiacetal ponieważ reakcja kondensacji drugiej cząsteczki Cys zachodzi bardzo szybko [19].



Rysunek 3. Poglądowe struktury chemiczne pochodnej tiazolidynowej i tiazynowej
Figure 3. Chemical structures of thiazolidyne and thiazine derivative

1.4. Aminokwasy tiolowe i wybrane endogenne aldehydy w stanach (pato)fizjologicznych w organizmie człowieka

W warunkach fizjologicznych Cys jest wbudowywana w białka, gdzie m.in. dzięki tworzeniu wiązań disiarczkowych, odpowiada za utrzymanie ich stabilności. Jest także prekursorem koenzymu A i Glu [1]. Stanowi również główny składnik budulcowy keratyny włosów, skóry oraz paznokci. Warunkuje ich wytrzymałość chemiczną oraz fizyczną. Odgrywa ona również kluczową rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak detoksykacja metali oraz ksenobiotyków. W warunkach fizjologicznych występuje w komórkach na niskim poziomie, co stanowi swego rodzaju mechanizm obronny przed jej toksycznością, szczególnie w stosunku do centralnego układu nerwowego [24]. Oznaczana jest często w moczu i służy jako jeden ze wskaźników rozwijających się chorób nerek. Cys stanowi także marker rozwoju chorób dziedzicznych, takich jak cystynozę oraz cystynurię, w których przebiegu jej stężenie w moczu związane jest z możliwością rozwoju kamicy nerkowej [25].

W przypadku Hcy jej stężenie w warunkach fizjologicznych jest utrzymywane na niskim poziomie, dzięki remetylacji do Met i przemianom katabolicznym na drodze transsulfuracji. Przekształcenia te są kontrolowane przez reakcje enzymatyczne [26]. W osoczu zdrowego człowieka stężenie całkowitej Hcy utrzymuje się na poziomie 5 – 15 $\mu\text{mol/l}$, a wszelkie wartości wykraczające poza ten zakres mogą świadczyć o rozwijającej się lub trwającej w organizmie chorobie. Zaburzenia w ilości Hcy w osoczu mogą wynikać z żywieniowych niedoborów jej kofaktorów, przewlekłych chorób, leczenia, czynników fizjologicznych oraz stylu życia, w tym spożywania alkoholu czy palenia papierosów [27]. Podwyższony poziom Hcy w osoczu, określany mianem hiperhomocysteinemii, stanowi czynnik ryzyka rozwoju niektórych chorób, w szczególności zaś chorób układu krążenia [26].

FA jest substancją silnie toksyczną, która przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (*International Agency for Research of Cancer - IARC*) sklasyfikowana została jako rakotwórcza dla ludzi. FA działa drażniąco na spojówkę oczu a także na błony śluzowe dróg oddechowych. Powoduje ponadto zaburzenia oddychania i podrażnienia skóry [7]. Wydalany jest z organizmu po przekształceniu, w postaci ditlenku węgla i wody z wydychanym powietrzem oraz w niezmienionej formie przez nerki [6].

W warunkach fizjologicznych AA reaguje między innymi z aminami biogennymi, hemoglobina oraz grupami -SH białek. Wytwarzany jest także przez mikroflorę bakteryjną górnych dróg oddechowych i przewodu pokarmowego na drodze fermentacji węglowodanów [28]. AA ze względu na swój elektrofilowy

charakter łatwo reaguje ze związkami nukleofilowymi, do których zalicza się np. aminokwasy, białka i tiole. Reaktywność ta sprawia, iż jest on silnym mutagenem i klasyfikuje się go jako czynnik rakotwórczy. Detoksykowany jest w znacznej mierze poprzez utlenianie za pośrednictwem dehydrogenazy aldehydowej do kwasu octowego, który następnie wchodzi w cykl kwasu cytrynowego [29].

W organizmach żywych PLP stanowi kofaktor enzymów katalizujących przebieg wielu ważnych reakcji. Bierze udział między innymi w produkcji tryptofanu, serotoniny, kwasu solnego w żołądku oraz formowaniu hemoglobiny i czerwonych krwinek. Odgrywa także kluczową rolę we wspieraniu zarówno wrodzonej, jak i nabytej odporności organizmu poprzez udział w produkcji mikroflory jelitowej [30]. Wykazano, że PLP odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu układu krążenia [31], a jego niedobór może prowadzić do rozwoju miażdżycy czy udaru. Wykazano również, że PLP uczestniczy w kondensacji Hcy z seryną, której jest katalizatorem a reakcja ta stanowi pierwszy etap szlaku transsulfuracji.

ACR jako silny elektrofil, który charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, szybko przemieszcza się przez błony komórkowe na skutek dyfuzji, a w konsekwencji wywołuje szereg niekorzystnych reakcji fizjologicznych. Niszczy np. endogenne układy antyoksydacyjne poprzez wzmożenie tworzenia reaktywnych form tlenu w komórkach, co ostatecznie prowadzi m.in. do przerywania błony komórkowej [20]. ACR jest klasyfikowana jako związek drażniący, wysoce toksyczny oraz potencjalnie kancerogeny. Toksyczność ACR została obszernie omówiona w wielu publikacjach, gdzie sugeruje się jej powiązanie z występowaniem różnych stanów patologicznych, takich jak rak płuc, choroba Alzheimera czy miażdżycy [32,33].

Wykazano powiązanie występowania podwyższonego poziomu 4-HNE w przebiegu chorób, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona, ponieważ może on łączyć się np. z Cys w białkach [5], która wykazuje w stosunku do niego większe powinowactwo niż histamina czy lizyna.

Uważa się, że oznaczenie poziomu MDA jako końcowego produktu peroksydacji lipidów w określonej tkance jest markerem występującego w niej stresu oksydacyjnego, natomiast poziom MDA w osoczu i moczu reprezentuje stres oksydacyjny „całego ciała” [34].

Wdychanie oparów CA może prowadzić do podrażnienia oczu, nosa, gardła oraz płuc a w konsekwencji powodować ucisk w klatce piersiowej czy duszności [35].

2. Oznaczanie wybranych tiazolidynowych pochodnych

2.1. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i formaldehydu

Wykazano, że wyniku kondensacji FA z Cys powstaje kwas 1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy (TCA), a reakcja ta zachodzi w roztworach wodnych w szerokim zakresie pH. Wykazano również, że TCA może działać jako przeciwutleniacz i zmiatacz wolnych rodników, chroniąc w ten sposób błony komórkowe przed negatywnymi skutkami ich działania. Wpływa to na opóźnianie starzenia, np. w komórkach wątroby, które wraz z wiekiem ulegają coraz to większej degradacji. TCA sprzedawany jest także jako suplement diety pod nazwą tioprolina, która posiada właściwości hepatoprotekcyjne, przeciwzapalne i przeciwcukrzycowe [36]. Opracowano metodę wykorzystującą technikę chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS), która umożliwia oznaczanie TCA w próbach płynnych pożywek do hodowli bakterii. Metoda jest dedykowana w szczególności do TCA produkowanego przez pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*), które poddane były działaniu FA [37]. Metoda wykorzystuje chloromrówczan etylu do derywatyzacji analitu w celu zwiększenia jego hydrofobowości, a same próbki były dodatkowo oczyszczane techniką ekstrakcji do fazy stałej i zatężane poprzez odparowanie do sucha i ponowne rozpuszczenie w acetonitrylu (ACN) [37]. Opracowana została także metoda wykorzystująca wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV) do oznaczania TCA w osoczu pacjentów chorych na raka szyi i głowy, którym podawano tioprolinę. Procedura przygotowania próbki osocza obejmowała jej odbiałczenie poprzez dodatek kwasu chlorowego(VII), a następnie jej odwirowanie. Uzyskany roztwór nad osadu, tzw. *supernatant* był następnie wprowadzany do układu chromatograficznego [36].

Ze względu na fakt, że TCA jest wydalany przez nerki opracowano metodę jego oznaczania w moczu szczurów. Oznaczenia miały odpowiedzieć na pytanie czy TCA w tym płynie fizjologicznym może stanowić istotny wskaźnik w biologicznym monitorowaniu narażenia na FA. W tym celu szczury podzielone na trzy grupy były poddawane inhalacjom powietrzem czystym oraz powietrzem zawierającym niskie i wysokie stężenie FA. Procedura przygotowania pobranych od zwierząt próbek moczu obejmowała derywatyzację analitu przy użyciu chloromrówczanu etylu oraz ekstrakcję za pomocą toluenu. Fazę organiczną po ekstrakcji odparowano, a następnie pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i poddano analizie chromatograficznej [38]. Stwierdzono, że w stosunku do próby kontrolnej poziom TCA znacząco wzrósł w moczu szczurów poddawanych inhalacji powietrzem o wysokiej zawartości FA.

2.2. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i acetaldehydu

Produkt reakcji pomiędzy Cys i AA nosi nazwę kwasu 2-metylo-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowego (MTCA). Podobnie jak w przypadku TCA reakcja pomiędzy Cys a AA zachodzi w warunkach fizjologicznych, przy czym tempo powstawania pochodnej jest uzależnione od stężenia aldehydu. Można więc zaryzykować stwierdzenie, że synteza MTCA stanowi mechanizm chroniący organizm przed toksycznym działaniem AA. Taki tok rozumowania wspiera hipotezę, że jest on substancją chroniącą organizm człowieka przed występowaniem negatywnych skutków nadmiernego spożycia alkoholu, np. nowotworem przewodu pokarmowego. Powstała pochodna nie jest uważana za substancję toksyczną. W celu monitorowania obecności i stężenia MTCA w osoczu i moczu człowieka została opracowana metoda bazująca na technice LC-MS/MS [29]. W przypadku tej metody procedura przygotowania próbki obejmuje jej odbiałczenie (w przypadku osocza) przy użyciu ACN oraz przeprowadzenie analitu w pochodną za pomocą bezwodnika octowego w środowisku buforu węglanowego o pH 9,9, w celu m.in. zapewnienia stabilności związku [29]. Została również opracowana metoda jednoczesnego oznaczania TCA i MTCA w moczu, oparta na derywatyzacji za pomocą chloromrówczanu etylu. Próbkę po etapie derywatyzacji chemicznej poddawana była ekstrakcji toluenem, następnie faza organiczna była odparowywana a pozostałość była rozpuszczana w octanie etylu i poddawana analizie chromatograficznej. Technika pomiarową w tym przypadku była chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS), a jako wzorzec wewnętrzny wykorzystano deuterowany MTCA [38].

2.3. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i fosforanu 5'-pirydoksalu

Dane literaturowe wskazują, że możliwa jest reakcja pomiędzy Cys a PLP w środowisku wodnym, a jej produktem jest kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy (HPPTCA). Reakcja zachodzi w szerokim zakresie pH, w tym w warunkach imitujących fizjologiczne [39,40]. Rola jaką wspomniana pochodna pełni w organizmie człowieka nie została jak dotąd określona. Można natomiast wysnuć pewne hipotezy w tym zakresie. Po pierwsze, tworzenie HPPTCA może prowadzić do niedoborów witaminy B₆, co pociągałoby za sobą szereg niepożądanych skutków ze względu na rolę jaką PLP odgrywa w procesach biochemicznych. Z drugiej jednak strony rozkładowi HPPTCA w warunkach fizjologicznych towarzyszy odtworzenie substratów (Cys oraz PLP), co może wskazywać, że pochodna ta może stanowić swoisty rezerwuar witaminy B₆ w organizmach żywych [16]. W przeciwieństwie do

TCA i MTCA, tiazolidynowa pochodna Cys i PLP jest nietrwała, m.in. dlatego też nie jest dostępna komercyjnie. Jak wspomniano wcześniej aminokwasy tiolowe pełnią wiele ważnych funkcji w organizmie. Jest to powód, dla którego jedna z opracowanych metod umożliwia jednocześnie oznaczenie HPPTCA oraz czterech najważniejszych aminokwasów tiolowych występujących w organizmie człowieka [41], w tym Cys oraz Hcy. Przed poddaniem próbki osocza analizie z wykorzystaniem techniki HPLC-UV w procedurze przygotowania próbki zastosowano redukcję wiązań disiarczkowych przy użyciu *tris*(2-karboksyetylo)fosfiny, konwersję analitów w odpowiednie pochodne z wykorzystaniem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylochinoliniowego oraz odbiałczenie kwasem chlorowym (VII). W innej metodzie do oznaczania HPPTCA w osoczu człowieka wykorzystano technikę GC-MS. W tym przypadku bardzo istotnym elementem procedury przygotowania próbki jest odbiałczanie osocza na drodze ultrafiltracji przy wykorzystaniu filtrów typu *cut-off*. Otrzymany filtrat był następnie odparowywany do sucha w koncentratorze próżniowym, po czym dodawana była mieszanina derywatyzująca, w której skład wchodziły *N*-trimetylosililo-*N*-metylotrifluoroacetamid z dodatkiem 1% chlorku trimetylosilanu oraz pirydyna [16].

3. Metody oznaczania wybranych tiazynowych pochodnych

3.1. Tiazynowa pochodna homocysteiny i formaldehydu

Produktem reakcji kondensacji Hcy z FA w środowisku wodnym jest kwas 1,3-tiazyno-4-karboksylowy (homo-TCA), a reakcja zachodzi w warunkach imitujących warunki fizjologiczne [42]. Produkt powstaje w środowisku wodnym o szerokim zakresie pH, mieszczącym się w przedziale 5 - 10. Stwierdzono, że szybkość tej reakcji zależy od pH środowiska ze wskazaniem, iż zachodzi ona szybciej w środowisku o odczynie kwaśnym. Wykazano, że reakcja pomiędzy wspomnianymi substancjami zachodzi również w organizmie człowieka a utworzona tiazyna jest obecna w moczu [17]. W badaniach wykorzystano technikę GC-MS. Procedura przygotowania próbki obejmowała m.in. modyfikację chemiczną analitu za pomocą chloromrówczanu izobutyli. Celem tego zabiegu było uzyskanie stabilnej i lotnej pochodnej. Rolę katalizatora w tej reakcji pełniła pirydyna. W następnym etapie uzyskana pochodna była ekstrahowana z mieszaniny reakcyjnej przy pomocy octanu etylu i w takiej formie natychmiast poddawana była analizie chromatograficznej ze względu na bardzo ograniczoną stabilność.

3.2. Tiazynowa pochodna homocysteiny i acetaldehydu

Produktem nieenzymatycznej i odwracalnej reakcji Hcy z AA jest kwas 2-metylotetrahydro-1,3-tiazyno-4-karboksylowy (homo-MTCA). Dotychczas nie opracowano jednak metody, która umożliwiłaby potwierdzenie obecności tej pochodnej w płynach biologicznych człowieka. Autorzy pracy podjęli jednak próbę adaptowania chromatograficznej metody oznaczania pochodnej Cys i AA w próbkach osocza i moczu na potrzeby przeprowadzenia badań wstępnych w tym zakresie [29]. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu techniki LC-MS/MS. W omawianym przypadku procedura przygotowania próbki obejmowała zasadniczo dwa etapy. Pierwszym z nich (szczególnie w przypadku próbek osocza) było ich odbiałczenie za pomocą dodatku ACN oraz wirowanie. Drugi etap stanowiła konwersja analitu w pochodną za pomocą bezwodnika octowego w celu zwiększenia stabilności analitu. Reakcja derywatyzacji przebiegała w środowisku buforu węglanowego o pH 9,9 w temperaturze 37 °C. Po upływie 30 minut próbki poddano analizie chromatograficznej. Co istotne, wykorzystanie tego narzędzia analitycznego nie umożliwiło potwierdzenia/wykluczenia obecności homo-MTCA w analizowanych próbkach moczu i osocza.

3.3. Tiazynowa pochodna homocysteiny i fosforanu 5'-pirydoksalu

Produktem nieenzymatycznej i odwracalnej reakcji Hcy z PLP jest kwas 2-pirydoksylo-1,4-tiazyno-4-karboksylowy (Hcy-PLP). Co ciekawe reakcja tego typu zachodzi w warunkach imitujących fizjologiczne (*in vitro*). Dotychczas nie opracowano metody umożliwiającej potwierdzenie obecności i oznaczenie Hcy-PLP w próbkach płynów biologicznych człowieka. Biorąc pod uwagę fakt, że zarówno PLP oraz Hcy są składnikami osocza czy też moczu, można przypuszczać, że produkty tych reakcji powinny być również obecne we wspomnianym materiale. Autorzy pracy [14] wskazali natomiast możliwość wykorzystania PLP jako odczynnika derywatyzującego tiole, takie jak Hcy i Cys. Zaprojektowana przez nich metoda wykorzystuje na etapie analizy technikę HPLC-UV i umożliwia oznaczenie całkowitej zawartości Hcy i Cys w próbkach osocza. W omawianym przypadku procedura przygotowania próbek do analizy chromatograficznej obejmuje kilka etapów, takich jak redukcja wiązań disiarczkowych, derywatyzacja oraz odbiałczanie. W pierwszym etapie do próbek osocza dodano bufor fosforanowy o pH 7,8 oraz odczynnik redukujący wiązania disiarczkowe – *tris*(2-karboksyetylo)fosfinę. Po upływie 15 minut próbki potraktowano roztworem PLP i pozostawiono na 15 minut w temperaturze 45°C. Po upływie wskazanego czasu zawartości próbek poddano działaniu kwasu chlorowego(VII), a następnie odwirowano w celu

usunięcia białek z osocza. Uzyskany *supernatant* poddawano analizie chromatograficznej.

UWAGI KOŃCOWE

Tiazynowe oraz tiazolidynowe pochodne aminokwasów tiolowych i endogennych aldehydów stanowią niezmiernie interesujące obiekty badań. Ich rola w organizmach żywych jest praktycznie nieznana, dlatego też bardzo ważne jest stworzenie odpowiednich narzędzi analitycznych, które umożliwią monitorowanie ich stężenia w płynach biologicznych. Ułatwi to poszukiwanie potencjalnego związku pomiędzy ich zawartością a rozwojem chorób. Istnieje tym samym realna potrzeba opracowywania nowych oraz ciągłego udoskonalania opisanych już, nielicznych metod, tak aby były one proste, szybkie i zgodne z zasadami zielonej chemii, a przy tym aby umożliwiały oznaczanie wspomnianych związków w różnych matrycach, z jak najlepszą dokładnością i precyzją.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] Y. Hashim, N. Ismail, P. Jamal, R. Othman, H. Salleh, *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.*, 2014, **3**, 95.
- [2] P. O'Brien, A. Siraki, N. Shangari, *Crit. Rev. Toxicol.*, 2005, **35**, 609.
- [3] R.P. Dator, M.J. Solivio, P.W. Villalta, S. Balbo, *Toxics.*, 2019, **7**, 1.
- [4] A. Ahmed Laskar, H. Younus, *Drug Metab. Rev.*, 2019, **51**, 42.
- [5] G.P. Voulgaridou, I. Anestopoulos, R. Franco, M.I. Panayiotidis, A. Pappa, *Mutat. Res.*, 2011, **711**, 13.
- [6] M. Kupczewska- Dobecka, *Pod. i Metod. Oceny Środowiska Pr.*, 2008, **3**, 51.
- [7] J. Skowroń, *Przem. Chem.*, 2013, **92**, 181.
- [8] V.J. Feron, H.P. Til, F. de Vrijer, R.A. Woutersen, F.R. Cassee, P.J. van Bladeren, *Mutat. Res. Toxicol.*, 1991, **259**, 363.
- [9] E. Quertemont, V. Didone, *Alcohol Res. Heal.*, 2006, **29**, 258.
- [10] P.J. Stover, M.S. Fischer, *Vitamin B-6, Adv. Nutr.*, 2015, **6**, 132.
- [11] K. Uchida, M. Kanematsu, Y. Morimitsu, T. Osawa, N. Noguchi, E. Niki, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 16058.
- [12] J.F. Stevens, C.S. Maier, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2008, **52**, 7.
- [13] D. Del Rio, A.J. Stewart, N. Pellegrini, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2005, **15**, 316.
- [14] R. Głowacki, J. Stachniuk, K. Borowczyk, H. Jakubowski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 1935.
- [15] J.J. Pesek, J.H. Frost, *Tetrahedron.*, 1975, **31**, 907.
- [16] J. Piechocka, M. Wrońska, I.E. Głowacka, R. Głowacki, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 1.
- [17] J. Piechocka, N. Litwicka, R. Głowacki, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**, 1.
- [18] Q. Zhu, Z. Sun, Y. Jiang, F. Chen, M. Wang, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, **55**, 1375.
- [19] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, *Free Radic. Biol. Med.*, 1991, **11**, 81.
- [20] Z. Yin, K. Jiang, L. Shi, J. Fei, J. Zheng, S. Ou, J. Ou, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **387**, 121686.
- [21] H. Buttkus, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1969, **46**, 88.
- [22] K. Kikugawa, Y. Machida, M. Kida, T. Kurechi, *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, **29**, 3003.
- [23] H. Esterbauer, A. Ertl, N. Scholz, *Tetrahedron.*, 1976, **32**, 285.
- [24] L. Włodek, E. Bald, *Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2003.
- [25] K. Kuśmierek, R. Głowacki, E. Bald, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 855.
- [26] T. Toyo'oka, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 3318.
- [27] K. Rasmussen, J. Moller, *Ann. Clin. Biochem.*, 2000, **37**, 627.
- [28] A.W. Jones, *Alcohol Alcohol.*, 1995, **30**, 271.

-
- [29] R.J. Reischl, W. Bicker, T. Keller, G. Lamprecht, W. Lindner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 1779.
- [30] K. Stach, W. Stach, K. Augoff, *Nutr.*, 2021, **13**, 3229.
- [31] H. Hellmann, S. Mooney, *Molecules.*, 2010, **15**, 442.
- [32] M. Singh, D.T. Nam, M. Arseneault, C. Ramassamy, *J. Alzheimer's Dis.*, 2010, **21**, 741.
- [33] A. Moghe, S. Ghare, B. Lamoreau, M. Mohammad, S. Barve, C. McClain, S. Joshi-Barve, *Toxicol. Sci.*, 2015, **143**, 242.
- [34] T. Weitner, S. Inić, J. Jablan, M. Gabričević, A.M. Domijan, *Croat. Chem. Acta.*, 2016, **89**, 133.
- [35] A. Suryanarayanan, *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, 2014, **1**, 1072.
- [36] J. Lankelma, P.G.M. Penders, A. Leyva, H.M. Pinedo, *Cncer Lett.*, 1981, **12**, 131.
- [37] J. Liu, W. Chan, *Chem. Res. Toxicol.*, 2015, **28**, 394.
- [38] H.S. Shin, H.S. Ann, B.H. Lee, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 1225.
- [39] M. V. Buell, R.E. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 6042.
- [40] F. Bergel, K. Harrap, *J.Chem.Soc.*, 1961, **789**, 4051.
- [41] J. Piechocka, M. Wyszczelska-Rokiel, R. Głowacki, *Sci. Rep.*, 2023, **13**, 1.
- [42] J.C. Wriston, C.G. Mackenzie, *J. Biol. Chem.*, 1957, **225**, 607.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 marca 2024 r.

Publikacja [D2]:

M. Gawęł, J. Piechocka, R. Głowacki, „Superowoce” okiem chemika analityka, *Analityka: nauka i praktyka* 2 (2023), 26-31.

(punktacja MNiSW₂₀₂₄=20)

Termin „superowoce” (ang. *superfruits*) odnosi się do naturalnie występujących, niepoddanych modyfikacjom genetycznym owoców, które charakteryzują się wyjątkowo wysoką zawartością związków bioaktywnych, takich jak antyoksydanty, witaminy, minerały oraz błonnik. Dodatkowo, do grupy tej zalicza się owoce wyróżniające się atrakcyjnymi cechami organoleptycznymi takimi jak barwa, smak, aromat, a także często egzotycznym pochodzeniem. Istotnym kryterium klasyfikacji superowoców jest udokumentowane korzystne oddziaływanie ich spożycia na organizm człowieka, przyczyniające się w długotrwałej perspektywie do obniżenia ryzyka rozwoju chorób cywilizacyjnych. Szczególnie dobrze udokumentowany w literaturze przedmiotu jest korzystny wpływ owoców jagodowych na funkcjonowanie organizmu człowieka. Dotyczy to zarówno gatunków z powodzeniem uprawianych w Polsce, takich jak borówka, malina czy jagoda leśna, jak i owoców pochodzących z odległych regionów świata np. jagód berberysu uprawianych w Patagonii.

Spektrum związków chemicznych oznaczanych w superowocach jest niezwykle szerokie. Współczesne badania koncentrują się przede wszystkim na antyoksydantach, witaminach oraz składnikach mineralnych. Najlepiej poznaną i najczęściej analizowaną klasę związków stanowią polifenole. Do tej grupy zalicza się m.in. flawonoidy, takie jak antocyjany, izoflawony, flawonole, katechiny, elagotaniny oraz ksantony, jak również kwasy fenolowe obejmujące pochodne kwasu cytrynowego oraz benzoowego. Pomimo licznych badań dotyczących zawartości polifenoli w superowocach, porównywanie wyników z danymi literaturowymi pozostaje problematyczne. Wynika to z faktu, że zawartość związków w matrycy zależy nie tylko od gatunku i odmiany owocu, lecz także od stopnia dojrzałości, warunków klimatycznych czy magazynowania. Sezonowość wielu owoców, szczególnie uprawianych w klimacie umiarkowanym, skutkuje ich powszechnym przetwarzaniem w postaci soków i dżemów. W konsekwencji wzrosło

zainteresowanie analizą zawartości związków bioaktywnych również w produktach przetworzonych.

Sama analityka owoców czy ich przetworów, w kontekście oznaczania przeciwutleniaczy, jest bardzo problematyczna i wymaga od badaczy wszechstronnego podejścia. Złożoność matrycy owocowej oraz niskie stężenia analitów determinują konieczność stosowania wyrafinowanych technik instrumentalnych o wysokiej czułości. Obecnie w analizie superowoców dominującą rolę odgrywa wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z różnymi trybami detekcji. Biorąc pod uwagę aktualne kierunki rozwoju bioanalizy, należy oczekiwać, że przyszłe metody oznaczania związków w próbkach owoców będą w coraz większym stopniu opierały się na nowoczesnych technikach separacyjnych, przy jednoczesnym uwzględnieniu zasad zielonej chemii, w szczególności w zakresie ograniczania zużycia rozpuszczalników, redukcji liczby etapów przygotowania próbki oraz minimalizacji generowanych odpadów.

ANALITYKA

ISSN - 1509-4650

NAUKA I PRAKTYKA

2 2023

OZNACZANIE ZANIECZYSZCZEŃ PIERWIASTKOWYCH W WYROBACH CERAMICZNYCH

| 22

WYTWARZANYCH Z DODATKIEM RÓŻNYCH ODPADÓW POPRODUKCYJNYCH

Niektóre odpady zawierające związki toksyczne mogą zostać immobilizowane w nierozpuszczalnej matrycy materiału poprzez zmieszanie odpadów z materiałami stanowiącymi podstawowe surowce w produkcji.

H. Ring
1890



MARTA GAWEL



JUSTYNA PIECHOCKA



RAFAŁ GŁOWACKI

W dobie trendów promujących zdrowy styl życia nieustannie na popularności zyskuje tak zwany superfood, czyli z założenia nieprzetworzona żywność pochodzenia naturalnego, bogata w składniki odżywcze, których ilość i właściwości mają działać korzystnie na organizm człowieka.

„Superowoce” okiem chemika analityka

Z roku na rok coraz większą uwagę przywiązuje się do prawidłowego żywienia. Powszechnie wiadomo, że spożywane pokarmy powinny nie tylko dostarczać energii, ale także być bogate w składniki odżywcze niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Owoce od zawsze uważane były za źródło cennych składników pokarmowych, a dietetycy nieustannie podkreślają, że ich spożycie w odpowiedniej ilości jest dobrym nawykiem żywieniowym. Wśród owoców szczególną grupę stanowią tak zwane superowoce, które w ostatnich latach zyskują coraz większą popularność. W konsekwencji wzrost zainteresowania rynkiem „superowoców” przyczynił się do rozwoju nowych kierunków badań naukowych.

Kilka słów o „superowocach”

Mianem „superowoców” (ang. *superfruits*) określane są niezmodyfikowane w żaden sposób, naturalnie występujące owoce, szczególnie bogate w antyoksydanty, minerały, witaminy oraz błonnik. Dodatkowo, zgodnie

z definicją, „superowoc” powinien wyróżniać ciekawy wygląd, smak, zapach oraz najlepiej egzotyczne pochodzenie. Kolejnym istotnym, jeżeli nie najważniejszym, wymaganiem stawianym „superowocom” jest fakt powiązania ich spożycia z dobroczynnym oddziaływaniem na ludzki organizm, przyczyniającym się ostatecznie do zmniejszenia ryzyka zachorowania na choroby cywilizacyjne. Co warto podkreślić, ów pozytywny wpływ musi znaleźć poparcie w wynikach badań *in vivo* i/lub *in vitro*. W tym kontekście istotne okazują się dane epidemiologiczne wskazujące na ograniczenie występowania różnorodnych chorób w populacji osób spożywających regularnie określone owoce.

Termin „superowoc” po raz pierwszy został zdefiniowany w 2004 roku, gdy pojawił się w książce zatytułowanej *SuperFoods RX – Fourteen Foods That Will Change Your Life* autorstwa Stevena Pratta i Kathy Matthews. Od tamtej pory stopniowo zyskuje coraz większą popularność, głównie dzięki reklamom w środkach masowego przekazu. Niestety, obecnie staje się on w głównej mierze hasłem komercyjnym, często nadużywany do zachęcenia potencjalnych konsumentów do zakupu określonego produktu, pomimo braku danych badawczych wskazujących na jego korzystny wpływ na funkcjonowanie organizmów żywych.

Jak wcześniej wspomniano, najważniejszym wymogiem stawianym owocom, które mają potencjalnie zostać określone mianem „super”, jest ich dobroczynny wpływ na organizm człowieka. Co ważne, badania przeprowadzone na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat dostarczyły dowodów, które potwierdziły prozdrowotne działanie wielu z nich. Szczególnie szeroko w literaturze udokumentowano pozytywny wpływ na funkcjonowanie organizmu człowieka owoców jagodowych, zarówno tych uprawianych z powodzeniem w Polsce (borówka, malina, jagoda leśna), jak i tych pochodzących z krańców świata, na przykład jagody berberysu uprawiane w Patagonii.



Fot. Wybrane „superowoce” dostępne na rynku polskim.
Od lewej: czerwona porzeczka, borówka, malina, truskawka.

Tabela 1. Charakterystyka wybranych „superowoców”

Owoc	Wysoka zawartość witaminy C	Bogaty w błonnik	Źródło minerałów	Wysoka zawartość polifenoli	Wysoka zawartość kwasów organicznych
Owoce jagodowe	Wiśnia	+		+	+
	Truskawka	+	+	+	+
	Żurawina	+		+	+
	Malina	+	+	+	+
	Jeżyna			+	
	Borówka	+		+	
	Jagoda acai	+	+		+
	Jagoda goji	+		+	+
	Wiciokrzew siny	+	+	+	+
	Porzeczka			+	
	Czarny bez	+	+	+	+
	Rokitnik	+		+	+
	Aronia		+	+	
	Grapefruit	+		+	
Pozostałe owoce	Czerwone winogrona			+	
	Guarana		+		
	Mangostan	+		+	
	Granat	+	+	+	+
	Acerola	+	+	+	+
	Papaja	+		+	+
	Guawa	+	+	+	+

Poza korzystnym wpływem na układ nerwowy, układ krążenia czy działaniem przeciwnowotworowym stwierdzono, że „superowoce” bogate są także w składniki niezbędne do prawidłowego funkcjonowania wątroby (np. jagoda acai), narządu wzroku (np. jagoda kamczacka), przyczyniające się do utrzymania prawidłowego stężenia glukozy we krwi (np. owoce aronii), działające ochronnie na układ pokarmowy (np. grapefruit, mangostan), przeciwmiażdżycowo (np. jagody goji) czy wspomagające prawidłowe funkcjonowanie układu moczowego (np. żurawina). Obecnie do „superowoców” zalicza się zarówno owoce uprawiane w krajach europejskich (fot.), takie jak porzeczki (czarna, biała i czerwona), borówka, agrest, czarny bez, malina, truskawka, jeżyna, jagody (leśna, kamczacka – wiciokrzew siny, acai, oraz goji – wilcza jagoda), aronia, żurawina, jak i szereg owoców egzotycznych, w tym mangostan, jagody maqui, granat, grapefruit, papaja czy guawa.

Analityka próbek „superowoców” oparta na wykorzystaniu technik separacyjnych

Spektrum związków oznaczanych w „superowocach” jest niezwykle szerokie. Obecnie prowadzone badania ukierunkowane są w szczególności na monitorowanie ich składu pod kątem obecności i zawartości substancji klasyfikowanych jako antyoksydanty, witaminy czy składniki mineralne. Zdecydowanie najlepiej poznaną (najczęściej oznaczaną) grupą związków, stanowiących składniki „superowoców”, są przeciwutleniacze, a wśród nich polifenole, takie jak flawonoidy (antocyjany, izoflawony, flawonole, katechiny, elagotaniiny, ksantony) oraz kwasy fenolowe (pochodne kwasu cyanomonowego: kwas kawowy, felurowy, kumarowy; pochodne kwasu benzoowego: kwas hydroksybenzoowy, galusowy). Przykłady istotnych grup związków chemicznych, stanowiących składniki wybranych „superowoców” w kontekście prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka, zestawiono w tabeli 1.

Podstawowym składnikiem wszystkich owoców jest woda stanowiąca aż 90% ich masy, co pozwala odnieść złudne wrażenie, że są one materiałem do badań nieprzysparzających większych problemów. W rzeczywistości mnogość i różnicowanie związków stanowiących pozostałe składniki owoców jest zaskakująco duża. Wśród nich wymienić należy między innymi węglowodany (fruktoza, glukoza, sacharoza), kwasy organiczne, pektyny, związki polifenolowe, witaminy, błonnik, minerały oraz barwniki. Wspomniana złożoność matrycy pociąga za sobą konieczność poddania próbki często wieloetapowemu i czasochłonnemu procesowi jej przygotowania do analizy, którego celem jest selektywna izolacja analitu oraz oczyszczenie próbki ze wszystkich substancji przeszkadzających. Z tego względu próbki owoców najczęściej podlegają takim etapom ich przygotowania, jak homogenizacja tkanek, ekstrakcja czy filtrowanie. Wpływ na ilość oraz stopień skomplikowania działań podejmowanych podczas przygotowania materiału do badań ma także postać owocu, a mianowicie, czy jest to surowy, nieprzetworzony produkt czy może uzyskany z niego dżem lub sok. Równie istotne jest, czy analizie podlega cały owoc, czy też wyłącznie jego skórka lub nasiona. Generalnie, liczba etapów procedury przygotowania próbki, którym musi podlegać materiał, nim zostanie poddany analizie, wzrasta wraz ze spadkiem jego stopnia upłynnienia. Istotnym aspektem, który należy niewątpliwie wziąć pod uwagę na etapie projektowania procedury przygotowania próbek owoców do analizy, jest możliwość jej rozkładu i utraty analitu wskutek zachodzących w próbkach owoców licznych reakcji enzymatycznych. Pomimo przeprowadzenia szeregu badań dotyczących zawartości polifenoli w „superowocach” to nadal porównanie oznaczonych zawartości z danymi literaturowymi przysparza naukowcom wielu problemów. Związane jest to z faktem, że zawartość tych związków zależna jest nie tylko od odmiany owocu, ale także od stopnia jego dojrzałości, warunków klimatycznych, w jakich dany owoc jest uprawiany. Szczególnie chodzi tutaj o nasłonecznienie oraz temperaturę. Istotne są też warunki przechowywania owocu po jego zebraniu. Szczególnie jeżeli chodzi o oznaczenia prowadzone w owocach, które zostały zakupione w sklepach.

W większości metod opisanych w literaturze specjalistycznej owoce zaraz po zebraniu zostały zamrożone i przechowywane do momentu analizy w temperaturze nawet -80°C . Jedynie w przypadku oznaczeń mających na celu wskazanie zawartości witaminy C pracowano na próbkach świeżych owoców. W większości opracowań wskazane zostało, iż owoce przed analizą poddane były procesowi liofilizacji, a następnie zostały zhomogenizowane z użyciem odpowiedniego układu rozpuszczalników służących do selektywnej ekstrakcji danego analitu. Zazwyczaj mieszanina taka zawierała takie rozpuszczalniki, jak acetonitryl, metanol, aceton, etanol czy woda, często zakwaszone na przykład kwasem solnym. Nierzadko po procesie tym

homogenat poddawano wirowaniu, sonikacji oraz filtracji, stosując głównie odpowiednie filtry membranowe. Uzyskany końcowo supernatant/przesącz mógł zostać następnie poddany na przykład procesowi ekstrakcji do fazy stałej. Drugim podejściem było odparowanie uzyskanego supernatantu/przesączu do sucha i jego ponowne rozpuszczenie. Poddanie próbki owocu procesom ekstrakcji ciecz–ciecz oraz ciecz–ciało stałe jest szczególnie ważne podczas wykonywania do oznaczeń wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją mas (HPLC-MS, HPLC-MS/MS), ponieważ zachodzi tutaj możliwość występowania supresji sygnału analitycznego przez substancje niebędące celem danego oznaczenia. Konieczność przeprowadzania procesu ekstrakcji pociąga za sobą straty oznaczanych analitów, ponieważ proces ten nigdy nie przebiega ze 100-procentową wydajnością, a wraz ze wzrostem liczby powtórzeń wzrasta także ryzyko popełnienia błędu. Stąd też pożądanym działaniem jest ograniczenie liczby etapów, którym próbka jest poddawana przed analizą, aby znaleźć takie rozwiązanie, które przy uzyskaniu jak najlepszej wydajności procesu jednocześnie znacznie ograniczy pracochłonność oraz czasochłonność, a w konsekwencji popełniany błąd. Podczas oznaczania wspomnianych w tekście związków nie zachodziła konieczność przeprowadzania derywatyzacji (konwersji analitów w pochodne), która

RHLSERVICE

Thermo
SCIENTIFIC

Autoryzowany Przedstawiciel

BRUKER

HAAKE NESLAB PRISM
BRUKER BioSpin

ul. Budziszyńska 74
60-179 Poznań
tel.: 61-8689136
sekretariat@rhl.pl
www.rhl.pl

POSIADAMY CERTYFIKAT
ISO 9001:2015

- Reometry
- Wiskozymetry
- Termostaty
- Kriostaty (chłodziarki)
- Wanny wodne i olejowe
- Wytrząsarki

- Fogging Tester (tester lotności)
- Wytłaczarki jedno- i dwusłimakowe
- Miniwytłaczarki: HAAKE MiniCTW oraz HAAKE MiniLab
- Spektrometry NMR i EPR
- Obrazowanie przedkliniczne MRI i NMI



szczególnie ważna jest podczas oznaczeń, w których używane są detektory spektrofotometryczne lub fluorymetryczne. W technikach tych bowiem analit musi mieć odpowiednie właściwości, dzięki którym możliwa jest jego detekcja – mieć w swojej cząsteczce ugrupowanie fluoroforowe lub chromoforowe. Jedynym przykładem, w przypadku którego autorzy wspominają o przeprowadzeniu analizy w pochodne, jest oznaczanie zawartości witaminy C, – przeprowadzenie kwasu dehydroaskobinowego w pochodną wykazującą fluorescencję. W przypadku oznaczeń prowadzonych przy użyciu detekcji mas upochodnianie analitów nie jest zazwyczaj konieczne.

Tabela 2. Zestawienie wybranych metod oznaczania istotnych biologicznie związków w „superowocach”

Próbka biologiczna	Grupa oznaczanych związków	Technika pomiarowa
Owoce mangostanu	Benzofenony, bioflawonoidy	LC-UV
	Poliizoprenyloowane benzofenony	LC-MS/MS
Borówki, truskawki	Polifenole	LC-MS/MS
Borówki, jeżyny, porzeczki czerwone, porzeczki czarne, maliny	Witamina C, kwasy organiczne: cytrynowy, chinowy, jabłkowy	LC-UV
Jagody maqui	Antocyjany	LC-UV-MS/MS
Porzeczki, truskawki	Flawonole, kwasy fenolowe, antocyjany, elagotanniny, witamina C	LC-UV-MS/MS LC-UV
Granaty	Antocyjany, elagotanniny, kwasy fenolowe, flawonole	LC-UV-MS/MS
Jagody kamczackie	Antocyjany, flawonoidy, kwasy fenolowe	LC-UV-MS/MS
Jagody berberysu	Flawonole	LC-UV-MS/MS
Wiciokrzew siny	Makroelementy	CITP-CD
Truskawki, jeżyny, maliny, borówki, czarne porzeczki, czerwone porzeczki	Karotenoidy	LC-UV
Borówki, czarne porzeczki, truskawki	Antocyjanidyny	LC-UV
Czarne porzeczki, truskawki	Antocyjany	LC-UV
Jeżyny	Katechiny	CE-UV
Objaśnienia: LC – chromatografia cieczowa, UV – detektor spektrofotometryczny, MS/MS – tandemowy spektrometr mas, CITP – izotachoforeza kapilarna, CE – elektroforeza kapilarna, CD – detektor konduktometryczny		

Ważnym aspektem w przypadku określania zawartości danych związków w badanym „superowocu” jest to, w jakiej formie się on znajduje – surowej czy przetworzonej. Nie mniej ważne jest to, czy będzie on analizowany w całości, z uwzględnieniem zarówno pestki, skórki i miąższu, czy też każdy z wymienionych elementów będzie analizowany oddzielnie. Godnym rozważania może być zatem to, w jakiej postaci dany owoc jest spożywany. Tak więc, w przypadku owoców jagodowych najbardziej miarodajnych wyników można spodziewać się podczas analizy całego owocu, uwzględniając także niewielkie nasionka, na przykład w truskawce czy w borówce, a także ich skórkę, ponieważ tego typu owoce najczęściej spożywa się w całości. Nie jest więc zaskakujący fakt, że właśnie takie podejście co do wykorzystania całego owocu w badaniach prezentuje większość autorów opisujących poszczególne metody oznaczania związków w owocach jagodowych. Podział owocu na fragmenty jest natomiast bardziej popularny w opracowaniach dotyczących owoców, które zwyczajowo są obierane lub pozbawiane nasion. I tak, podczas badań na przykład granatu skupiono się osobno na określeniu zawartości związków w skórce, miąższu i pestkach, gdzie największa zawartość polifenoli została wykryta właśnie w miąższu.

Wiele owoców, szczególnie tych uprawianych w Polsce, dostępnych jest sezonowo, a w okresach ich ograniczonej dostępności niejednokrotnie spożywane są one w formie przetworzonej, na przykład w postaci dżemów oraz soków. W konsekwencji fakt ten pociągnął za sobą zainteresowanie analityków zawartością dobroczynnych związków w produktach przetworzonych. Soki pozyskane z „superowoców” nie były z reguły poddawane przed analizą wielu skomplikowanym etapom, a cały proces ograniczał się jedynie do ich odwirowania. W przypadku próbek dżemów były one traktowane tak samo jak próbki owoców surowych. Zawartość polifenoli, w szczególności antocyjanów, oznaczona w tych produktach jest znacznie niższa od zawartości wspomnianych związków w ekstraktach uzyskanych z owoców surowych, co wskazywać może, że wszelkiego rodzaju obróbka, na przykład termiczna, prowadzi do degradacji antyoksydantów. Co ciekawe, badania pokazują także, że dżem pozyskany z jagód charakteryzuje się zarówno większą różnorodnością polifenoli, jak i ich wyższą zawartością w porównaniu z dżemem uzyskanym z truskawek.

Złożoność i zróżnicowanie pod kątem składu matrycy oraz stosunkowo niskie stężenia substancji oznaczanych w próbkach owoców wymuszają potrzebę wykorzystania w ich analizie odpowiednio czułych i precyzyjnych technik analitycznych. Jedną z najczęściej wykorzystywanych do tego celu technik jest wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) sprzężoną z różnymi rodzajami detekcji. Dotychczas w literaturze zostały opisane metody opierające się na wykorzystaniu HPLC w połączeniu z detektorem spektrofotometrycznym (DAD, UV-Vis) oraz tandemowym

spektrometrem mas (MS/MS), przy wykorzystaniu których oznaczano przede wszystkim związki zaliczane do polifenoli. Analityka próbek „superowoców”, bazująca na wykorzystaniu technik separacyjnych, nie ogranicza się jednak tylko do technik separacji w fazie ciekłej. W ostatnim czasie na popularności zyskują bowiem elektroforeza kapilarna i chromatografia gazowa, za pomocą których oznaczane są odpowiednio katechiny, makroelementy czy pestycydy oraz terpeny. W tabeli 2 zestawiono wybrane metody oznaczania istotnych biologicznie związków w próbkach „superowoców”. W tym miejscu należy nadmienić, że przytoczone przykłady stanowią niewielki odsetek spośród dotychczas opracowanych narzędzi analitycznych.

Podsumowanie

Na przestrzeni ostatnich lat daje się zaobserwować istotny wzrost dbałości o zdrowie i kondycję. Jak podkreślają specjaliści, lekarze klinicyści, w działaniach tych bardzo ważną rolę odgrywa rekreacja, sport oraz prawidłowe żywienie. Stąd też w dobie trendów promujących zdrowy styl życia nieustannie na popularności zyskuje tak zwany superfood, czyli z założenia nieprzetworzona żywność pochodzenia naturalnego, bogata w składniki odżywcze, których ilość i właściwości mają działać korzystnie na organizm człowieka. Współcześnie dzięki wysokiej zawartości składników o działaniu prozdrowotnym wiele owoców jest klasyfikowanych jako „superfood”. Niestety, w związku z ogromnym zainteresowaniem konsumentów żywnością funkcjonalną coraz powszechniejsze stały się nieuczciwe praktyki producentów żywności, co z kolei pociąga za sobą nieustanną potrzebę dostarczania nowych narzędzi analitycznych, umożliwiających kontrolę jakości żywności i wykrywanie potencjalnych nieprawidłowości. Obecnie w analityce „superowoców” dominującą rolę odgrywają techniki separacyjne, szczególnie techniki separacji w fazie ciekłej, w tym wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z różnymi rodzajami detekcji. Niejednokrotnie analiza „superowoców” poprzedzona jest skomplikowaną i wieloetapową procedurą przygotowania próbki ze względu na zróżnicowany pod względem składu matrycy materiał do badań. Biorąc pod uwagę aktualne trendy w bioanalityce, należy spodziewać się, że nowo opracowywane metody, umożliwiające oznaczenie istotnych związków w próbkach „superowoców”, będą się opierały na wykorzystaniu nowoczesnych technik instrumentalnych oraz będą uwzględniały ważne zasady zielonej chemii.

**Marta Gawel*, **, Justyna Piechocka*,
Rafał Głowacki***

*Katedra Chemii Środowiska, Wydział Chemii,
Uniwersytet Łódzki,

**Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych,
Uniwersytet Łódzki

e-mail: rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl

BYRSKI POL

Ponad 30 lat
z IKA Werke GmbH



**Działalność firmy obejmuje
doradztwo techniczne,
dystrybucję i handel
sprzętem laboratoryjnym,
pomiarowo-analitycznym
i produkcyjnym:**

Sprzęt laboratoryjny

- mieszadła magnetyczne, mieszadła mechaniczne, homogenizatory, wytrząsarki, młynki, łaznie wodne, płyty grzewcze, pompy próżniowe i perystaltyczne, wyparki, ekstraktory substancji stałych, reaktory laboratoryjne

Sprzęt pomiarowo-analityczny

- zetowniki, analizatory elektrochemicznej syntezy organicznej, termograwimetry, kalometry, analizatory laboratoryjne C, S, N, O, H, CO₂

Sprzęt produkcyjny

- pojemnościowy – homogenizatory, turbotrony, rototrony
- przepływowy – homogenizatory, dispax reaktory, młyny koloidalne
- emulgatory – mieszalniki (o poj. od 10 – 4000 L), dla substancji o różnej lepkości

BYRSKI POL

ul. Przy Bazantarni 4/6, 02-793 Warszawa
tel. +48 22 649 24 05, fax: +48 22 859 14 39
e-mail: info@byrskipol.pl, www.byrskipol.pl

Publikacja [D3]:

M. Gawel, R. Głowacki, P. Kubalczyk, J. Piechocka, HPLC-MS/MS based method for the determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid in human plasma, *Sci. Rep.* 14 (2024) 24425, 1–11.

(IF₅=4,3, punktacja MNiSW₂₀₂₄=140)

Doniesienia literaturowe wskazują, że tiole mogą reagować z fosforanem 5'-pirydoksalu (PLP) w warunkach fizjologicznych, prowadząc do powstawania odpowiednich kwasów tiazynowych i tiazolidynowych. Wykazano, że kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4 karboksylowy (HPPTCA), stanowiący pochodną cysteiny (Cys) i PLP tworzy się *in vivo* w organizmie człowieka. Rola jaką HPPTCA pełni w organizmach żywych nie została do tej pory dostatecznie poznana, a dostępne dane dotyczące jego stężeń w materiałach biologicznych są ograniczone. Wobec wspomnianych faktów niezmiernie ważne okazało się opracowanie metod służących do oznaczania HPPTCA w płynach ustrojowych człowieka. Dotychczas opracowano jedynie dwie metody umożliwiające oznaczanie HPPTCA w osoczu człowieka z wykorzystaniem technik chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) [29] oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV) [28]. Obie metody pomimo szeregu zalet posiadają pewne istotne ograniczenia, których rozwiązaniem może stać się wykorzystanie spektrometrii mas. W niniejszej pracy przedstawiłam metodę oznaczania HPPTCA w osoczu opartą na technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS).

Procedura przygotowania próbek obejmowała ekstrakcję HPPTCA z białek osocza z wykorzystaniem acetonitrylu (ACN), odbiałczanie próbki poprzez ultrafiltrację oraz rozcieńczenie uzyskanego filtratu fazą ruchomą przed końcową analizą chromatograficzną. Zaproponowane przeze mnie podejście stanowi modyfikację procedury wykorzystanej wcześniej w metodzie opartej na technice GC-MS. Zastosowanie ACN prowadzi do zmiany konformacji przestrzennej białek, co skutkuje osłabieniem oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy HPPTCA a białkami, a w konsekwencji zwiększeniem odzysku analitu z matrycy biologicznej.

W toku badań oceniłam wpływ temperatury oraz sposobu mieszania próbki na wydajność ekstrakcji, ponieważ parametry te nie były wcześniej analizowane. Wykazałam, że temperatura w zakresie 15-25°C nie wpływa istotnie na efektywność procesu. Zgodnie z oczekiwaniami, lepszą powtarzalność uzyskałam podczas wytrząsania próbek przy wykorzystaniu termowyrzäsarki oraz mieszadła typu *vortex*, w porównaniu z mieszaniem ręcznym. W rutynowej analizie zdecydowałam się wytrząsać próbki przy wykorzystaniu *vortexu* w temperaturze pokojowej. Odbiałczanie przeprowadziłam zgodnie z procedurą stosowaną w metodzie GC-MS, wykorzystując filtry typu *cut-off* z membraną wykonaną z polieterosulfonu (PES). Oceniałam wpływ czasu oraz temperatury wirowania a także wielkości porów membrany na odzysk analitu. Stwierdziłam, że zmniejszenie wielkości porów membrany skutkuje poprawą jakości sygnału oraz powtarzalności wyników, co najprawdopodobniej wynika z bardziej efektywnego usuwania składników matrycy wpływających na odpowiedź detektora mas. Nie zaobserwowałam istotnego wpływu temperatury wirowania (4°C vs 25°C) na intensywność sygnału. Najlepsze rezultaty uzyskałam przy wirowaniu próbek przez 7 minut w temperaturze pokojowej oraz zastosowaniu filtrów o wielkości porów 5 kDa. W celu ograniczenia supresji jonizacji, będącej konsekwencją efektów matrycowych, na które szczególnie wrażliwa jest technika HPLC-MS/MS, próbki rozcieńczałam. Do tego celu zastosowałam opisaną poniżej mieszaninę rozpuszczalnika A i rozpuszczalnika B w stosunku objętościowym 60:40 (A:B, v/v), ze względu na jej zgodność z początkowym składem fazy ruchomej. Kompatybilność składu próbki z zastosowaną fazą ruchomą ma szczególne znaczenie w chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Ustaliłam 50-krotny optymalny stopień rozcieńczenia, co pozwoliło na zmniejszenie supresji sygnału. Dalsze rozcieńczanie nie zmniejszało efektów matrycowych a jedynie obniżało czułość metody. W opracowanej metodzie zastosowałam również wzorzec wewnętrzny (IS) -4-deoksypirydoksynę (4-DPD). Jak wykazałam w procesie walidacji, jego użycie istotnie poprawia powtarzalność oraz odtwarzalność uzyskiwanych wyników analitycznych.

Opisana metoda oznaczania HPPTCA w osoczu obejmuje rozdzielenie analitu oraz zastosowanego IS z wykorzystaniem chromatografii HILIC oraz detekcję MS/MS z jonizacją przez elektrorozpylanie w trybie dodatnim, przy monitorowaniu reakcji następczych z wykorzystaniem trybu monitorowania wielokrotnych przejść

jonowych (MRM). W oznaczeniach wykorzystałam kolumnę X-Bridge Glycan BEH Amide oraz typową dla HILIC fazę ruchomą składającą się z 0,1% kwasu mrówkowego (FA) w mieszaninie wody i ACN (95:5, v/v) (rozpuszczalnik A) oraz mieszaniny wody i ACN (5:95, v/v) (rozpuszczalnik B). Analizy przeprowadziłam przy zastosowaniu elucji gradientowej. Ustaliłam, że początkowy udział fazy wodnej na poziomie 60% oraz natężenie przepływu fazy ruchomej wynoszące 0,3 ml/min zapewniają optymalne warunki retencji analizowanych związków. Dla każdego z nich analizę prowadziłam z wykorzystaniem trzech przejść MRM. Jedno z nich, odpowiadające najbardziej intensywnemu jonowi fragmentacyjnemu, wykorzystywałam do oznaczeń ilościowych, natomiast dwa pozostałe służyły do potwierdzenia obecności analitu w próbce (identyfikacja jakościowa).

Opracowana metoda poddana została pełnej walidacji zgodnie z odpowiednimi wytycznymi dotyczącymi walidacji metod bioanalitycznych [64]. Proces ten obejmował ocenę selektywności/specyficzności, liniowości, precyzji i dokładności (zarówno między- jak i wewnątrzdniowej), granicy oznaczalności, efektów matrycowych, efektu przeniesienia oraz tzw. powtarzalności procesu wprowadzania próbki do układu pomiarowego. Uwzględniając aktualne kierunki rozwoju chemii analitycznej, ze szczególnym naciskiem na aspekty środowiskowe, przeprowadziłam również ocenę „zieloności” opracowanej metody z wykorzystaniem odpowiedniego narzędzia analitycznego. W ramach badań porównałam nową procedurę z wcześniej opisanymi metodami oznaczania HPPTCA pod kątem wpływu na środowisko. Zwalidowana metoda została zastosowana do piętnastu próbek biologicznych pochodzących od potencjalnie zdrowych dawców. Uzyskane wyniki stężenia HPPTCA mieściły się w zakresie 0,55–8,29 $\mu\text{mol/l}$ i były zbliżone do wartości uzyskiwanych przy zastosowaniu wcześniej opracowanych metod analitycznych.

W przedstawionym artykule opisałam pierwszą metodę oznaczania HPPTCA w osoczu człowieka z wykorzystaniem techniki HPLC-MS/MS. Istotnym osiągnięciem opracowanej procedury jest dostarczenie wiarygodnych dowodów potwierdzających obecność HPPTCA w osoczu, co wynika z wysokiej czułości i selektywności techniki HPLC-MS/MS, uznawanej za jedno z najbardziej zaawansowanych narzędzi stosowanych w analizach biomedycznych. Metoda stanowi nowe, użyteczne narzędzie do badania roli HPPTCA w organizmie

człowieka, uzupełniające wcześniej opublikowane metody oparte na GC-MS oraz HPLC-UV.



OPEN HPLC-MS/MS based method for the determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid in human plasma

Marta Gawel^{1,2}, Rafał Głowacki¹, Paweł Kubalczyk¹ & Justyna Piechocka¹✉

The report presents first high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) based method for the determination of plasma 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid (HPPTCA), an adduct of cysteine and active form of vitamin B6 pyridoxal 5'-phosphate. The assay employs 4-deoxypyridoxine (4-DPD) as an internal standard. Sample preparation procedure primarily involves acetonitrile (ACN) extraction of HPPTCA from plasma proteins, sample deproteinization by ultrafiltration, and dilution of ultrafiltrate with mobile phase prior to chromatographic analysis. The chromatographic separations of HPPTCA and 4-DPD are achieved within 6 min at 20 °C on X-Bridge Glycan BEH Amide (100 × 2.1 mm, 2.5 µm) column using gradient elution. The eluent consists of 0.1% formic acid in a mixture of solvent A (water and ACN (95:5, v: v)) and solvent B (water and ACN (5:95, v: v)) delivered at a flow rate of 0.3 mL/min. The assay linearity was observed within 0.25–10 µmol/L in plasma. The limit of quantification was found to be 0.25 µmol/L. The method was successfully applied to plasma samples delivered by apparently healthy donors showing that the HPLC-MS/MS assay is suitable for human plasma screening. The presence of HPPTCA was confirmed in eleven of fifteen study samples. The HPPTCA concentration ranged from 0.55 to 8.39 µmol/L.

Keywords Cysteine, Hydrophilic interactions liquid chromatography, Plasma, Pyridoxal 5'-phosphate, tandem mass spectrometry, 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid

Abbreviations

ACN	Acetonitrile
CMQT	2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate
Cys	Cysteine
Cys ₂	Cystine
CV	Coefficient of variation
ESI	Electrospray ionization mode
FA	Formic acid
GC	Gas chromatography
Hcy	Homocysteine
HILIC	Hydrophilic interactions liquid chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
HPPTCA	2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid
IS	Internal standard
(L/U) LOQ	(Lower/upper) limit of quantification
MeOH	Methanol
MRM	Multiple reaction monitoring mode

¹Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, University of Lodz, 163/165 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland. ²Doctoral School of Exact and Natural Sciences, University of Lodz, 12/16 Banacha Str., 90-237 Łódź, Poland. ✉email: justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl

(MS)/MS	(Tandem) mass spectrometry
MSTFA	<i>N</i> -trimethylsilyl- <i>N</i> -methyl trifluoroacetamide
MWCO	Molecular weight cut-off
PES	Polyethersulfone
PLP	Pyridoxal 5'-phosphate
PTFE	Polytetrafluoroethylene
UV	Ultraviolet detection
4-DPD	4-deoxypyridoxine

The association between amino thiols and origination of many civilization diseases has been well-documented. For instance, it has been recognized that the rise in plasma homocysteine (Hcy) and cysteine (Cys) levels is a risk predictor of morbidity of cardiovascular diseases^{1–5}. In parallel, clinical trials have shown that high-risk patients do benefit from the lowering plasma Hcy level by vitamin B supplementation, including vitamin B₆^{6–11}. However, the mechanism of vitamin B₆ action is still unclear. In fact, it may be due to the formation of Cys/Hcy and active form of vitamin B₆ pyridoxal 5'-phosphate (PLP) adducts.

Thus far, it has been reported that naturally occurring PLP easily reacts with Cys^{12–18} and Hcy^{12,13,18–21} in aqueous media, in particular under physiological conditions. More importantly, it has been demonstrated that 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid (HPPTCA), an adduct of Cys and PLP is formed *in vivo* in humans^{22,23}. It has been also recognized that vitamin B₆ supplementation elevates plasma HPPTCA which may be accompanied by reduction in plasma Cys or even toxic Hcy levels^{22,23}. On the other hand, the facile formation of HPPTCA and its decomposition leading to Cys and PLP release²², point to a conclusion that PLP may be stored in the human body in the form of HPPTCA. In fact the role of HPPTCA in health and disease remains substantially unknown and data on HPPTCA content in humans are very limited.

So far, only two methods have been developed enabling determination of HPPTCA in human plasma^{22,23}. The assays primarily involve sample deproteinization by ultrafiltration²² or by treatment with perchloric acid²³, pre-column derivatization with *N*-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide (MSTFA)²² or 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate (CMQT)²³ and subsequent quantification of the resulting product by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)²² and high performance liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry (HPLC-UV)²³ techniques (Table 1). The estimated concentration of plasma HPPTCA, using the proposed methods, ranged from 18.86 to 65.60 µmol/L in the group of thirty one apparently healthy donors^{22,23}.

The present paper aims to provide high-throughput potential method for the determination of HPPTCA in human plasma by HPLC coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) detection, which is currently considered as one of the most powerful analytical techniques in the bioanalysis.

Materials and methods

Reagents and materials

In general, chemicals used in this study were commercially available and at least of analytical reagent grade. 4-Deoxypyridoxine hydrochloride (4-DPD) was from Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA). (In)organic solvents and mobile phase additives suitable for HPLC-MS/MS, namely water, methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), and formic acid (FA) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). HPPTCA was prepared in our laboratory as previously described²². For sample deproteinization, Vivaspin 500 centrifugal concentrators with 5 kDa molecular weight cut-off (MWCO) polyethersulfone (PES) membrane purchased from Sartorius Stedim Lab. Ltd. (Stonehouse, United Kingdom) were exploited. Samples were filtered prior to chromatographic analysis using syringe filters with 0.20 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) HI membrane (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Instrumentation

An Agilent 1260 Infinity II HPLC system equipped with flexible pump integrated with vacuum degasser model G7104C, temperature-controlled sample storage combined with automated sample injector model G7129C, column compartment model G7116B and triple quadrupole G6470B MS/MS system with Agilent JetStream ionization technology (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used for the HPLC-MS/MS experiments. Data acquisition and analysis were performed using a MassHunter software. The analytes were separated on X-Bridge Glycan BEH Amide (100 × 2.1 mm, 2.5 µm) column from Waters Corporation (Milford, MA, USA). During the study, Multi-Speed Vortex MSV-3500 (Biosan, Riga, Latvia) and a Mikro 220R centrifuge with fast cool function (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) were used.

Stock solutions

All solutions were prepared with HPLC-MS/MS grade (in)organic solvents.

The stock solutions of HPPTCA (1 mmol/L) and 4-DPD (internal standard, IS) (1 mmol/L) were prepared in water. The solutions were kept at 4 °C for no longer than 4 h and 8 h as recommended in the literature²² or by manufacturer, respectively. The working solutions were prepared by diluting a particular standard solution with water as needed and processed without delay. All solutions were protected from light.

The mobile phase components, namely solvent A (0.1% FA in a mixture of water and ACN (95:5, v: v)) and solvent B (0.1% FA in a mixture of water and ACN (5:95, v: v)) as well as needle rinse solvent consisting of water, MeOH and ACN (50:25:25; v: v: v) were prepared once a week. The solutions were stored in tight amber glass bottles at ambient temperature.

Assay		GC-MS	HPLC-UV	HPLC-MS/MS
General information	Method reference	22	23	Present method
	Analysis time* [min]	~ 160	~ 345	~ 25
	Plasma sample size [μL]	250	50	50
	Chemicals consumption** [mL]	0.25	0.075	0.28
	Recommended quantification mode	External standard addition method	External standard addition method	Single/IS addition methods
Critical sample preparation steps	IS addition	-	-	4-DPD
	Extraction of HPPTCA	ACN 25 °C, 10 min	-	ACN 25 °C, 10 min
	Disulfides reduction	-	TCEP 25 °C, 15 min	-
	Derivatization	MSTFA 25 °C, 100 min	CMQT 25 °C, 300 min	-
	Sample deproteinization	Ultrafiltration 4 °C, 10 min	Perchloric acid 4 °C, 10 min	Ultrafiltration 25 °C, 7 min
	Sample drying method	Vacuum concentrator 80 °C, 20 min	-	-
	Sample dilution	-	-	50 times with mobile phase
	Stability of processed samples at 25 °C [h]	3	48	2
Validation data	Linearity [μmol/L]	1–20	1–100	0.25–10
	LOQ [μmol/L]	1	1	0.25
	Intra-assay accuracy [%]	n.a.	92.74–105.57	96.10–113.0
	Intra-assay precision [%]	n.a.	2.48–6.99	6.94–15.46
	Matrix affected assay	no	no	yes

Table 1. The comparison of methods for the determination of HPPTCA in human plasma. *Legend:* n.a. no data available; *overall analysis time corresponding to sample preparation and chromatographic analysis time; **the volume of chemicals used per sample referring to sample preparation step. *Abbreviations:* ACN, acetonitrile; CMQT, 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate; GC, gas chromatography; HPLC, high performance liquid chromatography; HPPTCA, 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid; IS, internal standard; (MS)/MS, (tandem) mass spectrometry; LOQ, limit of quantification; MSTFA, *N*-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine; UV, ultraviolet detection; 4-DPD, 4-deoxypyridoxine.

Biological samples collection

Blood samples (about 2 mL) were collected from individuals after overnight fasting into evacuated tubes containing EDTA by venipuncture, immediately cooled on ice and centrifuged at 5000g for 15 min at room temperature within 30 min. The separated plasma was delivered to the laboratory in a frozen state using dry ice as a cooling agent. Samples were processed without delay, immediately after defrosting at room temperature, using the procedures described herein. A group of fifteen apparently healthy anonymous individuals, belonging to an ethnically homogeneous group, was involved in the study. They were not supplemented with the analyte, neither HPPTCA precursors (Cys and PLP) before sample collection. No medications were allowed.

Plasma samples preparation

The plasma sample (50 μL) was spiked with 5 μL of 50 nmol/L 4-DPD providing the concentration of IS of 5 μmol/L in plasma. Then, 30 μL of ACN was added and the resulting mixture was vortexed at 3000 rpm for 10 min at 25 °C. Thereafter, sample was deproteinized by ultrafiltration (12,000g, 25 °C, 7 min). The obtained ultrafiltrate (5 μL) was diluted by 50 times with a mixture of solvent A in solvent B (60:40; v: v). The resulting solution was clarified by passage through syringe filters and placed in a temperature-controlled autosampler set to 25 °C. 1 μL of the sample was injected into HPLC-MS/MS system and analyzed according to the procedure described in Sect. 2.6.

HPLC-MS/MS conditions

The chromatographic separations were performed at 20 °C using gradient elution (0–2 min 40% solvent B; 2–4 min 40–0% solvent B; 4–6 min 0–40% solvent B) with the mobile phase delivered at the flow rate of 0.3 mL/min. After each injection, the needle and connecting tubing was washed with a needle rinse solvent for 15 s. Column was re-equilibrated between analyses by setting the post-run conditioning at 40% B for 2 min. Note: In order to provide reproducibility of retention time and peak shape, at least five blank injections running the full-time program should be performed following by analysis of study samples.

The MS/MS detector was operated in positive electrospray ionization (ESI) mode with the following set of operating parameters: drying gas (nitrogen) temperature 300 °C, drying gas (nitrogen) flow 8 L/min, nebulizer pressure 35 psi, sheath gas (nitrogen) temperature 350 °C, sheath gas (nitrogen) flow 11 L/min, capillary

voltage + 4000 V/-2500 V, nozzle voltage 0 V/-1000 V. In this study, the effluent was predominantly monitored in multiple reaction monitoring (MRM) mode using three diagnostic pathways per the target compound (Fig. 1a, b and Table S1). The instrument was set to acquire data using unit resolutions within 0.80–1.04 min and 1.05–1.2 min range of time for 4-DPD and HPPTCA respectively, with a dwell time of 100 ms that yielded about 3 scan cycles per second across the chromatographic peak. Detailed data regarding the detection conditions in MRM MS/MS mode are summarized in Table S1.

Results and discussion

The paper presents HPLC-MS/MS based method for the determination of HPPTCA in human plasma. The following (sub)sections of the report provide all relevant information related to development, validation, and in-study use of the described herein assay.

Sample preparation

Sample preparation procedure involves addition of 4-DPD acting as IS, ACN extraction of HPPTCA from plasma proteins, sample deproteinization by ultrafiltration, dilution of ultrafiltrate with mobile phase and membrane filtration of the resulting solution prior to chromatographic analysis. The procedure was developed based on previously published GC-MS assay by Piechocka et al.²², enabling analysis of HPPTCA in plasma samples.

Addition of internal standard

An internal standardization was used to improve performance of the method. 4-DPD exhibiting structural and physicochemical similarity to HPPTCA (Fig. 1a, b) was chosen as IS. Interestingly, 4-DPD has been already used as an IS in vitamin B6 and 4-pyridoxic acid analysis of human biological fluids, feeds, plant and animal tissues^{24–30}. As demonstrated upon validation of the method, using an IS improves the repeatability and reproducibility of results.

HPPTCA extraction

HPPTCA was extracted from plasma proteins according to previously published procedure²², namely 50 μ L of plasma was mixed with 30 μ L of ACN, vigorously shaken for 10 min and then the obtained solution was subjected to deproteinization without delay. As demonstrated by Piechocka et al.²², highly polar HPPTCA molecules interact with plasma proteins surface via weak intermolecular forces. In order to increase HPPTCA recovery, samples need to be thus exposed to ACN before ultrafiltration, resulting in change of structure of hydration layer around proteins. In addition, the effect of temperature and agitation mode on extraction efficiency was investigated since the influence of such parameters has not been previously checked. It has been noticed that temperature in the range of 15–35 $^{\circ}$ C, did not significantly affect the efficiency of the process (Figure S1a). As expected, better reproducibility was achieved when samples were shaken using thermo-shaker and vortex mixer

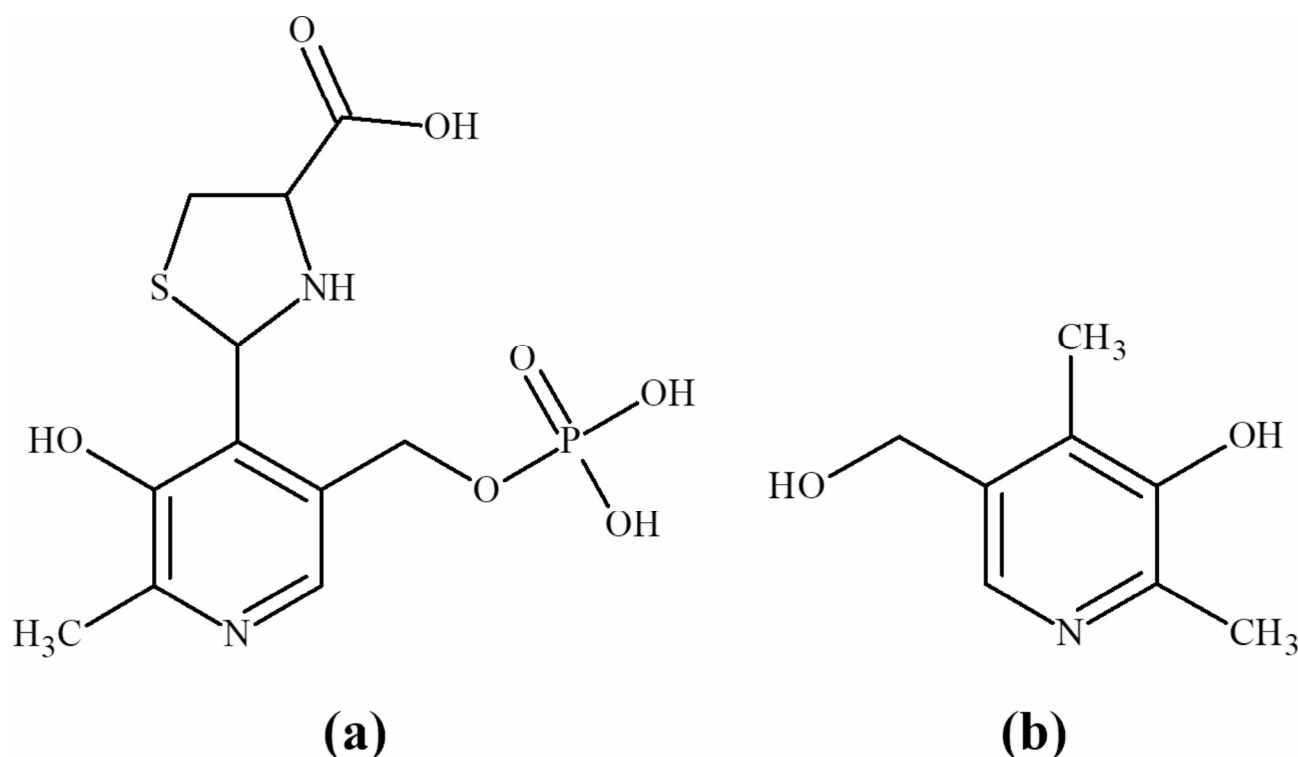


Fig. 1. The main research project object (a) HPPTCA and (b) 4-DPD.

instead of shaking by hand (Figure S1b). For routine analysis, samples were vortexed at ambient temperature as reported previously²².

Removal of proteins

The assay involves sample deproteinization as HPLC-MS/MS system is incapable of accommodating proteins. In the presented study, an approach utilizing cut-off filters with PES membrane was used according to a previously published procedure²². Then, the impact of centrifugation time and temperature, and pore size of membrane on the measured concentration of the analyte was evaluated. It has been found that the smaller pore size of membrane, the better signal quality and batch to batch reproducibility of results (Figure S2 a), most probably due to more efficient removal of sample components altering the detector response. Moreover, it has been recognized that the duration of the process, tested in the range of 1–20 min, affected operational efficiency (Figure S2 b). In parallel, there was no difference in the analyte-delivered signal intensity when samples were centrifuged at 4 °C and 25 °C. The most satisfactory results were obtained when samples were centrifuged for 7 min at room temperature and filtered through 5 kDa MWCO filter.

Sample dilution

In order to reduce ion suppression being one form of matrix effect that HPLC-ESI-MS/MS technique suffers from, samples were diluted. A mixture of solvent A in solvent B (60:40; v: v) was nominated as sample diluent with regard to compatibility with initial mobile phase composition. It has been encountered that diluting sample by up to 50 times led to reduced signal suppression (Figure S3 a, b), while its further dilution did not help to minimize matrix effects and contributed to lower sensitivity resulting from dilution. For routine analysis, the obtained ultrafiltrate was thus diluted by 50 times with a mixture of solvent A in solvent B (60:40; v: v).

Sample filtration

Prior to chromatographic analysis, samples were clarified by passage through syringe filters in order to keep the tiniest particulates out of HPLC column. Typical high recovery nylon, PES and PTFE based membrane filters, from different sources, were tested. Filters in the range of 0.20–0.45 µm nominal porosity were considered among those available in our laboratory. It has been recognized that membrane type affected the recovery of HPPTCA (Figure S4) which was found to be between 80.91 and 123.39%. For processed samples filtration, PTFE syringe filters were exploited providing the recovery of the analyte of 123.39%, regardless of its concentration.

Stability of processed samples

The total time and conditions that a processed sample is stored until completion of analysis were determined. The stability of the HPPTCA and IS in a given matrix was evaluated in the temperature-controlled autosampler set to 25 °C and 4 °C. It was found that HPPTCA content remains stable up to 120 min at any examined conditions, regardless its concentration within the quantitation range, since the drop to 89.95% of the initial concentration was achieved. In parallel, there was no noticeable change in 4-DPD delivered peak area/height which remained stable for at least 1 working day at ambient temperature. The freeze-thaw stability test of processed samples has also shown that reliable and valid HPLC-MS/MS data can only be obtained when freshly prepared samples are analyzed. These results agree with the literature data and support information that HPPTCA, in water solutions, is unstable^{17,18,22}. In relation to 4-DPD, this is a first piece of data on this topic to the best of our knowledge.

Chromatographic and detection conditions

The described herein plasma HPPTCA assay involves separation of the analyte and IS using hydrophilic interactions liquid chromatography (HILIC) followed by positive ESI ionization MS/MS detection in MRM mode. A standard approach was employed to specify optimal conditions of HPLC-MS/MS system providing the best method's performance.

Selection of separation conditions for HILIC based method

Recently, Głowacki et al.¹⁸ have demonstrated that HILIC coupled with UV detection is suitable for determining plasma Cys and Hcy after derivatization with PLP in the form of substituted 1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid and 1,3-thiazinane-4-carboxylic acid, respectively. In the present study, HILIC technique has been thus employed. X-Bridge Glycan BEH Amide column and typical mobile phase for HILIC separations, consisted of 0.1% FA in a mixture of water and ACN (95:5, v: v) (solvent A) and water and ACN (5:95, v: v) (solvent B), were applied. During method development, it was recognized that gradient elution was necessary to maintain the efficient resolution of HPPTCA and IS from other sample components, properly equilibrate the chromatographic system between analyses, and reduce carry-over/matrix effects to the minimum level. In parallel, an initial aqueous solvent content and flow rate of mobile phase set to 60% and 0.3 mL/min respectively were found to be appropriate to retain the compounds of interest. Column temperature was set to 20 °C as recommended by column manufacturer. Under these (optimized) conditions, the HPPTCA and 4-DPD-delivered peaks' shape symmetry, expressed as symmetry factor, oscillated in the 1.00–1.16 and 0.80–1.21 range respectively, while the resolution of 0.94 indicated peaks separation. The peak of 4-DPD (0.95 min) and HPPTCA (1.15 min) eluted within 2 min (Fig. 2 and Figure S5 a, b), and the analysis time 6 min is more favorable than in other methods such as GC-MS and HPLC-UV, where it is 23 min²² and 14 min²³, respectively. As these results were satisfactory, no further work was undertaken to optimize separation conditions.

Optimization of ESI-MS/MS detection conditions

In order to increase sensitivity and selectivity as well as improve batch to batch detector response reproducibility in trace analysis, ESI-MS/MS detection conditions were optimized. Firstly, it was recognized that target

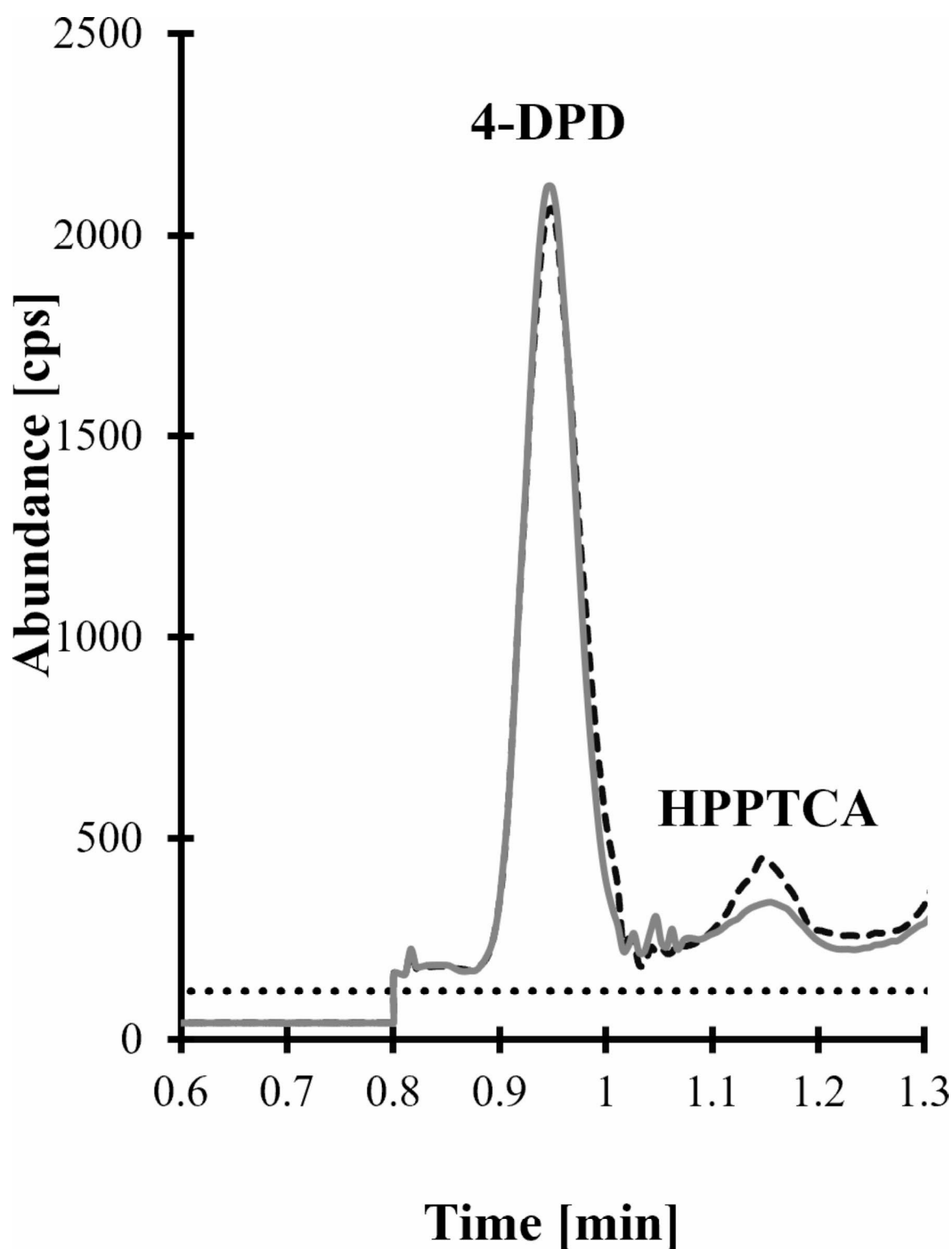


Fig. 2. Representative chromatograms of standard solutions and human plasma prepared according to the procedure described in Sect. 2.5. Chromatographic conditions were as described in Sect. 2.6. Chromatograms are presented as a sum of intensities of all monitored precursor to product ion transitions for HPPTCA and 4-DPD. Blank standard solution (black dotted line), blank human plasma sample spiked with 4-DPD (5 µmol/L in plasma) (grey line) and the same sample spiked with HPPTCA (5 µmol/L in plasma) and 4-DPD (5 µmol/L in plasma) (black dashed line).

compounds generate both positive and negative ions, while the most abundant ions were singly protonated precursor ion $[M + H]^+$ of HPPTCA and 4-DPD having the mass of 351.1 and 154.2 respectively. Then, MRM and ion source optimization, by injection analysis of standard solution of HPPTCA and 4-DPD with column, were conducted using Agilent MassHunter Optimizer software. Three MS/MS transitions per analyte were selected. The target compounds were quantified using the precursor to product ion transitions representing the first most abundant fragment ion. The other two MS/MS transitions were employed as a qualifier for identification purposes. Detailed data regarding the detection conditions in MRM ESI-MS/MS mode are described in Sect. 2.6 and gathered in Table S1.

The identification and confirmation of the target compounds were performed by analyzing the standard solution of HPPTCA and 4-DPD prepared separately and processed according to the procedure described in Sect. 2.5 and 2.6. The analyses were carried out by HPLC-ESI-MS/MS system which was set to collect time information as well as acquire data in scan mode and subsequently in MRM mode. Finally, the confirmation of the origin of HPPTCA and IS-delivered peak in real samples was based upon comparison of retention time and ESI-MS spectra with the corresponding set of data obtained by analyzing an authentic compound. The primary MRM transition of each target compound and confirmatory MRM transitions were monitored for their quantification and confirmation, respectively. The peak disappearance after acid/base hydrolysis before HPLC analysis was also helpful in confirming HPPTCA identity as the analyte is susceptible to hydrolysis^{17,18,23}.

Evaluation of matrix effects

Matrix effects are a major concern in quantitative HPLC-ESI-MS/MS because they detrimentally affect the accuracy, reproducibility, and sensitivity. In particular, highly polar molecules, to which HPPTCA belongs, are generally considered to have the largest ion suppression. Thus, considerable attention was given to optimizing sample preparation procedure and chromatographic/detection conditions in order to minimize matrix effects as described in Sect. 3.1 and 3.2. Then, the degree of matrix effects on optimized HPLC-MS/MS method was determined using post extraction addition technique as reported by Taylor³¹. The matrix effect was determined as -32.72% denoting ion suppression. By contrast, the matrix effect was -65.45% when 4-DPD was not used. Consequently, internal standardization using 4-DPD combined with single standard addition was used in routine HPLC-MS/MS analysis to rectify matrix effects. As demonstrated upon validation of the method, the employed strategies for compensating matrix effects for HPPTCA helped to improve the repeatability and reproducibility of results.

Greenness assessment of the method

AGREE-Analytical GREENness metric approach and software (version 0.5 beta)³² was employed to assess the greenness of the delivered method. The approach has been already used to identify strong and weak points of other HPPTCA assays²³, considering each of the twelve principles of Green Analytical Chemistry. The overall score was 0.49 and 0.43 in relation to HPLC-UV²³ and GC-MS²² based HPPTCA assays, respectively (Fig. 3b, c).

In order to assess the presented herein HPLC-MS/MS assay's greenness, equal weights have been set for all twelve principles evaluated, and the following assumptions have been made: procedure involves an external sample (pre)treatment with a reduced number of steps (principle 1); the volume of plasma is 0.050 mL (principle 2); the analytical device is positioned off-line (principle 3); the number of distinctive analytical steps is five, including IS addition, extraction of HPPTCA, sample deproteinization and dilution followed by HPLC-MS/MS analysis (principle 4); the procedure is semi-automated and involves a miniaturized sample preparation methods (principle 5); derivatization step is not required (principle 6); the total amount of waste is 14.01 (g and mL combined), consisting of the sample itself, chemicals, and plastic disposable ware used to prepare and analyze sample (principle 7); one analyte is determined in a single run, and the sample throughput is ten samples per hour (principle 8); the most demanding technique is HPLC-MS/MS (principle 9); none of the reagents can be obtained from bio-based sources (principle 10); the procedure requires no more than 1.60 mL of toxic chemical reagents, namely ACN, MeOH and FA (principle 11); ACN is harmful and highly flammable, while MeOH is

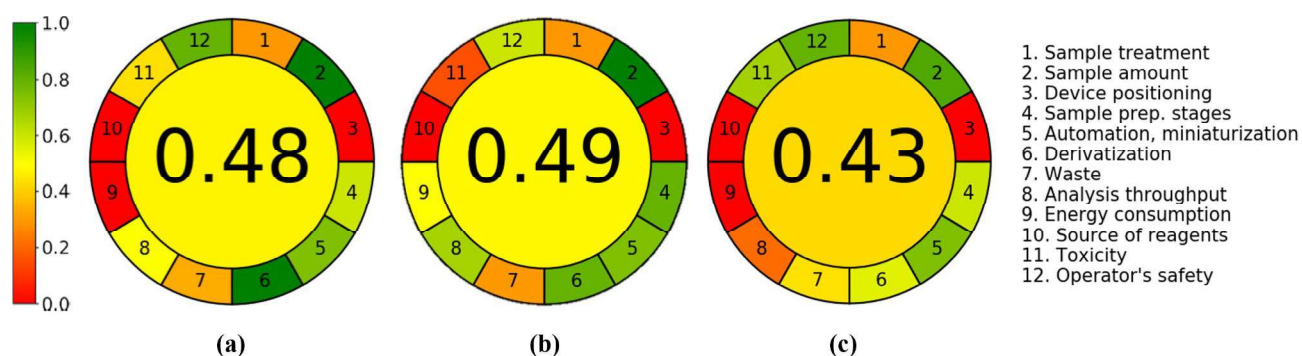


Fig. 3. The assessment results with AGREE analysis of procedure for determination of HPPTCA in human plasma by (a) proposed HPLC-MS/MS based method, and previously published (b) HPLC-UV and (c) GC-MS assays²³.

highly flammable and toxic to humans (principle 12). FA was not taken into account at the stage of assessing the operator's safety since only 2.045 µL was used.

The AGREE results for the method under consideration are presented in Fig. 3a. Overall, the method is comparable in terms of greenness to other HPPTCA assays^{22,23}. However, the distribution of strong and weak points of the method differs noticeably. In particular, the HPLC-MS/MS method can be considered environmentally-friendly thanks to carrying out the chemical analysis on a very small scale combined with a low consumption of hazardous chemicals. The assay also has a relatively high-throughput potential and simplicity in sample preparation, while its serious limitation is the use of energy-intensive measurement technique without the possibility of carrying out the analysis in situ with the use of chemicals from renewable sources.

Validation of the method

Full validation of the new HPPTCA assay based on HPLC-MS/MS was performed. All studies were planned and performed in accordance with the United States Food and Drug Administration guidance for validation of bioanalytical methods³³. The scheme of operation was analogous to that described in detail in our previously published articles concerning HPLC-UV²³ and GC-MS²² assays for analysis of plasma HPPTCA. The process included evaluation of selectivity and specificity, linearity, intra-/inter-assay precision and accuracy, limit of quantification (LOQ), matrix effect, carry-over, and reinjection reproducibility. The assessments were made using laboratory-made pooled blank plasma samples spiked with known quantities of the analyte and IS to prepare calibration standards.

Selectivity and specificity

Selectivity and specificity studies evaluated interferences originating from all (un)known components of study samples, in particular Cys, PLP, cystine (Cys₂). Several types of samples were assayed according to the procedures described herein, namely (1) blank standard solution, (2) standard solution of Cys, PLP, Cys₂, HPPTCA and IS, (3) blank and zero plasma samples from four control subjects (as it was difficult to obtain such kind of normal plasma samples) and (4) the same blank plasma samples spiked with Cys, PLP, Cys₂, HPPTCA and IS. As shown in Fig. 2 and Figure S5 a, b, no significant response attributable to interfering components was observed at the retention times of the analyte and the IS in the blank/zero samples. Under set conditions, Cys, PLP, Cys₂ are not retained and their corresponding peaks are eluted before the column dead volume. Peak purity measurements have also denoted the ability of HPLC-MS/MS method to differentiate and measure HPPTCA and IS in the presence of any interfering substances in plasma samples.

Linearity

An IS calibration method was used to verify the calibration range of 0.25-10 µmol/L in plasma. For this purpose, calibration curves consisted of a blank/zero sample and six calibrators at the level of 0.25, 0.5, 1; 2.5, 5, 10 µmol/L were generated and were run in triplicate over 3 subsequent working days. The least-squares regression model was used to describe the concentration-response relationship (HPPTCA peak area to 4-DPD peak area ratio). The calibration standards fitted well into the linear regime within the intended quantification range, which gave correlation coefficient values of 0.9992. Substantial changes in the slope of any regression line obtained over 3 days were observed suggesting that the HPLC-MS/MS assay is affected by matrix components. Data dealing with validation parameters, evaluated as a part of the linearity assessment, are shown in Table 2.

Accuracy and precision

The accuracy and precision of the assay, referring to intra- and inter-day measurements, were evaluated as a part of a linearity assessment. The precision was expressed as coefficient of variation (CV) of measurement repeatability. Accuracy was presented as the percentage of analyte recovery which was calculated by expressing the mean measured amount as a percentage of added amount of HPPTCA. The accuracy ranged from 96.10 to 113.00% and 91.53–113.49% for intra- and inter-day variation, respectively. In parallel, the precision varied from 6.94 to 15.46% and 0.56–16.23% for intra- and inter-day measurements, respectively. Detailed data on precision and accuracy from the 3 day experiments, compared with intra-assay precision and accuracy, are shown in Table 3.

The limit of quantification

LOQ evaluation was conducted in parallel with the intra-assay precision and accuracy assessment for the calibration range. The lower LOQ (LLOQ) was determined as LOQ (Table 2) as it resulted in reproducible detector response at least 10-times as high as the baseline signal with a precision and accuracy of 15.46% and 96.10%, respectively. The accepted LOQ value was lower than that published earlier (Table 1)^{22,23}.

Regression equation	R	Linear range (µmol/L) ¹	Intra-assay precision (%)		Intra-assay accuracy (%)		LOQ (µmol/L)
			Min	Max	Min	Max	
y = 0.1357x + 0.0046	0.9992	0.25-10	6.94	15.46	96.10	113.00	0.25

Table 2. Validation data corresponding to intra-assay measurements (n = 3). Abbreviations: LOQ, limit of quantification; R, correlation coefficient.

Concentration (μmol/L)	Precision (%)		Accuracy (%)	
	Intra-assay	Intermediate	Intra-assay	Intermediate
0.25	15.46	14.01	96.10	109.35
1	12.64	7.55	113.00	101.89
5	8.04	6.31	106.34	102.37
10	6.94	10.82	98.85	99.82

Table 3. Precision and accuracy of the data (*n* = 3).

Carry-over

Carry-over assessment was made as a part of the linearity evaluation by analyzing blank standard solution samples after the calibration standard at the upper LOQ (ULOQ). Each time the response of blank samples was as high as background signal denoting the absence of carry-over effect.

Matrix effect

Apart from selectivity studies, the matrix effect assessment involved comparing calibration curves of the six individual sources of plasma samples against a calibration curve of the pooled matrix. The CV of the slope of the regression lines deviated by 17.03% denoting the presence of matrix effects. As interpatient variability was detected, a single standard addition method combined with IS addition method was used to establish the levels of HPPTCA in plasma samples.

Reinjection reproducibility

Reinjection reproducibility test calculations were performed as a part of assessment of stability of processed samples by analyzing the same calibration standard(s) at the (L/U)LOQ in ten replicate injections. Reinjection repeatability was expressed as CV of HPPTCA peak area to 4-DPD peak area ratio. The CV value of monitored parameter did not exceed 11.39% indicating that reinjection of samples prepared for research purposes can be made within 120 min as demonstrated upon stability testing.

In conclusion, it has been proven upon validation that all evaluated validation parameters fall within acceptable tolerance limits³³ and the performance of the presented herein method is sufficient to allow to be used in diagnostic testing of plasma samples for HPPTCA.

Application of the method

The HPLC-MS/MS assay was used to quantitatively determine HPPTCA in human plasma samples from apparently healthy donors. Single standard addition method combined with IS addition method, enabling compensate matrix effects, were used to establish levels of the analyte in study samples. The presence of HPPTCA was confirmed in eleven of fifteen plasma samples. The concentration of the analyte in each sample was calculated using the following formula: $C_x = Y_x \times C_{IS} / (Y_{IS} - Y_x)$, where symbols mean C_x concentration of the analyte in normal plasma sample, Y_x ratio of the analytical signal of HPPTCA and 4-DPD for the normal plasma sample, C_{IS} concentration for the sample with the addition of a known amount of the IS; Y_{IS} ratio of the analytical signal of HPPTCA and 4-DPD for the sample with the addition of a known amount of the IS. The estimated concentrations of HPPTCA, based on data obtained by triplicate analysis of a particular sample from an individual source, varied from 0.55 to 8.39 μmol/L. Importantly, these values were similar to those previously reported^{22,23}, denoting the data’s reliability from the presented HPLC-MS/MS assay.

Conclusions

To the best of our knowledge, the article presents the first HPLC-MS/MS based method for assessment of HPPTCA content in human plasma. Moreover, the report provides evidence that 4-DPD can be used as an IS in HPPTCA analysis to improve data quality. Even more importantly, presented assay has produced compelling evidence supporting the conclusion that HPPTCA is a component of human plasma, as reported elsewhere^{22,23}.

In this study, using AGREE-Analytical GREENness metric approach and software (version 0.5 beta)³², strong and weak points of presented herein analytical procedure designed to determine HPPTCA content in human plasma have been identified. The attractiveness of the presented herein HPLC-MS/MS assay relies on short analysis time (~25 min) and straightforward sample preparation procedure making possible to determine HPPTCA without derivatization. In these terms, our method is more convenient compared to other HPPTCA assays based on GC-MS²² and HPLC-UV²³ techniques, where this process takes ~160 min or ~345 min, respectively and HPPTCA is determined after derivatization with MSTFA²² or CMQT²³. On the other hand, a serious limitation of the presented method is limited stability of the analyte under experimental conditions (<2 h) by contrast with other HPPTCA assays in which samples remain stable 48 h²³ and 3 h²². Moreover, the necessity of using of single standard addition method together with IS method to quantify samples limits throughput potential of the proposed method (Table 1).

The HPLC-MS/MS assay provides a new useful tool for investigating role of HPPTCA in health and disease along with previously published GC-MS²² and HPLC-UV²³ based methods. However, a successful analysis using the HPLC-MS/MS method can only be achieved when the recommended procedures in this report are followed.

Data availability

Essential data is contained within the article and supplementary materials file. In addition, the dataset generated and analyzed during this study, which contributed to the article, can be made available by the corresponding author (J.P.) upon reasonable request as long as the request does not compromise intellectual property interests. Plasma samples are not available from the authors.

Received: 5 July 2024; Accepted: 8 October 2024

Published online: 18 October 2024

References

- Oliveira, P. & Laurindo, F. Implications of plasma thiol redox in disease. *Clin. Sci.* **132**, 1257–1280 (2018).
- Moretti, R. & Caruso, P. The controversial role of homocysteine in neurology: From labs to clinical practice. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 231, 1–22 (2019).
- Chrysant, S. G. & Chrysant, G. S. The current status of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: A mini review. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **16**, 559–565 (2018).
- Muzurović, E., Kraljević, I., Solak, M., Dragić, S. & Mikhailidis, D. P. Homocysteine and diabetes: Role in macrovascular and microvascular complications. *J. Diabetes Complicat.* **35**, 107834, 1–16 (2021).
- Hasan, T. et al. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. *Exp. Mol. Med.* **51**, 21–34 (2019).
- Azarpazhooh, M. R., Bogiatzi, C. & Spence, J. D. Stroke prevention: Little-known and neglected aspects. *Cerebrovasc. Dis.* **50**, 622–635 (2021).
- Sohouli, M. H. et al. A comprehensive review and meta-regression analysis of randomized controlled trials examining the impact of vitamin B12 supplementation on homocysteine levels. *Nutr. Rev.* **82**, 726–737 (2024).
- Zhang, D. M., Ye, J. X., Mu, J. S. & Cui, X. P. Efficacy of vitamin B supplementation on cognition in elderly patients with cognitive-related diseases: A systematic review and meta-analysis. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **30**, 50–59 (2017).
- Mandaviya, P. R., Stolk, L. & Heil, S. G. Homocysteine and DNA methylation: A review of animal and human literature. *Mol. Genet. Metab.* **113**, 243–252 (2014).
- Martí-Carvajal, A., Solà, I., Lathyris, D. & Dayer, M. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst. Rev.* **8**, 1–126 (2017).
- Smith, A. D., Refsum, H. & Homocysteine B vitamins, and cognitive impairment. *Annu. Rev. Nutr.* **36**, 211–239 (2016).
- Matsuo, Y. Formation of Schiff bases of pyridoxal phosphate. Reaction with metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2011–2015 (1957).
- Buell, M. V. & Hansen, R. E. Reaction of pyridoxal-5-phosphate with amino thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 6042–6049 (1960).
- Bergel, F. & Harrop, K. Interaction between carbonyl groups and biologically essential substituents. Part 111 the formation of a thiazolidine derivative in aqueous solution from pyridoxal phosphate and L-cysteine. *J. Chem. Soc.* **789**, 4051–4056 (1961).
- Mackay, D. The mechanism of the reaction of cysteine with pyridoxal 5'-phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 93–100 (1962).
- Mackay, D. & Shepherd, D. M. Inhibition of histidine decarboxylases and interaction of the inhibitors with pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* **59**, 553–561 (1962).
- Terzuoli, L. et al. Some chemical properties and biological role of thiazolidine compounds. *Life Sci.* **63**, 1251–1267 (1998).
- Głowacki, R., Stachniuk, J., Borowczyk, K. & Jakubowski, H. Quantification of homocysteine and cysteine by derivatization with pyridoxal 5'-phosphate and hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 1935–1941 (2016).
- Pestaña, A., Sandoval, I. & Sols, A. Inhibition by homocysteine of serine dehydratase and other pyridoxal 5'-phosphate enzymes of the rat through cofactor blockage. *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 373–379 (1971).
- Tunnicliff, G. & Ngo, T. T. The mode of action of homocysteine on mouse brain glutamic decarboxylase and γ -aminobutyrate aminotransferase. *Can. J. Biochem.* **55**, 1013–1018 (1977).
- Griffiths, R. et al. Synergistic inhibition of [^3H]muscimol binding to calf-brain synaptic membranes in the presence of L-homocysteine and pyridoxal 5'-phosphate. *Eur. J. Biochem.* **137**, 467–478 (1983).
- Piechocka, J., Wrońska, M., Głowacka, I. E. & Głowacki, R. 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid, novel metabolite of pyridoxal 5'-phosphate and cysteine is present in human plasma - chromatographic investigations. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3548, 1–16 (2020).
- Piechocka, J., Wyszczelska-Rokiel, M. & Głowacki, R. Simultaneous determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid and main plasma amino thiols by HPLC–UV based method. *Sci. Rep.* **13**, 9294, 1–12 (2023).
- Esteve, M. J., Farré, R., Frigola, A. & García-Cantabella, J. M. Determination of vitamin B6 (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) in pork meat and pork meat products by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **795**, 383–387 (1998).
- Zhang, X., Tang, X. & Daly, T. M. A one-step NIST traceable HPLC method for quantitation of vitamin B6 and 4-pyridoxic acid in human plasma. *Pract. Lab. Med.* **21**(e00160), 1–8 (2020).
- Oureshi, S. A. & Huang, H. Determination of B6 vitamers in serum by simple isocratic high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **13**, 191–201 (1990).
- Sharma, S. K. & Dakshinamurti, K. Determination of vitamin B6 vitamers and pyridoxic acid in biological samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **578**, 45–51 (1992).
- Shepherd, G. S., Louw, M. E. J. & Labadarios, D. Analysis of vitamin B6 vitamers in plasma by cation-exchange high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **416**, 138–143 (1987).
- van Schoonhoven, J., Schrijver, J., VandenBerg, H. & Haenen, G. R. M. M. Reliable and sensitive HPLC method with fluorometric detection for the analysis of vitamin B6 in foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1475–1480 (1994).
- Gregory, J. F. & Feldstein, D. Determination of vitamin B-6 in foods and other biological materials by paired-ion high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 359–363 (1985).
- Taylor, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **38**, 328–334 (2005).
- Pena-Pereira, F., Wojnowski, W. & Tobiszewski, M. AGREE - Analytical GREEnness metric approach and software. *Anal. Chem.* **92**, 10076–10082 (2020).
- M10 Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis. *Guidance for Industry*. (2022).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Magdalena Kędzierska, from the Medical University of Lodz, for the donation of plasma samples from apparently healthy volunteers.

Author contributions

M.G.: Investigation, Visualization. R.G.: Conceptualization, Writing – review and editing, Resources, Funding

acquisition. P.K.: Visualization. J.P.: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review and editing, Supervision, Project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

The authors acknowledge the financial support from National Science Center, Poland (grant number 2017/27/B/ST4/01476).

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Institutional review board statement

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University of Lodz (decision identification code 7(I)/KBBN-UŁ/II/2020, date of approval 30 March 2020). Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75760-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Publikacja [D4]:

M. Gaweł, R. Głowacki, J. Piechocka, First HPLC-UV method for the determination of homocysteine thiolactone in human urine after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide, *Sci. Rep.* 15 (2025) 1–14. (IF₅=4,3, punktacja MNiSW₂₀₂₄=140)

Wyniki badań klinicznych uzyskane w ciągu ostatnich trzydziestu lat wskazują na systematyczny wzrost częstości występowania tzw. chorób cywilizacyjnych. Ich rozwój wiązany jest między innymi z zaburzeniami metabolizmu związków siarki, do których należy homocysteina (Hcy) oraz będący jej wewnątrzcząsteczkowym estrem - tiolakton homocysteiny (HTL). Naukowcy coraz częściej skłaniają się ku twierdzeniu, że to właśnie on, a nie sama Hcy odpowiada za szkodliwe działanie na organizm człowieka. HTL wykazuje bowiem znaczną reaktywność w stosunku do białek osocza, która prowadzi do zaburzenia bądź utraty ich właściwości strukturalnych i funkcjonalnych [2,7]. Proces ten, określany jako *N*-homocysteinyłacja, wiązany jest z patogenezą chorób układu sercowo-naczyniowego, schorzeń układu nerwowego, chorób metabolicznych oraz zaburzeń płodności [2,18–21]. Zmodyfikowane białka wykazują zwiększoną podatność na uszkodzenia oksydacyjne oraz agregację w porównaniu z formami natywnymi, a ich obecność może nasilać odpowiedzi autoimmunologiczne organizmu. Pomimo rosnącego zainteresowania rolą HTL oraz procesem *N*-homocysteinyłacji, jego znaczenie biologiczne nie zostało dotychczas w pełni wyjaśnione. Ograniczona wiedza w tym zakresie uzasadnia potrzebę opracowywania nowych, czułych i jednocześnie prostych narzędzi analitycznych umożliwiających monitorowanie stężenia HTL w płynach biologicznych. Co szczególnie interesujące nie opracowano dotychczas metody wykorzystującej wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV) do oznaczenia HTL w moczu, pomimo że jest to bezspornie jedna z najbardziej rozpowszechnionych, tanich i dostępnych technik w laboratoriach bioanalitycznych. Celem niniejszej pracy było stworzenie narzędzia analitycznego do oceny zawartości HTL w moczu człowieka przy wykorzystaniu techniki HPLC-UV, a tym samym wypełnienie istniejącej luki badawczej. Opracowana przeze mnie metoda opiera się na jednoczesnej hydrolizie HTL oraz derywatyzacji powstającej Hcy

z zastosowaniem selektywnego względem grup tiolowych odczynnika - bromku 1-benzyl-2-chloropirydyniowego (BBCP).

Procedura przygotowania próbki do analizy obejmowała ekstrakcję cieczy-ciecz (LLE) z wykorzystaniem chloroformu, reekstrakcję (re-LLE) analitu kwasem solnym, odparowanie próbki do sucha, przeprowadzenie derywatyzacji oraz odbiałczanie. Przygotowanie próbek moczu oparłam częściowo na wcześniej opublikowanej metodzie, wprowadzając do niej niezbędne modyfikacje [57]. LLE stanowiła kluczowy etap opracowanej procedury, umożliwiający oddzielenie HTL od pozostałych składników moczu oraz małowcząsteczkowych związków siarki, w szczególności różnych form Hcy. Jak wykazano w literaturze, wydajność LLE HTL jest ściśle związana z pH środowiska, dlatego istotnym elementem badań było jego odpowiednie dostosowanie w celu zminimalizowania strat analitu. Regulację pH próbek moczu prowadziłam za pomocą 0,2 mol/l dwusadowego fosforanu sodu. Stwierdziłam, że minimalny wymagany stosunek objętościowy, dzięki któremu badane próbki moczu ostatecznie uzyskiwały pH w zakresie 7,1-7,9, niezależnie od wyjściowego pH, wynosił 2:1 (mocz : roztwór fosforanu sodu, v/v). Kolejnym istotnym etapem była możliwie jak najszybsza LLE HTL ze względu na jego ograniczoną stabilność nawet w lekko zasadowym środowisku. Warunki LLE oraz re-LLE zostały zaadaptowane z wcześniej opisanych metod [57]. Co ważne, podejmowałam próby uproszczenia procedury przygotowania próbki poprzez jednoczesne przeprowadzenie etapów re-LLE i derywatyzacji, jednak uzyskane wyniki były niezadowalające. Wykazałam, że odczynnik derywatyzujący BBCP ulega częściowemu przeniesieniu z fazy wodnej do fazy organicznej, co też jednoznacznie potwierdziło konieczność przeprowadzania re-LLE HTL z wykorzystaniem kwasu solnego. W celu ograniczenia rozcieńczenia próbki, zdecydowałam się odparowywać ekstrakty do sucha przed przeprowadzeniem reakcji derywatyzacji. Usunięcie nadmiaru kwasu solnego z próbek okazało się kluczowe również z punktu widzenia równowagi reakcji (reguła Le Chateliera-Brauna), ponieważ jego obecność jako produktu reakcji pomiędzy pochodną Hcy a BBCP może obniżać wydajność procesu derywatyzacji. Odparowanie ekstraktów moczu prowadziłam w fiolkach szklanych w termostacie blokowym. W ramach optymalizacji tego etapu oceniłam wpływ temperatury oraz czasu odparowania na odzysk analitu. Najbardziej satysfakcjonujące wyniki uzyskałam przy wykorzystaniu temperatury 110°C w czasie 15 minut.

W badaniach wykazałam, że BBP reaguje efektywnie w ciągu 5-15 minut ze związkami tiolowymi w pH w zakresie 7,0-11,0, prowadząc do powstawania odpowiednich pochodnych wykazujących absorpcję promieniowania z zakresu ultrafioletu. Jak wskazano wcześniej, kluczowym elementem przyjętej koncepcji badań była zasadowa hydroliza pierścienia HTL, dlatego jednym z optymalizowanych parametrów było pH środowiska reakcji. Podczas badań stwierdziłam, że szybkość rozkładu HTL zależy od pH, jednak nie wpływa to istotnie na wysoką wydajność samego procesu derywatyzacji. Z praktycznego punktu widzenia wybrałam bufor fosforanowy o pH 11,0, co umożliwiło łatwiejszą kontrolę przebiegu reakcji oraz uzyskanie powtarzalnych wyników. W przypadku oznaczeń HTL w moczu, gdzie jego spodziewana zawartość jest niewielka, dążyłam do ograniczenia nadmiernego rozcieńczania próbki. Kluczowe było zatem dobranie minimalnej objętości odczynników dodawanych do suchych ekstraktów, zapewniającej jednocześnie skuteczne rozpuszczenie pozostałości. Optymalizacji poddałam również inne kluczowe dla derywatyzacji parametry takie jak nadmiar BBP względem analitu, czas reakcji oraz temperatura i sposób mieszania próbek. Wykazałam, że temperatura nie wpływa istotnie na wyniki analizy, natomiast wyższy odzysk analitu oraz lepszą powtarzalność i odtwarzalność uzyskiwano w przypadku wytrząsania próbek. Ostatnim etapem przygotowania próbki było jej zakwaszenie. Zgodnie z danymi literaturowymi, pochodne tiol-BBCP wykazują zwiększoną stabilność w kwaśnym środowisku, dlatego w celu zwiększenia trwałości otrzymanego produktu zastosowałam zakwaszenie przy użyciu kwasu chlorowego(VII) (PCA). Dodatkowo etap ten prowadzi do zatrzymania reakcji derywatyzacji oraz strącenia ewentualnych, pozostałych w próbce białek.

Przedstawiona metoda oznaczania HTL w moczu obejmuje rozdzielenie pochodnej Hcy oraz BBP z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC), a następnie detekcję z wykorzystaniem detektora spektrofotometrycznego. Efektywne rozdzielenie pochodnej od pozostałych składników matrycy uzyskałam poprzez zastosowanie elucji gradientowej przy natężeniu przepływu fazy ruchomej wynoszącym 1 ml/min. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu oraz wody zawierającej 0,1% kwasu octowego. Zastosowałam klasyczną, często wykorzystywaną w oznaczeniach pochodnych małocząsteczkowych tioli, kolumnę typu ZORBAX SB-C18.

Opracowana metoda, podobnie jak w przypadku [D3], została poddana pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi dotyczącymi metod bioanalitycznych [64] oraz analizie pod kątem tzw. „zieloności”. Zwalidowaną metodę zastosowałam do analizy osiemnastu próbek moczu pochodzących od tzw. pozornie zdrowych dawców. Uzyskane wyniki dotyczące zawartości HTL skorygowałam względem stężenia kreatyniny. W celu ułatwienia interpretacji danych oznaczyłam również całkowite stężenia Hcy, Cys, Cys-Gly oraz GSH w badanych próbkach. Oszacowane stężenia HTL mieściły się w zakresie 0,0367-0,6931 $\mu\text{mol/l}$ moczu i były zbliżone do opublikowanych wcześniej danych.

W publikacji opisałam pierwszą metodę ilościowego oznaczania HTL w moczu człowieka z wykorzystaniem techniki HPLC-UV. Uzyskane wyniki wskazują również, że zastosowanie BBP w analizie związków tiolowych może zostać rozszerzone również na wewnątrzcząsteczkowe tioestry. Opracowana metoda może znaleźć praktyczne zastosowanie w diagnostycznej analizie próbek moczu na zawartość HTL, co umożliwi badanie dużych populacji pacjentów oraz przyczyni się do pogłębienia wiedzy na temat roli HTL w fizjologii i patologii organizmu człowieka.



OPEN

First HPLC-UV method for the determination of homocysteine thiolactone in human urine after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide

Marta Gawel^{1,2}, Rafał Głowacki¹ & Justyna Piechocka¹✉

The report presents first high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection (HPLC-UV) based method for the determination of homocysteine thiolactone (HTL) in human urine. Sample preparation procedure chiefly involves chloroform liquid-liquid extraction of HTL and its re-extraction with hydrochloric acid, followed by evaporation to dryness and treatment of the residue with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide and perchloric acid. The chromatographic separation of obtained UV-absorbing 2-*S*-pyridinium derivative is achieved within 6 min at 25 °C on Zorbax SB-C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm) column using gradient elution. The eluent consists of 0.1% acetic acid in a mixture with acetonitrile delivered at a flow rate of 1 mL/min. The analyte is quantified by monitoring at 316 nm. The assay linearity was observed within 0.1–1.0 μmol/L in urine. The limit of quantification was found to be 100 nmol/L. The accuracy ranged from 92.56 to 112.51% and 92.56–114.31%, while precision varied from 5.89 to 11.27% and 3.85–14.25% for intra- and inter-assay measurements, respectively. The method was successfully applied to urine samples delivered by apparently healthy donors. The presence of HTL was confirmed in twelve of eighteen study samples. The HTL concentration ranged from 36.67 to 693.12 nmol/L.

Keywords Homocysteine Thiolactone, Liquid-liquid extraction, Reversed phase liquid chromatography, Ultraviolet detection, Urine, 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide

Abbreviations

ACN	acetonitrile
BBCP	1-benzyl-2-chloropyridinium bromide
CE	capillary electrophoresis
CMLT	2-chloro-1-methylpyridinium tetrafluoroborate
Crn	creatinine
Cys	cysteine
Cys ₂	cystine
Cys-Gly	cysteinyl-glycine
CV	coefficient of variation
ELSD	light scattering detector
FLD	fluorescence detector
GC	gas chromatography
Glu	glutathione
Glu ₂	oxidized glutathione
Hcy	homocysteine
Hcy-BBCP	2- <i>S</i> -pyridinium derivative of homocysteine
Hcy ₂	homocystine
HPLC	high performance liquid chromatography

¹Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, University of Lodz, 163/165 Pomorska Str, Łódź 90-236, Poland. ²Doctoral School of Exact and Natural Sciences, University of Lodz, 12/16 Banacha Str, Łódź 90-237, Poland. ✉email: justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl

HTL	homocysteine thiolactone
LA	lipoic acid
LLE	liquid-liquid extraction
LLys	lipoyllysine
(MS)/MS	(tandem) mass spectrometry
NAC	N-acetylcysteine
OPA	o-phthalaldehyde
PBS	phosphate buffer
PCA	perchloric acid
PP	polypropylene
RP	reversed phase
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
ULOQ	upper limit of quantification
UV	ultraviolet detection

Homocysteine thiolactone (HTL) is an intramolecular thioester of homocysteine (Hcy) which is recognized to be a cytotoxic metabolite of protein-related Hcy metabolism. Lately, it has been suggested that HTL can be mechanistically involved in cardiovascular diseases due to its chemical reactivity and the ability to modify protein lysine residues^{1–4}. In a recent prospective studies with a large cohort of coronary artery disease individuals⁵ and stroke patients⁶, it has been found that elevated urinary HTL is a risk predictor of incident acute myocardial infarction as well as increases the risk of ischemic stroke by promoting unfavorable fibrin clot properties. These findings highlight the necessity for development of a new assays to make further studies of HTL easier in health and disease as its role in humans is not sufficiently examined.

So far, a number of methods have been developed enabling determination of HTL in human urine, plasma and saliva^{7,8}, while analysis of urine is currently of the greatest diagnostic importance^{1,7}. Among several separation techniques, high performance liquid chromatography (HPLC)^{8–11}, capillary electrophoresis (CE)^{12–14} and gas chromatography (GC)^{15,16} coupled with ultraviolet (UV)^{12–14}, fluorescence (FLD)^{9–11} and (tandem) mass spectrometry detection (MS)/MS^{8,15,16} were used to quantitate HTL in urine. In particular, the methods rely on urine sample purification by liquid-liquid extraction (LLE)^{8,10,12,15,16}, single drop microextraction^{13,14} and solid phase extraction^{9,11}. In addition, some of the assays involve the determination of HTL after on-column or post-column derivatization with o-phthalaldehyde (OPA)^{9–11}, while the other approaches employ pre-column derivatization of HTL with N-trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide¹⁵ and isobutyl chloroformate¹⁶. In the case of CE-UV^{12–14} and HPLC-MS/MS⁸ assays, derivatization was not needed to produce signal of the analyte.

Up to date, methods allowing the determination of urinary HTL by HPLC-UV are not available, despite the fact that it is the most commonly used analytical technique in the bioanalysis. Thus, our aim was to provide method for the determination of HTL in human urine by HPLC-UV. Such approach will make possible to widespread use of delivered assay in worldwide laboratories and it should facilitate further studies exploring the role of HTL.

Materials and methods

Reagents and materials

In this study, commercially available chemicals and at least of analytical reagent grade were used. Trisodium phosphate, sodium phosphate dibasic heptahydrate, sodium phosphate monobasic monohydrate, HTL hydrochloride, creatinine (Crn), tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), cysteinyl-glycine (Cys-Gly), symmetrical disulfides of particular aminothiols, namely homocystine (Hcy₂), cystine (Cys₂) and oxidized glutathione (Glu₂), HPLC-gradient grade acetonitrile (ACN), ethanol and methanol, GC-grade chloroform, and acetic acid were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydrochloric acid and perchloric acid (PCA) were from J.T. Baker (Deventer, Netherlands). 1-Benzyl-2-chloropyridinium bromide (BBCP) and 2-chloro-1-methyllepidinium tetrafluoroborate (CMLT) were prepared in our laboratory as previously described^{17,18}. Ultrapure deionized water was produced in our laboratory.

Instrumentation

In relation to HTL assay, an Agilent 1220 Infinity HPLC system equipped with a binary pump integrated with a two-channel vacuum degasser, autosampler, temperature-controlled column compartment and UV detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used. Instrument control, data acquisition and analysis were performed using an OpenLAB CDS software. The analyte was separated on ZORBAX SB-C18 (150 × 4.6 mm, 5.0 μm) column from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).

Regarding to the Crn and total Hcy, Cys-Gly, glutathione (Glu) and cysteine (Cys) determination, HPLC analyses were carried out using an Agilent 1220 Infinity HPLC system equipped with a binary pump integrated with two-channel degasser, autosampler, column oven, evaporative light scattering detector (ELSD) 1260 Infinity II series and UV detector. Instrument control, data acquisition and analysis were carried out using OpenLAB CDS ChemStation software. Crn was separated on Poroshell 120 SB-C18 (75 × 4.6 mm, 2.7 μm) column from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), while Hcy, Cys-Gly, Glu and Cys were separated on Aeris PEPTIDE XB-C18 (150 × 4.6 mm, 3.6 μm) column from Phenomenex (Torrance, CA, USA).

For sample shaking, MSC-100 thermo-shaker (Allsheng Instruments Co., Ltd., Hangzhou, China) and Multi-Speed Vortex MSV-3500 (Biosan, Riga, Latvia) were used. During the study, QBD2 dry-block thermostat (Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK), a Mikro 220R centrifuge with fast cool function (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany), and a FiveEasy F-20 pH-meter (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) were also used. For absorbance measurements, the UV-1900 spectrophotometer with the UVProbe software (Shimadzu, Kyoto,

Japan) was employed. Samples were stored in an ultra-low-temperature freezer (Panasonic Healthcare Co., Ltd., Sakata, Japan). Water was purified using a Direct-Q 3 UV water purification system (Millipore, Vienna, Austria).

Stock solutions

All solutions were prepared with the use of ultrapure deionized water.

The stock solutions of 0.1 mol/L HTL, Cys₂, Hcy₂, Glu₂, Cys-Gly were prepared by dissolving an appropriate amount of solid substance in hydrochloric acid (0.5 mol/L), while stock solution of 0.15 mol/L Crn was prepared in water. The solutions were kept at 4 °C for no longer than 7 days without noticeable change in their content as recommended in the literature^{8,19,20}. The solutions were stored in polypropylene (PP) microcentrifuge tubes. Their working solutions were prepared daily by diluting a standard solution with water as needed and processed without delay.

The stock solution of 0.1 mol/L BBCP and 0.1 mol/L CMLT were prepared by dissolving an appropriate amount of substance in water. The solution of BBCP was stored in tight glass flasks at 4 °C for no longer than 1 month (Figure S1 a). The working solution of 4.0 mmol/L BBCP was prepared daily by diluting a standard solution with 0.2 mol/L phosphate buffer (PBS) at pH 11.0 as needed and processed without delay (Figure S1 b).

The stock solution of 0.2 mol/L PBS buffer at pH 11.0 and pH 7.8 were prepared by dissolving an appropriate amount of trisodium phosphate in water, and then adjusting the pH with an appropriate volume of 0.2 mol/L water solution of sodium phosphate monobasic. The PBS buffers were prepared once a week and stored in tight glass bottle at room temperature.

The stock solution of 0.2 mol/L sodium phosphate dibasic (pH ~8.8) was prepared by dissolving an appropriate amount of solid in water. The solution was stored in tight glass flasks at ambient temperature for no longer 1 week.

The stock solution of TCEP (0.25 mol/L) was prepared by dissolving an appropriate amount of TCEP powder in deionized water as needed and processed without delay. The solution was stored in PP tube at room temperature.

The mobile phase component consisting of 0.1% acetic acid or 0.5% acetic acid was prepared by diluting glacial acetic acid with water. The solution was prepared once a week and stored in tight amber glass bottle at room temperature.

The other solutions, including PCA (3.0 mol/L) and hydrochloric acid (0.5 mol/L, 0.05 mol/L) were prepared by dilution of a particular standard solution with water. All of these solutions were stored in tight glass flasks at ambient temperature for no longer than 1 month.

Biological samples collection

First, early morning urine samples (about 5 mL) were collected from individuals after overnight fasting using standard method²¹. Samples of urine “mid-stream” were obtained by asking donors to put fluid into a sterile container. Then, samples were cooled on ice and delivered to the laboratory within 3 h after collection. Samples were processed without delay using the procedures described in Sect. 2.5 and Sect. 2.6. In addition, obtained results for urinary HTL content were adjusted for Crn which was assayed by our HPLC-ELSD method¹⁹. The urine samples were also analyzed for total Hcy, Cys-Gly, Glu and Cys by our HPLC-UV method²⁰.

A group of eighteen apparently healthy anonymous individuals was involved in the study. The control subjects, belonging to an ethnically homogeneous group, were neither supplemented with the analyte before sample collection, or its precursors. In addition, no medications were allowed. All subjects involved in the study have also declared that, to the best of their knowledge, none of them suffer from any disease.

Urine sample preparation

The urine sample was partially prepared according to previously published and slightly modified method⁸. Urine (250 µL) was mixed with 125 µL of 0.2 mol/L sodium phosphate dibasic in 2 mL PP microtube. In the next step, the analyte was extracted by shaking using microtube shaking incubator at 1500 rpm for 1 min at 25 °C with 1500 µL of chloroform. Thereafter, the resulting mixture was centrifuged (12,000g, 25 °C, 1 min) and the bottom layer (1300 µL) was transferred into a 2 mL PP microtube. Then, 120 µL of 0.05 mol/L hydrochloric acid was added to the mixture. After shaking at 1500 rpm for 3 min at 25 °C, the upper layer (100 µL) was transferred to a first hydrolytic class glass vial and dried in dry-block thermostat (110 °C, ~15 min). After cooling down (~5 min), the residue was treated with 50 µL of 4.0 mmol/L BBCP in 0.2 mol/L PBS buffer, pH 11.0. After vortexing at 1500 rpm for 15 min at 25 °C, the reaction mixture was treated with 10 µL of 3.0 mol/L PCA. A 10 µL aliquot of the resulting solution was injected onto reversed phase (RP) column. Each sample was analyzed according to the procedure described in Sect. 2.6.

Chromatographic conditions

Urine samples were analyzed using slightly modified method^{22–25}. The chromatographic separations were performed on ZORBAX SB-C18 (150 × 4.6 mm, 5.0 µm) column at room temperature using linear gradient elution (0–3.5 min, 10–50% B; 3.5–5.0 min, 50–10% B; 5.0–6.0 min, 10% B) with the mobile phase consisted of 0.1% acetic acid (solvent A) and ACN (solvent B), delivered at the flow rate of 1 mL/min. The column was re-equilibrated between analyses by setting the post-run conditioning at 10% B for 0.5 min. The effluent was monitored with UV detector at 316 nm with the bandwidth of 4 nm using 390 nm ± 20 nm as a reference wavelength.

Results and discussion

The article presents the first HPLC-UV based method that allows quantification of urinary HTL. The following (sub)sections of the report provide all necessary information on the development, validation, and in-study use of the proposed herein assay.

Sample preparation

Sample processing involves two crucial steps, namely separation of HTL from the other urine sample constituents, and derivatization of HTL followed by HPLC-UV analysis. In general, these steps are typical for HTL assays⁷. Sample preparation procedure primarily involves (1) chloroform LLE of HTL and re-LLE of the analyte with diluted hydrochloric acid to separate HTL from low molecular-weight thiols present in urine^{26,27}, in particular Hcy species; (2) drying sample under elevated temperature to remove an excess of acid; (3) treatment of the residue with BBP under alkaline conditions followed by sample acidification with PCA to enhance UV detectability and terminate the derivatization reaction, respectively. Then, HTL-delivered Hcy in the form of 2-S-pyridinium derivative (Hcy-BBCP) is quantified by HPLC-UV assay. The presented herein sample preparation procedure was partially based on HPLC-MS/MS and HPLC-FLD assays by Piechocka and Glowacki⁸. We have found out that some characteristics of the above-mentioned approach can be adopted in terms of urine samples purification.

Preliminary considerations

The normal urine pH range is between 4.5 and 8.0, while the most common value for urine pH is 5.5–7.0 according to the American Association for Clinical Chemistry. Because it was established by Piechocka and Glowacki⁸ that the efficiency of HTL extraction is dependent on medium pH, a pH adjustment of the sample has become required to minimize its contribution to the recovery losses in this method. As demonstrated previously⁸, sample pH greater than 7.0 were of analytical value given that dissociation constant of HTL equals to 6.66^{7,8}. In order to counteract excessive sample dilution, 0.2 mol/L sodium phosphate dibasic was chosen to adjust the sample pH^{10–12}. It was found that minimum ratio of 2:1 by volumes, urine to 0.2 mol/L sodium phosphate dibasic is needed to gain a pH for the mixture in the range of 7.1–7.9, regardless of its source and pH of normal urine sample ranging from 4.5 to 7.0. As it has been described in the next sections of the paper, the best results were achieved when 250 µL of urine was mixed with 125 µL of 0.2 mol/L sodium phosphate dibasic and subjected to LLE step without delay due to limited stability of HTL under even slightly alkaline conditions^{7,8}. The LLE and re-LLE processes were proceeded with chloroform (1500 µL) and diluted hydrochloric acid (0.05 mol/L, 120 µL) respectively, as previously described⁸. The concentration of hydrochloric acid tested in the 0.005–0.1 mol/L range, did not affect operational efficiency.

Interestingly, in an attempt to simplify the sample preparation process, some efforts have been made toward integration of re-LLE and derivatization steps. For this purpose, HTL was re-LLE from chloroform with 4.0 mmol/L BBP in 0.2 mol/L PBS buffer, pH 11.0 by vortexing at 1500 rpm for 15 min at 25 °C as described in Sect. 2.5. Unfortunately, the outcome of the process was disappointing. It has been recognized that BBP is transferred from aqueous layer to organic phase. As little as 1.17% of initial concentration of the reagent was found in derivatization mixture after 15 min vortexing indicating that re-LLE has to be performed with 0.05 mol/L hydrochloric acid.

Sample enrichment

In order to counteract sample dilution, extracts (100 µL) were dried before the subsequent chemical derivatization step. Importantly, the removal of the excess of hydrochloric acid from the samples was found to be essential taking into account Le Chatelier's principle. Hydrochloric acid is a product from chemical reaction of HTL-delivered Hcy and BBP (Fig. 1 b), and its excess could affect the outcome of the derivatization reaction. During the study, it has been recognized that the registered Hcy-BBCP peak area was approximately 10-times lower when even trace amounts of hydrochloric acid were present in the sample in comparison with reference values. In the presented study, extracts were thus placed in first hydrolytic class glass vials as recommended elsewhere²⁸, and evaporated using dry-block thermostat. Then, the impact of evaporation temperature and time on the analyte-delivered signal intensity was evaluated. The reduction of time from 15 to 6 min, needed for solvent removal from samples, was observed in parallel with temperature rise from 110 to 130 °C. In addition, it has been recognized that duration of the process, tested up to 40 min, affected operational efficiency (Figure S2 a, Figure S2 b, Figure S2 c) regardless of excellent stability of HTL in the form of hydrochloride^{1,7}. The most satisfactory results were obtained when extracts were placed in dry-block thermostat set to 110 °C for at least 15 min and no longer than 20 min (Figure S2 a). Under set conditions, no more than 4.80% of the analyte was lost if compared with reference values.

Derivatization

The presented HPLC-UV method is based on the simultaneous decomposition of HTL and derivatization of HTL-delivered Hcy with the thiol-specific reagent, possessing an active halogen atom as a reactive moiety, namely BBP. In the case of HTL, derivatization might be considered useless at first glance as it is a UV-absorbing molecule^{1,7,12–14,29}. Based on thorough investigation of literature⁷, we have nonetheless concluded that chemical modification of the analyte is needed for enhancing UV detectability of HTL and improving its chromatographic behavior in RP-HPLC mode of separation.

Thus far, BBP has been demonstrated to be an effective derivatizing agent when determining captopril^{17,30}, N-acetylcysteine (NAC)³⁰, Cys^{31–33}, Cys-Gly^{31–33}, Glu^{32,33}, Hcy^{32,33}, lipoic acid (LA)^{22,23,33,34}, and lipoyllysine (LLys)^{24,25} and total thiols concentration³⁵ in pharmaceutical formulations³⁰, human plasma^{17,23,32,33}, urine^{22,24,31,34,35} and animal meat²⁵ by HPLC-UV^{17,22–25,30–33}, CE with UV detection³⁴ and spectrophotometry³⁵.

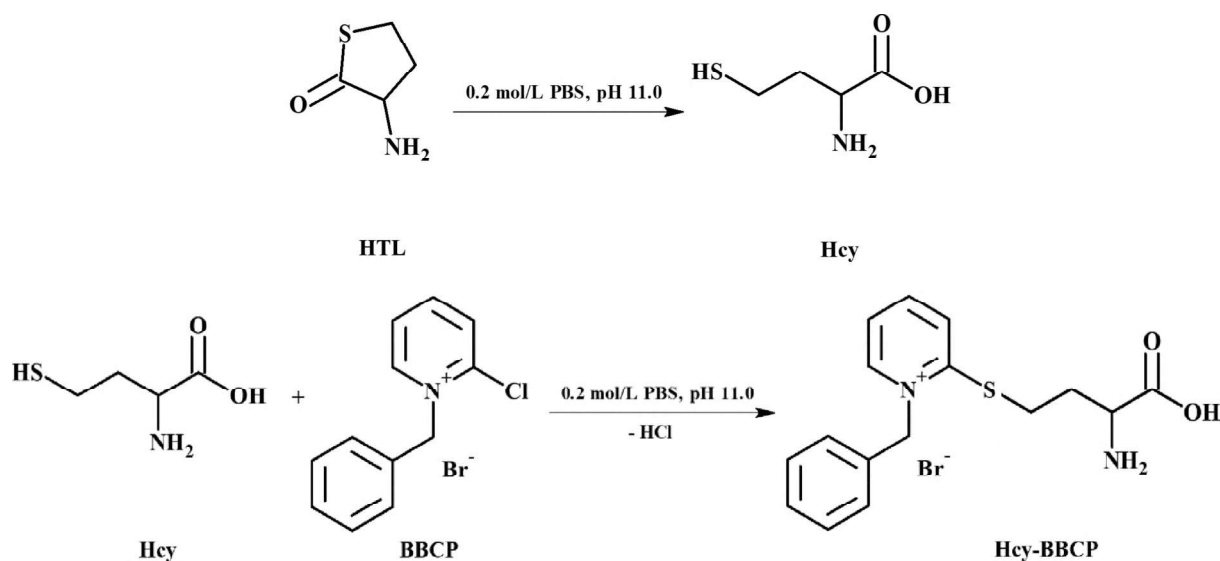


Fig. 1. The main research project objects. (a) The reaction equation of HTL hydrolysis providing Hcy. (b) The schematic representation of the reaction involved in the chemical derivatization of HTL-delivered Hcy with BBCP affording Hcy-BBCP derivative.

It has been shown that BBCP reacts efficiently in 5–15 min at room temperature with the above mentioned sulfur-containing compounds in alkaline solutions (pH for the reaction mixture in the range of 7.0–11.0) to give corresponding UV-absorbing 2-S-pyridinium derivatives, exhibiting absorption maximum wavelength at around 314–321 nm.

During the study, it has been found out that derivatization of HTL with BBCP also occurs under alkaline conditions, but it requires longer reaction time. The reaction results in production of UV-absorbing Hcy-BBCP derivative. It is also analytically important that the reaction is accompanied by bathochromic shift of absorption bands of the derivative compared with its precursors (Fig. 2 a, Fig. 2 b). In fact, it is a multi-step process in which the instability of the analyte under extremely alkaline conditions ($\text{pH} \geq 11.0$) is of key importance^{1,7}. Based on literature data^{1,7,32}, it has been concluded that HTL firstly undergoes an equilibrium ring opening resulting in Hcy release. Simultaneous with that process, halide leaving group of BBCP is displaced by highly nucleophilic thiol group of Hcy, and it leads to formation of a HTL-delivered Hcy-BBCP adduct and hydrochloric acid release (Fig. 1 a, Fig. 1 b). Thus far, the HTL susceptibility to alkaline hydrolysis has been used in methods employing OPA to form fluorescent derivative^{9–11,36–38}. As the presented assay utilizes the limited stability of HTL under extremely alkaline conditions at the stage of derivatization with BBCP for the first time, through studies have been thus performed in order to optimize the process.

In the beginning, the impact of the pH of the reaction medium on process efficiency was studied within the range of 11.0–13.0. In order to control the pH level, 0.2 mol/L PBS buffer was selected having high capacity and effective buffering range in the defined above regions of pH. It was recognized that the rate of HTL decomposition was dependent on the pH, but it did not have an impact on the high yields of the derivatization process (Figure S3). From the purely practical point of view, 0.2 mol/L PBS buffer at pH 11.0 was chosen as it was easier to control the course of the reaction and obtain reproducible results. For further experiments, the minimal volume of the solution (50 μL) was used to cover the extract residue and bottom of the vial in order to prevent excessive sample dilution.

Subsequently, other factors having an impact on derivatization reaction yield have been optimized, namely the quantity of BBCP, temperature and reaction time. It was found that temperature, tested in the range of 20–30 °C, does not effect it. Thus, the reaction course was examined at room temperature in the range of 0–180 min by applying BBCP solutions at different concentration levels, varied from 2 to 400 mmol/L, providing the concentration of BBCP in reaction mixture in the range of 0.09–18.18 mmol/L. At the same time, the stability of Hcy-BBCP derivative was assessed. The increase of the analyte-delivered peak area was observed in parallel with the concentration of BBCP rise from 0.09 to 1.82 mmol/L, and then there were generally no significant changes (Figure S4 a). Interestingly, we have also recognized that higher analyte recovery, better reproducibility and replicability of the process were achieved when samples were shaken instead of put aside. The progressive rise of the signal peak area was observed concomitant with shaking frequency rise from 300 rpm to the highest possible shaking frequency of 1500 rpm (Figure S4 c). Finally, for routine analysis, the extract residue was treated with 50 μL of 4.0 mmol/L BBCP in 0.2 mol/L PBS buffer, pH 11.0 and placed in vortex shaker set to 1500 rpm. A larger excess of BBCP was excluded as it was the source of additional baseline noises. Under set conditions, the reaction was finished in 15 min at ambient temperature with a high level of precision (Figure S4 b). An additional advantage was also good stability of the Hcy-BBCP derivative under alkaline conditions. As shown in Figure S4 b, it remains stable for the next 30 min making possible to prepare multiple samples not under time

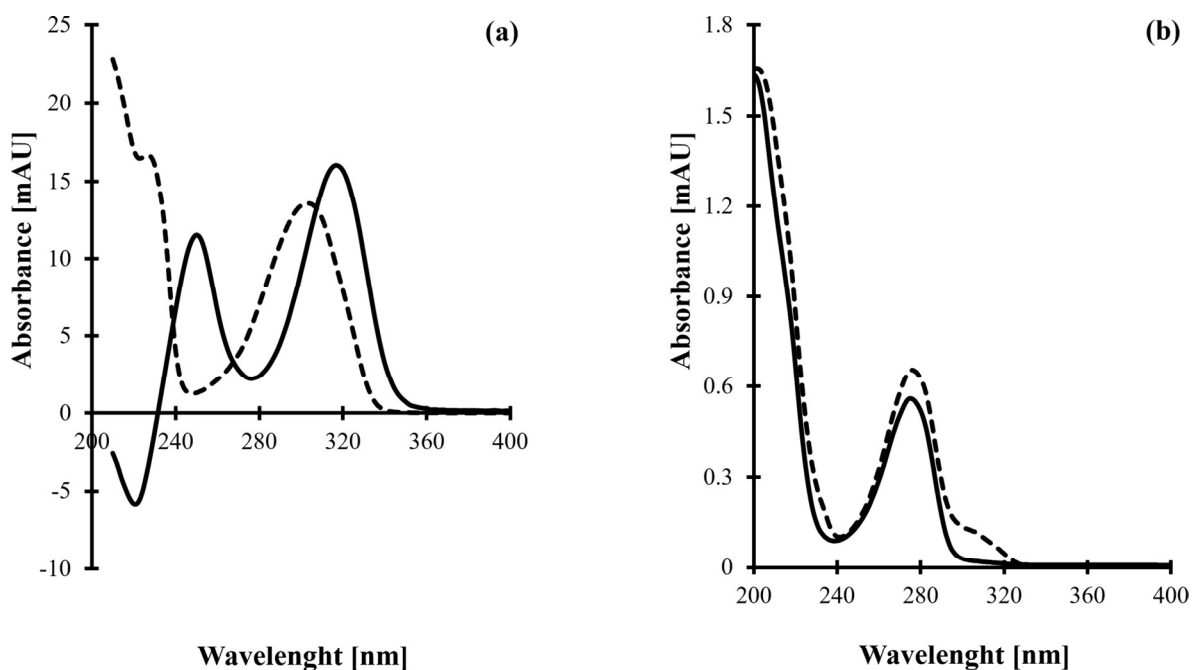


Fig. 2. (a) UV absorption spectrum of Hcy-BBCP derivative (solid line) and BBCP (dashed line) obtained by analyzing quality control sample assayed according to procedures described in Sect. 2.5 and Sect. 2.6. (b) UV absorption spectrum of BBCP obtained by analyzing its standard solution prepared in water (solid line) and 0.2 mol/L PBS buffer, pH 11.0 (dashed line) assayed using UV-1900 spectrophotometer.

regime. Nevertheless, it is recommended to acidify samples after completion of the derivatization reaction to prolong stability of the obtained product.

During the study, the stability of stock and working solutions of BBCP was also determined as we found that such data are not available in the literature. The stability of the reagent and derivatizing mixture was evaluated at 25 °C and 4 °C. In the stability experiments of stock solution of BBCP and derivatizing mixture were prepared in preselected time intervals across 1 month and assayed under described herein HPLC-UV conditions. In order to assess the total time that a processed sample can be treated with the derivatizing mixture, the solution containing 4.0 mmol/L BBCP in 0.2 mol/L PBS buffer, pH 11.0 was analyzed across one working day. It was recognized that the content of BBCP remains stable at any examined conditions in the tested period of time since a drop to 98.79% (Figure S1 a) and 99.63% (Figure S1 b) initial concentration was observed in relation to stock and working solutions of BBCP, respectively. It has been thus concluded that the stock solution of BBCP and derivatizing mixture can be prepared once per month and day, respectively without noticeable change in its content.

Sample acidification

According to literature data^{17,23,25,32}, 2-S-pyridinium derivatives of some low molecular-weight sulfur-containing compounds, including Hcy-BBCP derivative³², are stable under acidic conditions. In order to prolong stability of the obtained product, samples were acidified with 3.0 mol/L PCA as reported elsewhere^{22–25,31,32,34,35}. The process was also essential to terminate the derivatization reaction. Samples were acidified by mixing the sample with 3.0 mol/L PCA and minimum crashing at 5:1 ratio by volumes.

Stability of processed samples

The total time and conditions that a processed samples are kept until completion of analysis were evaluated as recommended in the literature³⁹. The stability of the Hcy-BBCP derivative was assessed at 25 °C and 4 °C. It was recognized that the sample remains stable at least 1 month, regardless the concentration of the analyte within the quantitation range and examined conditions. When study samples were left at 25 °C and 4 °C, the drop to 99.33% and 99.64% of the initial concentration was observed, respectively (Figure S5 a, Figure S5 b). The freeze-thaw stability test of processed samples has also shown that reliable and valid HPLC-UV data can be obtained when even five times thawed samples are analyzed (Figure S6) as the recovery of 99.88% was observed. These results agree with the literature data and support information that 2-S-pyridinium derivative of Cys, Glu, Hcy, Cys-Gly, LA, Llys and captopril are highly stable compounds under acidic conditions^{17,23,25,32}. The Hcy-BBCP derivative stability make possible to prepare a large batch of samples.

In overall, the research demonstrates that BBCP is suitable derivatizing agent for not only captopril¹⁷, Cys^{31–33}, Cys-Gly^{31–33}, Glu^{32,33}, Hcy^{32,33}, LA^{22,23,33,34} and Llys^{24,25}, but also HTL. Regarding HTL, this is a first piece of

data on this topic to the best of our knowledge. Moreover, human urine samples preparation procedure for HTL determination by HPLC-UV assay has been elaborated. It is also without analytical importance that Hcy-BBCP derivative exhibits an excellent stability under experimental conditions allowing to prepare a large batch of samples which contributes to the effort minimization. On the other hand, a serious limitation of the presented method is multistep sample preparation procedure. Overall sample preparation time of a set of twenty four samples was estimated to be around 60 min (~40 min per sample) (Fig. 3). The time of sample pretreatment is nevertheless longer in comparison with the latest HPLC-MS/MS and HPLC-FLD based method that requires no more than 15 min⁸. In relation to other urinary HTL assays, sample preparation time is comparable or even shorter⁷. Regarding to the presented method, the process consumes of 1805 μL of inexpensive chemicals per 250 μL sample and it is quite high when comparing to other assays. Detailed information on this topic can be found here⁷.

Chromatographic and detection conditions

The presented herein urinary HTL assay involves separation of the HTL-delivered Hcy and BBCP derivative with the use of RP-HPLC mode of separation followed by UV detection. A standard approach was employed to find optimal HPLC-UV conditions which provides the best method's performance.

Selection of separation conditions

Thus far, numerous methods for the determination of some low molecular-weight sulfur-containing compounds in the form of 2-S-pyridinium derivatives have been elaborated^{17,22–25,30–35}. In particular, it has been demonstrated that RP-HPLC coupled with UV detection is suitable for this purpose^{17,22–25,30–33}. In these methods, the chromatographic separations were accomplished at room temperature^{22–25,31–33} or elevated temperature (45–50 °C)^{17,30} using isocratic^{17,30} or linear gradient elution^{22–25,31–33} under acidic conditions (pH for the mobile phase in the range of 2.2–2.6). The corresponding 2-S-pyridinium derivatives were eluted with the mobile phase consisted of acetone^{17,30} or ACN^{22–25,31–33}, used as an organic mobile phase modifier, and 0.2 mol/L citrate buffer^{17,30}, 0.1 mol/L trichloroacetic acid^{31–33} or 2% acetic acid^{22–25}. In addition, it has been reported that an initial organic mobile phase modifier content no higher than 10% is essential to retain target compounds providing that chromatographic separations are performed with eluent at acidic pH, delivered at the flow rate of 1 mL/min at ambient temperature^{17,22–25,30–33}.

In the present study, initial experiments were performed according to the adopted approaches^{22–25} using ZORBAX SB-C18 column for RP separations as recommended elsewhere^{22–25,31–33}. In fact, efficient resolution

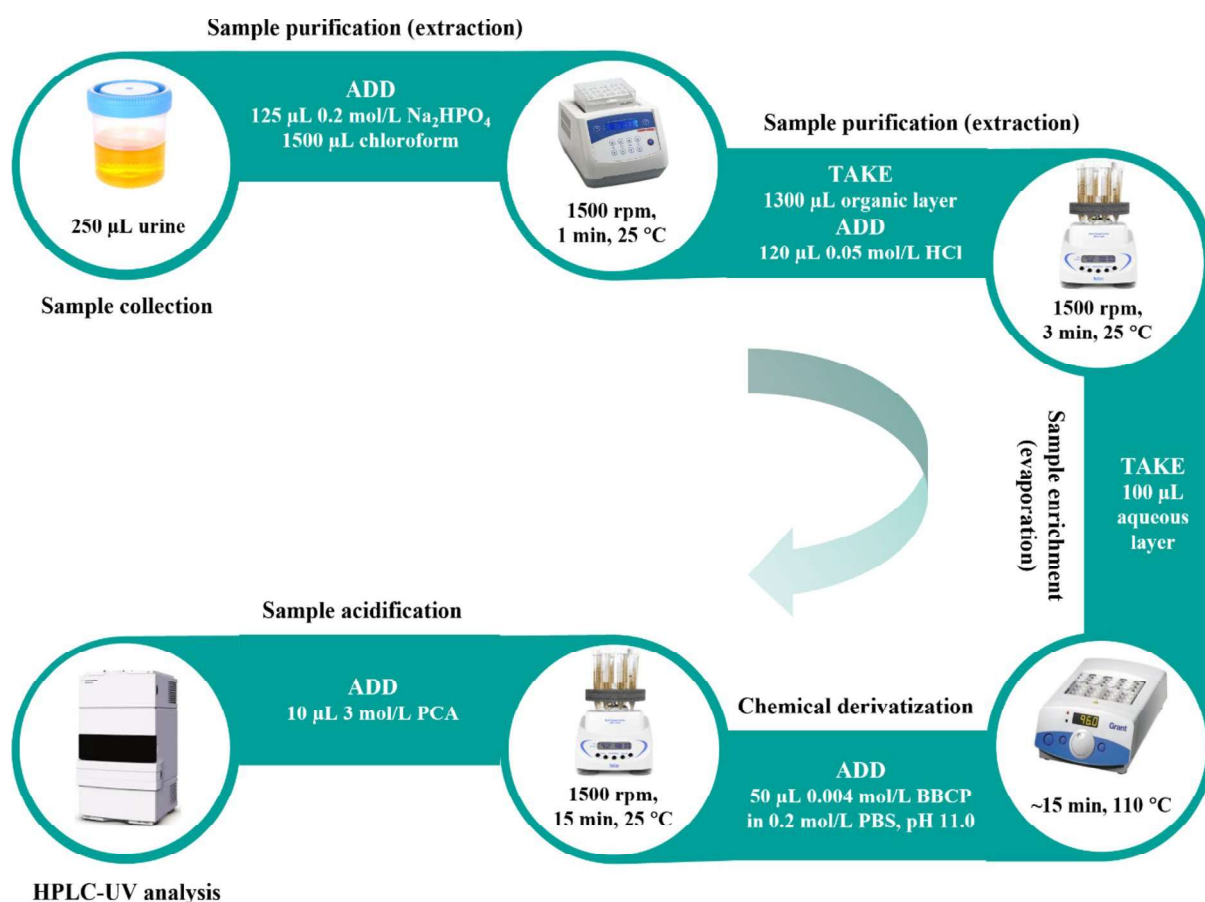


Fig. 3. The experimental procedure for HTL determination in human urine described in Sect. 2.5.

of Hcy-BBCP from the other sample components as well as proper equilibration of the chromatographic system between analyses in a relatively short analysis time were achieved by means of modifying run gradient profile as well as selecting a mixture of ACN and water with as little as 0.1% acetic acid (pH ~ 3.2) as mobile phase to decrease the eluent components environmental impacts. Under set conditions, the analyte was eluted within 3 min and its peak was easy to differentiate from the other responses on chromatogram (Fig. 4 and Figure S7). Each time the elution profile of blank samples was free from any interference at the retention time of the analyte. As these results were satisfactory in terms of retention of the compound of interest, its peak shape and resolution, separation conditions were not furtherly optimized. In general, the analysis time 6 min is longer than in other urinary HTL assays such as HPLC-FLD^{9,10}, GC-MS¹⁵ and CE-UV¹² where it is 3–5 min. In some cases, the duration of HPLC analysis is comparable⁸ or even more favorable than in other HPLC-FLD¹¹, GC-MS¹⁶ and CE-UV^{13,14} based methods, where it is 12 min¹¹, 15 min¹⁶ and 7–10 min^{13,14}, respectively.

Selection of detection conditions

During the study, it has been recognized that reaction of HTL with BBCP results in production of UV-absorbing Hcy-BBCP derivative, exhibiting absorption peak near 316 nm (Fig. 2 a). The target compound was thus quantified using 316 nm as it also allow to increase sensitivity and selectivity in trace analysis.

The identification and confirmation of the analyte delivered peak were conducted by analyzing the standard solution of HTL prepared and analyzed according to the procedures described in Sect. 2.5 and Sect. 2.6. Moreover, the Hcy-BBCP peak was evaluated for purity. For this purpose, the analyses were carried out with HPLC system coupled with UV detector set to collect time and spectral information throughout the entire chromatogram. Importantly, the same spectra were collected in different sections of the particular analyte peak, indicating its purity. The analyte-delivered peak disappearance after base hydrolysis before applying sample to the sample preparation procedure and HPLC analysis was also helpful in confirming HTL identity since the analyte is susceptible to hydrolysis^{1,7}.

Finally, the confirmation of the origin of analyte-delivered peak and quantification of HTL in urine samples were made by comparing of retention time and UV spectrum with the set of data obtained by analyzing an analytical standard of HTL.

Greenness assessment of the method

An AGREE - Analytical GREENness tool (version 0.5 beta)⁴⁰ was used to identify strong and weak points of the delivered method in terms of its environmental friendliness. Equal weights were set for all evaluated parameters. The below indicated assumptions have been made: procedure involves an external sample (pre)treatment with a reduced number of steps (principle 1); the volume of urine is 0.25 mL (principle 2); the analytical device is positioned off-line (principle 3); the number of distinctive analytical steps is five, including LLE and re-LLE of HTL, sample evaporation, chemical derivatization and sample acidification followed by HPLC-UV analysis (principle 4); the procedure is semi-automated and involves a miniaturized sample preparation methods (principle 5); derivatization step is required (principle 6); the total amount of waste is 18.16 (g and mL combined),

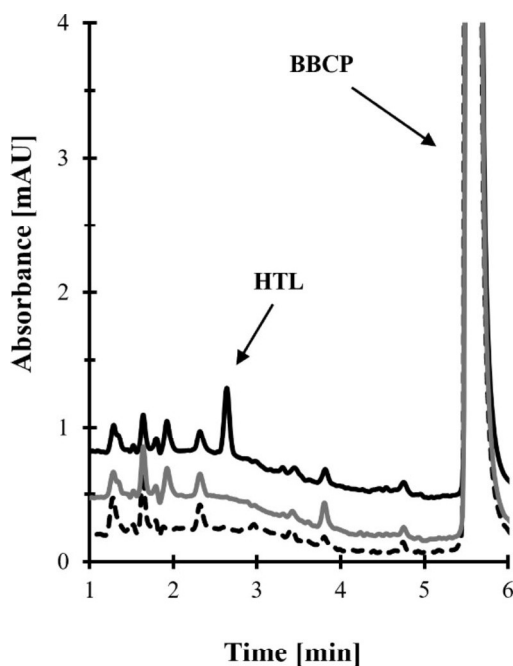


Fig. 4. Representative chromatograms of standard solutions and human urine prepared according to the procedure described in Sect. 2.5. Chromatographic conditions were as described in Sect. 2.6. Blank standard solution (black dashed line), blank human urine (grey line) and the same sample spiked with HTL (1 $\mu\text{mol/L}$ in urine) (black solid line). Under these conditions, the analyte-delivered signal appears at 2.63 min.

including sample itself, chemicals, and plastic disposable ware (principle 7); one analyte is determined in a single run, and the sample throughput is ten samples per hour (principle 8); the most demanding technique is HPLC-UV (principle 9); none of the reagents can be obtained from bio-based sources (principle 10); the procedure requires approximately 3.60 mL of toxic chemical reagents, including ACN and chloroform (principle 11); ACN is harmful and highly flammable, while chloroform is toxic and health hazard (principle 12). Acetic acid, PCA, and hydrochloric acid were not taken into account at the stage of assessing the operator's safety since their trace amounts were used. The overall score is 0.46 (Fig. 5).

As shown in Fig. 5, the attractiveness of the presented method relies on a opportunity of performing analysis on a small scale. Nevertheless, the process is accompanied by relatively high consumption of chemicals and laboratory disposable plastic ware. In addition, semi-automation of the analytical procedures allows for reduction of labor-intensity, maximization of sample throughput, improving accuracy and reproducibility of the assay. On the other hand, a serious limitation of the presented method is the need of performing analyses with the use of energy-intensive measurement technique and toxic chemicals. Simple but multistep sample preparation procedure as well as relatively low sample throughput potential represent an additional limitations. In overall, the presented herein assay falls into some principles of Green Analytical Chemistry⁴⁰.

Validation of the method

Full validation of the HPLC-UV method was conducted. Studies were conducted in accordance with the latest International Council for Harmonization harmonized guideline for bioanalytical methods validation³⁹. The same protocol was employed as described in detail in our previously published article concerning HPLC-MS/MS and HPLC-FLD assays for the analysis of urinary HTL⁸. The process involved assessment of selectivity and specificity, linearity, intra-/inter-assay precision and accuracy, limit of quantification (LOQ), matrix effect, carry-over, and reinjection reproducibility. Some parameters which can be checked among system suitability testing were also evaluated. The experiments were made using freshly laboratory-made pooled blank urine samples which were spiked with known quantities of HTL to prepare calibration standards.

System suitability

System suitability parameters including repeatability of chromatographic retention / peak area of the analyte, expressed as the coefficient of variation (CV) of retention time / peak area, symmetry factor, and number of theoretical plates were nominated during the method validation to determine instrument performance under optimized conditions. System suitability test calculations were performed as a part of linearity evaluation, and the calibration standards at the upper LOQ (ULOQ) were analyzed in ten replicate injections. The CV value of retention time and peak area was 0.095% and 0.22% respectively (acceptance criteria $\leq 1\%$), the mean symmetry factor was 1.06 (acceptance criteria 0.8–1.5), and number of theoretical plates was 16 229 (acceptance criteria ≥ 2000) for the analyte assayed by HPLC-UV method.

Selectivity and specificity

The selectivity of the method was assessed at first attempt during studies concerning the identification and confirmation of the origin of HTL-delivered peak as described in Sect. 3.2. Selectivity and specificity studies evaluated interferences originating from all (un)known components of study samples, in particular Cys, Glu, Hcy, Cys-Gly, LA, LLys and NAC which are present in normal urine specimens^{20,22,24,27,31,34} and known to give corresponding UV-absorbing 2-S-pyridinium derivatives^{17,22–25,30–34}. Importantly, the studies evaluated interferences originating from Hcy being the precursor/degradation product of HTL, although Hcy is not (re)-LLE under set conditions⁷. Several types of samples were assayed, including (1) blank standard solution, (2) standard solution of reduced/oxidized form of Cys, Glu, Hcy, Cys-Gly, LA, LLys, NAC, and HTL (if applicable), (3) blank urine samples from six control and (4) the same blank urine samples spiked with reduced/oxidized form of Cys, Glu, Hcy, Cys-Gly, LA, LLys, NAC, and HTL (if applicable). As shown in Fig. 4 and Figure S7, no significant response attributable to interfering components was observed at the retention time of Hcy-BBPC

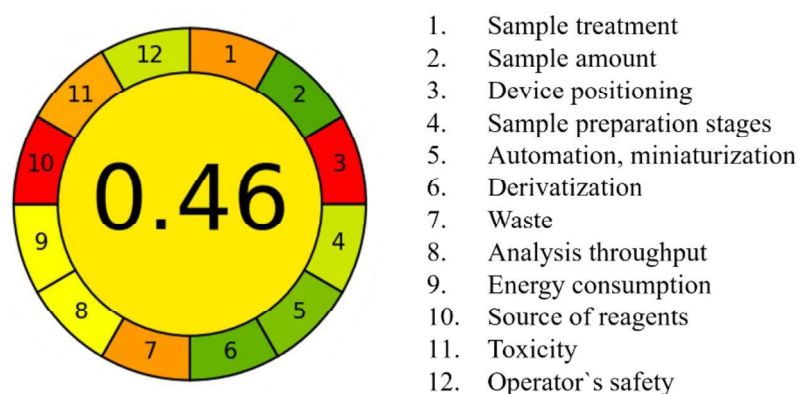


Fig. 5. The assessment results with AGREE analysis of procedure for the proposed HPLC-UV based method enabling determination of HTL in human urine.

Regression equation	R	Linear range (μmol/L)	Intra-assay precision (%)		Intra-assay accuracy (%)		LOQ (μmol/L)
			Min	Max	Min	Max	
$y = 4.2567x + 0.1150$	0.9980	0.1–1	5.89	11.27	92.56	112.51	0.1

Table 1. Validation data corresponding to intra-assay measurements ($n = 3$). *Abbreviations:* LOQ, limit of quantification; R, correlation coefficient.

Concentration (μmol/L)	Precision (%)		Accuracy (%)	
	Intra-assay	Intermediate	Intra-assay	Intermediate
0.10	11.27	14.25	92.56	113.36
0.25	8.28	11.55	112.51	114.31
0.50	5.89	3.85	110.29	99.07
1.0	6.61	5.94	101.35	100.34

Table 2. Precision and accuracy of the data ($n = 3$).

in the blank samples. Under these conditions, the reduced/oxidized form of Cys, Glu, Hcy, Cys-Gly, LA, Llys and NAC (if applicable) are not (re)-LLE under experimental conditions. In order to provide definite proof that the HPLC-UV assay can discriminate HTL in a complex mixture without interference from other sample components, a blank standard solution and a standard solution of reduced/oxidized form of Cys-Gly, Cys, Hcy, Glu, NAC, Llys and LA (if applicable) was assayed without applying sample, prepared according to the procedure described in Sect. 2.5, to the LLE and re-LLE processes. Under these conditions, the LA, Llys and oxidized form of Cys-Gly, Cys, Hcy, Glu, and NAC do not react with BBP, while their reduced forms give a corresponding 2-S-pyridinium derivative eluting at 2.24 min, 2.34 min, 2.63 min, 2.89 min, 3.45 min, respectively (Figure S7). The order of elution was as reported elsewhere²⁴. Peak purity tests also confirmed the ability of HPLC-UV method to differentiate and measure HTL in the presence of matrix components in urine samples.

Linearity

An external standard addition method was used to test the calibration range of 0.1–1 μmol/L in urine. Calibration curves consisting of blank sample and five calibrators at the level of 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 μmol/L were generated and were run in triplicate over 3 days. The concentrations of HTL in calibration standards were chosen taking into account the concentration range expected in real urine samples⁷. The concentration-response relationship (Hcy-BBPP peak area) was described using the least-squares regression model. The calibration standards fitted well into the linear regime within the intended quantification range, which gave correlation coefficient values of 0.9980. Substantial changes in the slope of any regression line obtained over 3 subsequent days were not detected denoting the absence of matrix effect. Detailed data on validation parameters, which were evaluated during the linearity assessment, are presented in Table 1.

Precision and accuracy

The intra- and inter-day accuracy and precision of the assay were assessed during linearity evaluation. The precision was expressed as CV of measurement repeatability. Accuracy was shown as the percentage of analyte recovery. The accuracy was calculated by expressing the mean measured amount as a percentage of added amount of HTL (nominal concentration). The accuracy varied from 92.56 to 112.51% and 92.56–114.31% for intra- and inter-day measurements, respectively. In parallel, the precision ranged from 5.89 to 11.27% and 3.85–14.25% for intra- and inter-day variations, respectively. Detailed data on precision and accuracy from the 3 day experiments are shown in Table 2.

The limit of quantification

The LOQ was calculated considering the parameters of the analytical curves performed for urine samples from six individual sources, pooled matrix and surrogate matrix (0.2 mol/L PBS buffer, pH 7.4) with the use of equation: $LOQ = 10 \times SD_a / b$, where SD_a is the standard deviation of the y-intercept of the calibration curve and b is the slope of the regression line. In addition, the LOQ was determined experimentally by the signal-to-noise method. For this purpose, a surrogate matrix was spiked with decreasing concentrations of HTL and samples were then handled according to the procedures described in Sect. 2.5 and Sect. 2.6 until the injected amount resulted in a peak 10-times as high as the baseline signal. The surrogate matrix was employed to assess the LOQ as the assay is not affected by matrix effects. The estimated LOQ value using two independent methods closely corresponded to each other and equals to 100 nmol/L in urine. As demonstrated upon validation, this concentration of HTL produced reproducible detector response with a precision and accuracy of 11.27% and 92.56%, respectively. The accepted LOQ value was similar or even better than that reported earlier concerning determination of urinary HTL by CE-UV^{12,14} and HPLC-FLD assays^{10,11} or higher than that obtained by GC-MS^{15,16}, HPLC-FLD⁹, CE-UV¹³, and HPLC-MS/MS methods⁸. However, the estimated LOQ value make possible the determination of HTL in human urine.

Carry-over effect

Carry-over evaluation was performed during the linearity assessment. For this purpose, blank standard solution samples were analyzed after the calibration standard at the ULOQ. Every time the response of blank samples was as high as background signal. This observation denoted the absence of carry-over effect. The registered chromatograms during carry-over effect evaluation were similar to the elution profile of blank samples presented in Fig. 4 and Figure S7.

Matrix effect

The matrix effect was assessed in a relevant population referring to a group of apparently healthy volunteers enrolled in the study. The matrix effect evaluation involved comparing calibration curves of the six individual sources of urine samples against a calibration curve of the pooled matrix and surrogate matrix (0.2 mol/L PBS buffer, pH 7.4). The CV of the slope of the regression lines did not deviate by more than 4.03% indicating the absence of any matrix effect. Since interpatient variability was not detected, an external standard addition method was employed to quantify the content of HTL in study samples.

Reinjection reproducibility

Reinjection reproducibility test calculations were conducted using the obtained data during evaluation of stability of processed samples since their excellent stability was demonstrated. In this way, the evaluation of reinjection reproducibility was conducted by analyzing the calibration standard(s) at the lower LOQ and ULOQ after keeping them at autosampler temperature (25 °C and 4 °C). In total, the samples were injected in 13 replicates across 1 month. Reinjection repeatability was expressed as CV of the Hcy-BBCP peak area. The CV value of the parameter did not exceed 0.67% demonstrating that reinjection of study samples can be made within 1 month as indicated during stability testing.

All in all, it has been demonstrated upon validation that all assessed validation parameters fall within acceptable tolerance limits³⁹ indicating that the performance of the new method is satisfactory. Based on the obtained results it was concluded that the presented method can be used in diagnostic testing of urine samples for HTL.

Application of the method

The HPLC-UV assay was used to determine HTL in human urine samples from presumably healthy donors. External standard addition method was used to establish the concentration of HTL in study samples. The content of HTL in urine samples was calculated using the mathematical formula corresponding to the equation of the particular calibration line generated on that occasion. Moreover, the obtained results for urinary HTL content were adjusted for Crn. In order to facilitate interpretation of the obtained results, urine samples were also assayed to determine total Hcy, Cys-Gly, Glu and Cys content. HTL was present in twelve of eighteen urine samples delivered by anonymous individuals. The estimated concentrations of HTL, based on data obtained by triplicate analysis of a particular sample from an individual source, varied from 0.0367 to 0.6931 $\mu\text{mol/L}$ in urine (2.08–85.13 $\mu\text{mol/mol}$ Crn) (Table 3). Importantly, these values were similar to those previously reported^{8,9,11,12,15,16}, denoting the data's reliability from the presented HPLC-UV assay.

Conclusions

The paper presents the first HPLC-UV method for quantification of HTL in human urine. Furthermore, the report provides evidence that the practical application of BBCP in sulfur-containing compounds analysis can be extended to intramolecular thioesters. The presented herein method's performance allows its use in diagnostic testing of urine samples for HTL. The use of common equipment in worldwide laboratories, which is known for its stability and low demand in terms of maintenance, represents an additional advantage. The presented method should facilitate studies exploring the role of HTL in health and disease.

Volunteer	Estimated concentration				
	HTL	Hcy	Cys	Glu	Cys-Gly
No.	($\mu\text{mol/mol Crn}$)	(mmol/mol Crn)			
1	9.37	2.55	37.19	0.06	0.94
2	0.00	0.97	13.67	0.13	0.44
3	5.83	0.93	14.99	0.14	0.73
4	4.20	0.63	14.37	0.05	0.48
5	0.00	0.42	10.61	0.07	0.65
6	7.70	0.62	14.61	0.07	0.61
7	0.00	1.33	28.05	0.23	1.09
8	68.02	1.07	23.66	0.11	1.32
9	85.13	0.61	15.68	0.24	0.91
10	5.32	1.21	15.44	0.03	0.60
11	2.08	0.72	12.54	0.06	0.42
12	6.60	0.84	8.95	0.09	0.46
13	0.00	0.40	14.18	0.20	0.69
14	2.37	0.35	11.51	0.15	0.66
15	7.84	1.24	23.37	0.14	1.23
16	0.00	0.46	14.18	0.06	0.60
17	0.00	0.61	11.68	0.15	0.66
18	9.05	0.97	19.50	0.40	1.34

Table 3. Estimated concentrations of low molecular-weight sulfur-containing compounds and Crn in human urine ($n = 18$), expressed as a mean value of the measured amount. *Abbreviations:* Crn, creatinine; Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; Glu, glutathione; Hcy, homocysteine; HTL, homocysteine thiolactone.

Data availability

Essential data is contained within the article and supplementary materials file. In addition, the dataset generated and analyzed during this study, which contributed to the article, can be made available by the corresponding author upon reasonable request as long as the request does not compromise intellectual property interests. Urine samples are not available from the authors.

Received: 7 January 2025; Accepted: 26 February 2025

Published online: 01 March 2025

References

- Jakubowski, H. & Glowacki, R. Chemical biology of homocysteine Thiolactone and related metabolites. *Adv. Clin. Chem.* **55**, 81–103 (2011).
- Jakubowski, H. *Homocysteine in Protein Structure/Function and Human Disease. Chemical Biology of Homocysteine-Containing Proteins* (Springer Vienna, 2013).
- Jakubowski, H. Homocysteine modification in protein structure/function and human disease. *Physiol. Rev.* **99**, 555–604 (2019).
- Perla-Kaján, J., Twardowski, T. & Jakubowski, H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids*. **32**, 561–572 (2007).
- Borowczyk, K. et al. Urinary excretion of homocysteine Thiolactone and the risk of acute myocardial infarction in coronary artery disease patients: the WENBIT trial. *J. Intern. Med.* **285**, 232–244 (2019).
- Sikora, M. et al. Homocysteine Thiolactone and other sulfur-containing amino acid metabolites are associated with fibrin clot properties and the risk of ischemic stroke. *Sci. Rep.* **14**, 11222, 1–13 (2024).
- Piechocka, J. & Glowacki, R. Up-to-date knowledge about analytical methods for homocysteine Thiolactone determination in biological samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **159**, 116906, 1–15 (2023).
- Piechocka, J. & Glowacki, R. Comprehensive studies on the development of HPLC-MS/MS and HPLC-FL based methods for routine determination of homocysteine Thiolactone in human urine. *Talanta* **272**, 125791, 1–13 (2024).
- Glowacki, R., Bald, E. & Jakubowski, H. An on-column derivatization method for the determination of homocysteine-thiolactone and protein N-linked homocysteine. *Amino Acids*. **41**, 187–194 (2011).
- Jakubowski, H. Quantification of urinary S- and N-homocysteinylation protein and homocysteine-thiolactone in mice. *Anal. Biochem.* **508**, 118–123 (2016).
- Chwatko, G. & Jakubowski, H. Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans. *Clin. Chem.* **51**, 408–415 (2005).
- Furmaniak, P., Kubalczuk, P. & Glowacki, R. Determination of homocysteine Thiolactone in urine by field amplified sample injection and sweeping MEKC method with UV detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **961**, 36–41 (2014).
- Purgat, K., Olejarz, P., Koška, I., Glowacki, R. & Kubalczuk, P. Determination of homocysteine Thiolactone in human urine by capillary zone electrophoresis and single drop Microextraction. *Anal. Biochem.* **596**, 113640, 1–6 (2020).
- Purgat, K., Koška, I. & Kubalczuk, P. The use of single drop Microextraction and field amplified sample injection for CZE determination of homocysteine Thiolactone in urine. *Molecules* **26**, 5687, 1–13 (2021).
- Piechocka, J., Wrońska, M., Chwatko, G., Jakubowski, H. & Glowacki, R. Quantification of homocysteine Thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **1149**, 122155, 1–7 (2020).
- Wrońska, M. et al. Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine Thiolactone in human urine. *J. Chromatogr. B.* **1099**, 18–24 (2018).

17. Bald, E., Sypniewski, S., Drzewoski, J. & Stepień, M. Application of 2-halopyridinium salts as ultraviolet derivatization reagents and solid-phase extraction for determination of Captopril in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **681**, 283–289 (1996).
18. Głowacki, R., Borowczyk, K. & Bald, E. Determination of Nε-homocysteinyl-lysine and γ-glutamylcysteine in plasma by liquid chromatography with UV-detection. *J. Anal. Chem.* **69**, 583–589 (2014).
19. Piechocka, J. et al. Application of the HPLC-ELSD technique for the determination of major metabolites of ibuprofen and creatinine in human urine. *Sci. Rep.* **13**, 20268, 1–14 (2023).
20. Stachniuk, J., Kubalczyk, P., Furmaniak, P. & Głowacki, R. A versatile method for analysis of saliva, plasma and urine for total thiols using HPLC with UV detection. *Talanta* **155**, 70–77 (2016).
21. González-Domínguez, R., González-Domínguez, Á. & Sayago, A. Fernández-Recamales, Á. Recommendations and best practices for standardizing the pre-analytical processing of blood and urine samples in metabolomics. *Metabolites* **10**, 229, 1–18 (2020).
22. Chwatko, G., Kubalczyk, P. & Bald, E. Determination of lipoic acid in the form of 2-S-pyridinium derivative by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Curr. Anal. Chem.* **10**, 320–325 (2014).
23. Chwatko, G. et al. Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Arab. J. Chem.* **12**, 4878–4886 (2019).
24. Kamińska, A., Głowacka, I. E., Pasternak, B., Głowacki, R. & Chwatko, G. The first method for determination of Lipoyllysine in human urine after oral lipoic acid supplementation. *Bioanalysis* **11**, 1359–1373 (2019).
25. Kamińska, A. & Chwatko, G. Estimation of Lipoyllysine content in meat and its antioxidative capacity. *J. Agric. Food Chem.* **68**, 10992–10999 (2020).
26. Kuśmerek, K., Chwatko, G., Głowacki, R. & Bald, E. Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* **877**, 3300–3308 (2009).
27. Głowacki, R., Piechocka, J., Bald, E. & Chwatko, G. Application of separation techniques in analytics of biologically relevant sulfur compounds. in *Handbook of Bioanalytics* (eds Buszewski, B. & Baranowska, I.) 233–256 (Springer Nature Switzerland, (2022)).
28. Piechocka, J. & Głowacki, R. One-pot sample Preparation procedure for the determination of protein N-linked homocysteine by HPLC-FLD based method. *J. Chromatogr. B* **1228**, 123835, 1–7 (2023).
29. Jakubowski, H. The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples. *Anal. Biochem.* **308**, 112–119 (2002).
30. Bald, E. & Sypniewski, S. Determination of thiol drugs in pharmaceutical formulations as their S-pyridinium derivatives by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* **358**, 554–555 (1997).
31. Kuśmerek, K. & Bald, E. Analysis of major urinary aminothiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Acta Chromatogr.* **21**, 411–420 (2009).
32. Kuśmerek, K. & Bald, E. Reversed-phase liquid chromatography method for the determination of total plasma thiols after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide. *Biomed. Chromatogr.* **23**, 770–775 (2009).
33. 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.* **21**, 1049, 1–15 (2020).
34. Kubalczyk, P. & Głowacki, R. Determination of lipoic acid in human urine by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **38**, 1800–1805 (2017).
35. Chwatko, G. Spectrophotometric method for the determination of total thiols in human urine. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **43**, 424–428 (2013).
36. Mukai, Y., Togawa, T., Suzuki, T., Ohata, K. & Tanabe, S. Determination of homocysteine Thiolactone and homocysteine in cell cultures using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* **767**, 263–268 (2002).
37. Tsiasioti, A., Zacharis, C. K. & Tzanavaras, P. D. Single-step hydrolysis and derivatization of homocysteine Thiolactone using zone fluidics: simultaneous analysis of mixtures with homocysteine following separation by fluorosurfactant-modified gold nanoparticles. *Molecules* **27** (2040), 1–9 (2022).
38. Chwatko, G. & Jakubowski, H. The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma. *Anal. Biochem.* **337**, 271–277 (2005).
39. ICH for. M10 Guideline for Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis. (2022).
40. Pena-Pereira, F., Wojnowski, W. & Tobiszewski, M. AGREE - Analytical greenness metric approach and software. *Anal. Chem.* **92**, 10076–10082 (2020).

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge all the volunteers from the Faculty of Chemistry, University of Lodz for the donation of urine samples. We also gratefully acknowledge Paul Ricque, an Erasmus+ student from ESCOM - School of Organic and Mineral Chemistry, Compiègne, France, for technical assistance.

Author contributions

M.G.: Investigation, Visualization. R.G.: Critical review, Resources, Funding. J.P.: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review and editing, Supervision, Project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors acknowledge the financial support in covering the costs from the University of Lodz (B2411100000234.01).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

CRedit authorship contribution statement

M.G.: Investigation, Visualization. R.G.: Critical review, Resources, Funding. J.P.: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review and editing, Supervision, Project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could

have appeared to influence the work reported in this paper.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the authors did not use generative AI and AI-assisted technologies.

Institutional review board statement

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University of Lodz (decision identification code 2/KEBN-UL/V/2022-23, date of approval 2 June 2023).

Informed consent statement

Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-025-92323-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2025

Publikacja [D5]:

M. Gaweł, R. Głowacki, J. Piechocka, Analysis of berry superfruits for reduced and total thiol content by LC-UV- based methods (*Food Chemistry*, w recenzji)

Racjonalne odżywianie się, a co za tym idzie dostarczenie do organizmu cennych składników odżywczych może przyczyniać się do ograniczenia częstotliwości zachorowania na choroby nowotworowe, neurodegeneracyjne czy układu krążenia. Rezerwuar cennych składników pokarmowych stanowią niewątpliwie owoce, wśród których szczególnie ważną grupę reprezentują tzw. superowoce, których właściwości prozdrowotne zostały dobrze udokumentowane. Są one bogate m.in. w witaminy, minerały oraz błonnik. W superowocach oznaczana jest szeroka gama związków bioaktywnych. Obecnie prowadzone badania koncentrują się w szczególności na monitorowaniu ich składu pod kątem zawartości substancji określanych mianem przeciwutleniaczy, chroniących organizm przed negatywnymi skutkami działania stresu oksydacyjnego. Jedną z grup naturalnych antyoksydantów stanowią małowartościowe związki siarki takie jak GSH, Hcy, Cys oraz Cys-Gly. Pomimo, że owoce jagodowe są powszechnie uznawane za żywność o właściwościach prozdrowotnych, dotychczas nie zostały one kompleksowo scharakteryzowane pod kątem pełnego spektrum istotnych fizjologicznie tioli. Dostępna literatura dostarcza jedynie fragmentarycznych danych dotyczących ich zawartości w owocach, co wskazuje na wyraźną lukę badawczą w charakterystyce chemicznej tych matryc. W niniejszej pracy przedstawiłam pierwszą metodę umożliwiającą oznaczanie zarówno form zredukowanych jak i całkowitej zawartości wybranych tioli w superowocach dostępnych na rynku polskim przy wykorzystaniu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV).

Przygotowanie próbek obejmowało kilka kluczowych etapów istotnych z punktu widzenia analizy związków tiolowych. Procedura obejmowała bowiem homogenizację próbki owocu, redukcję wiązań disiarczkowych (w przypadku oznaczania całkowitej zawartości tioli), derywatyzację oraz odbiałczanie. Z uwagi na fakt wykorzystywania w badaniach owoców bardzo zróżnicowanych, szczególnie pod kątem pH czy zawartości wody, jednym z niezbędnych elementów procedury było zastosowanie wzorca wewnętrznego, którym w niniejszej pracy była

N-acetylocysteina (NAC). Istotnym etapem przygotowania próbek stanowiła derywatyzacja tioli z wykorzystaniem selektywnego względem grupy tiolowej tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT). W celu uzyskania wysokiej wydajności reakcji konieczne było utrzymanie pH homogenatu w zakresie 6,5-8,0, który stanowi optymalne środowisko dla przebiegu reakcji derywatyzacji. Jako medium do homogenizacji spełniające powyższe warunki wybrałam 0,2 mol/l bufor fosforanowy o pH 9,0, dzięki któremu udało się zapewnić stabilność pH nawet przy bardzo zróżnicowanej puli owoców jagodowych. Dodatkowo, w celu uzyskania odpowiedniej rozdzielczości chromatograficznej oraz selektywności metody, stosunek masy próbki owocu do objętości rozpuszczalnika ustaliłam na poziomie 1:10 (m/v). Cały proces homogenizacji prowadziłam w warunkach chłodzenia na lodzie, co pozwalało na spowolnienie reakcji enzymatycznych odpowiedzialnych za degradację analitów. Potwierdziłam, że CMQT reaguje niemal natychmiast z oznaczanymi tiolami tworząc odpowiednie 2-S-chinoliniowe pochodne. W niniejszej pracy zoptymalizowałam stężenie CMQT oraz czas reakcji derywatyzacji. Badania kinetyczne wykazały, że reakcja kończyła się już po 1 minucie przy stężeniu CMQT wynoszącym 10 $\mu\text{mol/ml}$. W celu oznaczenia całkowitej zawartości tioli próbki poddawałam wcześniej redukcji wiązań disiarczkowych, co generowało wolne grupy tiolowe dostępne dla CMQT. Na podstawie danych literaturowych zdecydowałam się wykorzystać *tris*(2-karboksyetylo) fosfinę (TCEP) jako najbardziej odpowiednią do redukcji wiązań disiarczkowych. Optymalizacja procesu redukcji obejmowała dobór jej stężenia oraz czasu reakcji. W analizie rutynowej zastosowałam czas reakcji wynoszący 10 minut, mimo że pełna redukcja zachodziła już po około 1 minucie przy stężeniu TCEP 10 $\mu\text{mol/ml}$, co pozwalało na efektywne przygotowanie większej liczby próbek. Co istotne w toku badań wykazałam, że na potrzeby oznaczania całkowitej zawartości związków tiolowych etapy redukcji wiązań disiarczkowych oraz derywatyzacji można połączyć, co zdecydowanie upraszczało proces analityczny. W celu zakończenia reakcji derywatyzacji, wytrącenia ewentualnych białek oraz zwiększenia stabilności pochodnych próbki zakwaszałam kwasem chlorowym(VII) (PCA). Uzyskany po odwirowaniu *supernatant* poddawany był filtracji przy wykorzystaniu filtra z membraną wykonaną z polieterosulfonu (PES) i poddawany analizie chromatograficznej.

Próbki owoców analizowałam w warunkach opisanych wcześniej, gdzie jako technikę rozdzielania wykorzystano chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) [28]. Dotychczas użyteczność tej techniki została szeroko udokumentowana w analizie małowcząsteczkowych związków siarki po derywatywacji z CMQT. Fazę ruchomą stanowił 0,1 mol/l kwas trichlorooctowy doprowadzony do pH 1,7 przy wykorzystaniu 1 mol/l wodorotlenku sodu (faza ruchoma A) oraz acetonitryl (faza ruchoma B). Początkowy skład fazy ruchomej wynosił 89:11 (A:B, v/v) a wykorzystanie elucji gradientowej pozwoliło na zadowalające rozdzielanie pochodnych tiolowych od innych składników badanych próbek.

Opracowana metoda, podobnie jak opisane wcześniej [D3,D4] poddana została pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi dla metod bioanalitycznych [64]. Wszystkie istotne parametry walidacyjne oszacowałam zarówno dla całkowitych jak i zredukowanych form tioli. Metoda została zaaplikowana do 15 próbek różnych owoców jagodowych dostępnych na rynku polskim, m.in. borówek, malin, truskawek, jeżyn czy porzeczek.

W artykule opisałam pierwszą metodę wykorzystującą technikę HPLC-UV do jednoczesnego oznaczania zarówno całkowitej jak i zredukowanej zawartości małowcząsteczkowych tioli w szerokiej gamie jagodowych „superowoców”. W konsekwencji przedstawione dane są pierwszymi dotyczącymi zawartości małowcząsteczkowych związków tiolowych - cennej grupy antyoksydantów, w tego typu matrycach. Spośród wszystkich analizowanych próbek dominującym tiolem był GSH, nieco mniejsze zawartości mi się udokumentować w przypadku Cys, a Cys-Gly wykryłam jedynie w śladowych ilościach. W analizowanych próbkach nie potwierdziłam obecności Hcy.

**Analysis of berry superfruits for reduced and total thiol content
by LC-UV-based methods**

Marta Gawel^{1,2}, Rafał Głowacki^{1*}, Justyna Piechocka^{1*}

¹*University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry,
163/165 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland*

²*University of Lodz, Doctoral School of Exact and Natural Sciences, 12/16 Banacha Str.,
90-237 Łódź, Poland*

ORCID iD: 0009-0006-2241-6877 (M.G.), 0000-0003-0071-1470 (R.G.),

0000-0002-1160-3160 (J.P.)

marta.gawel@edu.uni.lodz.pl (M.G.), rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl (R.G.),

justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl (J.P.)

Corresponding authors

* Justyna Piechocka, University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Environmental
Chemistry, 163/165 Pomorska Str., 90-236 Lodz, Poland

E-Mail: justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl

Tel.: +48-42-635 5844

Fax: +48-42-635 5832

* Rafał Głowacki, University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Environmental
Chemistry, 163/165 Pomorska Str., 90-236 Lodz, Poland

E-Mail: rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl

Tel.: +48-42-635 5835

Fax: +48-42-635 5832

Abstract

The article presents the first methods for determining total and reduced glutathione (GSH),
cysteine (Cys), cysteinyl-glycine (Cys-Gly), and homocysteine (Hcy) in berries using high-
performance liquid chromatography with ultraviolet detection. The assay employs N-acetyl-
cysteine as an internal standard. Sample preparation involves homogenization in phosphate
buffer, tris(2-carboxyethyl)phosphine-mediated reduction of disulfide bonds (if total thiol

content is determined), 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate derivatization, perchloric acid acidification, and filtration through a polyethersulfone membrane. Separation is achieved on a Zorbax SB-C18 column using gradient elution with trichloroacetic acid and acetonitrile. Both total and reduced thiol assays showed linearity at 0.5-50 $\mu\text{mol/L}$ for GSH and 0.5-20 $\mu\text{mol/L}$ for Cys and Cys-Gly. Applied to various Polish market berries (e.g., strawberry, raspberry, blueberry, blackberry, forest berry, haskap berry, wild strawberry, currant, gooseberry, cranberry, chokeberry, and elderberry) results identified GSH as the predominant thiol. Cys appeared at lower levels, Cys-Gly was found in traces, and Hcy was undetected.

Keywords

aminothiols; antioxidants; berry fruits; high-performance liquid chromatography; superfruits; ultraviolet detection

Abbreviations

ACN, acetonitrile; CMQT, 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate; Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; CV, coefficient of variation; GSH, glutathione; Hcy, homocysteine; IS, internal standard; LC, high-performance liquid chromatography; LOQ, limit of quantification; NAC, N-acetyl-cysteine; PBS, phosphate buffer; PCA, perchloric acid; PES, polyethersulfone; PP, polypropylene; SD, standard deviation; TCA, trichloroacetic acid; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine; UV, ultraviolet detection.

1. Introduction

“Superfruits” is a commercial designation referring to unprocessed, genetically unmodified fruits of natural origin that are exceptionally rich in essential nutrients with pro-health effects on the human body (Chang et al., 2019; Liu et al., 2021; Nagaraja et al., 2026). Despite the widespread appeal of functional foods valued for their physiological benefits, comprehensive data regarding their qualitative and quantitative composition are scarce. Moreover, detailed information regarding the individual bioactive molecules that drive these health benefits remains limited. Although superfruits contain a diverse range of compounds, research has predominantly focused on monitoring vitamins, minerals, and antioxidants (Chang et al., 2019; Liu et al., 2021; Nagaraja et al., 2026) with polyphenols being the most extensively studied group.

Low-molecular-mass sulfur-containing compounds, notably glutathione (GSH), cysteine (Cys), cysteinyl-glycine (Cys-Gly), and homocysteine (Hcy), are well-established antioxidants

that play a crucial role in maintaining cellular redox homeostasis (Głowacki et al., 2022). In human clinical studies, these four compounds are frequently studied together due to their metabolic relationship within the γ -glutamyl cycle (Głowacki et al., 2022; Isokawa et al., 2014; Piechocka, Wrońska, et al., 2020). Although berry fruits are famed for their antioxidant properties, they have not yet been comprehensively investigated to characterize the full spectrum of these relevant thiols. Their specific thiol composition remains largely unmapped. Existing literature provides only piecemeal data, such as the presence of Cys and GSH in strawberries (Demirkol et al., 2004, 2008; H. Zhang et al., 2014) and blackberries (Huang et al., 2023; Jumakulova et al., 2025; Shah et al., 2025) or Cys in raspberries (S. Zhang et al., 2022) and blueberries (H. Zhang et al., 2014), leaving a significant gap in the chemical characterization of these matrices. Furthermore, to the best of our knowledge, a critical analytical bottleneck exists, as no validated method is currently available for the accurate quantification of both reduced and total thiol levels in such complex plant tissues.

The objective of this research is to develop and validate methods based on high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection (LC-UV) for the determination of both reduced and total thiols in berry fruits. Subsequently, the developed assays will be utilized to map the thiol profiles of various commercially available “superfruits” on the Polish market. The sample set is extensive, covering strawberries, raspberries, blueberries, blackberries, forest berries, haskap berries, wild strawberries, currants (black, red, and white), gooseberries (white and green), cranberries, chokeberries, and black elderberries. By filling this analytical gap, the study will enhance our understanding of the nutritional and biochemical properties of these superfruits.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

Throughout the experiments commercially available and at least analytical reagent grade chemicals were used. Cys, GSH, Hcy, Cys-Gly, N-acetyl-cysteine (NAC) and their symmetrical disulfides as well as tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), sodium phosphate dibasic heptahydrate, sodium phosphate tribasic, LC gradient grade acetonitrile (ACN), and trichloroacetic acid (TCA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium hydroxide and perchloric acid (PCA) were obtained from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Hydrochloric acid was purchased from POCH (Gliwice, Poland). 2-Chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate (CMQT) was synthesized according to the previously reported method (Bald & Głowacki, 2001). To filter test samples, syringe filters with a 0.22 μ m

polyethersulfone (PES) (Filtrakon, Łaziska Górne, Poland) were used. Ultrapure water was obtained using a Direct-Q 3 UV water purification system (Millipore, Vienna, Austria).

2.2. Instrumentation

To analyze the test samples, an Agilent 1220 Infinity LC system was used. The system was equipped with a binary pump integrated with a vacuum degasser, autosampler, a temperature-controlled column compartment, and UV detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Instrument control, data acquisition, and analysis were performed using OpenLAB CDS software, version A.01.05. The analytes were separated on a ZORBAX SB-C18 (150 × 4.6 mm, 5.0 µm) column purchased from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).

For sample homogenization and centrifugation, an IKA T25 basic homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany) and a Mikro 220R centrifuge with a fast-cool function (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) were used. A FiveEasy F-20 pH-meter (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) was also employed. Samples were stored in an ultra-low-temperature freezer (Panasonic Healthcare Co., Sakata, Japan). Water was purified using a Direct-Q 3 UV water purification system (Millipore, Vienna, Austria).

2.3. Stock solutions

All solutions throughout the experiment were prepared using ultrapure water and LC gradient grade solvents.

Stock solutions (0.1 mol/L) of Cys, GSH, Hcy, Cys-Gly, NAC, and their symmetrical disulfides were prepared weekly by dissolving the required amount of each solid in 0.5 mol/L hydrochloric acid. These solutions were stored in polypropylene (PP) microcentrifuge tubes at 4 °C. Working solutions were prepared daily by diluting the stocks with 0.05 mol/L hydrochloric acid and were used without delay.

A 0.25 mol/L stock solution of TCEP was freshly prepared by dissolving the appropriate amount of TCEP powder in deionized water.

A 0.25 mol/L stock solution of CMQT was prepared weekly by dissolving the appropriate amount of CMQT powder in deionized water. The solution was stored in PP microcentrifuge tube at 4 °C.

The 3 mol/L PCA and 0.05 mol/L or 0.5 mol/L hydrochloric acid solutions were prepared by diluting the concentrated reagents with water. These were stored in tightly sealed glass flasks at ambient temperature and used within one month.

A 0.2 mol/L phosphate buffer (PBS) stock solution, pH 9.0 was prepared by dissolving the

appropriate amount of sodium phosphate dibasic in water, with the pH adjusted using 0.2 mol/L sodium phosphate tribasic. The solution was stored in a tightly capped glass bottle at 4 °C.

The LC-UV mobile phase (0.1 mol/L TCA, pH 1.7) was prepared by dissolving TCA in ultrapure water, with the pH adjusted potentiometrically using 1 mol/L sodium hydroxide solution. The buffer was stored in a sealed amber glass bottle at room temperature. The 1 mol/L sodium hydroxide titrant was prepared by dissolving substance pellets in water and stored in a tightly capped flask at ambient temperature.

2.4. Samples collection

Berry fruits were collected from organic domestic allotment gardens during the summertime. The fruits were not washed; immediately after harvesting, they were frozen at -80 °C and stored for no longer than six months. Prior to analysis, the fruits were thawed at room temperature and processed without delay.

The samples included popular superfruits commercially available on the Polish market, such as strawberry, raspberry, blueberry, blackberry, forest berry, haskap berry, wild strawberry, currant (black, red, white), gooseberry (white and red), cranberry, chokeberry, and black elderberry.

2.5. Sample preparation for the determination of reduced thiols

A berry sample (~1 g) was mixed with 10 mL of ice-cold 0.2 mol/L PBS pH 9.0 in a 50 mL PP Falcon tube. The sample was spiked with 10 µL of NAC (0.1 mol/L) as an internal standard (IS). Subsequently, 400 µL of 0.25 mol/L CMQT was added. The mixture was homogenized on ice for 1 min at low speed and then incubated on ice for an additional 10 min. After incubation, the reaction mixture was acidified with 100 µL of 3 mol/L PCA and centrifuged at 12,000 × g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was filtered through a 0.22 µm PES syringe filter. Finally, a 20 µL aliquot was injected into the LC-UV system. During analysis, samples were maintained in the autosampler at room temperature.

2.6. Sample preparation for the determination of total thiols

A berry sample (~1 g) was mixed with 10 mL of ice-cold 0.2 mol/L PBS pH 9.0 in a 50 mL PP Falcon tube. The sample was spiked with 10 µL of NAC (0.1 mol/L) as an IS. Subsequently, 400 µL of 0.25 mol/L CMQT and 400 µL of 0.25 mol/L TCEP were added. The mixture was homogenized on ice for 1 min at low speed and then incubated on ice for an additional 10 min. After incubation, the reaction mixture was acidified with 100 µL of 3 mol/L PCA and

centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was filtered through a 0.22 µm PES syringe filter. Finally, a 20 µL aliquot was injected into the LC-UV system. During analysis, samples were maintained in the autosampler at room temperature.

2.7. LC-UV conditions

Samples were analyzed according to the previously reported method (Piechocka et al., 2023). The chromatographic separations were performed at 25 °C using gradient elution (0-8 min, 11-40% solvent B; 8-12 min, 40-11% solvent B) with the mobile phase consisted of 0.1 mol/L TCA pH 1.7 (solvent A) and ACN (solvent B), delivered at a flow rate of 1 mL/min. The column was re-equilibrated between analyses by setting the post-run conditioning at 11% B for 2 min. UV detection was performed at 355 nm (4 nm bandwidth) with a reference at 390 nm $\pm$ 10 nm. The detector was set to acquire data from 4 to 10 min.

3. Results and discussion

The article describes the first LC-UV methods for the determination of total and reduced GSH, Hcy, Cys, and Cys-Gly in berry fruits. The following section details the results obtained during method development, validation and its application to superfruits, presented in the chronological order of the experiments.

3.1. Sample preparation

Sample preparation involves the addition of NAC acting as an IS, simultaneous homogenization in 0.2 mol/L PBS pH 9.0, reduction of disulfide bonds with TCEP (if total thiol content is determined), and derivatization with CMQT. The mixture is then acidified with 3 mol/L PCA and filtered through a PES membrane prior to LC-UV analysis. These sample preparation steps are typical for the determination of both reduced and total thiol content in various matrices (Głowacki et al., 2022; Isokawa et al., 2014; Kuśmierk et al., 2009; Piechocka, Wrońska, et al., 2020; Toyo'oka, 2009; Tsiasioti & Tzanavaras, 2023). Method development was conducted using strawberries as a model matrix. For the optimization of reduced and total thiol assays, samples were fortified with Cys, GSH, Hcy, and Cys-Gly (or their corresponding symmetrical disulfides at 100 µmol/L). In each case, a 1 g portion of the whole fruit was analyzed to reflect its common dietary form.

3.1.1. Addition of internal standard

Since NAC has not been identified as an endogenous component of berry fruits, it was utilized

as an IS to account for procedural variability. To date, its application as an IS has been documented primarily in the LC analyses of thiols in biological matrices (Arroyo et al., 1997; Khan & Iqbal, 2011; Liu et al., 2006). As demonstrated during method validation, the inclusion of NAC enhances the precision and consistency of the data.

3.1.2. Homogenization

To ensure sample homogeneity and prevent enzymatic degradation, whole berry fruits were homogenized on ice using a rotor-stator homogenizer (Figure 1a-b), following established literature protocols (Chwatko et al., 2014; Demirkol & Cagri-Mehmetoglu, 2008; Tsiasioti & Tzanavaras, 2023). Homogenization was carried out in a 0.2 mol/L PBS buffer, serving as both the homogenization and derivatization medium (Chwatko et al., 2014; Głowacki et al., 2016, 2022; Kuśmierek et al., 2009, 2011; Piechocka, Wrońska, et al., 2020; Piechocka et al., 2023; Stachniuk et al., 2016; Sudomir et al., 2025). It was found that 0.2 mol/L PBS at pH 9.0 is crucial to maintain the homogenate pH within the range of 6.5 to 8.0, regardless of the type of berry fruit. This is particularly important considering that CMQT effectively reacts with Hcy, Cys, Cys-Gly, GSH, and NAC in this medium (pH range 6.0-10.0) to yield the corresponding 2-S-quinolinium derivatives (Stachniuk et al., 2016). Furthermore, a 1:10 (w/v) sample-to-solvent ratio was found to be critical for maintaining the homogenate pH within the intended range and ensuring sufficient chromatographic resolution and method selectivity (Figure 2). Additionally, 1-min homogenization period was found to be sufficient to achieve sample uniformity and efficient analyte extraction. The homogenate is then incubated on ice to ensure complete reduction of disulfides (if total thiol content is determined) and completion of derivatization steps.

3.1.3. Reduction of disulfide bonds

To determine the total thiol content, samples were treated with a reducing agent to convert disulfides into free thiols, thereby making them available for derivatization with CMQT. Based on our previous experience (Chwatko et al., 2014; Głowacki et al., 2016; Kuśmierek et al., 2011; Piechocka, Wieczorek, et al., 2020; Piechocka, Wrońska, et al., 2020; Piechocka et al., 2023; Stachniuk et al., 2016; Sudomir et al., 2025), TCEP was employed to cleave disulfide bonds. The optimization of this process focused on two primary parameters, namely the TCEP concentration (Figure 3a) and reaction time (Figure 3b). These factors were evaluated using TCEP concentrations ranging from 1 to 12.5 $\mu\text{mol/mL}$ in the reaction mixture, with incubation times of 1-20 min on ice. Kinetic analysis indicated that the reduction was complete within 1

min at a TCEP concentration of 10 $\mu\text{mol/mL}$. For routine analysis, a 10-min reaction time was selected to ensure the streamlined processing of multiple sample batches. Notably, for the determination of total thiol content, homogenization was performed simultaneously with disulfide bond reduction and derivatization to simplify the workflow. As demonstrated earlier, this approach enables highly reproducible results and good reaction yields for Hcy, Cys, Cys-Gly, and lipoic acid after treatment with TCEP and CMQT (Sudomir et al., 2025).

3.1.4. Derivatization

To facilitate UV absorption and improve analyte stability, samples were derivatized with CMQT. The utility of this reagent for the modification of Cys, Hcy, GSH, Cys-Gly, and NAC is well-supported by previous studies (Bald & Głowacki, 2001; Chwatko et al., 2014; Gawel et al., 2025; Głowacki et al., 2016, 2022; Kuśmierek et al., 2011; Piechocka et al., 2023). It has been shown that CMQT reacts almost instantaneously with mentioned thiols in 0.2 mol/L PBS (pH range 6.0-10.0) to yield the corresponding 2-*S*-quinolinium derivatives (Bald & Głowacki, 2001; Stachniuk et al., 2016). In this study, the CMQT concentration (Figure 4a) and reaction time (Figure 4b), were optimized. Optimization was carried out using CMQT concentrations ranging from 1 to 12.5 $\mu\text{mol/mL}$ in the reaction mixture, with incubation times of 1-20 min on ice. Kinetic studies revealed that the reaction reached completion within 1 min at a CMQT concentration of 10 $\mu\text{mol/mL}$. In addition, it was observed that analytes in homogenates treated with CMQT and TCEP stored on ice remained stable for at least 8 h across all examined concentrations (Figure 5a). Recoveries for the total thiol assay were 85.17%, 85.25%, 98.28%, 100.1%, and 100.3% for Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy and NAC, respectively. By contrast, reduced thiols in homogenates containing only CMQT were stable for no more than 30 min (Figure 5b), achieving recoveries of 100.32%, 93.12%, 91.49%, 82.01%, and 99.23%. A reaction time of 10 min was selected for routine analysis to facilitate the efficient processing of sample batches, followed by acidification.

3.1.5. Deproteinization

To terminate the derivatization reaction, precipitate proteins, and prolong the stability of the 2-*S*-quinolinium derivatives of Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, and NAC, samples were acidified. Based on our previous experience (Chwatko et al., 2014; Głowacki et al., 2016, 2022; Kuśmierek et al., 2011; Piechocka et al., 2023; Stachniuk et al., 2016; Sudomir et al., 2025), acidification was performed using 3 mol/L PCA. Efficient protein precipitation and sample acidification were achieved by adding 100 μL of 3 mol/L PCA to the homogenates. The test

sample pH was estimated to be 0-1. After centrifugation, the supernatant was filtered.

3.1.6. Filtration

Prior to LC analysis, the test samples underwent purification via filtration. A comparative assessment of various syringe filters, including nylon, polytetrafluoroethylene, and PES with porosities of 0.20-0.22 μm , was conducted (Figure 6). The PES filter was chosen, as it offered the highest recovery (98.4-100.5%) and high precision across all tested concentration levels.

3.1.7. Stability of test samples

The stability of 2-S-quinolinium derivatives of Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, and NAC in processed samples was evaluated at 25 °C at low, medium and high concentration levels (ICH, 2022). Stability tests confirmed that these derivatives remain stable for at least 7 days across all the concentrations examined. For the total thiol assay, recoveries of 93.96%, 88.04%, 98.96%, 89.96%, and 93.07% were obtained for 2-S-quinolinium derivatives of Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, and NAC, respectively (Figure 7a), while for the reduced thiol assay, they reached 90.10%, 97.16%, 94.20%, 88.88%, and 93.38% (Figure 7b). Moreover, freeze-thaw stability testing indicated that samples subjected to up to five freeze-thaw cycles yield reliable results. In both total and reduced thiol assays, the concentration of the target derivatives remained above 90.38% and 90.62% of their initial values, respectively (Figure 8a-b). These findings align with the well-established stability of 2-S-quinolinium derivatives under acidic conditions (Głowacki et al., 2022; Kuśmierek et al., 2009, 2011; Piechocka et al., 2023; Piechocka, Wrońska, et al., 2020; Stachniuk et al., 2016; Sudomir et al., 2025).

3.2. Chromatographic and detection conditions

Samples were analyzed according to the previously reported method (Piechocka et al., 2023), which utilizes ion-pair reversed-phase LC coupled with UV detection to quantify 2-S-quinolinium derivatives of GSH, Cys, Hcy, and Cys-Gly. To date, the utility of this separation technique has been extensively documented for the determination of both low- and high-molecular-mass sulfur compounds following derivatization with CMQT (Głowacki et al., 2022; Isokawa et al., 2014; Kuśmierek et al., 2009, 2011; Piechocka, Wrońska, et al., 2020; Toyo'oka, 2009). Importantly, effective separation of the 2-S-quinolinium derivatives of analytes and IS in berry fruit samples was achieved within 12 min at room temperature under the set conditions (Figure 9a-b and Figure 10a-b). Each target compound yielded a single chromatographic peak, and the elution profiles of blank samples showed no interfering signals at the analytes' retention

times when monitored at 355 nm (Figure 9 and Figure 10). The elution order was as follows: NAC, GSH, Hcy, Cys, and Cys-Gly. Under these conditions, the peak symmetry factors for NAC, GSH, Hcy, Cys, and Cys-Gly ranged from 0.90-0.92, 0.93-0.98, 0.86-1.03, 0.89-1.22, and 0.96-1.31, respectively. Since satisfactory methods' performance was achieved, the LC-UV conditions were not further optimized in this study. To confirm the identity of the analytes and the IS in real samples, their retention times and UV spectra were compared with those obtained from analytical standards.

3.3. Validation of the method

Validation was performed according to the latest International Council for Harmonisation guidelines for bioanalytical method validation (ICH, 2022). Parameters such as selectivity, linearity, intra- and inter-day precision and accuracy, the limit of quantification (LOQ), carry-over, matrix effect, and reinjection reproducibility were assessed for both reduced and total GSH, Cys, and Cys-Gly. As noted in Section 3.4, Hcy was not detected in berry fruits examined, therefore, the compound was not evaluated during validation process.

3.3.1. Selectivity

The selectivity of the method was previously established for several low-molecular-mass sulfur species that form UV-absorbing 2-S-quinolinium derivatives upon reaction with CMQT (Głowacki et al., 2022; Kuśmierk et al., 2009, 2011; Toyo'oka, 2009). The compounds included Cys, Cys-Gly, Hcy, GSH, NAC, 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid, captopril, mesna, cysteamine, tiopronin, methimazole, γ -glutamyl-cysteine, and thioproline, among others (Gaweł et al., 2025; Piechocka et al., 2023). Furthermore, the selectivity studies evaluated interferences originating from all known and unknown components of berry samples using a spiking approach, since the analytes are endogenous components of these superfruits. Berry samples with known endogenous reduced/total thiol concentrations were spiked with analytical standards at low, medium, and high LOQ. The lack of co-eluting interferences, coupled with a linear increase in peak areas following fortification, confirmed the methods' selectivity and capacity to accurately distinguish the analytes from the complex matrix components. The selectivity was confirmed by comparing retention times and peak shapes in both non-spiked and spiked samples. Peak purity tests further confirmed the ability of the LC-UV method to differentiate and measure thiols in the presence of matrix components in berry samples.

3.3.2. Linearity

An IS calibration method was applied to evaluate the calibration range of 0.5-50 $\mu\text{mol/L}$ for reduced/total GSH, and 0.5-20 $\mu\text{mol/L}$ for reduced/total Cys and Cys-Gly. Calibration standard concentrations were selected based on preliminary findings. Each calibration curve, comprising blank/zero samples and seven calibrators, was processed in triplicate over three consecutive days. To establish the concentration-response relationship (analyte-to-IS peak area ratio), a linear least-squares regression was applied. The resulting curves exhibited excellent linearity, with correlation coefficients exceeding 0.9977. However, variability in the regression slopes was noted both within and between days. For the total thiol assay, the coefficient of variation (CV) of the slopes ranged from 2.32% to 7.70%, while for the reduced thiol assay, it varied from 1.78% to 7.97%, reflecting the presence of the matrix effects in the LC-UV analysis (Table 1).

3.3.3. Precision and accuracy

Methods' performance, in terms of precision and accuracy, was verified during linearity evaluation. Precision was expressed as the CV, whereas accuracy was calculated as the percentage of nominal concentration (recovery). For total thiol assay, the intra- and inter-day accuracy fell within the ranges of 84.33-120.21% and 82.52-118.60%, with corresponding precision values of 0.34-7.90% and 0.34-7.90%. In the case of reduced thiol assay, the accuracy ranged from 81.16% to 109.24% and 81.16% to 117.35%, while precision varied from 0.55% to 12.36% and 0.45% to 14.85% for intra- and inter-day measurements, respectively (Table 2).

3.3.4. The limit of quantification

Since the analytes are endogenous components of berry superfruits, the LOQ was determined based on the lowest point of the calibration range (Table 2). This concentration produced a reproducible detector response at least 10-fold higher than the baseline signal, with high levels of precision and accuracy for all analytes. The precision did not exceed 12.36% and accuracy ranged from 81.16% to 120.21%. Furthermore, the estimated LOQ values corresponded to those determined experimentally by the signal-to-noise method, using 0.2 mol/L PBS pH 9.0 as a surrogate matrix.

3.3.5. Carry-over effect

No signals corresponding to 2-S-quinolinium derivatives of GSH, Cys, Cys-Gly, Hcy, or NAC were observed in blank samples analyzed directly after the upper LOQ calibrator, demonstrating

that the method is devoid of carry-over effects.

3.3.6. Matrix effect

The matrix effect was assessed by comparing calibration curves from six independent strawberry sources and five other berry species (black currant, blueberry, forest berry, raspberry, blackberry) against a curve in a surrogate matrix (0.2 mol/L PBS pH 9.0). The CV of the slopes of the regression lines was 32.16%, indicating a substantial matrix effect. Due to the detected interspecies variability, a single-point standard addition method, integrated with internal standardization, was used for determination of thiols in the berries.

3.3.7. Reinjection reproducibility

To evaluate reinjection reproducibility, ten replicate injections of quality control samples at three concentration levels (low, medium, and high) were performed. The CV values of retention times were 0.05% for NAC, 0.03% for Cys-Gly, 0.05% for Hcy, 0.03% for Cys, and 0.06% for GSH, regardless of the tested concentration. Regarding peak areas, the mean CV values were 0.10% for NAC, 0.34% for Cys-Gly, 0.56% for Hcy, 0.31% for Cys, and 0.98% for GSH. This high precision confirms that the processed samples remain stable for multiple reinjections without compromising data integrity, easily meeting the acceptance criterion of $CV \leq 1\%$.

3.4. Application of the method

The LC-UV assays were used to quantify reduced and total forms of GSH, Cys, Cys-Gly, and Hcy in several berry superfruits. A single-point standard addition approach, integrated with internal standardization, was employed to mitigate matrix effects and determine analyte concentrations in the samples. The concentration of each analyte was calculated using the following formula: $C_x = (Y_x \times C_{IS}) / (Y_{IS} - Y_x)$, where C_x represents the analyte concentration in the berry sample, Y_x is the signal ratio of analyte to the IS in the sample, C_{IS} is the concentration of added IS, and Y_{IS} is the signal ratio in the spiked sample. Table 3 details the estimated concentrations of reduced and total thiols. As far as we are aware, this study constitutes preliminary data regarding thiol profiles in berry superfruits.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this work describes the first LC-UV approach to quantify both total and reduced GSH, Cys, Cys-Gly, and Hcy across a diverse range of berry superfruits. Consequently, it reports the first comprehensive data on the thiol content – a group of valuable

antioxidants - in these species. Among all analyzed samples, GSH predominated as the most abundant thiol, followed by Cys at significantly lower levels, while Cys-Gly was detected only in trace amounts (Table 3). From a practical perspective, our results offer valuable insights into public health, helping health-conscious individuals make informed dietary choices and purchase decisions. The proposed analytical tools are well-suited for evaluating the impact of food processing on antioxidant levels. A key strength of these methods lies in their simplified sample preparation procedure and excellent analyte stability at all stages. The entire protocol for both reduced and total thiols takes roughly 40 min using no more than 25 mL of inexpensive chemicals. These features make our methods ideally suited for high-throughput food quality control.

Supplementary material: Not applicable.

Author contributions: **M.G.:** Investigation, Validation, Resources, Visualization, Data curation, Project administration, Funding acquisition. **R.G.:** Conceptualization, Substantive advice, Critical review, Funding acquisition. **J.P.:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review and editing, Supervision, Project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process: During the preparation of this work the authors did not use generative AI and AI-assisted technologies.

Funding: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors acknowledge financial support from the University of Lodz (B2511100000234.01 and B2510009000301.07).

Institutional review board statement: Not applicable.

Informed consent statement: Not applicable.

Data availability statement: Essential data are contained within the article. In addition, the dataset generated and analyzed during this study, which contributed to the article, can be made available by the corresponding author upon reasonable request provided that the request does not compromise intellectual property interests. Samples are not available from the authors.

Acknowledgments: The authors thank all volunteers for providing samples of home-grown berry fruits.

References:

- Arroyo, C., López-Calull, C., Garcia-Capdevila, L., Gich, I., Barbanoj, M., & Bonal, J. (1997). Determination of captopril in plasma by high-performance liquid chromatography for pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*, 688, 339–344. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00306-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00306-4)
- Bald, E., & Głowacki, R. (2001). 2-Chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate as an effective and thiol specific UV-tagging reagent for liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 24, 1323–1339. <https://doi.org/10.1081/JLC-100103450>
- Chang, S. K., Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2019). Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects - a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 1580–1604. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1422111>
- Chwatko, G., Kuźniak, E., Kubalczyk, P., Borowczyk, K., Wyszczelska-Rokiel, M., Głowacki, R., Cofino, W. P., Havel, L., Kizek, R., Trnkova, L., & Kizek, R. (2014). Determination of cysteine and glutathione in cucumber leaves by HPLC with UV detection. *Analytical Methods*, 6, 8039–8044. <https://doi.org/10.1039/c4ay01574f>
- Demirkol, O., Adams, C., & Ercal, N. (2004). Biologically important thiols in various vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8151–8154. <https://doi.org/10.1021/jf040266f>
- Demirkol, O., & Cagri-Mehmetoglu, A. (2008). Biologically important thiols in various organically and conventionally grown vegetables. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47, 77–84. <https://doi.org/10.1021/jf040266f>
- Demirkol, O., Cagri-Mehmetoglu, A., Qiang, Z., Ercal, N., & Adams, C. (2008). Impact of food disinfection on beneficial biothiol contents in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10414–10421. <https://doi.org/10.1021/jf802209t>

- Gawel, M., Płodzik, M., Głowacki, R., & Piechocka, J. (2025). Versatile high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection-based method for the determination of thioproline in pharmaceutical and cosmetic products. *Molecules*, *30*, 3152, 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules30153152>
- Głowacki, R., Piechocka, J., Bald, E., & Chwatko, G. (2022). Application of separation techniques in analytics of biologically relevant sulfur compounds. B. Buszewski & I. Baranowska (Eds.), *Handbook of Bioanalytics* (pp. 233–256). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-95660-8_11
- Głowacki, R., Stachniuk, J., & Borowczyk, K. (2016). A simple HPLC-UV method for simultaneous determination of cysteine and cysteinylglycine in biological fluids. *Acta Chromatographica*, *28*, 333–346. <https://doi.org/10.1556/1326.2016.28.3.4>
- Huang, X., Wu, Y., Zhang, S., Yang, H., Wu, W., Lyu, L., & Li, W. (2023). Variation in antioxidant enzyme activity and key gene expression during fruit development of blackberry and blackberry–raspberry hybrids. *Food Bioscience*, *54*, 102892, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102892>
- ICH. (2022). *M10 guideline on bioanalytical method validation*. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>
- Isokawa, M., Kanamori, T., Funatsu, T., & Tsunoda, M. (2014). Analytical methods involving separation techniques for determination of low-molecular-weight biothiols in human plasma and blood. *Journal of Chromatography B*, *964*, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.041>
- Jumakulova, N. S., Kabulova, F. D., Khujanov, A. N., & Matchanov, A. D. (2025). Biochemical composition of blackberry varieties cultivated under the climatic conditions of the Samarkand region. *Plant Science Today*, *12*, 1–10. <https://doi.org/10.14719/pst.7675>
- Khan, M. I., & Iqbal, Z. (2011). Simultaneous determination of ascorbic acid, aminothiols, and methionine in biological matrices using ion-pairing RP-HPLC coupled with electrochemical detector. *Journal of Chromatography B*, *879*, 2567–2575. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.013>
- Kuśmierek, K., Chwatko, G., Głowacki, R., & Bald, E. (2009). Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, *877*, 3300–3308. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.038>
- Kuśmierek, K., Chwatko, G., Głowacki, R., Kubalczyk, P., & Bald, E. (2011). Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography

- and capillary electrophoresis analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879, 1290–1307. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.035>
- Liu, J., Wu, H., & Hou, Y. (2006). Determination of total tiopronin in human plasma by LC-ESI-MS using tris (2-carboxy-ethyl) phosphine as reducing reagent and methyl acrylate as derivatization reagent for the thiol group. *Journal of Chromatography B*, 844, 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.06.035>
- Liu, J., Xu, D., Chen, S., Yuan, F., Mao, L., & Gao, Y. (2021). Superfruits in China: Bioactive phytochemicals and their potential health benefits - a review. *Food Science and Nutrition*, 9, 6892–6902. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2614>
- Nagaraja, S. K., Mir, J. I., Verma, M. K., & Dar, A. H. (2026). A comprehensive review on nutrition, phytochemistry, pharmacology and food application perspectives of bioactive rich superfruits. *Future Postharvest and Food*, 00, 1–22. <https://doi.org/10.1002/fpf2.70040>
- Piechocka, J., Wieczorek, M., & Głowacki, R. (2020). Gas chromatography–mass spectrometry based approach for the determination of methionine-related sulfur-containing compounds in human saliva. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 9252, 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21239252>
- Piechocka, J., Wrońska, M., & Głowacki, R. (2020). Chromatographic strategies for the determination of aminothiols in human saliva. *Trends in Analytical Chemistry*, 126, 115866, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115866>
- Piechocka, J., Wyszczelska-Rokiel, M., & Głowacki, R. (2023). Simultaneous determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid and main plasma aminothiols by HPLC–UV based method. *Scientific Reports*, 13, 9294, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36548-9>
- Shah, H. M. S., Singh, Z., Hasan, M. U., Kaur, J., Afrifa-Yamoah, E., & Woodward, A. (2025). Methyl jasmonate application downregulates drupelet reversion and enhances phenolic biosynthesis and antioxidant potential of blackberries. *Journal of Plant Growth Regulation*, 44, 353–366. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11499-1>
- Stachniuk, J., Kubalczyk, P., Furmaniak, P., & Głowacki, R. (2016). A versatile method for analysis of saliva, plasma and urine for total thiols using HPLC with UV detection. *Talanta*, 155, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.031>
- Sudomir, U., Piechocka, J., Głowacki, R., & Kubalczyk, P. (2025). Fast, simple and accurate method for simultaneous determination of α -lipoic acid and selected thiols in human saliva

by capillary electrophoresis with UV detection and pH-mediated sample stacking. *Molecules*, *30*, 3129, 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules30153129>

Toyo'oka, T. (2009). Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples. *Journal of Chromatography B*, *877*, 3318–3330. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.034>

Tsiasioti, A., & Tzanavaras, P. D. (2023). Determination of glutathione and glutathione disulfide using liquid chromatography: A review on recent applications. *Microchemical Journal*, *193*, 109157. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109157>

Zhang, H., Wang, Z. Y., Yang, X., Zhao, H. T., Zhang, Y. C., Dong, A. J., Jing, J., & Wang, J. (2014). Determination of free amino acids and 18 elements in freeze-dried strawberry and blueberry fruit using an Amino Acid Analyzer and ICP-MS with micro-wave digestion. *Food Chemistry*, *147*, 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.118>

Zhang, S., Liu, Z., Li, X., Abubaker, M. A., Liu, X., Li, Z., Wang, X., Zhu, X., Zhang, J., & Chen, X. (2022). Comparative study of three raspberry cultivar (*Rubus idaeus* L.) leaves metabolites: Metabolome profiling and antioxidant activities. *Applied Sciences*, *12*, 990, 1–16. <https://doi.org/10.3390/app12030990>

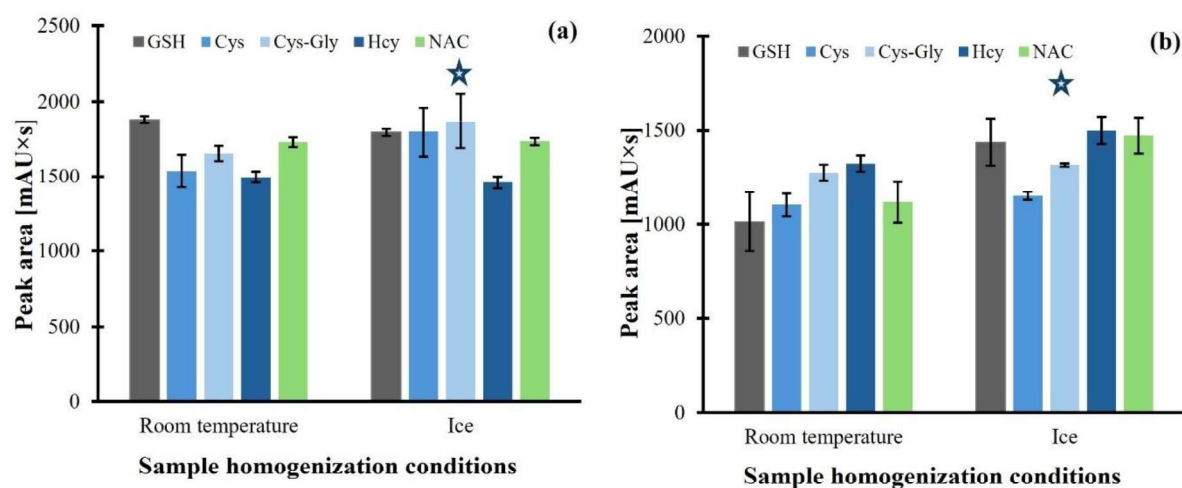


Figure 1. Comparison of (a) total thiol and (b) reduced thiol stability during homogenization of berry fruits at room temperature and on ice. Data are presented as mean $\pm$ SD (n=3).

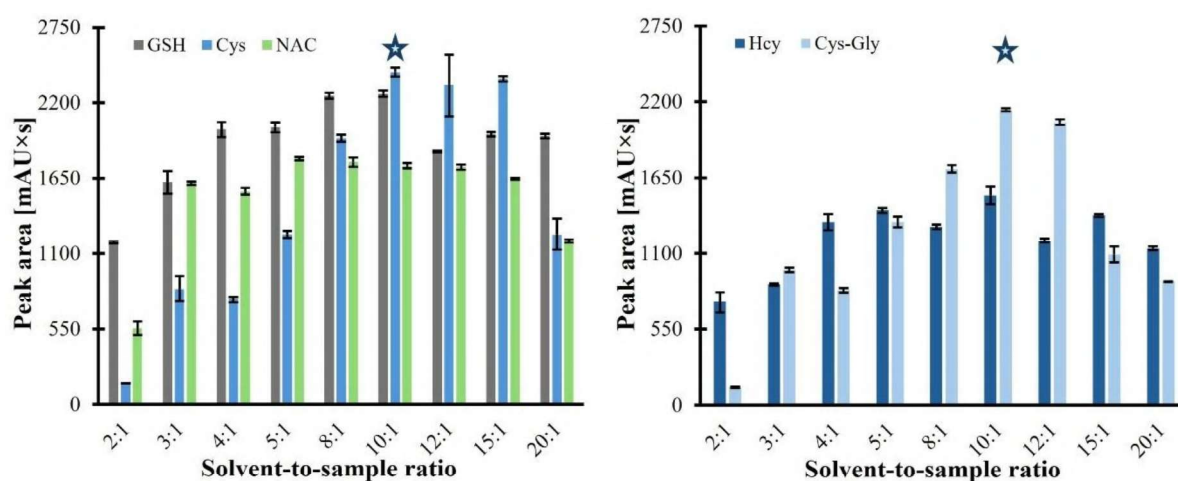


Figure 2. The effect of different dilution ratios on the LC-UV detector response for the 2-S-quinolinium derivatives of thiols. Values represent mean $\pm$ SD (n=3).

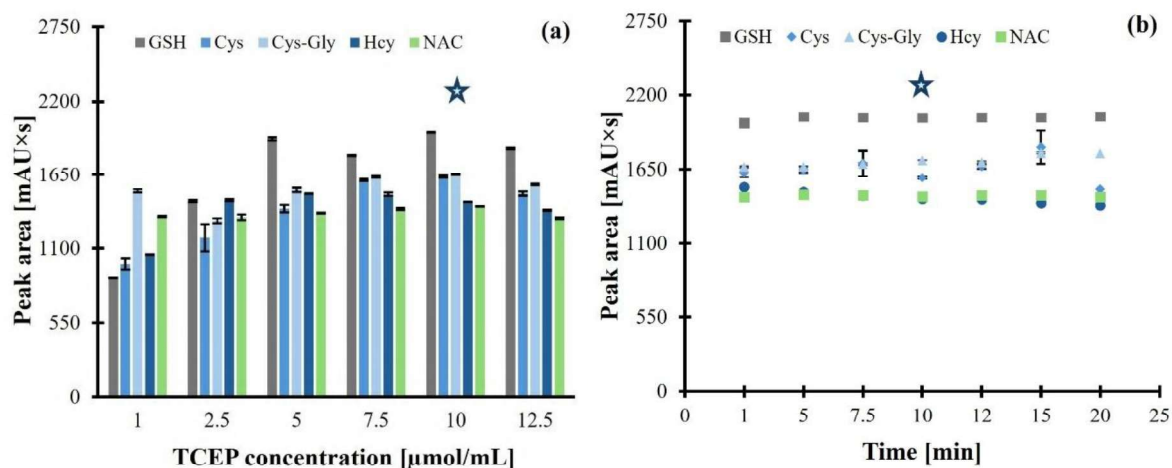


Figure 3. Optimization of the disulfide reduction step. (a) Effect of TCEP concentration on the reduction yield in berry extract. (b) Kinetic profile of the reduction reaction at 10 μmol/mL TCEP concentration on ice. Values represent the mean ± SD (n=3).

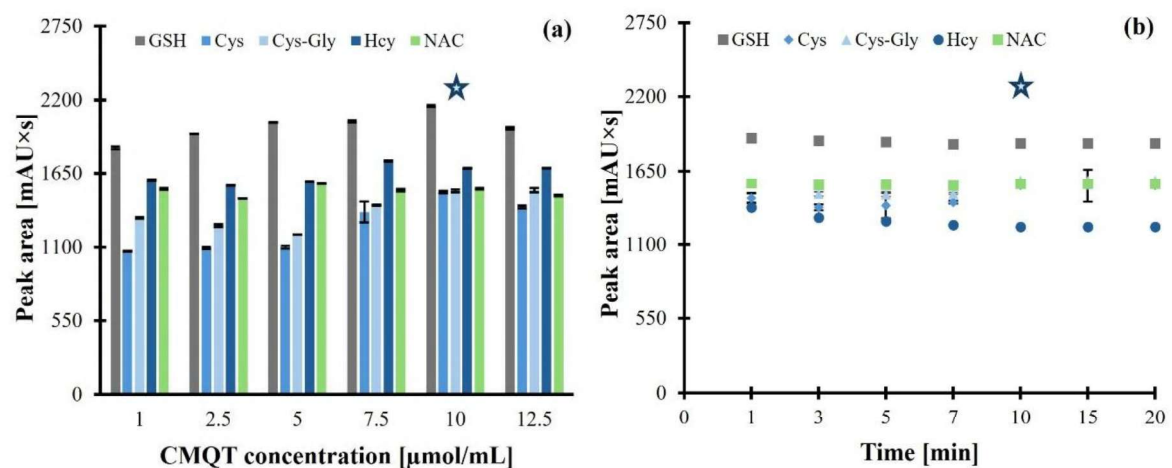


Figure 4. Optimization of the derivatization step. (a) Effect of CMQT concentration on the derivatization yield in berry extract. (b) Kinetic profile of the derivatization reaction at 10 μmol/mL CMQT concentration on ice. Values represent the mean ± SD (n=3).

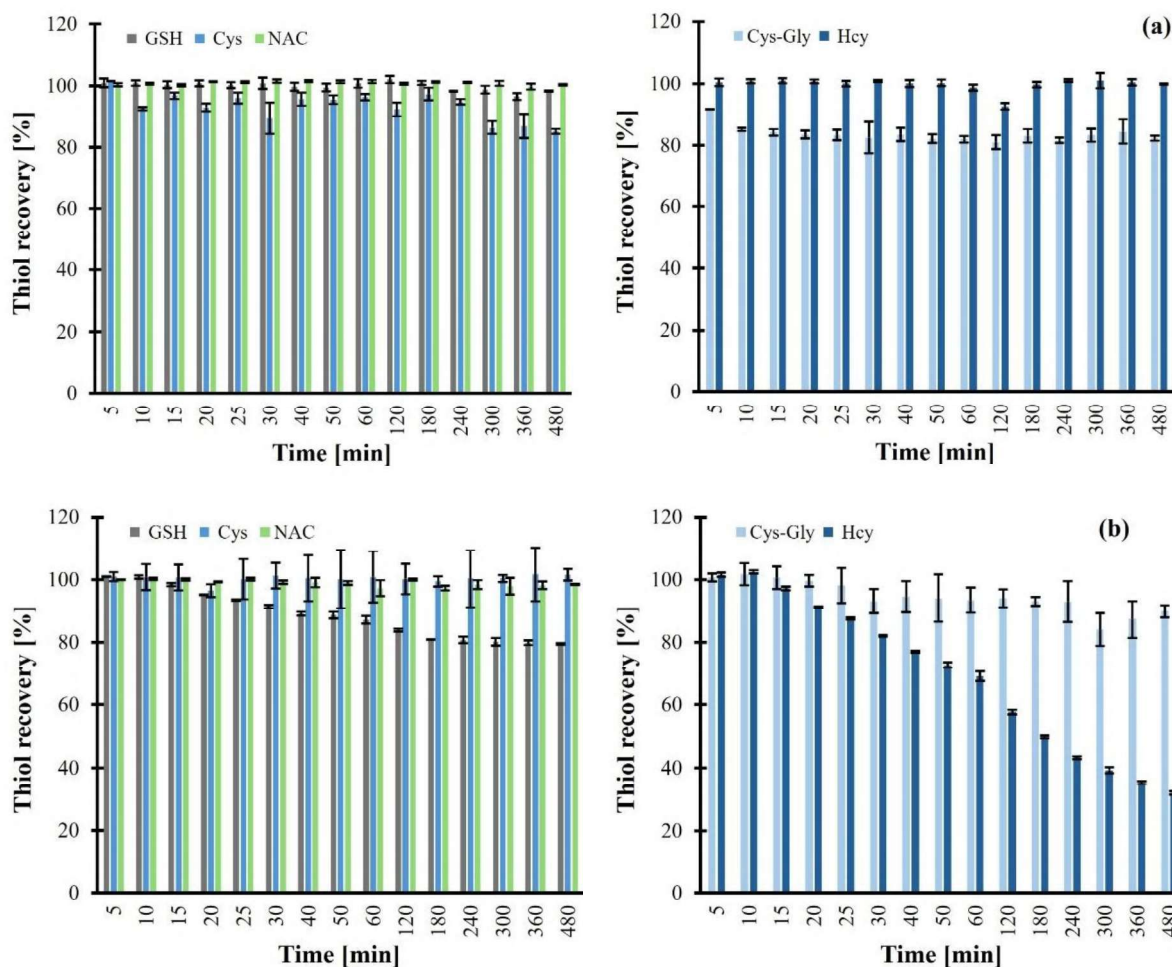


Figure 5. Stability of thiols in berry homogenates during storage on ice. (a) Total thiol assay (samples treated with TCEP and CMQT) and (b) reduced thiol assay (samples treated with CMQT). Data are presented as mean $\pm$ SD (n=3).

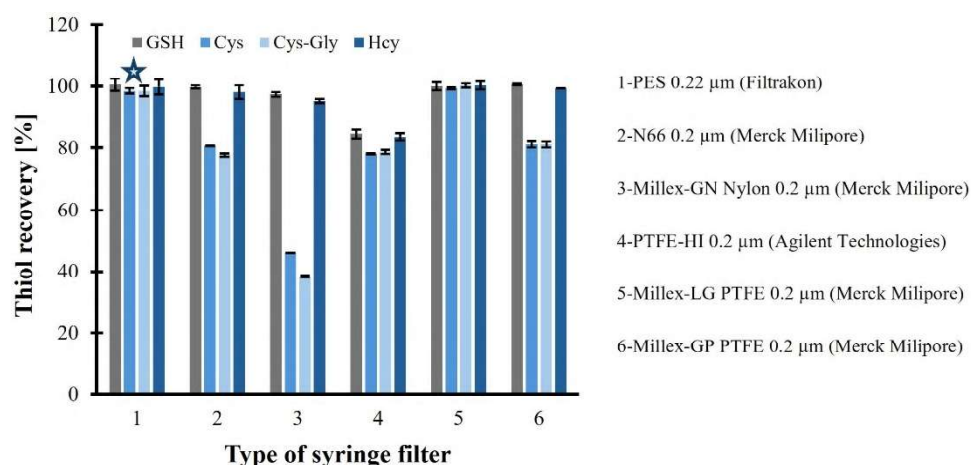


Figure 6. Effect of syringe filter material on the recovery of 2-S-quinolinium derivatives of analytes from test samples prior to LC-UV analysis. Data are presented as mean $\pm$ SD (n=3) for various concentration levels.

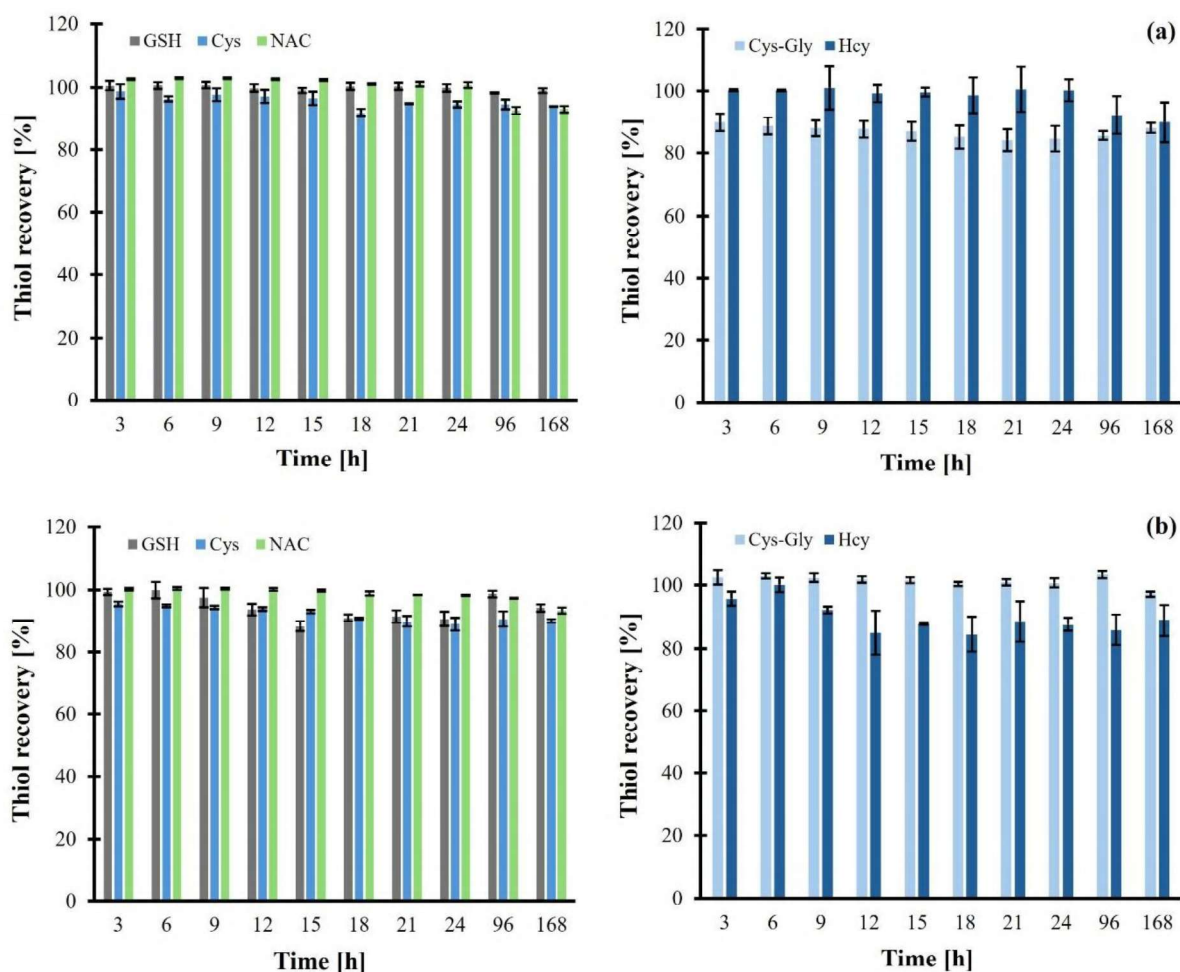


Figure 7. Stability of 2-S-quinolinium derivatives of Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, and NAC in samples during storage at 25 °C. (a) Total thiol assay and (b) reduced thiol assay. Values represent the mean $\pm$ SD (n=3).

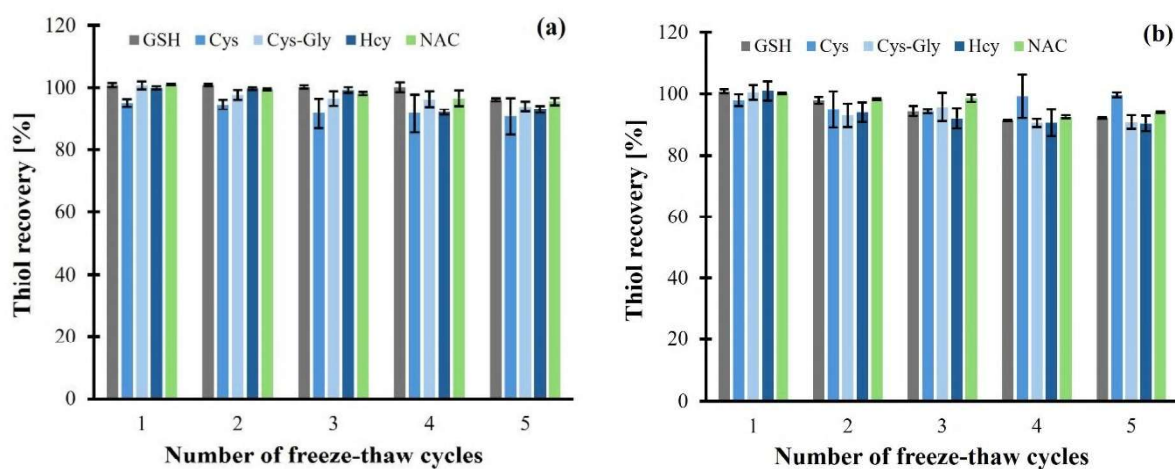


Figure 8. Freeze-thaw stability of 2-S-quinolinium derivatives of Cys, Cys-Gly, GSH, Hcy, and NAC in processed samples. (a) Total thiol assay and (b) reduced thiol assay. Values represent the mean $\pm$ SD (n=3).

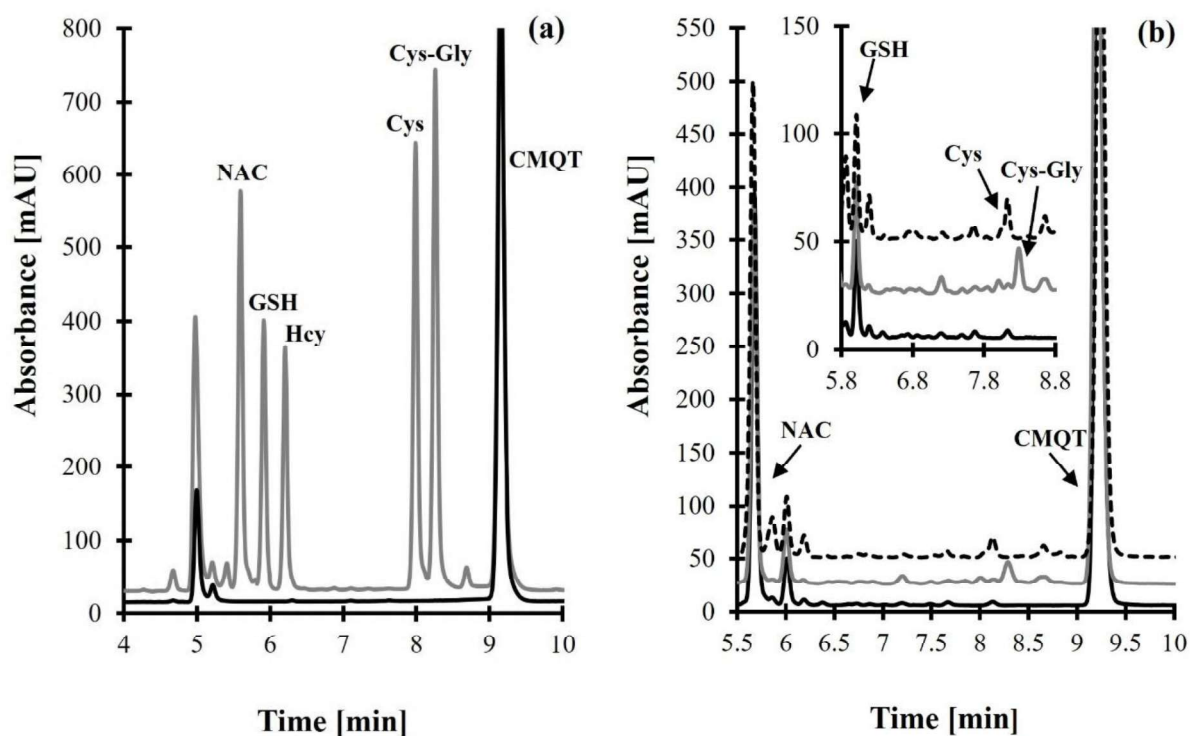


Figure 9. Representative chromatograms of standard solutions and berry fruit samples prepared according to the procedure described in Section 2.6. Chromatographic conditions were as specified in Section 2.7. (a) Blank standard solution (black line) and a standard solution containing GSH, Hcy, Cys, Cys-Gly, and NAC (100 $\mu\text{mol/L}$ each, grey line). (b) Strawberry (black dashed line), raspberry (grey line), and white gooseberry (black line). The retention times for NAC, GSH, Hcy, Cys, and Cys-Gly are 5.6, 6.0, 6.2, 8.0, and 8.2 min, respectively.

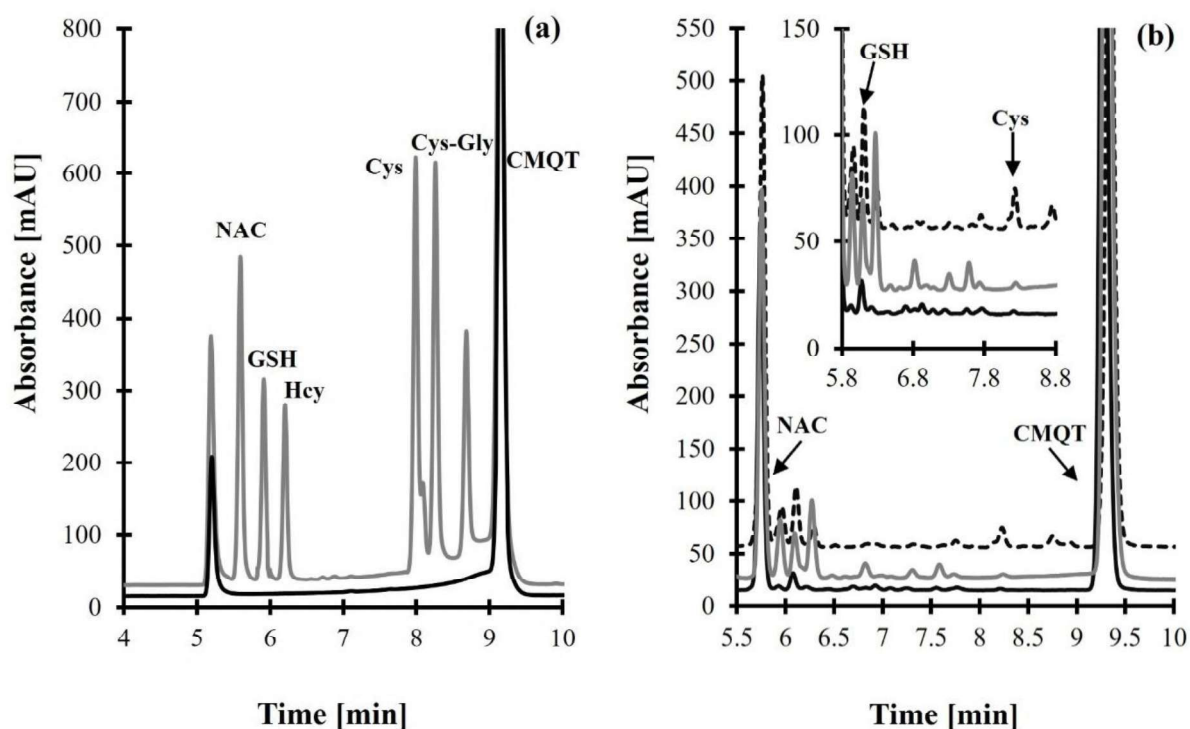


Figure 10. Representative chromatograms of standard solutions and berry fruit samples prepared according to the procedure described in Section 2.5. Chromatographic conditions were as specified in Section 2.7. (a) Blank standard solution (black line) and a standard solution containing GSH, Hcy, Cys, Cys-Gly, and NAC (100 $\mu\text{mol/L}$ each, grey line). (b) Strawberry (black dashed line), white currant (grey line), and white gooseberry (black line). The retention times for NAC, GSH, Hcy, Cys, and Cys-Gly are 5.6, 6.0, 6.2, 8.0, and 8.2 min, respectively.

1 **Table 1.** Validation data corresponding to intra-day measurements (n=3).

Analyte	Regression equation (R)	CV slope (%)	Range (μmol/L)	Precision (%)		Accuracy (%)		LOQ (μmol/L)
				Min	Max	Min	Max	
Total thiol assay								
Cys	y=0.0117x+0.0818 (0.9991)	2.71	0.5-20	1.77	5.40	97.09	120.21	0.5
Cys-Gly	y=0.0091x-0.0014 (0.9977)	7.70	0.5-20	1.74	7.90	89.74	117.07	0.5
GSH	y=0.0049x+0.1071 (0.9999)	2.32	0.5-50	0.34	4.19	84.33	118.36	0.5
Reduced thiol assay								
Cys	y=0.0078x+0.0261 (0.9989)	7.97	0.5-20	1.52	12.36	88.09	105.89	0.5
Cys-Gly	y=0.0084x-0.0021 (0.9980)	1.78	0.5-20	0.84	9.52	83.08	107.72	0.5
GSH	y=0.011x+0.068 (0.9999)	2.24	0.5-50	0.55	3.26	81.16	109.24	0.5

2 *Abbreviations:* Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; CV, coefficient of variation; GSH, glutathione; LOQ,
3 limit of quantification; R, correlation coefficient.

4

5 **Table 2.** Precision and accuracy data based on three-day measurements (n=3).

Analyte	Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	Precision (%)		Accuracy (%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Total thiol assay					
Cys	0.5	2.01	2.70	97.09	82.52
	2.5	3.03	1.67	108.78	102.99
	10	3.36	2.02	103.26	103.60
	20	5.40	2.10	99.53	101.91
Cys-Gly	0.5	6.17	5.03	117.07	95.33
	2.5	4.69	4.06	105.48	100.80
	10	6.11	4.56	89.74	99.61
	20	7.90	3.40	102.60	108.65
GSH	0.5	1.01	0.66	84.33	102.64
	2.5	1.44	1.66	113.22	109.88
	10	4.03	1.99	86.49	93.36
	50	4.19	3.08	99.97	101.54
Reduced thiol assay					
Cys	0.5	1.57	2.04	105.89	87.77
	2.5	7.80	4.11	88.09	102.14
	10	12.36	8.38	91.30	94.26
	20	7.76	7.38	100.72	102.97
Cys-Gly	0.5	5.13	6.45	83.08	83.49
	2.5	7.92	6.77	97.85	88.39
	10	0.84	6.27	101.14	99.26
	20	9.52	8.52	107.34	102.36
GSH	0.5	0.55	3.07	81.16	104.99
	2.5	3.26	6.42	86.71	87.65
	10	3.21	3.44	106.42	88.38
	50	2.22	7.38	100.17	99.71

6 *Abbreviations:* Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; GSH, glutathione.

8 **Table 3.** Total and reduced thiol content in berry superfruits. Values represent the mean $\pm$ SD (n=3).

Berry type	Total thiol content ($\mu\text{g} \pm \text{SD/g berry}$)				Reduced thiol content ($\mu\text{g} \pm \text{SD/g berry}$)			
	Cys	Cys-Gly	GSH	Hcy	Cys	Cys-Gly	GSH	Hcy
Blackberry	1.95 $\pm$ 0.31	ND	81.85 $\pm$ 1.27	ND	0.89 $\pm$ 0.13	ND	34.66 $\pm$ 0.44	ND
Black elderberry	13.62 $\pm$ 2.55	ND	38.06 $\pm$ 6.07	ND	2.97 $\pm$ 0.46	ND	7.93 $\pm$ 0.53	ND
Blueberry	3.57 $\pm$ 0.29	ND	45.44 $\pm$ 2.29	ND	0.55 $\pm$ 0.02*	ND	1.78 $\pm$ 0.02	ND
Chokeberry	ND	ND	59.21 $\pm$ 5.25	ND	ND	ND	25.29 $\pm$ 0.60	ND
Cranberry	11.28 $\pm$ 0.32	ND	97.82 $\pm$ 3.46	ND	1.07 $\pm$ 0.19	ND	4.03 $\pm$ 0.21	ND
Black currant	9.32 $\pm$ 1.52	ND	121.07 $\pm$ 4.90	ND	0.96 $\pm$ 0.08	ND	37.40 $\pm$ 1.51	ND
Red currant	23.30 $\pm$ 2.18	ND	122.26 $\pm$ 4.01	ND	4.28 $\pm$ 1.25	ND	35.73 $\pm$ 1.62	ND
White currant	3.23 $\pm$ 0.18	ND	45.03 $\pm$ 3.72	ND	1.17 $\pm$ 0.20	ND	10.33 $\pm$ 0.12	ND
Forest berry	0.62 $\pm$ 0.57*	27.31 $\pm$ 0.07	211.94 $\pm$ 5.44	ND	0.41 $\pm$ 1.67*	2.33 $\pm$ 0.07	15.05 $\pm$ 0.66	ND
White gooseberry	4.71 $\pm$ 0.26	ND	151.03 $\pm$ 2.73	ND	2.35 $\pm$ 0.22	ND	27.01 $\pm$ 0.31	ND
Red gooseberry	2.99 $\pm$ 0.16	ND	343.55 $\pm$ 14.20	ND	1.22 $\pm$ 0.37	ND	17.46 $\pm$ 2.34	ND
Haskap berry	6.84 $\pm$ 0.68	129.38 $\pm$ 0.12	56.50 $\pm$ 4.42	ND	0.38 $\pm$ 0.63*	4.76 $\pm$ 0.12	21.72 $\pm$ 0.45	ND
Raspberry	2.82 $\pm$ 0.09	116.10 $\pm$ 0.77	168.63 $\pm$ 0.93	ND	0.77 $\pm$ 0.05	ND	35.95 $\pm$ 0.26	ND
Strawberry	22.09 $\pm$ 0.48	ND	214.60 $\pm$ 1.56	ND	9.80 $\pm$ 0.70	ND	25.65 $\pm$ 0.96	ND
Wild strawberry	3.58 $\pm$ 0.52	ND	23.32 $\pm$ 0.84	ND	1.00 $\pm$ 0.14	ND	6.74 $\pm$ 0.30	ND

9 *Abbreviations:* Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; GSH, glutathione; Hcy, homocysteine; SD, standard deviation. Legend: (*) estimated concentration below lower LOQ,

10 ND, not detected.

Publikacja [D6]:

M. Gaweł, R. Głowacki, J. Piechocka, The first LC-ESI-MS/MS-based method(s) for the determination of reduced and grand total thiols in berry superfruits (*Food Chemistry, w recenzji*)

W kolejnych badaniach dotyczących określania zawartości związków tiolowych w owocach jagodowych wykorzystałam technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS), charakteryzująca się wysoką czułością oraz niskimi granicami wykrywalności i oznaczalności, co stanowi istotną przewagę w przypadku tego typu oznaczeń. Niniejsza praca przedstawia metodę oznaczania zarówno zredukowanych jak i całkowitych form tioli w próbkach owoców jagodowych dostępnych na rynku polskim.

Przygotowanie próbek w ramach opracowanej metody obejmowało kilka kluczowych etapów, w tym: homogenizację próbki owocu, redukcję wiązań disiarczkowych (w przypadku oznaczania całkowitej zawartości tioli), rozcieńczenie oraz filtrację. Ze względu na specyfikę analizowanych matryc oraz ich znaczne zróżnicowanie pod względem pH i zawartości wody, konieczne było zastosowanie wzorca wewnętrznego (IS), co pozwoliło na uzyskanie odpowiedniej powtarzalności i odtwarzalności wyników. W celu zapewnienia jednorodności próbek owoców, jednym z kluczowych etapów ich przygotowania była homogenizacja prowadzona w odpowiednio dobranym medium. W omawianej metodzie zastosowałam 0,1% roztwór kwasu mrówkowego (FA). Optymalny stosunek masy owocu do objętości FA ustaliłam na poziomie 1:2 (m/v), co umożliwiało precyzyjne pipetowanie homogenatu przy jednoczesnym ograniczeniu nadmiernego rozcieńczenia próbki. Cały proces homogenizacji prowadziłam w warunkach chłodzenia na lodzie w celu ograniczenia degradacji enzymatycznej analitów. W przypadku oznaczania całkowitej zawartości tioli kluczowym etapem było przeprowadzenie redukcji wiązań disiarczkowych. Podobnie jak w opisywanej powyżej metodzie [D5], zdecydowałam się na wykorzystanie *tris*(2-karboksyetylo) fosfiny (TCEP). Zoptymalizowałam najważniejsze parametry wpływające na wydajność reakcji, tj. stężenie reduktora oraz czas inkubacji. Badania kinetyczne wykazały, że reakcja przebiega w czasie 7,5 minuty przy stężeniu TCEP wynoszącym 10 mmol/l. W analizach rutynowych

przyjęłam jednak wartość 10 minut, co umożliwiało efektywne zarządzanie czasem podczas przygotowywania większych serii próbek. Co ważne, w przypadku oznaczania całkowitej zawartości tioli homogenizację prowadziłam równocześnie z procesem redukcji wiązań disiarczkowych. Uzyskane po odwirowaniu roztwory przed analizą rozcieńczałam 0,1% FA, który to stanowił również jeden ze składników fazy ruchomej. Kompatybilność składu próbki ze stosowaną fazą ruchomą okazała się kluczowa podczas prowadzenia oznaczeń z wykorzystaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Bezpośrednio przed analizą chromatograficzną próbki poddawałam filtracji z wykorzystaniem filtrów membranowych.

W opisywanych badaniach anality rozdzielałam na kolumnie XBridge Glycan BEH Amide. Zastosowałam typową dla HPLC-MS/MS fazę ruchomą, składającą się z 0,1% FA w mieszaninie rozpuszczalnika A (woda/acetonitryl, 95:5, v/v) oraz rozpuszczalnika B (woda/acetonitryl, 5:95, v/v). Początkowy skład objętościowy eluentów wynosił 10:90 (A:B, v/v). Zastosowanie elucji gradientowej umożliwiło skuteczne rozdzielenie analitów oraz IS, który stanowiła cysteamina (MEA). Oznaczenia prowadziłam w trybie monitorowania wielokrotnych przejść jonowych (MRM) przy dodatniej jonizacji poprzez elektrorozpylanie. Dla każdego analitu wybrane zostały trzy przejścia MRM. Przejście odpowiadające jonowi o największej intensywności wykorzystałam do oznaczeń ilościowych, natomiast dwa pozostałe służyły do potwierdzenia tożsamości analitu (analiza jakościowa).

Opracowaną metodę, podobnie jak wcześniej opisane [D3,D4,D5] poddałam pełnej walidacji zgodnie z wytycznymi dla metod bioanalitycznych [64], a następnie zastosowałam do szeregu próbek owoców jagodowych dostępnych na rynku polskim.

Przedstawiona praca opisuje pierwszą metodę bazującą na technice HPLC-MS/MS, która umożliwia oznaczanie zarówno całkowitej jak i zredukowanej zawartości małowymagłych związków tiolowych w owocach jagodowych. Z praktycznego punktu widzenia uzyskane wyniki mogą mieć duże znaczenie w kontekście zdrowia publicznego oraz świadomych wyborów żywieniowych, wspierając podejmowanie decyzji dotyczących diety i konsumpcji produktów roślinnych. Spośród wszystkich związków badanych w owocach jagodowych, GSH okazał się dominującym. Co ważne, w porównaniu z opisaną powyżej metodą [D5], w niektórych owocach stwierdziłam obecność Hcy zarówno w formie utlenionej jak i zredukowanej.

The first LC-ESI-MS/MS-based method(s) for the determination of reduced and grand total thiols in berry superfruits

Marta Gawel^{1,2}, Rafał Głowacki^{1*}, Justyna Piechocka^{1*}

¹*University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry,
163/165 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland*

²*University of Lodz, Doctoral School of Exact and Natural Sciences, 12/16 Banacha Str.,
90-237 Łódź, Poland*

ORCID iD: 0009-0006-2241-6877 (M.G.), 0000-0003-0071-1470 (R.G.),

0000-0002-1160-3160 (J.P.)

marta.gawel@edu.uni.lodz.pl (M.G.), rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl (R.G.),

justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl (J.P.)

Corresponding authors

* Justyna Piechocka, University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, 163/165 Pomorska Str., 90-236 Lodz, Poland

E-Mail: justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl

Tel.: +48-42-635 5844

Fax: +48-42-635 5832

* Rafał Głowacki, University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, 163/165 Pomorska Str., 90-236 Lodz, Poland

E-Mail: rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl

Tel.: +48-42-635 5835

Fax: +48-42-635 5832

Abstract

The article presents the results of total and reduced glutathione (GSH), homocysteine (Hcy), cysteine (Cys), and cysteinyl-glycine (Cys-Gly) contents in berry fruits, obtained using an original method based on high-performance liquid chromatography with positive electrospray ionization tandem mass spectrometry detection (LC-ESI-MS/MS). The assay employs

cysteamine or cystamine as an internal standard when reduced or total thiol content is determined, respectively. Sample preparation primarily involves homogenization in 0.1% formic acid (FA), reduction of disulfide bonds with tris(2-carboxyethyl)phosphine (if total thiol content is determined) and filtration through polyethersulfone membrane. Chromatographic separation of the analytes is achieved within 10 min at 25 °C on an X-Bridge Glycan BEH Amide (100 × 2.1 mm, 2.5 µm) column using gradient elution. The mobile phase consists of 0.1% FA in a mixture of solvent A (water/acetonitrile, 95:5, v/v) and solvent B (water/acetonitrile, 5:95, v/v) delivered at a flow rate of 0.3 mL/min. The methods were validated according to ICH M10 on bioanalytical method validation guidelines. They were successfully applied to commonly consumed berries in Poland, such as strawberry, raspberry, blueberry, blackberry, forest berry, haskap berry, wild strawberry, currant, gooseberry, cranberry, chokeberry, and elderberry. In all analyzed berries, GSH was found to be the most abundant thiol. Cys was present in significantly lower concentrations. Cys-Gly and Hcy occurred in trace amounts and were not detected in all samples.

Keywords

aminothiols; antioxidants; berry fruits; high-performance liquid chromatography; mass spectrometry; superfruits

Abbreviations

ACN, acetonitrile; Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; CV, coefficient of variation; ESI, electrospray ionization; FA, formic acid; GSH, glutathione; Hcy, homocysteine; HILIC, high-performance hydrophilic interaction chromatography; IS, internal standard; LC, high-performance liquid chromatography; LOQ, limit of quantification; MEA, cysteamine; MeOH, methanol; MRM, multiple reaction monitoring mode; MS/MS, tandem mass spectrometry; PES, polyethersulfone; PP, polypropylene; SD, standard deviation; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine.

1. Introduction

The term “superfruits” is usually used to describe non-genetically modified, unprocessed fruits of natural origin that are exceptionally rich in essential nutrients with beneficial effects on the human health body (Chang et al., 2019; Liu et al., 2021; Nagaraja et al., 2026). Despite the widespread popularity of food products valued for their health-promoting properties, there is a notable lack of comprehensive data regarding their qualitative and quantitative composition.

Furthermore, specific information on the individual bioactive substances responsible for these health benefits remains scarce. While the analytical spectrum of compounds identified in superfruits is broad, research primarily focuses on monitoring vitamins, minerals, and antioxidants (Chang et al., 2019; Liu et al., 2021; Nagaraja et al., 2026). Among these, polyphenols remain the most thoroughly studied group to date.

Sulfur-containing compounds, such as glutathione (GSH), cysteine (Cys), cysteinyl-glycine (Cys-Gly), and homocysteine (Hcy) are well-known antioxidants that play a critical role in cellular redox homeostasis (Głowacki et al., 2022). In humans, these four compounds are often analyzed collectively due to their chemical relationship within the γ -glutamyl cycle (Głowacki et al., 2022; Isokawa et al., 2014; Piechocka, Wrońska, et al., 2020). Interestingly, despite being widely recognized for their antioxidant properties, berry fruits have not yet been the subject of comprehensive studies to confirm or exclude the presence of the full spectrum of these relevant thiols. Their specific thiol composition remains largely unmapped. Existing literature provides only fragmentary data, such as the presence of Cys and GSH in strawberries (Demirkol et al., 2004, 2008; H. Zhang et al., 2014) and blackberries (Huang et al., 2023; Jumakulova et al., 2025; Shah et al., 2025) or Cys in raspberries (S. Zhang et al., 2022) and blueberries (H. Zhang et al., 2014), leaving a significant gap in our understanding of these matrices. Furthermore, to the best of our knowledge, a significant analytical bottleneck exists as there is currently no established methodology capable of accurately quantifying both the reduced forms and the total thiol content within these complex plant tissues.

Thus, this research aims to develop and validate robust analytical methods based on high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the determination of both reduced and total thiols in berries. Then, the assays will be applied to screen various berries to establish the profiles of GSH, Cys, Cys-Gly, and Hcy in some commercially available “superfruits” on the Polish market. The study will encompass a wide range of samples, including strawberries, raspberries, blueberries, blackberries, forest berries, haskap berries, wild strawberries, currants (black, red, white), gooseberries (white and green), cranberries, chokeberries, and black elderberries. Filling this analytical gap will provide deeper insights into the nutritional biochemistry of these superfruits.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

Throughout the experiments commercially available and at least analytical reagent grade chemicals were used. Cys, GSH, Hcy, Cys-Gly, cysteamine (MEA), and their symmetrical

disulfides as well as tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water, acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and formic acid (FA) which served as mobile phase constituents suitable for LC-MS/MS were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Hydrochloric acid was obtained from POCH (Gliwice, Poland). To filter test samples, syringe filters with a 0.20 μ m polyethersulfone (PES) membrane (Merck Millipore, Vienna, Austria) were used.

2.2. Instrumentation

To analyze the test samples, an Agilent 1260 Infinity II LC system was used. The system was equipped with a flexible pump integrated with a vacuum degasser (model G7104C), a temperature-controlled sample storage unit combined with an automated sample injector (model G7129C), a column compartment (model G7116B) and a G6470B triple quadrupole MS/MS with Agilent JetStream ionization technology (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Instrument control, data acquisition, and analysis were performed using MassHunter software. The analytes were separated on an X-Bridge Glycan BEH Amide (100 $\times$ 2.1 mm, 2.5 μ m) column purchased from Waters Corporation (Milford, MA, USA).

For sample homogenization and centrifugation, an IKA T25 basic homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany) and a Mikro 220R centrifuge with a fast-cool function (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) were used. Samples were stored in an ultra-low-temperature freezer (Panasonic Healthcare Co., Sakata, Japan).

2.3. Stock solutions

All solutions throughout the experiment were prepared using LC-MS/MS grade solvents.

Stock solutions (0.1 mol/L) of Cys, GSH, Hcy, Cys-Gly, MEA, and their symmetrical disulfides were prepared weekly by dissolving the required amount of each solid in 0.5 mol/L hydrochloric acid. These solutions were stored in polypropylene (PP) microcentrifuge tubes at 4 °C. Working solutions were prepared daily by diluting the stocks with 0.05 mol/L hydrochloric acid and were used without delay.

The mobile phase components, specifically solvent A (0.1% FA in a mixture of water and ACN, 95:5, v/v) and solvent B (0.1% FA in a mixture of water and ACN, 5:95, v/v) along with the needle rinse solution (water/MeOH/ACN, 50:25:25, v/v/v), were prepared weekly. The solutions were stored in tightly sealed amber glass bottles at ambient temperature.

A 0.25 mol/L stock solution of TCEP was freshly prepared by dissolving the appropriate amount of TCEP powder in deionized water.

The 0.1% FA and 0.05 mol/L or 0.5 mol/L hydrochloric acid solutions were prepared by diluting the concentrated reagents with water. These were stored in tightly sealed glass flasks at ambient temperature and used within one month.

2.4. Samples collection

Berry fruits were collected from organic domestic allotment gardens during the summertime. The fruits were not washed; immediately after harvesting, they were frozen at -80 °C and stored for no longer than six months. Prior to analysis, the fruits were thawed at room temperature and processed without delay.

The samples included popular superfruits commercially available on the Polish market, such as strawberry, raspberry, blueberry, blackberry, forest berry, haskap berry, wild strawberry, currant (black, red, white), gooseberry (white and red), cranberry, chokeberry, and black elderberry.

2.5. Sample preparation for the determination of reduced thiols

A berry sample (~2 g) was mixed with 4 mL of ice-cold 0.1% FA in a 50 mL PP Falcon tube. The sample was spiked with 10 µL of MEA (10 mmol/L) acting as an internal standard (IS). The mixture was homogenized on ice for 1 min at low speed. Following homogenization, the sample was centrifuged at 12,000 × g for 1 min at 4 °C. For Cys, Cys-Gly, and Hcy an aliquot of the supernatant (25 µL) was transferred to a PP microcentrifuge tube and diluted with 975 µL of 0.1% FA. For GSH, 1 µL of supernatant was diluted with 999 µL 0.1% FA. The sample was filtered through a 0.20 µm PES syringe filter. Finally, 1 µL volume was injected into the LC-MS/MS system. Test samples were maintained in the autosampler at 10 °C.

2.6. Sample preparation for the determination of total thiols

A berry sample (~2 g) was mixed with 4 mL of ice-cold 0.1% FA in a 50 mL PP Falcon tube. The sample was spiked with 10 µL of MEA disulfide (5 mmol/L) as IS. Then, 160 µL of TCEP (0.25 mol/L) was added and the mixture was homogenized on ice for 1 min at low speed. Following homogenization, the sample was incubated for 10 min and centrifuged at 12,000 × g for 1 min at 4 °C. For Cys, Cys-Gly, and Hcy an aliquot of the supernatant (25 µL) was transferred to a PP microcentrifuge tube and diluted with 975 µL of 0.1% FA. For GSH, 1 µL of supernatant was diluted with 999 µL 0.1% FA. The sample was filtered through a 0.20 µm PES syringe filter. Finally, 1 µL volume was injected into the LC-MS/MS system. Test samples were maintained in the autosampler at 10 °C.

2.7. LC-MS/MS conditions

The chromatographic separations were performed at 25 °C using gradient elution (0-3 min, 90-50% solvent B; 3-5 min, 50-90% solvent B; 5-10 min, 90% solvent B) with the mobile phase delivered at a flow rate of 0.3 mL/min. After each injection, the needle and connecting tubing were washed with a needle rinse solvent for 15 s. Note: To ensure reproducibility of retention times and peak shapes, at least five blank injections running the full gradient program should be performed, followed by the analysis of study samples.

The MS/MS detector was operated in positive electrospray ionization (ESI) mode. The operating parameters were as follows: drying gas (nitrogen) temperature, 300 °C; drying gas (nitrogen) flow, 8 L/min; nebulizer pressure, 35 psi; sheath gas (nitrogen) temperature, 350 °C; sheath gas (nitrogen) flow, 11 L/min; capillary voltage, + 4000 V/-2500 V; nozzle voltage, 0 V/-1000 V. The effluent was monitored in multiple reaction monitoring (MRM) mode using three diagnostic transitions for each target compound (Table 1). The instrument was set to unit resolution within 1.20-2.50 min for MEA, 2.55-3.55 min for Cys-Gly and Hcy, 3.80-4.44 min for Cys, and 4.45-5.20 min time ranges for GSH. A dwell time of 100 ms or 50 ms was applied when three or six MRM transitions were monitored per segment, yielding approximately three scan cycles per second across the chromatographic peak. Detailed MRM detection conditions are summarized in Table 1.

3. Results and discussion

The article describes the first LC-ESI-MS/MS method(s) for the determination of total and reduced GSH, Hcy, Cys, and Cys-Gly in berry fruits. The following section details the results obtained during method development, validation and its application to superfruits, presented in the chronological order of the experiments.

3.1. Sample preparation

Sample preparation involves the addition of MEA acting as an IS (or MEA disulfide if total thiol content is determined), homogenization in 0.1% FA, and reduction of disulfide bonds with TCEP (if total thiol content is determined). The mixture is then diluted with 0.1% FA and filtered through a PES membrane prior to LC-MS/MS analysis. These sample preparation steps are typical for the determination of both reduced and total thiol content in various matrices (Głowacki et al., 2022; Isokawa et al., 2014; Kuśmierek et al., 2009; Piechocka, Wrońska, et al., 2020; Toyo'oka, 2009; Tsiasioti & Tzanavaras, 2023). Importantly, the assays do not employ

derivatization. The procedures were developed using strawberries as a model matrix spiked with Cys, GSH, Hcy, and Cys-Gly (or their respective symmetrical disulfides, 625 nmol/L) when the assay for reduced and total thiol content was optimized, respectively. The standard berry sample mass was 2 g. Whole fruit samples were assayed, reflecting the form in which they are typically consumed.

3.1.1. Addition of internal standard

MEA was employed as an IS to compensate for variability throughout the analytical workflow. Existing literature provides no evidence of its natural occurrence in plants. To date, MEA has been utilized as an IS for thiol analysis in biological samples via LC (Accinni et al., 1998; Daskalakis et al., 1996). As demonstrated during method validation, the use of MEA improves result repeatability and reproducibility.

3.1.2. Homogenization

To ensure sample homogeneity, whole berry fruits were homogenized using a rotor-stator homogenizer. Homogenization was performed on ice to limit enzymatic degradation, as recommended in the literature (Chwatko et al., 2014; Demirkol & Cagri-Mehmetoglu, 2008; Tsiasioti & Tzanavaras, 2023). Solvents such as ACN, 0.1% FA, and MeOH were tested, serving both as eluent components for LC-MS/MS and protein precipitating agents. A 1:2 (w/v) sample-to-solvent ratio was employed to produce a homogenate suitable for precise and accurate pipetting. This approach maintains sample concentration and ensures an acidic pH, which enhances the stability of thiols (Bald et al., 2004; Kuśmierek et al., 2008; Wu et al., 2021). In this study, pH of homogenates varied from 2 to 3 (measured using indicator paper). Analytes in homogenates stored on ice remained stable up to 1 h in samples treated with TCEP, and at least for 6 h in untreated samples, across all examined concentrations. Recoveries for the total thiol assay were 116.60%, 90.63%, 119.39%, and 119.73% for, Cys, Cys-Gly, GSH, and Hcy, respectively (Figure 1a), while for the reduced thiol assay, they reached 96.62%, 94.02%, 108.30%, 92.73% (Figure 1b). Furthermore, it was observed that a 1-min homogenization period in 0.1% FA was sufficient for sample uniformity and efficient analyte extraction (Figure 2). After centrifugation, the supernatant was diluted 40 times for Cys, Cys-Gly, and Hcy and 1,000 times for GSH with 0.1% FA and filtered (Figure 3). Sample dilution factors were optimized empirically. For Cys, Cys-Gly, and Hcy, a 1-to-40 dilution resulted in sharp, symmetrical peaks and linear responses. For GSH, a 1,000-fold dilution was necessary to avoid signal clipping and poor peak symmetry observed at lower dilutions, ultimately providing

excellent linearity for this analyte.

3.1.3.Reduction of disulfide bonds

To determine the total thiol content, samples were treated with a reducing agent. Based on our previous experience (Chwatko et al., 2014; Głowacki et al., 2016; Kuśmierek et al., 2011; Piechocka et al., 2023; Piechocka, Wieczorek, et al., 2020; Piechocka, Wrońska, et al., 2020; Stachniuk et al., 2016), TCEP was employed to cleave disulfide bonds. The main factors affecting the disulfide reduction yield, namely the TCEP concentration (Figure 4a) and reaction time (Figure 4b), were optimized. Optimization was carried out using TCEP concentrations ranging from 1 to 15 mmol/L in the reaction mixture, with incubation times of 2.5-30 min on ice. Kinetic studies revealed that the reaction reached completion within 7.5 min at a TCEP concentration of 10 mmol/L. A reaction time of 10 min was selected for routine analysis to facilitate the efficient processing of sample batches. For the determination of total thiol content, homogenization was performed simultaneously with the reduction of disulfide bonds.

3.1.4.Filtration

Prior to LC analysis, the test samples were purified by filtration. Various syringe filters, including nylon, polytetrafluoroethylene, and PES with nominal porosities of 0.20-0.22 μm , were evaluated (Figure 5). Among these, the PES filter was selected as it yielded the highest recovery (98.14-99.57%) and excellent reproducibility, independent of analytes' concentration.

3.1.5.Stability of test samples

Thiol stability was evaluated at 10 °C at low, middle and high concentration levels (ICH, 2022). Stability testing indicated that total and reduced thiols remain stable for 48 h and 12 h, respectively, across all examined concentrations. For the total thiol assay, recoveries of 117.62%, 108.96%, 112.82%, 114.25% were obtained for Cys, Cys-Gly, GSH, and Hcy, respectively (Figure 6a), while for the reduced thiol assay, they reached 90.43%, 106.88%, 103.73%, 88.01% (Figure 6b). Furthermore, freeze-thaw stability testing demonstrated that samples subjected to up to two freeze-thaw cycles provide reliable results. In the total thiol assay, recoveries of 88.48%, 99.51%, 110.50%, 92.69% were observed for Cys, Cys-Gly, GSH, and Hcy, respectively (Figure 7a). In the case of reduced thiol assay, the recoveries reached 119.35%, 99.78%, 89.44%, 85.45% for Cys, Cys-Gly, GSH, and Hcy, respectively (Figure 7b). These findings align with the well-established stability of reduced thiols under acidic conditions (Bald et al., 2004; Kuśmierek et al., 2008; Wu et al., 2021). In this study, the test sample pH

was estimated to be approximately 2-3.

3.2. Chromatographic and detection conditions

The assays utilize high-performance hydrophilic interaction chromatography (HILIC) coupled with positive ESI-MS/MS detection in MRM mode to quantify GSH, Hcy, Cys, and Cys-Gly in berry superfruits.

3.2.1. Selection of separation conditions

So far, it has been demonstrated that hydrophilic compounds such as GSH, Hcy, Cys, Cys-Gly, and MEA can be effectively separated using HILIC (Cao et al., 2015; Zhu et al., 2020). In this study, the analytes were separated on an X-Bridge Glycan BEH Amide column (Cao et al., 2015; Zhu et al., 2020), which was also previously employed in our research on plasma 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid, an adduct of Cys and the active form of vitamin B6, pyridoxal 5'-phosphate (Gawel et al., 2024). A typical LC-MS/MS mobile phase was used, consisting of 0.1% FA in a mixture of solvent A (water/ACN, 95:5, v/v) and solvent B (water/ACN, 5:95, v/v). By employing gradient elution, effective separation of analytes and IS was achieved within 5 min at room temperature (Figure 8a-b). Each target compound generated a single chromatographic peak, and the elution profiles of blank samples were free from interferences at the retention times of the analytes (Figure 8a). The elution order was as follows: MEA, Cys-Gly, Hcy, Cys, and GSH. Under these conditions, the peak symmetry factors for MEA, Cys-Gly, Hcy, Cys, and GSH ranged from 0.90-1.22, 1.19-1.23, 1.24-1.26, 1.22-1.27, and 1.12-1.22, respectively.

3.2.2. Selection of detection conditions

The LC-MS/MS analyses were performed in positive ESI mode, as analytes generate both positive and negative ions, with singly protonated precursor ions $[M+H]^+$ being the most abundant. Qualitative and quantitative analyses were performed in MRM mode. MRM transitions and ESI-MS/MS conditions were optimized using Agilent MassHunter Optimizer software via on-column injection of individual standard solutions. Three MS/MS transitions per analyte were selected. To confirm the identity of the analytes and IS in real samples, retention times and MRM transition ratios were compared with those obtained from analytical standards. The primary MRM transition of each target compound was used for quantification, while the secondary transitions served for identification. Detailed MRM parameters and ESI-MS/MS conditions are provided in section 2.7 and summarized in Table 1.

3.3. Validation of the method

Validation was performed according to the latest International Council for Harmonisation guidelines for bioanalytical method validation (ICH, 2022). Parameters such as specificity, linearity, intra- and inter-day precision and accuracy, the limit of quantification (LOQ), carry-over, matrix effect, and reinjection reproducibility were evaluated.

3.3.1. Specificity

The specificity of the method was evaluated using the spiking approach as the target thiols are endogenous components of berry superfruits. Berry samples with known basal concentrations of reduced/total GSH, Hcy, Cys, and Cys-Gly were spiked with analytical standards at low, middle, and high LOQ. The absence of additional interfering peaks and the consistent proportional increase in peak areas following fortification demonstrated the methods' ability to accurately distinguish the analytes from the complex matrix components. The specificity was confirmed by comparing retention times and peak shapes in both non-spiked and spiked samples. Method specificity was further confirmed by monitoring the ion ratios between the quantifier and qualifier MRM transitions, which remained within $\pm 20\%$ of the values obtained for analytical standards.

3.3.2. Linearity

An IS calibration method was employed to examine the calibration ranges as specified in Table 2. The concentrations of analytes in the calibration standards were chosen based on pilot results. Calibration curves consisted of blank/zero samples and eight calibrators, analyzed in triplicate over three consecutive days. To describe the concentration-response relationship (ratio of analyte peak area to IS peak area), a least-squares regression model was used. The calibration standards fitted well into the linear regime, with correlation coefficients of at least 0.9945. Intra- and inter-day variability in the slopes of the regression lines was observed. For the total thiol assay, the coefficient of variation (CV) of the slopes ranged from 1.41% to 3.73% for all analytes. In the case of the reduced thiol assay, the CV of slopes varied from 0.36% to 3.47%. This indicates that the LC-MS/MS assays are affected by matrix components (Table 2).

3.3.3. Precision and accuracy

The precision and accuracy of the methods were assessed during linearity evaluation. Precision was expressed as the CV, while accuracy was calculated as the percentage of nominal

concentration (recovery). For total thiol assay, the accuracy ranged from 84.81% to 117.29% and 90.60% to 114.98%, while precision varied from 0.30% to 12.98% and 3.13% to 11.00% for intra- and inter-day measurements, respectively. In the case of reduced thiol assay, the accuracy ranged from 87.26% to 113.06% and 87.11% to 114.28%, while precision varied from 0.83% to 16.90% and 2.52% to 8.86% for intra- and inter-day measurements, respectively (Table 3).

3.3.4. The limit of quantification

The LOQ was established based on the lowest point of the calibration range (Table 2). This concentration yielded a reproducible detector response at least 10-fold higher than the baseline signal, with high levels of precision and accuracy for all analytes. The precision did not exceed 16.90% and accuracy ranged from 84.81% to 117.29%.

3.3.5. Carry-over effect

No signal attributable to GSH, Hcy, Cys, Cys-Gly, or MEA was detected in blank samples analyzed immediately following the upper LOQ calibrator, confirming that the method is free from carry-over effects.

3.3.6. Matrix effect

The matrix effect was evaluated by comparing calibration curves from six independent sources of strawberries and five other berry species (blackberry, black currant, blueberry, cranberry, raspberry) against a calibration curve in a surrogate matrix (0.1% FA). The CV of the slopes of the regression lines was 32.24%, indicating a significant matrix effect. Due to the detected interspecies variability, a single-point standard addition method combined with internal standardization was employed to quantify thiols in the berries.

3.3.7. Reinjection reproducibility

Reinjection reproducibility was evaluated by monitoring retention times and peak areas. Low, middle, and high-quality control samples were analyzed in ten replicate injections. Regarding retention times, the CV values were 1.69% for MEA, 0.09% for Cys-Gly, 0.10% for Hcy, 0.06% for Cys, and 0.07% for GSH, regardless of the tested concentration. The mean CV values for peak areas were 0.01% for MEA, 0.01% for Cys-Gly, 0.03% for Hcy, 0.02% for Cys, and 0.18% for GSH, indicating that the samples can be reinjected at least 10 times (acceptance criterion: $CV \leq 5\%$).

3.4. Application of the method

The LC-MS/MS assays were employed to determine reduced and total levels of Cys, Hcy, GSH, and Cys-Gly in several superfruits. A single-point standard addition method combined with internal standardization was used to compensate for matrix effects and establish analyte levels in the samples. The concentration of each analyte was calculated using the following formula: $C_x = (Y_x \times C_{IS}) / (Y_{IS} - Y_x)$, where C_x represents the analyte concentration in the berry sample, Y_x is the signal ratio of analyte to the IS in the sample, C_{IS} is the concentration of added IS, and Y_{IS} is the signal ratio in the spiked sample. The estimated concentrations of reduced and total Cys, Hcy, GSH, and Cys-Gly are presented in Table 4. To the best of our knowledge, this represents the initial data on thiol levels in berry superfruits.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this study presents the first LC-MS/MS methods for the determination of both total and reduced GSH, Hcy, Cys, and Cys-Gly in a wide range of berry superfruits. Consequently, it provides inaugural data regarding the thiol content – a group of valuable antioxidants - in these fruits. In all analyzed berries, GSH was found to be the most abundant thiol. Cys was present in significantly lower concentrations, while Cys-Gly and Hcy occurred in trace amounts and were not detected in all samples. From a practical standpoint, our results are highly relevant to public health and health-conscious consumers, potentially informing dietary choices and purchasing decisions. The developed assays possess the necessary characteristic to become a robust tool for evaluating the impact of food processing on antioxidant levels. Furthermore, the streamlined sample preparation procedure and excellent analyte stability at every stage of handling represent a significant advantage of these methodologies. Regarding the reduced thiol assay, the entire sample preparation and analysis protocol takes about 12 min and consumes approximately 8.0 mL chemicals. Similarly, the total thiol assay takes only 22 min and requires no more than 8.2 mL of inexpensive, low-toxicity, and commercially available reagents. This makes the methods highly well-suited for routine food quality control.

Supplementary material: Not applicable.

Author contributions: **M.G.:** Investigation, Validation, Resources, Visualization, Data curation, Project administration, Funding acquisition. **R.G.:** Conceptualization, Substantive

advice, Critical review, Funding acquisition. **J.P.:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Writing – review and editing, Supervision, Project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process: During the preparation of this work the authors did not use generative AI and AI-assisted technologies.

Funding: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors acknowledge financial support from the University of Lodz (B2511100000234.01 and B2510009000301.07).

Institutional review board statement: Not applicable.

Informed consent statement: Not applicable.

Data availability statement: Essential data are contained within the article. In addition, the dataset generated and analyzed during this study, which contributed to the article, can be made available by the corresponding author upon reasonable request provided that the request does not compromise intellectual property interests. Samples are not available from the authors.

Acknowledgments: The authors thank all volunteers for providing samples of home-grown berry fruits.

References:

- Accinni, R., Campolo, J., Bartesaghi, S., De Leo, G., Lucarelli, C., Cursano, C. F., & Parodi, O. (1998). High-performance liquid chromatographic determination of total plasma homocysteine with or without internal standards. *Journal of Chromatography A*, 828, 397–400. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00661-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00661-X)
- Bald, E., Chwatko, G., Głowacki, R., & Kuśmierek, K. (2004). Analysis of plasma thiols by

- high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1032, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.030>
- Cao, Z., Sun, L., Mou, R., Zhou, R., Zhu, Z., & Chen, M. (2015). A novel method for the simultaneous analysis of seven biothiols in rice (*Oryza sativa* L.) using hydrophilic interaction chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 976–977, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.007>
- Chang, S. K., Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2019). Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects - a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 1580–1604. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1422111>
- Chwatko, G., Kuźniak, E., Kubalczyk, P., Borowczyk, K., Wyszczelska-Rokiel, M., Głowacki, R., Cofino, W. P., Havel, L., Kizek, R., Trnkova, L., & Kizek, R. (2014). Determination of cysteine and glutathione in cucumber leaves by HPLC with UV detection. *Analytical Methods*, 6, 8039–8044. <https://doi.org/10.1039/c4ay01574f>
- Daskalakis, I., Lucock, M. D., Anderson, A., Wild, J., Schorah, C. J., & Levene, M. I. (1996). Determination of plasma total homocysteine and cysteine using HPLC with fluorescence detection and an ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulphonate (SBD-F) derivatization protocol optimized for antioxidant concentration, derivatization reagent con. *Biomedical Chromatography*, 10, 205–212. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0801\(199609\)10:5<205::AID-BMC589>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0801(199609)10:5<205::AID-BMC589>3.0.CO;2-P)
- Demirkol, O., Adams, C., & Ercal, N. (2004). Biologically important thiols in various vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8151–8154. <https://doi.org/10.1021/jf040266f>
- Demirkol, O., & Cagri-Mehmetoglu, A. (2008). Biologically important thiols in various organically and conventionally grown vegetables. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47, 77–84. <https://doi.org/10.1021/jf040266f>
- Demirkol, O., Cagri-Mehmetoglu, A., Qiang, Z., Ercal, N., & Adams, C. (2008). Impact of food disinfection on beneficial biothiol contents in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10414–10421. <https://doi.org/10.1021/jf802209t>
- Gawel, M., Głowacki, R., Kubalczyk, P., & Piechocka, J. (2024). HPLC-MS/MS based method for the determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid in human plasma. *Scientific Reports*, 14, 24425, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75760-z>
- Głowacki, R., Piechocka, J., Bald, E., & Chwatko, G. (2022). Application of separation techniques in analytics of biologically relevant sulfur compounds. In B. Buszewski & I.

- Baranowska (Eds.), *Handbook of Bioanalytics* (pp. 233–256). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-95660-8_11
- Głowacki, R., Stachniuk, J., & Borowczyk, K. (2016). A simple HPLC-UV method for simultaneous determination of cysteine and cysteinylglycine in biological fluids. *Acta Chromatographica*, 28, 333–346. <https://doi.org/10.1556/1326.2016.28.3.4>
- Huang, X., Wu, Y., Zhang, S., Yang, H., Wu, W., Lyu, L., & Li, W. (2023). Variation in antioxidant enzyme activity and key gene expression during fruit development of blackberry and blackberry–raspberry hybrids. *Food Bioscience*, 54, 102892, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102892>
- ICH. (2022). *M10 guideline on bioanalytical method validation*. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>
- Isokawa, M., Kanamori, T., Funatsu, T., & Tsunoda, M. (2014). Analytical methods involving separation techniques for determination of low-molecular-weight biothiols in human plasma and blood. *Journal of Chromatography B*, 964, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.041>
- Jumakulova, N. S., Kabulova, F. D., Khujanov, A. N., & Matchanov, A. D. (2025). Biochemical composition of blackberry varieties cultivated under the climatic conditions of the Samarkand region. *Plant Science Today*, 12, 1–10. <https://doi.org/10.14719/pst.7675>
- Kuśmierek, K., Chwatko, G., & Bald, E. (2008). Redox status of main urinary sulfur amino acids evaluation by liquid chromatography. *Chromatographia*, 68, S91–S95. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0582-x>
- Kuśmierek, K., Chwatko, G., Głowacki, R., & Bald, E. (2009). Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 877, 3300–3308. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.038>
- Kuśmierek, K., Chwatko, G., Głowacki, R., Kubalczyk, P., & Bald, E. (2011). Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879, 1290–1307. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.035>
- Liu, J., Xu, D., Chen, S., Yuan, F., Mao, L., & Gao, Y. (2021). Superfruits in China: Bioactive phytochemicals and their potential health benefits - a review. *Food Science and Nutrition*, 9, 6892–6902. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2614>
- Nagaraja, S. K., Mir, J. I., Verma, M. K., & Dar, A. H. (2026). A comprehensive review on

nutrition, phytochemistry, pharmacology and food application perspectives of bioactive rich superfruits. *Future Postharvest and Food*, 00, 1–22. <https://doi.org/10.1002/fpf2.70040>

Piechocka, J., Wieczorek, M., & Głowacki, R. (2020). Gas chromatography–mass spectrometry based approach for the determination of methionine-related sulfur-containing compounds in human saliva. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 9252, 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21239252>

Piechocka, J., Wrońska, M., & Głowacki, R. (2020). Chromatographic strategies for the determination of aminothiols in human saliva. *Trends in Analytical Chemistry*, 126, 115866, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115866>

Piechocka, J., Wyszczelska-Rokiel, M., & Głowacki, R. (2023). Simultaneous determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid and main plasma aminothiols by HPLC–UV based method. *Scientific Reports*, 13, 9294, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36548-9>

Shah, H. M. S., Singh, Z., Hasan, M. U., Kaur, J., Afrifa-Yamoah, E., & Woodward, A. (2025). Methyl jasmonate application downregulates drupelet reversion and enhances phenolic biosynthesis and antioxidant potential of blackberries. *Journal of Plant Growth Regulation*, 44, 353–366. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11499-1>

Stachniuk, J., Kubalczyk, P., Furmaniak, P., & Głowacki, R. (2016). A versatile method for analysis of saliva, plasma and urine for total thiols using HPLC with UV detection. *Talanta*, 155, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.031>

Toyo’oka, T. (2009). Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 877, 3318–3330. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.034>

Tsiasioti, A., & Tzanavaras, P. D. (2023). Determination of glutathione and glutathione disulfide using liquid chromatography: A review on recent applications. *Microchemical Journal*, 193, 109157. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109157>

Wu, J., Sigler, A., Pfaff, A., Cen, N., Ercal, N., & Shi, H. (2021). Development of a HPLC-MS/MS method for assessment of thiol redox status in human tear fluids. *Analytical Biochemistry*, 629, 114295, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114295>

Zhang, H., Wang, Z. Y., Yang, X., Zhao, H. T., Zhang, Y. C., Dong, A. J., Jing, J., & Wang, J. (2014). Determination of free amino acids and 18 elements in freeze-dried strawberry and blueberry fruit using an Amino Acid Analyzer and ICP-MS with micro-wave digestion. *Food Chemistry*, 147, 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.118>

544 Zhang, S., Liu, Z., Li, X., Abubaker, M. A., Liu, X., Li, Z., Wang, X., Zhu, X., Zhang, J., &
545 Chen, X. (2022). Comparative study of three raspberry cultivar (*Rubus idaeus* L.) leaves
546 metabolites: Metabolome profiling and antioxidant activities. *Applied Sciences*, 12, 990,
547 1–16. <https://doi.org/10.3390/app12030990>
548 Zhu, B., Li, L., Wei, H., Zhou, W., Zhou, W., Li, F., Lin, P., Sheng, J., Wang, Q., Yan, C., &
549 Cheng, Y. (2020). A simultaneously quantitative profiling method for 40 endogenous
550 amino acids and derivatives in cell lines using hydrophilic interaction liquid
551 chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Talanta*, 207, 120256, 1–11.
552 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120256>
553

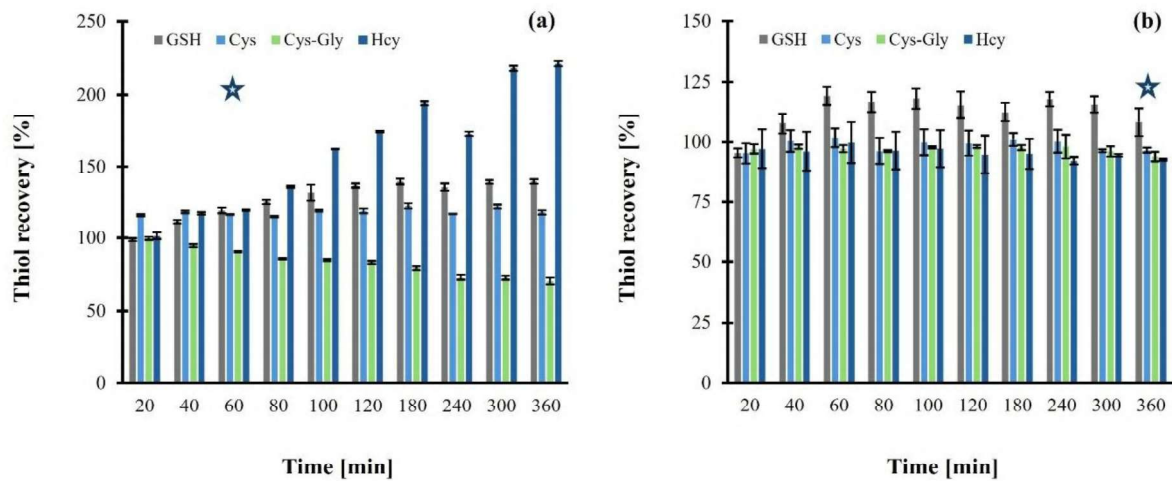


Figure 1. Stability of thiols in berry homogenates during storage on ice. (a) Total thiol assay (samples treated with TCEP) and (b) reduced thiol assay (samples without TCEP treatment). Data are presented as mean $\pm$ SD (n=3).

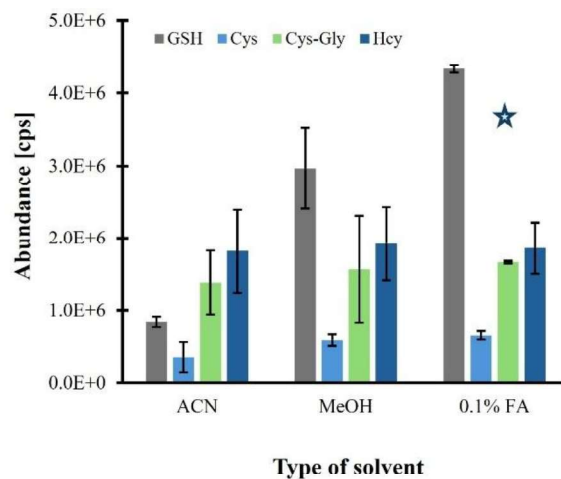


Figure 2. Comparison of different solvents for thiol extraction. Values represent the mean $\pm$ SD (n=3).

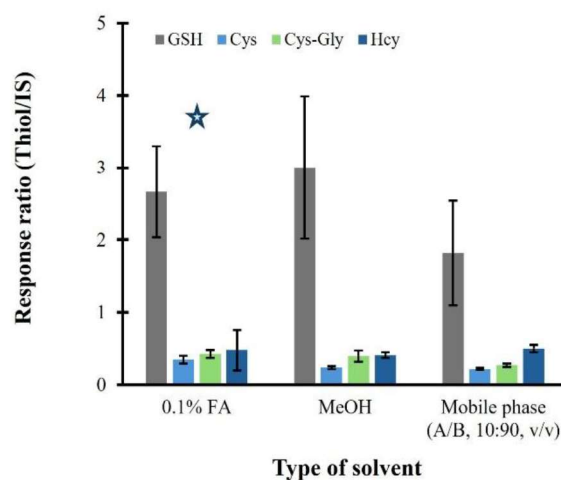


Figure 3. Effect of different dilution solvents on the analytical response of thiols. Values represent mean $\pm$ SD (n=3).

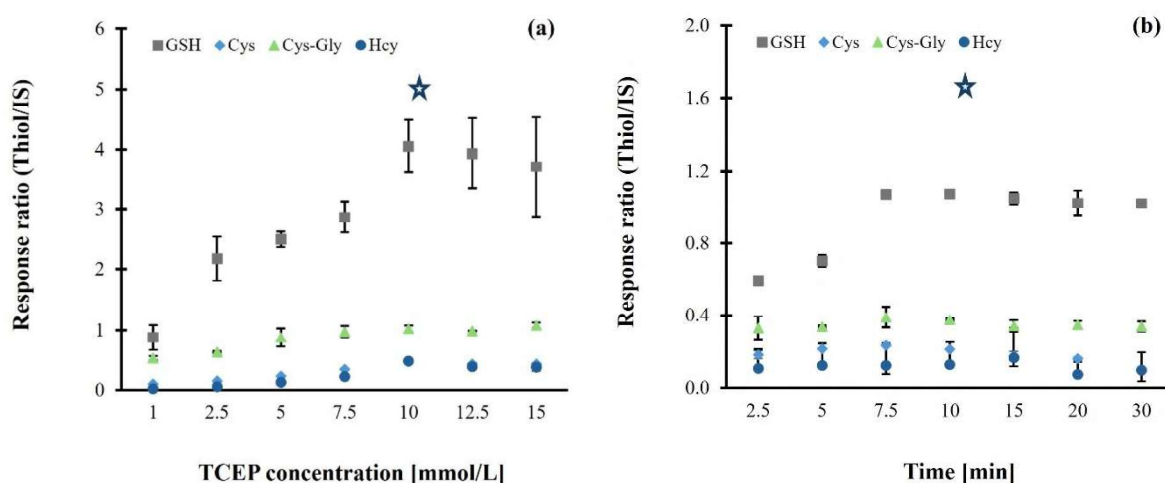


Figure 4. Optimization of the disulfide reduction step. (a) Effect of TCEP concentration on the reduction yield in berry extract. (b) Kinetic profile of the reduction reaction at 10 mmol/L TCEP concentration on ice. Values represent the mean $\pm$ SD (n=3).

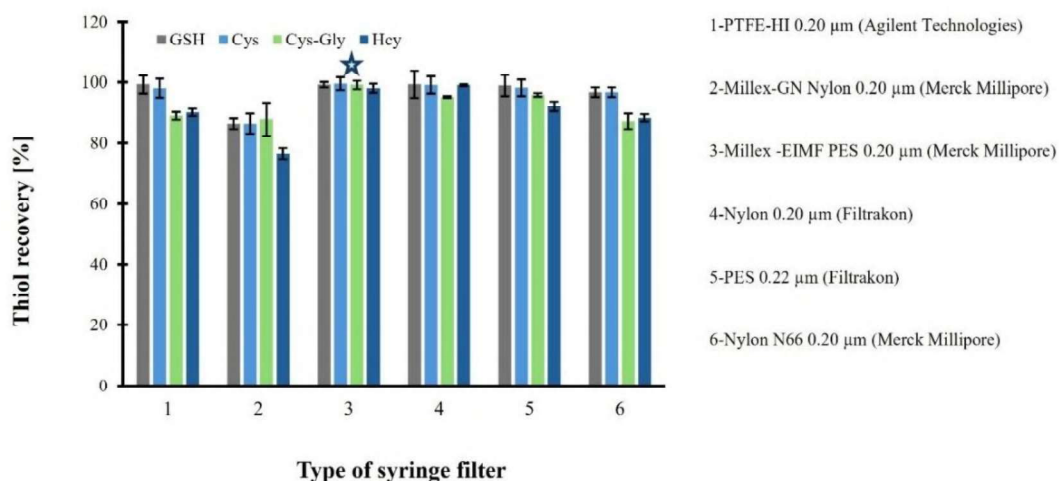


Figure 5. Effect of syringe filter material on the recovery of analytes from test samples prior to LC-MS/MS analysis. Data are presented as mean $\pm$ SD (n=3) for various concentration levels.

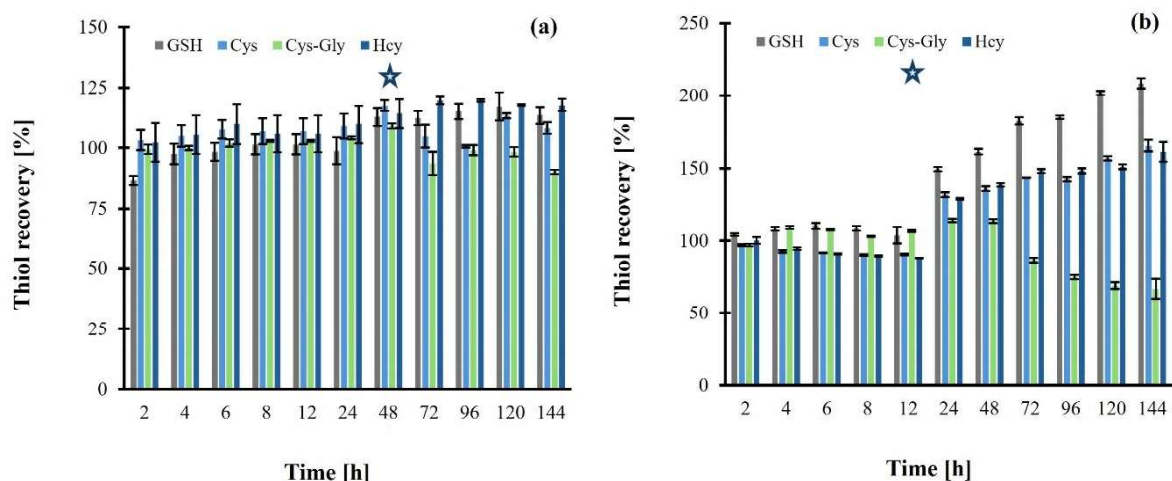
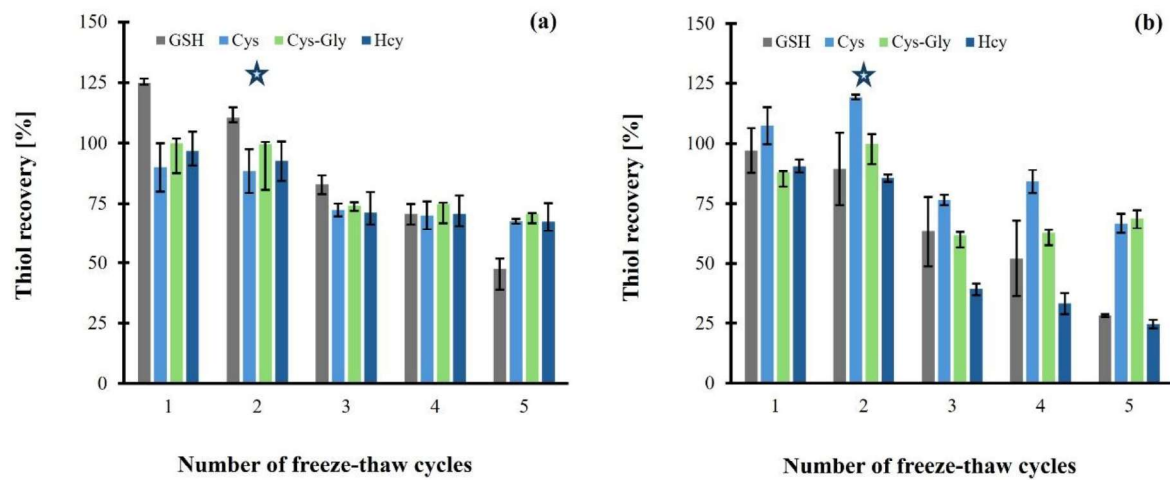


Figure 6. Stability of thiols in samples during storage at 10 °C. (a) Total thiol assay (TCEP-treated samples) and (b) reduced thiol assay (samples without TCEP treatment). Values represent the mean $\pm$ SD (n=3).



30
 31 **Figure 7.** Freeze-thaw stability of thiols in processed samples. (a) Total thiol assay TCEP-
 32 treated samples) and (b) reduced thiol assay (samples without TCEP treatment). Values
 33 represent the mean $\pm$ SD (n=3).

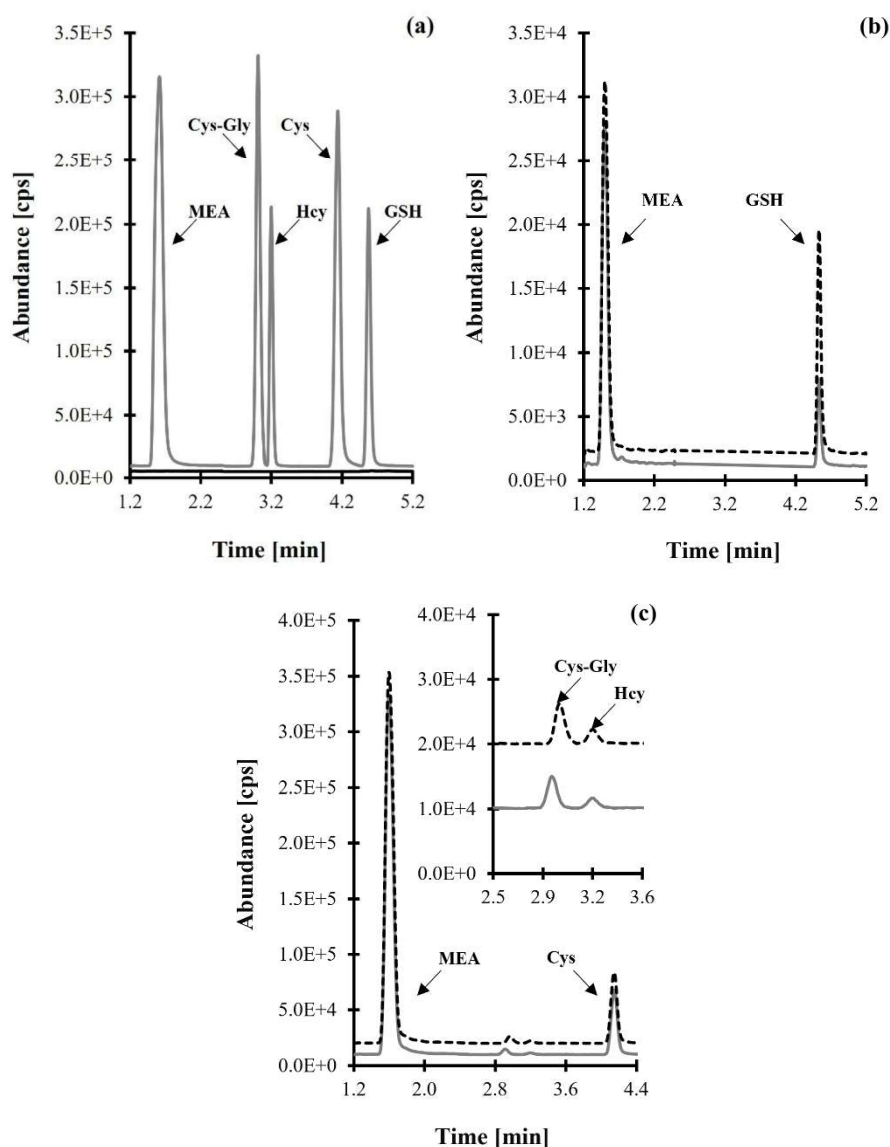


Figure 8. Representative chromatograms of standard solutions and berry fruit samples prepared according to the procedure described in Section 2.6. Chromatographic conditions were as specified in Section 2.7. (a) Blank standard solution (black line) and a standard solution containing GSH, Hcy, Cys, Cys-Gly, and MEA (100 nmol/L each, grey line). (b) Samples were diluted 1,000-fold. Strawberry (grey line) and raspberry (black dashed line). (c) Samples were diluted 40-fold. Strawberry (grey line) and raspberry (black dashed line). The retention times for MEA, Cys-Gly, Hcy, Cys, and GSH are 1.6, 3.0, 3.2, 4.1, and 4.6 min, respectively.

Table 1. MS/MS detection parameters and diagnostic transitions for GSH, Cys, Hcy, Cys-Gly, and MEA in MRM mode.

Analyte	Precursor Ion $[M+H]^+$ <i>m/z</i>	Product Ion <i>m/z</i>	Fragmentor Voltage V	Collision Energy V	CAV V	Polarity
Cys	122.2	76.1	70	18	5	Positive
		59.1*	70	14	5	
		58.0	70	26	5	
Cys-Gly	179.2	162.0	90	18	5	
		76.1*	90	38	5	
		59.1	90	10	5	
GSH	308.2	179.0*	110	10	5	
		76.1	110	26	5	
		59.1	110	70	5	
Hcy	136.2	90.1*	70	10	5	
		73.1	70	18	5	
		56.2	70	18	5	
MEA	78.2	61.1*	38	10	5	
		59.1	38	58	5	
		58.1	38	50	5	

Legend: (*) quantification transition. *Abbreviations:* CAV, collision cell accelerator voltage; Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; GSH, glutathione; Hcy, homocysteine; $[M+H]^+$, singly protonated precursor ion; MEA, cysteamine; *m/z*, mass to charge ratio.

6 **Table 2.** Validation data corresponding to intra-day measurements (n=3).

Analyte	Regression equation (R)	CV slope (%)	Range (nmol/L)	Precision (%)		Accuracy (%)		LOQ (nmol/L)
				Min	Max	Min	Max	
Total thiol assay								
Cys	y=0.9301x+0.0623 (0.9999)	1.41	12.5-625	1.96	5.61	97.76	110.76	12.5
Cys-Gly	y=1.9152x+0.0090 (0.9993)	3.21	0.625-250	2.37	7.12	85.29	110.84	0.625
GSH	y=4.7224x+0.3210 (0.9945)	1.68	5-0.200	0.30	7.58	84.81	103.85	5
Hcy	y=1.0564x+0.0018 (0.9996)	3.73	0.625-250	1.15	12.98	95.05	117.29	0.625
Reduced thiol assay								
Cys	y=0.7153x+0.0457 (0.9990)	0.36	1.25-625	1.65	5.65	89.66	108.57	1.25
Cys-Gly	y=1.2681x+0.0025 (0.9986)	1.01	0.625-250	1.04	14.55	87.26	106.41	0.625
GSH	y=9.0175x+0.1710 (0.9987)	3.47	2.5-200	0.83	9.48	94.00	108.25	2.5
Hcy	y=1.7356x-0.0008 (0.9986)	1.98	0.625-125	2.50	16.90	89.36	113.06	0.625

7 *Abbreviations:* Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; CV, coefficient of variation; GSH, glutathione; Hcy,
8 homocysteine; LOQ, limit of quantification; R, correlation coefficient.

9 **Table 3.** Precision and accuracy data based on three-day measurements (n=3).

Analyte	Concentration (nmol/L)	Precision (%)		Accuracy (%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Total thiol assay					
Cys	12.5	5.61	4.89	109.54	91.62
	62.5	1.96	6.27	110.15	105.10
	250	3.22	4.14	97.76	93.66
	625	2.65	5.06	101.36	102.66
Cys-Gly	0.625	4.46	5.40	88.72	99.24
	2.5	2.37	3.13	85.29	90.60
	62.5	7.12	5.50	90.40	92.08
	250	3.68	4.50	100.90	102.31
GSH	5	0.73	6.21	84.81	114.98
	25	0.93	3.42	88.69	98.61
	150	6.70	5.96	86.75	92.02
	200	3.33	3.31	103.85	103.43
Hcy	0.625	12.98	11.00	117.29	103.97
	2.5	1.15	5.65	106.75	105.06
	62.5	3.83	7.52	95.05	91.08
	250	4.67	8.93	101.00	101.47
Reduced thiol assay					
Cys	1.25	1.95	4.53	101.15	103.01
	12.5	4.52	4.08	89.66	96.16
	250	3.51	3.99	94.77	98.29
	625	2.32	6.57	101.48	100.09
Cys-Gly	0.625	10.67	8.40	87.26	87.59
	2.5	8.14	5.46	104.63	108.67
	125	2.40	4.49	91.07	88.99
	250	1.60	8.42	101.97	102.32
GSH	2.5	0.83	3.87	97.91	87.11

	10	6.70	3.78	108.25	103.24
	150	5.35	6.72	101.37	103.28
	200	1.63	7.21	98.68	98.45
	0.625	16.90	8.86	113.06	113.28
Hcy	2.5	2.50	7.51	89.36	101.79
	25	3.88	3.56	104.67	114.28
	125	2.87	2.52	101.43	100.94

Abbreviations: Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; GSH, glutathione; Hcy, homocysteine.

10

11

12 **Table 4.** Total and reduced thiol content in berry superfruits. Values represent the mean $\pm$ SD (n=3).

Berry type	Total thiol content (per g berry)				Reduced thiol content (per g berry)			
	$(\mu\text{g} \pm \text{SD})$		$(\text{ng} \pm \text{SD})$		$(\mu\text{g} \pm \text{SD})$	$(\text{ng} \pm \text{SD})$		
	GSH	Cys	Cys-Gly	Hey	GSH	Cys	Cys-Gly	Hey
Blackberry	12.02 $\pm$ 0.46	0.81 $\pm$ 0.04	118.34 $\pm$ 4.28	93.70 $\pm$ 8.32	5.17 $\pm$ 0.90	31.51 $\pm$ 0.11	ND	ND
Black elderberry	19.73 $\pm$ 0.57	6.31 $\pm$ 0.27	70.86 $\pm$ 3.34	187.01 $\pm$ 27.17	4.10 $\pm$ 0.28	862.57 $\pm$ 1.16	41.21 $\pm$ 1.94	42.27 $\pm$ 1.56
Blueberry	66.31 $\pm$ 1.66	0.68 $\pm$ 0.03	ND	ND	5.20 $\pm$ 0.75	49.35 $\pm$ 0.38	ND	ND
Chokeberry	26.03 $\pm$ 2.60	1.57 $\pm$ 0.14	106.83 $\pm$ 3.81	ND	0.02 $\pm$ 0.00*	10.53 $\pm$ 0.30	12.75 $\pm$ 1.76	ND
Cranberry	16.39 $\pm$ 0.95	0.33 $\pm$ 0.05	14.50 $\pm$ 2.58	ND	2.79 $\pm$ 0.22	36.21 $\pm$ 0.16	11.67 $\pm$ 0.36	ND
Black currant	197.98 $\pm$ 7.08	3.32 $\pm$ 0.04	122.26 $\pm$ 2.85	88.38 $\pm$ 2.70	23.16 $\pm$ 0.67	295.67 $\pm$ 13.50	98.21 $\pm$ 2.70	7.44 $\pm$ 0.17
Red currant	79.68 $\pm$ 1.33	4.99 $\pm$ 0.09	68.24 $\pm$ 1.63	105.11 $\pm$ 11.92	18.24 $\pm$ 0.86	1645.42 $\pm$ 2.63	39.32 $\pm$ 1.18	12.86 $\pm$ 0.49
White currant	23.98 $\pm$ 1.05	1.82 $\pm$ 0.14	44.13 $\pm$ 11.15	12.25 $\pm$ 1.30	6.13 $\pm$ 0.36	543.62 $\pm$ 3.49	20.63 $\pm$ 2.19	ND
Forest berry	8.93 $\pm$ 1.75	0.20 $\pm$ 0.01*	ND	ND	1.12 $\pm$ 0.11*	17.11 $\pm$ 0.25	ND	ND
White gooseberry	96.48 $\pm$ 2.25	1.25 $\pm$ 0.07	82.48 $\pm$ 1.23	119.85 $\pm$ 3.62	13.73 $\pm$ 0.69	316.47 $\pm$ 0.55	55.60 $\pm$ 2.09	6.97 $\pm$ 0.71
Red gooseberry	39.94 $\pm$ 2.13	1.74 $\pm$ 0.11	77.91 $\pm$ 4.36	18.66 $\pm$ 2.18	7.07 $\pm$ 0.19	761.09 $\pm$ 2.37	71.59 $\pm$ 1.33	4.65 $\pm$ 0.67
Haskap berry	4774.62 $\pm$ 123.52	3.70 $\pm$ 0.07	197.70 $\pm$ 10.19	ND	23.61 $\pm$ 0.26	369.68 $\pm$ 1.44	121.40 $\pm$ 2.29	ND
Raspberry	116.14 $\pm$ 3.19	1.07 $\pm$ 0.29	176.25 $\pm$ 11.02	32.82 $\pm$ 4.43	24.38 $\pm$ 2.59	554.59 $\pm$ 1.53	157.49 $\pm$ 5.36	16.86 $\pm$ 2.99
Strawberry	73.48 $\pm$ 1.29	1.20 $\pm$ 0.03	50.86 $\pm$ 1.09	16.61 $\pm$ 2.39	17.28 $\pm$ 0.50	1191.44 $\pm$ 2.69	40.82 $\pm$ 1.07	ND
Wild strawberry	1.64 $\pm$ 0.09*	2.22 $\pm$ 0.06	106.84 $\pm$ 3.20	35.89 $\pm$ 3.00	0.75 $\pm$ 0.16*	323.04 $\pm$ 2.19	11.38 $\pm$ 1.44	ND

- 13 *Abbreviations:* Cys, cysteine; Cys-Gly, cysteinyl-glycine; GSH, glutathione; Hcy, homocysteine; SD, standard deviation. Legend: (*) estimated concentration below lower LOQ;
- 14 ND, not detected.

Podsumowanie

Wysokosprawna chromatografia cieczowa od wielu lat należy do najczęściej wykorzystywanych technik analitycznych w badaniach związków biologicznie aktywnych. Jej szerokie zastosowanie wynika z możliwości efektywnego rozdzielania składników o zróżnicowanej polarności, wysokiej powtarzalności analiz oraz możliwości współpracy z różnymi systemami detekcji. Ma to szczególne znaczenie w przypadku analizy związków siarki, których właściwości chemiczne często utrudniają bezpośrednie oznaczanie innymi technikami instrumentalnymi, dlatego też w swoich badaniach zdecydowałam się na opracowanie metod bazujących na technice HPLC w połączeniu z dwoma różnymi trybami detekcji. Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) umożliwiło mi opracowanie metod przeznaczonych do oznaczania związków siarki w osoczu oraz owocach, gdzie kluczowe znaczenie miała wysoka czułość i selektywność pomiarów. Wykorzystanie detekcji spektrofotometrycznej (UV) pozwoliło z kolei na opracowanie wiarygodnych i stosunkowo prostych oraz tanich metod analitycznych przeznaczonych do analizy moczu oraz owoców.

W kontekście oznaczeń prowadzonych z wykorzystaniem HPLC kluczowe znaczenie ma dobór optymalnych warunków chromatograficznych takich jak odpowiednie fazy ruchome, profil ich gradientu, ale także wybór odpowiedniej kolumny chromatograficznej zapewniającej możliwość selektywnego oznaczania badanych związków. W przypadku prowadzonych przeze mnie badań, w dwóch z opracowanych metod [D4,D5] wykorzystałam klasyczne kolumny ZORBAX z wypełnieniem C18, których zastosowanie w przypadku oznaczeń związków tiolowych zostało wcześniej szeroko udokumentowane [51,52]. Metody bazujące na technikach HPLC-MS/MS [D3,D6] okazały się znacznie bardziej wymagającym wyzwaniem analitycznym, ponieważ w ich przypadku zastosowanie faz ruchomych mogących tworzyć pary jonowe z analitami (w tym kwas trichlorooctowy) nie było możliwe. W konsekwencji retencja analitów w odwróconym układzie faz była znikoma. Dobrym rozwiązaniem okazało się zastosowanie chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Zastosowanie HILIC w analizie polarnych cząsteczek, do których należą małowczątkowe tiole, umożliwiło uzyskanie odpowiedniej retencji i kształtu pików. Dodatkowo, zastosowanie podczas elucji dużych zawartości organicznych faz ruchomych, zwiększyło efektywność

wykorzystywanej przeze mnie jonizacji poprzez elektrorozpylanie, a w konsekwencji poprawiło czułość detekcji MS/MS. W celu wyeluowania z kolumny maksymalnie dużej liczby substancji wchodzących w skład analizowanych mieszanin, we wszystkich metodach zastosowałam gradient składu fazy ruchomej. Takie podejście umożliwiało również względnie szybkie rekondycjonowanie kolumny.

Jednym z najważniejszych i zarazem najbardziej czasochłonných etapów opracowywania nowych procedur analitycznych jest odpowiednie przygotowanie próbki do analizy. W przypadku oznaczeń prowadzonych z wykorzystaniem techniki HPLC-MS/MS największe wyzwanie stanowiły efekty matrycowe, które znacząco wpływały na jakość przeprowadzanych analiz, powodując przede wszystkim problemy z powtarzalnością, przy niezadowalającym odzysku i niskiej precyzji. W celu zminimalizowania ww. efektów zastosowałam rozcieńczanie próbki, czego naturalną konsekwencją była konieczność dodatku IS. Takie podejście pozwoliło na minimalizację wspomnianych efektów z jednoczesnym ograniczeniem strat analitu, np. podczas ekstrakcji. Rozcieńczenia próbek przed analizą chromatograficzną prowadziłam z wykorzystaniem roztworów składających się z tych samych rozpuszczalników, które wchodziły w skład fazy ruchomej. Jest to szczególnie istotne podczas pracy w trybie HILIC, gdzie ogromne korzyści przynosi kompatybilność składu próbki ze składem fazy ruchomej. Z powodu braku dostępności wzorców znakowanych izotopowo, swoje poszukiwania IS nakierowałam na inne substancje o zbliżonych do analitów właściwościach fizykochemicznych, strukturalnych i tym samym - chromatograficznych. W toku badań wybrałam trzy substancje, a mianowicie 4-DPD, MEA oraz NAC, których zastosowanie pozwoliło zminimalizować trudności związane z odzyskiem i niską precyzją oznaczeń. Duże wyzwanie w kontekście występowania efektów matrycowych wygenerowała również metoda oznaczania małowymagłych związków siarki w owocach jagodowych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV [D5], choć w teorii jest ona mniej podatna na wpływ ww. efektów. Oprócz wspomnianej powyżej roli, zastosowanie IS miało również na celu kompensację strat analitu występujących na etapie homogenizacji. Z tego względu IS dodawałam do próbek już na początku procedury przygotowania materiału do analizy. Utrata analitu może bowiem wynikać nie tylko z aktywności enzymów obecnych w homogenatach, lecz także może być spowodowana jego adsorpcją na elementach aparatury wykorzystywanej podczas przygotowania próbek, takich jak chociażby głowica

homogenizatora. Ponadto zastosowanie IS pozwala na zniwelowanie różnic w stopniu rozcieńczenia próbek, wynikających ze zmiennej zawartości wody w poszczególnych owocach.

W kontekście oznaczania małocząsteczkowych związków siarki kluczowe znaczenie ma środowisko reakcji, szczególnie kiedy procedura wykorzystuje etap derywatyzacji chemicznej [D4,D5]. W tym kontekście dobór odpowiedniego buforu stanowi jeden z najważniejszych etapów przygotowania próbki. Musi on zapewnić nie tylko odpowiednie pH środowiska reakcji, ale także stanowić stabilne warunki, dzięki którym nie dojdzie do degradacji zarówno samego analitu, ale i utworzonej pochodnej. W opracowanej przeze mnie metodzie wykorzystującej technikę HPLC-UV do analizy owoców jagodowych [D5] przyjął, że jego podstawowym zadaniem na etapie przygotowania próbki, będzie zapewnienie odpowiednich warunków reakcji derywatyzacji. Ponieważ homogenaty badanych owoców charakteryzowały się znacznym zróżnicowaniem wartości pH, dobrałam objętość buforu jak i jego pH w taki sposób, aby po homogenizacji uzyskać pH z zakresu 6-8, czyli optymalne dla efektywnego działania odczynnika CMQT. Podczas przygotowywania próbek istotne było również wyeliminowanie zmian stężeń związków tiolowych, które mogłoby zaistnieć na skutek reakcji utleniania i redukcji. W praktyce analitycznej efekt ten osiąga się poprzez możliwie wczesne zabezpieczenie grup tiolowych za pomocą odczynnika derywatyzującego, niekiedy bezpośrednio po pobraniu materiału biologicznego. Analogiczne rozwiązanie zastosowałam w odniesieniu do próbek owoców. Homogenizację prowadziłam w obecności CMQT, co pozwalało na stabilizację oznaczanych tioli już na początkowym etapie przygotowania materiału do analizy [D5].

Sole chinoliniowe i pirydyniowe, do których zalicza się CMQT oraz BBP, są z powodzeniem wykorzystywane w analizie związków tiolowych od wielu już lat [11,51,52,65]. W ramach prowadzonych badań opracowałam dwie metody wykorzystujące reakcje derywatyzacji z ich udziałem [D4,D5]. W przypadku oznaczeń HTL w moczu konieczne było zapewnienie takich warunków reakcji, które umożliwiałyby zasadową hydrolizę pierścienia HTL i w konsekwencji uwolnienie Hcy zdolnej do dalszej reakcji z odczynnikiem derywatyzującym. W oznaczeniach przeprowadzanych w środowisku zasadowym (pH 11), lepszym i bardziej efektywnym odczynnikiem okazał się BBP. W przypadku procedury dedykowanej analizie owoców wybrałam ostatecznie CMQT. Powodem była możliwość

przewodzenia derywatyzacji także w lekko kwaśnym środowisku, co w przypadku próbek owoców przyniosło lepsze rezultaty. Istotną zaletą stosowania CMQT oraz BBCP jest możliwość prowadzenia procesu derywatyzacji w łagodnych warunkach, obejmujących wodne środowisko reakcji, temperaturę pokojową oraz krótki czas reakcji, nieprzekraczający kilkunastu minut. Otrzymane w tych warunkach pochodne charakteryzują się wysoką stabilnością, a także korzystnymi właściwościami spektroskopowymi i chromatograficznymi. Zastosowanie dużego nadmiaru molowego reagenta nie tylko przyspiesza reakcję, lecz stanowi także swoiste zabezpieczenie przed potencjalną konkurencyjną reakcją z udziałem analitu. Co ważne, wykorzystane przeze mnie w badaniach odczynniki nie są dostępne komercyjnie. Na potrzeby prowadzonych eksperymentów syntezowałam je zgodnie z opublikowanymi procedurami [66,67].

Opracowane w ramach niniejszej pracy metody chromatograficzne stanowią nowe i użyteczne narzędzia do oznaczania małocząsteczkowych związków siarki w matrycach biologicznych. Różnią się one nie tylko zastosowaną techniką detekcji, lecz także strategią przygotowania próbek, czasem analizy, kosztami wykonania oraz stopniem zgodności z założeniami zielonej chemii, co umożliwia kompleksową ocenę ich potencjału aplikacyjnego a także wskazanie optymalnych obszarów zastosowań. Metoda HPLC-UV opracowana dla potrzeb oznaczania HTL w moczu [D4] opiera się na relatywnie taniej i powszechnie dostępnej aparaturze, co zwiększa jej atrakcyjność w kontekście badań przesiewowych. Dodatkową zaletą jest wykorzystanie moczu jako materiału niezakaźnego i łatwego do pozyskania, co również sprzyja jej potencjalnemu zastosowaniu w badaniach rutynowych. Należy jednak zauważyć, że opisana procedura jest wieloetapowa i pracochłonna, ponieważ obejmuje LLE, odparowanie rozpuszczalnika a także derywatyzację, co wydłuża czas przygotowania próbki, zwiększa ryzyko strat analitu oraz wymaga zastosowania chloroformu. Metodę HPLC-UV przeznaczoną do oznaczania Cys, Cys-Gly, Hcy i GSH w owocach [D5], cechuje uproszczony etap przygotowania próbki, dzięki zastosowaniu jednoczesnej derywatyzacji i/lub redukcji na etapie homogenizacji. Jej ograniczeniem pozostaje jednak niewystarczająca czułość, objawiająca się dość wysokimi granicami oznaczalności, co skutkuje brakiem możliwości oznaczenia Hcy oraz trudnościami w przypadku monitorowania zawartości Cys-Gly. Tę ostatnią udało się oznaczyć jedynie w niewielkiej liczbie próbek. Metody bazujące na technice HPLC-UV, mimo swojej prostoty i niskich

kosztów eksploatacyjnych, generalnie cechuje niższa czułość. Fakt ten zawęża ich obszar zastosowania, jak np. w przypadku oznaczania HTL w moczu [D4] oraz wybranych tioli w owocach [D5], gdzie weryfikacja wyników z wykorzystaniem metody bazującej na technice HPLC-MS/MS potwierdziła obecność analitów niewykrywalnych w przypadku zastosowania detekcji UV. Jednocześnie ich olbrzymią zaletą pozostaje możliwość prostej implementacji w laboratoriach, brak konieczności zaawansowanej optymalizacji parametrów detekcji oraz dostępność tanich odczynników. Technika HPLC-MS/MS zapewnia dużo wyższą czułość i selektywność, dzięki czemu metody na niej bazujące [D3,D6] charakteryzują się lepszymi parametrami walidacyjnymi. W przypadku oznaczeń HPPTCA w osoczu istotną zaletą metody było pominięcie etapu derywatyzacji, co znacząco uprościło całą procedurę. Jednocześnie metoda ta jest dość kosztochłonna, chociażby ze względu na wysokie koszty aparatury i jej eksploatacji a także zastosowanie drogich filtrów *cut-off*. Dodatkowym utrudnieniem jest stosunkowo mała stabilność HPPTCA. Metoda HPLC-MS/MS przeznaczona do oznaczania Cys, Hcy, Cys-Gly i GSH w owocach jagodowych [D6], w której homogenizacja w obecności FA umożliwia jednoczesną ekstrakcję analitów i pomijając etap derywatyzacji jest zdecydowanie najprostszą w kontekście przygotowania próbki. Porównanie wszystkich opracowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej procedur wskazuje, że metody oparte o technikę HPLC-UV [D4,D5] wymagają bardziej złożonego przygotowania próbki, obejmującego m.in. etapy derywatyzacji oraz ekstrakcji i zateżania. Metody HPLC-MS/MS [D3,D6] cechują natomiast uproszczenie procedur analitycznych, skrócenie czasu analizy oraz redukcja liczby operacji prowadzących do strat analitów. Wiąże się to jednak z koniecznością wykorzystania bardziej zaawansowanej i kosztownej aparatury. W konsekwencji wybór optymalnej metody powinien uwzględniać wymagania dotyczące czułości i selektywności, dostępność aparatury, możliwości przygotowania próbek oraz planowany zakres zastosowań analitycznych. Najważniejsze parametry charakteryzujące opracowane w ramach pracy doktorskiej metody przedstawiłam w tabeli poniżej (Tabela 2).

Tabela 2 . Zestawienie podstawowych informacji na temat opracowanych metod oznaczania wybranych małowcząsteczkowych związków siarki w próbkach biologicznych.

Parametr	Opracowana metoda			
	D3	D4	D5	D6
Analit(y)	HPPTCA	HTL	Cys, Cys-Gly, GSH	Cys, Cys-Gly, Hcy, GSH
Matryca	Osocze	Mocz	Owoce jagodowe	Owoce jagodowe
Tryb chromatografii	HILIC; BEH Amide	RP; C18	RP; C18	HILIC; BEH Amide
Detekcja	MS/MS	UV	UV	MS/MS
Czasochłonność przygotowania próbki	Średnia (ok.25 minut)	Wysoka (ok. 50 minut)	Średnia (ok. 25 minut)	Niska (ok.10 minut)
Derywatyzacja	Nie	Tak (BBCP)	Tak (CMQT)	Nie
Warunki derywatyzacji	–	pH ok. 11 (hydroliza HTL do Hcy)	pH 6–8, homogenizacja w obecności CMQT	–
Wzorzec wewnętrzny	Tak (4-DPD)	Nie	Tak (NAC)	Tak (MEA)
Granica oznaczalności	rzędu $\mu\text{mol/l}$	rzędu nmol/l	rzędu nmol/l	rzędu $\mu\text{mol/l}$
Główne wyzwanie metodyczne	Efekty matrycowe	Złożone przygotowanie próbki, niskie stężenia HTL w moczu	Efekty matrycowe	Efekty matrycowe

Tabela 2 . Zestawienie podstawowych informacji na temat opracowanych metod oznaczania wybranych małowcząsteczkowych związków siarki w próbkach biologicznych.

Parametr	Opracowana metoda			
	D3	D4	D5	D6
Główne zalety	Wysoka czułość, brak derywatyzacji	Tania i powszechnie dostępna aparatura, materiał do badań pobierany w sposób nieinwazyjny	Uproszczona etap przygotowania próbki do analizy - homogenizacja z równoczesną derywatyzacją	Najprostsze przygotowanie próbki, możliwość wykrycia w próbkach Hcy i Cys-Gly
Główne ograniczenia	Wysokie koszty, konieczność stosowania filtrów <i>cut-off</i> , niestabilność analitu	Wieloetapowość, użycie chloroformu, ryzyko strat analitu	Niewystarczająca czułość dla niektórych analitów	Wysokie koszty aparatury i eksploatacji
Ogólna ocena potencjału aplikacyjnego	Wysoki dla analiz specjalistycznych	Wysoki dla badań przesiewowych	Umiarkowany (brak zastosowania dla Hcy i ograniczone dla CysGly)	Wysoki dla kompleksowej analizy tioli w owocach jagodowych

Objaśnienia: HPPTCA - kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo) -1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy, HTL - tiolakton homocysteiny, Cys - cysteina, Hcy - homocysteina, Cys-Gly - cysteinyloglicyna, GSH - glutation, RP - odwrócony układ faz, HILIC – chromatografia oddziaływań hydrofilowych, MS/MS - tandemowa spektrometria mas, UV - detekcja spektrofotometryczna, BBCP - bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy, CMQT - tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylochinoliniowy, NAC - *N*-acetylocysteina, 4-DPD - 4-deoksyperydoksyna, MEA - cysteamina

Wnioski końcowe

Przeprowadzone badania umożliwiły mi realizację wszystkich założonych celów rozprawy doktorskiej, sprecyzowanych na stronie 21 niniejszej pracy. W ich wyniku opracowałam oraz zwalidowałam cztery metody analityczne przeznaczone do oznaczania wybranych biologicznie ważnych związków siarki w zróżnicowanych matrycach, takich jak osocze i mocz oraz owoce jagodowe. Dwie z opracowanych metod opierają się na wykorzystaniu HPLC-UV, podczas gdy dwie kolejne wykorzystują technikę HPLC-MS/MS. Opracowane metody charakteryzują się dobrą selektywnością, dokładnością, precyzją oraz czułością, spełniając wymagania stawiane nowoczesnym procedurom analitycznym.

Ponadto na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć szereg istotnych z praktycznego punktu widzenia wniosków.

- HPPTCA stanowi składnik osocza człowieka, a jego obecność została jednoznacznie potwierdzona z wykorzystaniem jednej z najbardziej czułych technik stosowanych w analizie biomedycznej, tj. HPLC-MS/MS.
- Technika HILIC w połączeniu z detektorem MS/MS stanowi użyteczne narzędzie do monitorowania poziomu HPPTCA oraz Hcy, Cys, Cys-Gly i GSH w osoczu oraz owocach jagodowych.
- Technika HPLC-UV stanowi użyteczne narzędzie do rutynowych analiz zarówno HTL w moczu jak i GSH, Cys oraz Cys-Gly w owocach jagodowych.
- Połączenie etapu homogenizacji, derywatyzacji i/lub redukcji wiązań disiarczkowych znacząco wpływa na ograniczenie pracochłonności i czasochłonności opracowanych metodologii.
- Zastosowanie techniki HPLC-MS/MS umożliwia oznaczanie małocząsteczkowych związków siarki bez konieczności przeprowadzania etapu derywatyzacji, a procedury przygotowania próbek charakteryzują się wysokim stopniem uproszczenia.
- Zakres stosowalności BBP jako odczynnika derywatyzującego może być poszerzony o wewnątrzcząsteczkowy tioester - HTL.
- Znajomość stabilności analitów w homogenatach owoców pozwala na zapewnienie wiarygodności i powtarzalności wyników analiz poprzez dobór

odpowiednich warunków i czasu przechowywania próbek, minimalizację ich degradacji oraz ograniczenie błędów pomiarowych w badaniach składu i jakości żywności.

- Metody oznaczania Hcy, Cys, GSH oraz Cys-Gly w formie zredukowanej i utlenionej w owocach jagodowych, oparte na technikach HPLC-UV oraz HPLC-MS/MS, stanowią obecnie jedyne dostępne narzędzia analityczne umożliwiające kontrolę jakości żywności w zakresie zawartości tych związków.
- Skutecznymi sposobami minimalizowania wpływu efektów matrycowych na wyniki analiz chromatograficznych jest zastosowanie kalibracji ilościowej z wykorzystaniem metody wzorca wewnętrznego oraz rozcieńczenie próbki przed analizą.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy poszerzają dostępny warsztat metodyczny wykorzystywany do oznaczania związków siarki oraz potwierdzają przydatność wysokosprawnej chromatografii cieczowej jako uniwersalnego narzędzia w analizie związków biologicznie aktywnych. Opracowane metody mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad rolą związków siarki w procesach fizjologicznych i patologicznych, a także znaleźć zastosowanie w analizie żywności, badaniach biomedycznych oraz diagnostyce.

Streszczenie w języku polskim

Na przestrzeni ostatnich dekad odnotowuje się rosnącą liczbę zgonów związanych z występowaniem tzw. chorób cywilizacyjnych, w tym chorób nowotworowych, układu krążenia oraz neurodegeneracyjnych. Rozwój wspomnianych schorzeń wiązany jest m.in. z zaburzeniami metabolizmu małocząsteczkowych związków siarki, które mogą przyczyniać się do nasilenia stresu oksydacyjnego oraz zaburzeń równowagi redoks w organizmie. W związku z tym oznaczanie tioli oraz ich pochodnych w matrycach biologicznych, takich jak osocze i mocz jest szczególnie istotne w kontekście monitorowania stanu zdrowia oraz identyfikacji wczesnych zmian patologicznych. Jednocześnie coraz większe znaczenie przypisuje się analizie żywności, która w przypadku owoców stanowi ważne źródło informacji o substancjach bioaktywnych posiadających właściwości antyoksydacyjne. Zgodnie z danymi literaturowymi, prawidłowo zbilansowana dieta, bogata w składniki odżywcze, może przyczyniać się do ograniczenia częstości występowania chorób, także cywilizacyjnych lub spowalniać ich rozwój.

W analityce związków tiolowych kluczowe znaczenia ma dostęp do wiarygodnych i czułych narzędzi analitycznych, które umożliwiają ich oznaczanie w złożonych matrycach biologicznych, w tym w żywności. Wynika to z niskich stężeń tioli, ich dużej reaktywności oraz podatności na przemiany oksydacyjno-redukcyjne, co stawia szczególnie wysokie wymagania przed nowo opracowywanymi metodami analitycznymi. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) stanowi jedną z podstawowych technik stosowanych w analizie związków tiolowych w próbkach biologicznych. Jej szerokie zastosowanie podczas oznaczania małocząsteczkowych związków siarki wynika z wysokiej selektywności, czułości oraz zdolności do efektywnego rozdzielania składników. W połączeniu z odpowiednimi technikami detekcji, takimi jak detekcja w zakresie UV (HPLC-UV) lub spektrometria mas (HPLC-MS/MS), umożliwia uzyskanie wiarygodnych wyników jakościowych i ilościowych, nawet dla analitów występujących na bardzo niskich poziomach stężeń, w bardzo złożonych pod względem składu mieszaninach.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie narzędzi analitycznych, opartych na wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z różnymi trybami detekcji, dedykowanych oznaczaniu wybranych, ważnych biologicznie

związków siarki, w płynach ustrojowych oraz tzw. superowocach. W toku badań szczegółowej optymalizacji poddano procedury przygotowania próbek do analiz chromatograficznych, dążąc do ich maksymalnego uproszczenia w celu poprawy precyzji i dokładności oznaczeń, skrócenia czasu przygotowania próbek dla potrzeb zastosowań rutynowych oraz zmniejszenia uciążliwości środowiskowej opracowanych metod. Ważnym aspektem uwzględnionym podczas wspomnianych procesów optymalizacji były specyfika zastosowanych technik pomiarowych, właściwości fizykochemiczne analitów oraz skład badanych matryc.

W konsekwencji w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej opracowano cztery metody oparte na technikach HPLC-UV oraz HPLC-MS/MS, umożliwiające oznaczanie małocząsteczkowych tioli i ich pochodnych, zarówno w płynach biologicznych człowieka (mocz, osocze) jak i w próbkach roślinnych, które stanowiły uprawiane w Polsce owoce jagodowe.

Streszczenie w języku angielskim (Abstract)

In recent decades, an increasing number of deaths associated with so-called lifestyle diseases has been observed, including cancer, cardiovascular disorders, and neurodegenerative diseases. The development of these conditions has been linked, among other factors, to disturbances in the metabolism of low-molecular-weight sulphur compounds, which may contribute to the intensification of oxidative stress and disruption of redox homeostasis in the human body. Consequently, the determination of thiols and their derivatives in biological matrices such as plasma and urine is of particular importance for health monitoring and the identification of early pathological changes. At the same time, growing attention is being paid to the analysis of food for thiols content, including berries, which are an important source of bioactive compounds with antioxidant properties. According to the literature, a properly balanced diet rich in essential nutrients may help reduce the incidence of lifestyle diseases or slow their progression.

In the analytics of thiol compounds, access to reliable and sensitive analytical tools capable of their determination in complex biological and food matrices is of crucial importance. This is due to their low concentrations, high reactivity, and susceptibility to redox transformations, which impose stringent requirements on newly developed analytical methods. High-performance liquid chromatography (HPLC) is one of the fundamental techniques used in the analysis of thiol compounds in both biological and food samples. Its widespread application in the analysis of low-molecular-weight sulphur compounds result from its high selectivity, sensitivity, and ability to efficiently separate components present in complex matrices. When coupled with appropriate detection techniques, such as UV detection (HPLC-UV) or mass spectrometry (HPLC-MS/MS), it enables the generation of reliable qualitative and quantitative results, even for analytes present at very low concentration levels.

The aim of this doctoral dissertation was to develop analytical tools based on high-performance liquid chromatography coupled with various detection modes, dedicated to the determination of selected biologically important sulphur compounds in biological fluids and so-called superfruits. During the study, particular attention was paid to the optimization of sample preparation procedures for chromatographic analysis, with the aim of their maximal simplification to improve the precision and

accuracy of determinations, reduce sample preparation time in routine applications, and reducing environmental impact of the developed methods. An important aspect considered during these optimizations included the characteristics of the applied measurement techniques, the physicochemical properties of the analytes, as well as the composition of the investigated matrices.

As a result, four analytical methods based on HPLC-UV and HPLC-MS/MS techniques were developed, enabling the determination of low-molecular-weight thiols and their derivatives in both human biological fluids (urine, plasma) and plant samples, namely berries cultivated in Poland.

Dorobek naukowy

Publikacje:

- publikacje wchodzące w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej

[D1] **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, Tiazynowe i tiazolidynowe pochodne aminokwasów siarkowych i wybranych endogennych aldehydów. *Wiad. Chem.* 78 (2024), 1607-1625.

(punktacja MNiSW₂₀₂₄ = 20)

[D2] **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, „Superowoce” okiem chemika analityka, *Analityka: nauka i praktyka* 2 (2023), 26-31.

(punktacja MNiSW₂₀₂₄= 20)

[D3] **M. Gaweł**, R. Głowacki, P. Kubalczyk, J. Piechocka, HPLC-MS/MS based method for the determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid in human plasma, *Sci. Rep.* 14 (2024) 24425, 1–11.

(IF₅=4,3, punktacja MNiSW₂₀₂₄=140)

[D4] **M. Gaweł**, R. Głowacki, J. Piechocka, First HPLC-UV method for the determination of homocysteine thiolactone in human urine after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide, *Sci. Rep.* 15 (2025) 1–14.

(IF₅=4,3, punktacja MNiSW₂₀₂₄=140)

[D5] **M. Gaweł**, R. Głowacki, J. Piechocka, Analysis of berry superfruits for reduced and total thiol content by LC-UV- based methods (*Food Chemistry, w recenzji*).

[D6] **M. Gaweł**, R. Głowacki, J. Piechocka, The first LC-ESI-MS/MS-based method(s) for the determination of reduced and grand total thiols in berry superfruits (*Food Chemistry, w recenzji*).

- **pozostałe publikacje nie wchodzące w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej:**

1. J. Piechocka, N. Matwiej, **M. Gaweł**, M. Matyjaszczyk, R. Głowacki, G. Chwatko, Application of the HPLC-ELSD technique for the determination of major metabolites of ibuprofen and creatinine in human urine. *Sci. Rep.* 13 (2023) 20268, 1-14.
(IF₅=4,3, punktacja MNiSW₂₀₂₄=140)
2. **M. Gaweł**, M. Płodzik, R. Głowacki, J. Piechocka, Versatile High-Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Detection-Based Method for the Determination of Thioproline in Pharmaceutical and Cosmetic Products. *Molecules* 30 (2025) 3152, 1-14.
(IF₅=5, punktacja MNiSW₂₀₂₄=140)

- **pozostałe publikacje powstałe przed rozpoczęciem studiów doktoranckich:**

1. **M. Gaweł**, J. Piechocka, Włosy – nie tylko do czesania, *Chemia w Szkole* 3 (2021), 18-21.

Wystąpienia konferencyjne:

- **wystąpienia konferencyjne w trakcie trwania studiów doktoranckich:**
1. **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Opracowanie metody oznaczania kreatyniny w moczu techniką HPLC-UV/ELS*, Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 10.12.2022 r., Opole, plakat (autor prezentujący).
 2. **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Przygotowanie próbki superowoców do analizy chromatograficznej*, Zjazd Wiosenny Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 3-7.05.2023 r., Chęciny, komunikat ustny (autor prezentujący).
 3. **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Ślina jako przykład alternatywnej matrycy w badaniach klinicznych*, X Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 18-19.05.2023 r., Łódź, plakat (autor prezentujący).

4. **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Ocena uciążliwości środowiskowej metod oznaczania HPPTCA*, XI Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 16-17.05.2024 r., Łódź, plakat (autor prezentujący).
5. **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Oznaczanie tiazolidynowej pochodnej cysteiny i witaminy B6 w osoczu techniką HPLC-MS/MS-badania pilotażowe*, Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 9.12.2023 r., Łódź, plakat (autor prezentujący).
6. **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *HPLC-ESI-MS/MS based method for the determination of the metabolite of vitamin B6 and cysteine in human plasma*, 6th Advances in Pharmaceutical Analysis (APA2024), 10th Conference of Polish Metabolomic Society (MetCircle 2024), 14-16.11.2024 r., Łódź, plakat (autor prezentujący).
7. A. Olszewski, K. Borowczyk, P. Kubalczyk, U. Sudomir, **M. Gaweł**, R. Głowacki, G. Chwatko, *Capsaicin in dietary supplements-chromatographic study*, 6th Advances in Pharmaceutical Analysis (APA2024), 10th Conference of Polish Metabolomic Society (MetCircle 2024), 14-16.11.2024 r., Łódź, plakat (współautor).
8. U. Sudomir, J. Piechocka, **M. Gaweł**, A. Olszewski, P. Kubalczyk, *Determination of paracetamol in pharmaceuticals*, 6th Advances in Pharmaceutical Analysis (APA2024), 10th Conference of Polish Metabolomic Society (MetCircle 2024), 14-16.11.2024 r., Łódź, plakat (współautor).
9. M. Płodzik, **M. Gaweł**, R. Głowacki, J. Piechocka, *Przygotowanie próbek leków i kosmetyków do oznaczania tioproliny techniką HPLC-UV. Dobór warunków prowadzenia procesu derywatyzacji*, II Ogólnopolska Konferencja Studencka CHeMoLuBNi, 26.05.2025 r., Łódź, plakat (współautor).
10. **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Opracowanie metody umożliwiającej oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka techniką HPLC-UV*, Polska Konferencja Chemii Analitycznej (PoKoChA) 2025, 1-4.07.2025 r., Gdańsk, plakat (autor prezentujący).
11. **M. Gaweł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Chromatograficzne metody oznaczania pochodnej cysteiny i witaminy B6 w osoczu człowieka*, Polska

- Konferencja Chemii Analitycznej (PoKoChA) 2025, 1-4.07.2025 r., Gdańsk, plakat (autor prezentujący).
12. **M. Gawęł**, M. Płodzik, R. Głowacki, J. Piechocka, *Chromatograficzna metoda oznaczania tioproliny w produktach leczniczych i kosmetycznych*, Polska Konferencja Chemii Analitycznej (PoKoChA) 2025, 1-4.07.2025 r., Gdańsk, plakat (współautor).
 13. M. Płodzik, **M. Gawęł**, R. Głowacki, J. Piechocka, *Przygotowanie próbek leków i kosmetyków do oznaczania tioproliny techniką HPLC-UV*, III Warszawskie Sympozjum Chemiczne w ProbUWce, 11-12.04.2026 r., Warszawa, plakat (współautor).
 14. **M. Gawęł**, R. Głowacki, J. Piechocka, *Analysis of berry superfruits for total thiol content by LC-UV- based method*, 20th International Scientific Conference The Vital Nature Sign, 14-15.05.2026 r., konferencja hybrydowa: online oraz Kaunas (Litwa), komunikat ustny (autor prezentujący).
 15. M. Płodzik, **M. Gawęł**, N. Ciszek, J. Piechocka, *Chromatograficzne badania trwałości tiolakton homocysteiny i metioniny w warunkach laboratoryjnych*, Konferencja Chemia-Biznes-Śródowno (ChemBiŚ), 30-31.05.2026 r., Gdańsk, plakat (współautor).
 16. N. Ciszek, M. Płodzik, **M. Gawęł**, J. Piechocka, *Chromatograficzne badanie przemian metioniny do tiolakton homocysteiny w warunkach laboratoryjnych*, III Ogólnopolska Konferencja Studencka CHeMoLuBNi, 25.05.2026 r., Łódź, plakat (współautor).
 17. M. Płodzik, **M. Gawęł**, R. Głowacki, J. Piechocka, *Oznaczanie tioproliny w lekach i kosmetykach techniką HPLC-UV – walidacja nowo opracowanej metody oraz badania aplikacyjne*, III Ogólnopolska Konferencja Studencka CHeMoLuBNi, 25.05.2026 r., Łódź, plakat (współautor).
 18. **M. Gawęł**, R. Głowacki, J. Piechocka, *Superowoce i ich potencjał antyoksydacyjny – analiza tioli metodą LC-ESI-MS/MS*, XVII Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, 9.06.2026 r., Łódź, plakat (autor prezentujący).
 19. **M. Gawęł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Development of method for the determination of homocysteine thiolactone in human urine using HPLC-UV*,

International Conference Natural Science Baltic Conference, 27-28.06.2026 r., online, komunikat ustny (autor prezentujący).

- **wystąpienia konferencyjne przed rozpoczęciem studiów doktoranckich:**

1. **M. Gawęł**, J. Piechocka, *Niekonwencjonalne płyny biologiczne jako alternatywa dla badań rutynowych*, I Ogólnopolska Konferencja Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 10-12.09.2020 r., online, komunikat ustny (autor prezentujący).
2. **M. Gawęł**, J. Piechocka, *Could saliva become the gold standard in clinical trails*, 5th Edition National Scientific Conference „e-Factory of Science”, 10.04.2021 r., online, komunikat ustny (autor prezentujący).
3. **M. Gawęł**, J. Piechocka, *Opracowanie metody oznaczania kreatyniny w moczu i ślinie – badania chromatograficzne*, e-zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 27-29.05.2021 r., online, komunikat ustny (autor prezentujący).
4. J. Piechocka, **M. Gawęł**, R. Głowacki, *Opracowanie chromatograficznej metody oznaczania wybranych związków tiolowych w superowocach*, 63. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 13-17.09.2021 r., Łódź, plakat (współautor).
5. **M. Gawęł**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Superowoce jako źródło cennych antyoksydantów. Badania chromatograficzne*, Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 29.01.2022 r., Poznań, plakat (autor prezentujący).
6. **M. Gawęł**, R. Głowacki, J. Piechocka, *Wybrane aminokwasy tiolowe jako cenne antyoksydanty w superowocach. Badania chromatograficzne.*, IV Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, 23-24.04.2022 r., online, plakat (autor prezentujący) - plakat nagrodzony.
7. U. Sodomir, P. Kubalczyk, J. Piechocka, **M. Gawęł**, *Redukcja wiązań disiarczkowych jako ważny etap przygotowania próbek biologicznych do analizy*, IV Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, 23-24.04.2022 r., online, plakat (współautor).

8. **M. Gawel**, R. Głowacki, J. Piechocka, *Opracowanie chromatograficznej metody oznaczania naturalnych antyoksydantów w superowocach*, III Konferencja Naukowa Studentów „Młodzi Zdolni”, 6.05.2022 r., Łódź, plakat (autor prezentujący).
9. J. Piechocka, **M. Gawel**, R. Głowacki, *Determination of creatinine in human biofluids by liquid chromatography coupled with UV and ELS detection*, 26th International Symposium on Separation Sciences, 28.06-1.07.2022 r., Lublana (Słowenia), plakat (współautor).
10. **M. Gawel**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Optymalizacja procedury przygotowania próbek owoców jagodowych do oznaczania całkowitej zawartości wybranych aminokwasów tiolowych techniką LC-DAD*, XIII Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, 24.06.2022 r., Łódź, plakat (autor prezentujący) - plakat nagrodzony.

Projekty badawcze:

- **projekty badawcze zrealizowane w trakcie trwania studiów doktoranckich:**
 1. Kierownik projektu badawczego pt. „Stworzenie chromatograficznych narzędzi do oceny zawartości niektórych związków bioaktywnych w owocach jagodowych w kontekście ich walorów prozdrowotnych”, projekt finansowany ze środków Uniwersytetu Łódzkiego w ramach Programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (IDUB), 2025-2026 r.
- **projekty badawcze zrealizowane przed rozpoczęciem studiów doktoranckich:**
 1. Kierownik projektu badawczego pt. „Stworzenie chromatograficznych narzędzi do oceny walorów prozdrowotnych tzw. superowoców dostępnych na rynku polskim”, projekt finansowany w ramach Studenckich Grantów Badawczych UŁ, 2021 r.

Działalność popularyzująca naukę i organizacyjna w trakcie trwania studiów doktoranckich:

1. Członkostwo w Komitecie organizacyjnym Łódzkiego Sympozjum Doktorantów Chemii w latach 2023-2025, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki.
2. Członkostwo w Komitecie organizacyjnym Zjazdu Zimowego Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 2023 r., Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki.
3. Udział w Dniu Otwartym na Wydziale Chemii oraz Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w latach 2024-2026.

Szkolenia odbyte w trakcie trwania studiów doktoranckich

1. *Praktyczne aspekty chromatografii cieczowej*, Szkolenie zorganizowane przez firmę Merck, Łódź, 14.05.2024 r.
2. Szkolenie obejmujące wykorzystanie min. technik separacyjnych i spektroskopowych w analizie związków chemicznych, Lublana (Słowenia), 05.2025 r.
3. *Ekstrakcja do fazy stałej w praktyce*, Szkolenie zorganizowane przez firmę Merck, online, 6.11.2024 r.

Staże i zagraniczne wyjazdy naukowe odbyte w trakcie trwania studiów doktoranckich

1. CEEPUS International Summer School „Hazardous Substances”, 5-23.05.2025 r., Lublana (Słowenia).

Literatura

- [1] Y. Martínez, X. Li, G. Liu, P. Bin, W. Yan, D. Más, M. Valdivié, C.A.A. Hu, W. Ren, Y. Yin, The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases, *Amino Acids*. 49 (2017) 2091–2098.
- [2] H. Jakubowski, Homocysteine modification in protein structure/function and human disease, *Physiol. Rev.* 99 (2019) 555–604.
- [3] L. Włodek, E. Bald, Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2003.
- [4] C.K. Sen, L. Packer, Thiol homeostasis and supplements in physical exercise, *Am. J. Clin. Nutr.* 72 (2000) 653S–669S.
- [5] D. Mackay, The mechanism of the reaction of cysteine with pyridoxal 5'-phosphate, *Arch. Biochem. Biophys.* 99 (1962) 93–100.
- [6] F. Bergel, K. Harrap, Interaction between carbonyl groups and biologically essential substituents. Part 111 The formation of thiazolidine derivative in aqueous solution from pyridoxal phosphate and l-cysteine, *J.Chem.Soc.* 789 (1961) 4051–4056.
- [7] H. Jakubowski, R. Głowacki, Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites, *Adv. Clin. Chem.* 55 (2011) 81–103.
- [8] J. Perła-Kaján, H. Jakubowski, Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 3140–3181.
- [9] P.V.S. Oliveira, F.R.M. Laurindo, Implications of plasma thiol redox in disease, *Clin. Sci.* 132 (2018) 1257–1280.
- [10] S.E. Moriarty-Craige, D.P. Jones, Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism, *Annu. Rev. Nutr.* 24 (2004) 481–509.
- [11] T. Toyo'oka, Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 3318–3330.
- [12] R. Moretti, P. Caruso, The controversial role of homocysteine in neurology:

From labs to clinical practice, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019).

- [13] S.G. Chrysant, G.S. Chrysant, The current status of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: a mini review, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 16 (2018) 559–565.
- [14] E. Muzurović, I. Kraljević, M. Solak, S. Dragnić, D.P. Mikhailidis, Homocysteine and diabetes: Role in macrovascular and microvascular complications, *J. Diabetes Complications.* 35 (2021) 1–16.
- [15] T. Hasan, R. Arora, A.K. Bansal, R. Bhattacharya, G.S. Sharma, L.R. Singh, Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer, *Exp. Mol. Med.* 51 (2019) 21–34.
- [16] A.D. Smith, H. Refsum, Homocysteine - from disease biomarker to disease prevention, *J. Intern. Med.* 290 (2021) 826–854.
- [17] S.K. Jain, D. Micinski, L. Huning, G. Kahlon, P.F. Bass, S.N. Levine, Vitamin D and L-cysteine levels correlate positively with GSH and negatively with insulin resistance levels in the blood of type 2 diabetic patients, *Eur. J. Clin. Nutr.* 68 (2014) 1148–1153.
- [18] J. Perła-Kaján, T. Twardowski, H. Jakubowski, Mechanisms of homocysteine toxicity in humans, *Amino Acids.* 32 (2007) 561–572.
- [19] G.S. Sharma, T. Kumar, T.A. Dar, L.R. Singh, Protein N-homocysteinylation: From cellular toxicity to neurodegeneration, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850 (2015) 2239–2245.
- [20] R. Esse, M. Barroso, I.T. De Almeida, R. Castro, The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: State-of-the-art, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–24.
- [21] W.K.C. Lai, M.Y. Kan, Homocysteine-induced endothelial dysfunction, *Ann. Nutr. Metab.* 67 (2015) 1–12.
- [22] B. Rojkovich, E. Nagy, T. Pröhle, G. Poór, P. Gergely, Urinary excretion of thiol compounds in patients with rheumatoid arthritis, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6 (1999) 683–685.

- [23] Y. Matsuo, Formation of schiff bases of pyridoxal phosphate. Reaction with metal ions, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 2011–2015.
- [24] M.R. Azarpazhooh, C. Bogiatzi, J.D. Spence, Stroke Prevention: Little-Known and Neglected Aspects, *Cerebrovasc. Dis.* 50 (2021) 622–635.
- [25] D.M. Zhang, J.X. Ye, J.S. Mu, X.P. Cui, Efficacy of Vitamin B Supplementation on Cognition in Elderly Patients With Cognitive-Related Diseases, *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 30 (2017) 50–59.
- [26] A.D. Smith, H. Refsum, Homocysteine, B Vitamins, and Cognitive Impairment, *Annu. Rev. Nutr.* 36 (2016) 211–239.
- [27] M. Gawęł, R. Głowacki, P. Kubalczyk, J. Piechocka, HPLC-MS/MS based method for the determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid in human plasma, *Sci. Rep.* 14 (2024) 1–11.
- [28] J. Piechocka, M. Wyszczelska-Rokiel, R. Głowacki, Simultaneous determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid and main plasma aminothiols by HPLC–UV based method, *Sci. Rep.* 13 (2023) 1–12.
- [29] J. Piechocka, M. Wrońska, I.E. Głowacka, R. Głowacki, 2-(3-Hydroxy-5-Phosphonooxymethyl-2-Methyl-4-Pyridyl)-1,3-Thiazolidine-4-Carboxylic Acid, Novel Metabolite of Pyridoxal 5'-Phosphate and Cysteine Is Present in Human Plasma—Chromatographic Investigations, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–16.
- [30] J. Piechocka, M. Wrońska, R. Głowacki, Chromatographic strategies for the determination of aminothiols in human saliva, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 126 (2020) 1–14.
- [31] J. Piechocka, M. Wieczorek, R. Głowacki, Gas chromatography–mass spectrometry based approach for the determination of methionine-related sulfur-containing compounds in human saliva, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–18.
- [32] A. Mescher, *Histologia Janqueira. Podręcznik i atlas*, Edra Urban & Partner,

2018.

- [33] W. Dżygóra, Podstawy histologii. Cz. 1, Tkanki i ich charakterystyka, Karkonoska Państwowa Szkoła Wyższa w Jeleniej Górze, 2015.
- [34] E. Świętochowska, Białka osocza, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, 2011.
- [35] S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A.C. Guo, M.R. Wilson, C. Knox, T.C. Bjorn Dahl, R. Krishnamurthy, F. Saleem, P. Liu, Z.T. Dame, J. Poelzer, J. Huynh, F.S. Yallou, N. Psychogios, E. Dong, R. Bogumil, C. Roehring, D.S. Wishart, The Human Urine Metabolome, PLoS One. 8 (2013) e73076.
- [36] A.H. Emwas, C. Luchinat, P. Turano, L. Tenori, R. Roy, R.M. Salek, D. Ryan, J.S. Merzaban, R. Kaddurah-Daouk, A.C. Zeri, G.A. Nagana Gowda, D. Raftery, Y. Wang, L. Brennan, D.S. Wishart, Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review, Metabolomics. 11 (2015) 872–894.
- [37] J. Piechocka, N. Matwiej, M. Gawęł, M. Matyjaszczyk, R. Głowacki, G. Chwatko, Application of the HPLC-ELSD technique for the determination of major metabolites of ibuprofen and creatinine in human urine, Sci. Rep. 13 (2023) 1–14.
- [38] A.C. Brown, Understanding Food: Principles and Preparation, Cengage Learning, 2014.
- [39] G. Chwatko, E. Kuźniak, P. Kubalczyk, K. Borowczyk, M. Wyszczelska-Rokiel, R. Głowacki, Determination of cysteine and glutathione in cucumber leaves by HPLC with UV detection, Anal. Methods. 6 (2014) 8039–8044.
- [40] A. Tsiasioti, A.S. Zotou, P.D. Tzanavaras, Single run analysis of glutathione and its disulfide in food samples by liquid chromatography coupled to on-line post-column derivatization, Food Chem. 361 (2021).
- [41] J.S. Barnes, H.P. Nguyen, S. Shen, K.A. Schug, General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1216 (2009) 4728–4735.

- [42] D. Li, X. Meng, B. Li, Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis, *J. Food Compos. Anal.* 47 (2016) 1–7.
- [43] O. Demirkol, C. Adams, N. Ercal, Biologically important thiols in various vegetables and fruits, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 8151–8154.
- [44] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, A. Zotou, Ethyl propiolate as a post-column derivatization reagent for thiols: Development of a green liquid chromatographic method for the determination of glutathione in vegetables, *Anal. Chim. Acta.* 690 (2011) 122–128.
- [45] S. Millan, D.W. Jeffery, S. Dall'Acqua, A. Masi, A novel HPLC-MS/MS approach for the identification of biological thiols in vegetables, *Food Chem.* 339 (2021).
- [46] V.C. Fernandes, V.F. Domingues, N. Mateus, C. Delerue-Matos, Determination of pesticides in fruit and fruit juices by chromatographic methods. An overview, *J. Chromatogr. Sci.* 49 (2011) 715–730.
- [47] M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards, D. Ryan, Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits, *Analyst.* 125 (2000) 989–1009.
- [48] P. Garcia-Salas, A. Morales-Soto, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples, *Molecules.* 15 (2010) 8813–8826.
- [49] P.M. Ueland, M.A. Mansoor, A.B. Guttormsen, F. Müller, P. Aukrust, H. Refsum, A.M. Svardal, Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status - A possible element of the extracellular antioxidant defense system, *J. Nutr.* 126 (1996) 1281–1284.
- [50] E. Bald, G. Chwatko, R. Głowacki, K. Kuśmierek, Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A.* 1032 (2004) 109–115.
- [51] K. Kuśmierek, G. Chwatko, R. Głowacki, E. Bald, Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection,

- J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 877 (2009) 3300–3308.
- [52] K. Kuśmierek, G. Chwatko, R. Głowacki, P. Kubalczyk, E. Bald, Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 879 (2011) 1290–1307.
- [53] P. Monostori, G. Wittmann, E. Karg, S. Túri, Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 877 (2009) 3331–3346.
- [54] C. Bayle, E. Caussé, F. Couderc, Determination of aminothiols in body fluids, cells, and tissues by capillary electrophoresis, Electrophoresis. 25 (2004) 1457–1472.
- [55] J. Piechocka, R. Głowacki, Up-to-date knowledge about analytical methods for homocysteine thiolactone determination in biological samples, TrAC - Trends Anal. Chem. 159 (2023) 1–15.
- [56] M. Gaweł, R. Głowacki, J. Piechocka, First HPLC-UV method for the determination of homocysteine thiolactone in human urine after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide, Sci. Rep. 15 (2025) 1–14.
- [57] J. Piechocka, R. Głowacki, Comprehensive studies on the development of HPLC-MS/MS and HPLC-FL based methods for routine determination of homocysteine thiolactone in human urine, Talanta. 272 (2024) 1–13.
- [58] M. Kuhn, Å. Svanström, N.N.A. Kyei, S. Lignell, H.-U. Humpf, B. Cramer, Matrix effect variability in urine samples from different cohorts and implications on LC-ESI-MS mycotoxin biomarker analysis., Toxins (Basel). 18 (2026) 1–15.
- [59] L. Nováková, Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis, J. Chromatogr. A. 1292 (2013) 25–37.
- [60] J. Lankelma, P.G.M. Penders, A. Leyva, H.M. Pinedo, Determination of thioproline in plasma using high performance liquid chromatography, 12 (1981) 131–137.

- [61] J. Liu, W. Chan, Quantification of thiazolidine-4-carboxylic acid in toxicant-exposed cells by isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry reveals an intrinsic antagonistic response to oxidative stress-induced toxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 28 (2015) 394–400.
- [62] H.S. Shin, H.S. Ann, B.H. Lee, Determination of thiazolidine-4-carboxylates in urine by chloroformate derivatization and gas chromatography-electron impact mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1225–1232.
- [63] J. Piechocka, N. Litwicka, R. Głowacki, Identification and determination of 1,3-thiazinane-4-carboxylic acid in human urine—chromatographic studies, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 1–19.
- [64] ICH, M10 Bioanalytical method validation and study sample analysis, (2022).
- [65] R. Głowacki, J. Piechocka, E. Bald, G. Chwatko, Application of separation techniques in analytics of biologically relevant sulfur compounds, in: B. Buszewski, I. Baranowska (Eds.), *Handb. Bioanal.*, Springer Nature Switzerland, 2022.
- [66] E. Bald, R. Głowacki, 2-Chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate as an effective and thiol specific UV-tagging reagent for liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (2001) 1323–1339.
- [67] E. Bald, S. Sypniewski, J. Drzewoski, M. Stępień, Application of 2-halopyridinium salts as ultraviolet derivatization reagents and solid-phase extraction for determination of captopril in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 681 (1996) 283–289.

dr hab. Justyna Piechocka, prof. UŁ.....

Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii.....

Katedra Chemii Środowiska.....

90-236 Łódź, ul. Pomorska 163/165.....

adres e-mail:justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl

tel. 42-635-58-46.....

Dane kontaktowe osoby składającej oświadczenie

Łódź, dnia 1 czerwca 2026 r.

Miejscowość i data

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w poniżej zestawionych pracach, które Pani mgr Marta Gawęł włącza w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora, mój wkład w ich powstanie polegał na:

1. M Gawęł, J. Piechocka, R. Głowacki, Tiazynowe i tiazolidynowe pochodne aminokwasów siarkowych i wybranych endogennych aldehydów. *Wiad. Chem.* 78(2024) 1607-1625.

doradztwie merytorycznym, współtworzeniu koncepcji, ocenie treści i korekcie manuskryptu publikacji

2. M. Gawęł, J. Piechocka, R. Głowacki, „Superowoce” okiem chemika analityka, *Analityka* 2(2023) 26-31.

doradztwie merytorycznym, współtworzeniu koncepcji, ocenie treści i korekcie manuskryptu publikacji.

3. M. Gawęł, R. Głowacki, P. Kubalczyk, J. Piechocka, HPLC-MS/MS based method for the determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid in human plasma, *Sci. Rep.* 14 (2024) 1–11.

opracowaniu koncepcji badań i metodologii, określeniu zakresu prac, współudziale w dyskusji wyników, analizie formalnej i opracowaniu danych, przygotowaniu i redakcji manuskryptu, kierowaniu pracami laboratoryjnymi oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją czasopisma.

4. M. Gawęł, R. Głowacki, J. Piechocka, First HPLC-UV method for the determination of homocysteine thiolactone in human urine after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide, *Sci. Rep.* 15 (2025) 1–14.

opracowaniu koncepcji badań i metodologii, określeniu zakresu prac, współudziale w dyskusji wyników, analizie formalnej i opracowaniu danych, przygotowaniu i redakcji manuskryptu, kierowaniu pracami laboratoryjnymi oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją czasopisma.

5. M. Gawęł, R. Głowacki, J. Piechocka, Analysis of berry superfruits for reduced and total thiol content by LC-UV- based methods.

opracowaniu koncepcji badań i metodologii, określeniu zakresu prac, współudziale w dyskusji wyników, analizie formalnej i współudziale przy opracowaniu danych, przygotowaniu i redakcji manuskryptu, kierowaniu pracami laboratoryjnymi oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją czasopisma.

6. M. Gawęł, R. Głowacki, J. Piechocka, The first LC-ESI-MS/MS-based method(s) for the determination of reduced and grand total thiols in berry superfruits.

opracowaniu koncepcji badań i metodologii, określeniu zakresu prac, współudziale w dyskusji wyników, analizie formalnej i współudziale przy opracowaniu danych, przygotowaniu i redakcji manuskryptu, kierowaniu pracami laboratoryjnymi.



Podpis osoby składającej oświadczenie

dr hab. Paweł Kubalczyk, prof. UŁ

Łódź, dnia 18 czerwca 2026 r.

Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii

Miejscowość i data

Katedra Chemii Środowiska

90-236 Łódź, ul. Pomorska 163/165

adres e-mail: pawel.kubalczyk@chemia.uni.lodz.pl

tel. 42-635-58-41

Dane kontaktowe osoby składającej oświadczenie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w poniższej pracy, którą Pani mgr Marta Gawęł włącza w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora, **mój wkład w jej powstanie polegał na:**

1. M. Gawęł, R. Głowacki, P. Kubalczyk, J. Piechocka, HPLC-MS/MS based method for the determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid in human plasma, *Sci. Rep.* 14 (2024) 1–11.

wizualizacji danych oraz ocenie treści manuskryptu publikacji.



.....
Podpis osoby składającej oświadczenie

Prof. dr hab. Rafał Głowacki

Łódź, dnia 18 czerwca 2026 r.

Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii

Miejscowość i data

Katedra Chemii Środowiska

90-236 Łódź, ul. Pomorska 163/165

adres e-mail: rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl

tel. 42-635-58-35

Dane kontaktowe osoby składającej oświadczenie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w poniżej zestawionych pracach, które Pani mgr Marta Gawęł włącza w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora, mój wkład w ich powstanie polegał na:

1. M Gawęł, J. Piechocka, R. Głowacki, Tiazynowe i tiazolidynowe pochodne aminokwasów siarkowych i wybranych endogennych aldehydów. *Wiad. Chem.* 78(2024) 1607-1625.

doradztwie merytorycznym, współtworzeniu koncepcji, ocenie treści/korekcie manuskryptu publikacji

2. M. Gawęł, J. Piechocka, R. Głowacki, „Superowoce” okiem chemika analityka, *Analityka* 2 (2023) 26-31.

doradztwie merytorycznym, współtworzeniu koncepcji,, ocenie treści/korekcie manuskryptu publikacji.

3. M. Gawęł, R. Głowacki, P. Kubalczyk, J. Piechocka, HPLC-MS/MS based method for the determination of 2-(3-hydroxy-5-phosphonooxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid in human plasma, *Sci. Rep.* 14 (2024) 1–11.

współtworzeniu koncepcji badań, określeniu zakresu prac, współudziale w dyskusji wyników, zapewnieniu finansowania badań, ocenie treści/korekcie manuskryptu publikacji.

4. M. Gawęł, R. Głowacki, J. Piechocka, First HPLC-UV method for the determination of homocysteine thiolactone in human urine after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide, *Sci. Rep.* 15 (2025) 1–14.

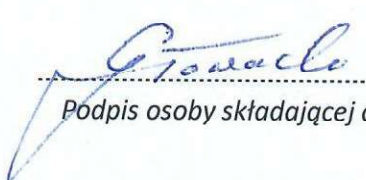
współudziale w zapewnieniu finansowania badań, doradztwie merytorycznym i ocenie treści/korekcie manuskryptu publikacji.

5. M. Gawęł, R. Głowacki, J. Piechocka, Analysis of berry superfruits for reduced and total thiol content by LC-UV- based methods.

współtworzeniu koncepcji badań, doradztwie merytorycznym, współudziale w dyskusji wyników, zapewnieniu finansowania badań, ocenie treści/korekcie manuskryptu publikacji.

6. M. Gawęł, R. Głowacki, J. Piechocka, The first LC-ESI-MS/MS-based method(s) for the determination of reduced and grand total thiols in berry superfruits.

współtworzeniu koncepcji badań, doradztwie merytorycznym, współudziale w dyskusji wyników, zapewnieniu finansowania badań, ocenie treści/korekcie manuskryptu publikacji oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją czasopisma.


Podpis osoby składającej oświadczenie