

ROZPRAWA DOKTORSKA

**ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII GAZOWEJ
W ANALIZIE MOCZU I ŚLINY
NA ZAWARTOŚĆ TIOLAKTONU HOMOCYSTEINY**

Monika Wieczorek

Praca wykonana w Katedrze Chemii Środowiska
Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego
pod kierunkiem
prof. dr. hab. Rafała Głowackiego

Łódź, 2022

Spis treści

Wykaz skrótów i symboli	3
Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	4
Wstęp	5
1. Właściwości, powstawanie i rola tiolaktonu homocysteiny	7
1.1. Właściwości fizykochemiczne	7
1.2. Występowanie i powstawanie w organizmie	9
1.3. Związek z chorobami	11
2. Przegląd metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny w płynach biologicznych	14
2.1. Mocz, osocze i ślina jako materiał diagnostyczny	14
2.2. Metody oparte o wysokosprawną chromatografię cieczową	16
2.3. Metody bazujące na elektroforezie kapilarnej	20
2.4. Metody bazujące na chromatografii gazowej	21
3. Uzasadnienie podjęcia tematu	23
4. Wyniki	27
5. Podsumowanie	74
5.1. Zalety i ograniczenia opracowanych metod	75
5.2. Wnioski dotyczące śliny jako potencjalnego zamiennika moczu i osocza	77
6. Wnioski końcowe	80
Abstract	81
Wykaz cytowanej literatury	82
Życiorys/dorobek naukowy	87
Oświadczenia współautorów	92

Wykaz skrótów i symboli

CE	elektroforeza kapilarna
CMLT	tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylolepidyniowy
Crn	kreatynina
Cys	cysteina
CZE	strefowa elektroforeza kapilarna
FLD	detektor fluorescencyjny
GC-MS	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
Hcy	homocysteina
HFBA	bezwodnik kwasu heptafluorobutylowego
HTL	tiolaktonu homocysteiny
IBCF	chloromrówczan izobutyłu
HSL	lakton homoseryny
IS	standard wewnętrzny
LC-MS/MS	chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
LOD	granica wykrywalności
LOQ	granica oznaczalności
Met	metionina
MSTFA	N-trimetylosililo-N-metylotrifluoroacetamid
Nϵ-Hcy-Lys	N- ϵ -homocysteinylozyna
N-Hcy białka	N-homocysteinylowane białka
OPA	aldehyd <i>o</i> -ftalowy
R²	współczynnik determinacji
RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
SDME	mikroekstrakcja do pojedynczej kropli
SPE	ekstrakcja do fazy stałej
TCEP	tris(2-karboksyetylo)fosfina
TMCS	chlerek trimetylosililowy
UV-Vis	spektroskopia w zakresie promieniowania ultrafioletowego i widzialnego

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

[D1] **M. Wrońska**, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, R. Głowacki, *Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine*, **Journal of Chromatography B**, 1099 (2018) 18–24.

[D2] J. Piechocka, **M. Wrońska**, G. Chwatko, H. Jakubowski, R. Głowacki, *Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry*, **Journal of Chromatography B**, 1149 (2020) 122155.

[D3] J. Piechocka, **M. Wieczorek**, R. Głowacki, *Gas Chromatography–Mass Spectrometry Based Approach for the Determination of Methionine-Related Sulfur-Containing Compounds in Human Saliva*, **International Journal of Molecular Sciences**, 21 (2020) 9252.

[D4] **M. Wrońska**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Chromatografia gazowa w analizie moczu i śliny na zawartość tiolaktonu homocysteiny*, **Analityka**, numer 1, rok (XIX) 2021, ISSN-1509-4650.

Wstęp

Tiolakton homocysteiny (HTL), inaczej tiolakton kwasu 2-amino-4-merkaptomasłowego jest cyklicznym tioestrem homocysteiny (Hcy), będącym metabolitem pośrednim na szlaku przemian metioniny (Met) w komórkach organizmów żywych. Doniesienia literaturowe o potencjalnej toksyczności tego związku zainicjowały szereg eksperymentów w celu weryfikacji, przyjętej w środowisku naukowym hipotezy o zależności przyczynowo skutkowej pomiędzy podwyższonym stężeniem HTL a rozwojem schorzeń układu krążenia i chorób nowotworowych, które pomimo ogromnego postępu w medycynie wciąż stanowią podstawowe zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Powszechnie wiadomo, że cząsteczka HTL jest chemicznie reaktywna, przez co zmienia strukturę białek, wpływa negatywnie na ich funkcję oraz działa toksycznie na komórki. W wyniku reakcji HTL z resztami lizynowymi białek powstają tzw. N-homocysteinyłowane białka (N-Hcy białka), które przyczyniają się do powstania wielu stanów patologicznych w organizmie człowieka. Do tej pory obecność tioestru potwierdzono w płynach biologicznych, takich jak mocz i osocze. Pomimo dużego zainteresowania tematyką wpływu HTL na zaburzenia prawidłowego funkcjonowania organizmu oraz patologie związane z N-homocysteinyłacją białek, zaproponowano zaledwie kilka metod oznaczania HTL w płynach biologicznych, przy czym żadna z opracowanych procedur nie wykazuje potencjału aplikacyjnego wobec próbek śliny. Jest to w pewnym sensie zaskakujące, ponieważ w ostatnim czasie w badaniach klinicznych ślina stanowi materiał, któremu poświęca się coraz więcej uwagi ze względu na nieinwazyjny i prosty sposób pobierania tego płynu biologicznego. Wykorzystanie śliny w diagnostyce medycznej daje także nową możliwość monitorowania zawartości ważnych biologicznie tioli w organizmie oraz przypuszczalnie może mieć korzystny wpływ na częstszą profilaktykę pierwotną jak i wtórną u pacjentów. Przeprowadzone dotychczas badania laboratoryjne nie wyjaśniają jednoznacznie patofizjologicznej roli HTL w organizmie, wobec czego brak jest wystarczających dowodów czy związek ten może pełnić rolę biochemicznego markera o znaczeniu prognostycznym i diagnostycznym w niektórych stanach chorobowych u ludzi. Z pewnością ciągły postęp naukowo-techniczny, zarówno w zakresie rozwijania nowych technik przygotowania próbki do analizy jak i metod pomiarowych, przyczyni się do opracowywania kolejnych procedur pozwalających na selektywne, precyzyjne i dokładne oznaczenie HTL i N-Hcy białek w materiale biologicznym. Ułatwi to wnikliwe zbadanie

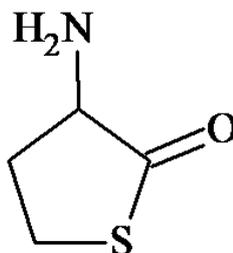
przemian metabolicznych niskocząsteczkowych związków siarki oraz wyjaśnienie mechanizmu ich szkodliwego działania na fizjologię komórkową.

Mając na względzie powyższe rozważania oraz istotną rolę jaką niskocząsteczkowe związki siarki odgrywają we wszystkich systemach biologicznych, przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie oryginalnych, prostych i czułych metod oznaczania HTL w moczu i ślinie człowieka, przy wykorzystaniu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Zaproponowane metodologie mają również umożliwić określenie zależności stężeniowej pomiędzy zawartością HTL we wspomnianych płynach biologicznych. Celem takiego podejścia będzie oszacowanie potencjału diagnostycznego śliny w kontekście jej wykorzystania na etapie diagnozowania chorób cywilizacyjnych, włączając choroby układu krążenia, neurodegeneracyjne czy nowotworowe.

1. Właściwości, powstawanie i rola tiolaktonu homocysteiny

1.1. Właściwości fizykochemiczne

HTL jest związkiem cyklicznym, posiadającym w pierścieniu 4 atomy węgla i 1 atom siarki. Komercyjnie jest dostępny pod postacią soli kwasu chlorowodorowego. Ten biały, drobnokrystaliczny i bezwonny proszek pozostaje stabilnym w temperaturze pokojowej i odznacza się dobrą rozpuszczalnością w wodzie. W warunkach fizjologicznych (pH = 7,4, 37 °C) HTL jest cząsteczką obojętną, a jego okres półtrwania wynosi około 30 h i jest dłuższy niż w przypadku innych wewnątrzcząsteczkowych aminoacylotioestrów [1]. Zmiana pH na zasadowe powoduje szybką hydrolizę HTL do Hcy [2].



Rysunek 1. Ideowa struktura chemiczna HTL.

Wartość pK_a grupy aminowej cząsteczki HTL wynosi 6,67 i jest wyjątkowo niska, w porównaniu z innymi aminoacylotioestrami, dla których grupa α -aminowa posiada pK_a około 9,5 [3]. Tak niska wartość jest konsekwencją obecności atomu siarki w pierścieniu.

Tabela 1. Wybrane właściwości fizykochemiczne HTL [1].

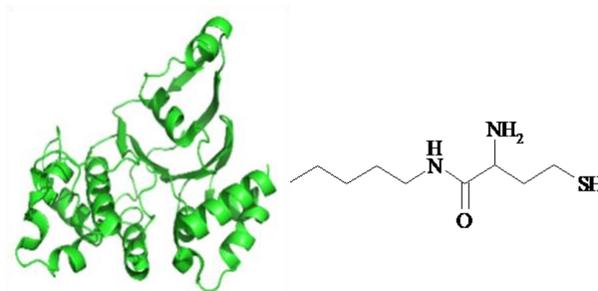
Tiolakton homocysteiny	Właściwość/wartość
Charakter chemiczny	Aminoacylo – tioester
pK_a grupy aminowej	6,67
Absorpcja promieniowania UV-Vis	Absorbuje, maksimum występuje przy długości fali $\lambda=240$ nm
Reaktywność chemiczna	Reaguje z grupami aminowymi białek Reaguje z aldehydami Podatny na katalizowaną hydrolizę do Hcy Oporny na utlenianie
Okres półtrwania w roztworze w pH 7,4 i temperaturze 37°C	≈ 30 godzin

Struktura cząsteczki HTL umożliwia wykorzystanie absorpcji promieniowania z zakresu UV do jego wykrywania w próbkach biologicznych. HTL wykazuje maximum absorpcji przy analitycznej długości fali równiej 240 nm oraz $\epsilon = 5\ 000\ \text{dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$ [4]. Większość aminokwasów tiolowych, w tym toksyczny metabolit – Hcy, można oznaczać chromatograficznie z wykorzystaniem detektora UV-Vis, bez przekształcania analitów w pochodną [4-6], ale ze względu na fakt, iż znaczna część substancji organicznych i nieorganicznych również pochłania promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie 190-210 nm, rejestrowanie sygnałów analitycznych przy tej długości fali nie ma praktycznego znaczenia. Ponadto w materiale biologicznym znajdują się spokrewnione z małowcząsteczkowymi związkami siarki metabolity o podobnych właściwościach fizykochemicznych oraz interferujące składniki matrycy, co utrudnia bądź wręcz uniemożliwia selektywne oddzielenie składników próbek w niezmienionej postaci. Podobnie jest w przypadku HTL. Stosunkowo niewielka wartość molowego współczynnika absorpcji, brak silnych chromoforów oraz niskie stężenie analitu w płynach ustrojowych człowieka decyduje o tym, że znacznie częściej w metodach oznaczania HTL wykorzystuje się reakcję derywatywacji chemicznej, np. z aldehydem *o*-ftalowym (OPA). W reakcji tej, opisaną przez Mukai i współpracowników, powstaje pochodna o właściwościach fluorescencyjnych, co wykorzystano podczas rozwijania chromatograficznych metod wykrywania i oznaczania HTL [2].

Ze względu na właściwości fizyczne cząsteczki HTL, takie jak brak lotności, stabilności termicznej i niska masa cząsteczkowa, niezbędnym etapem w procedurze przygotowania próbki podczas jego oznaczania techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) jest modyfikacja chemiczna. Stosunkowo duża reaktywność chemiczna HTL wynika z aminoacylotioestrowego charakteru związku oraz silnych naprężeń wiązań między atomami układu cyklicznego. HTL ulega reakcjom substytucji nukleofilowej jak i elektrofilowej [7], z łatwością acyluje wolne grupy aminowe aminokwasów i białek [8,9]. Ponadto, α -aminowa grupa w cząsteczce HTL wykazuje wysoką reaktywność względem aldehydów takich jak aldehyd mrówkowy, octowy, *o*-ftalowy, fosforan pirydoksalu czy streptomycyna [7]. Te cechy są wykorzystywane na etapie derywatywacji chemicznej zarówno w przypadku metod bazujących na HPLC jak i tych wykorzystujących GC, opracowanych przez Autorkę tej rozprawy.

W reakcji HTL z aldehydami dość nieoczekiwanie tworzone są iminy, pozostające w równowadze tautomerycznej z karbinoloaminami. Wytworzona w pierwszym etapie reakcji karbinoloamina ulega konwersji do 1,3-tetrahydropyridiny-4-karbonylowej lub jednego z jej dwóch podstawowych analogów [10].

HTL uczestniczy również w tworzeniu wiązań izopeptydowych z grupami ϵ -aminowymi bocznych łańcuchów lizyny wchodzącej w skład białek [1,11]. Reakcja ta prowadzi do tzw. N-homocysteinyłacji, czego konsekwencją są istotne zmiany strukturalne białek, a nawet ich degeneracja.



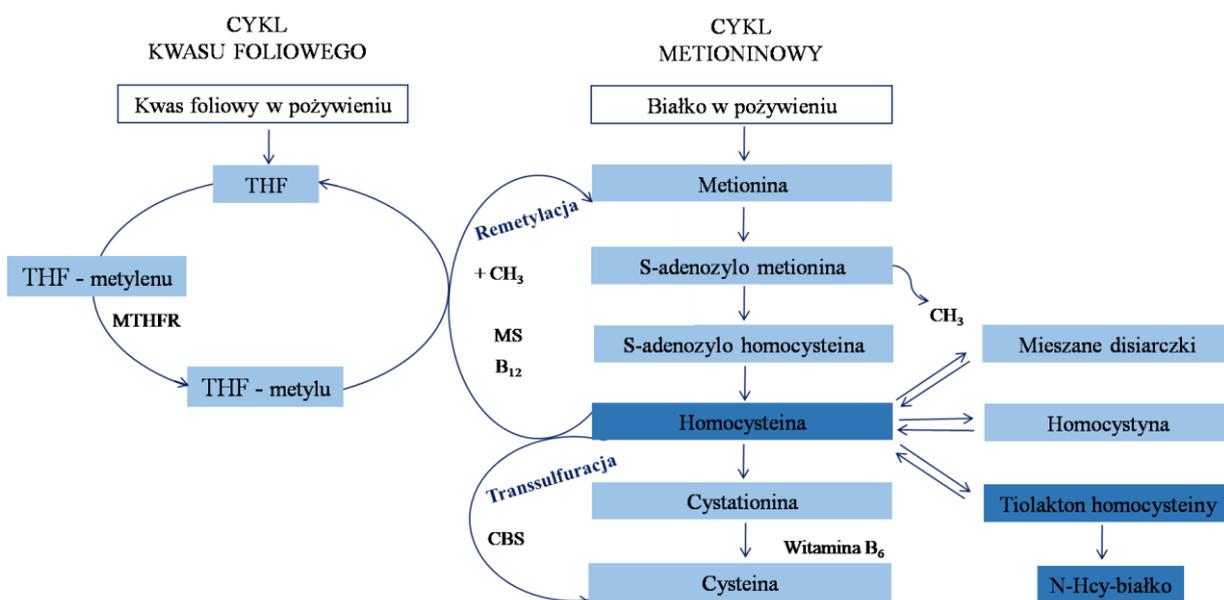
Rysunek 2. Poglądowa struktura N-homocysteinyłowanego białka.

Zniszczone N-Hcy białka usuwane są z organizmu na drodze degradacji proteolitycznej, co wiąże się z obniżeniem energii komórek, a co za tym idzie, ograniczony zostaje proces ich wzrostu. Na tej podstawie uważa się, że HTL jest bardziej niebezpieczny dla organizmu człowieka niż sama Hcy. Wykazano, że potranslacyjnie zmodyfikowane, w wyniku reakcji N-homocysteinyłacji białka wykazują właściwości toksyczne i indukują autoimmunologiczną odpowiedź organizmu, która wiązana jest z chorobami układu sercowo-naczyniowego i udarami mózgu u ludzi [12,13].

1.2. Występowanie i powstawanie w organizmie

Ważną biologicznie grupę związków będących produktami przejściowymi licznych przemian metabolicznych w komórkach organizmów żywych stanowią niskocząsteczkowe tiole. Prekursorem do ich wytwarzania jest Met, dostarczana do organizmu wraz z pożywieniem pochodzenia zwierzęcego. Uwolniony z białek w procesie trawienia aminokwas jest wykorzystywany w biosyntezie nowych białek oraz S-adenozylometioniny (SAM), która pełni rolę uniwersalnego donora grup metylowych. Konsekwencją zachodzących wewnątrzkomórkowych przemian jest utworzenie cząsteczki Hcy, której dalsze przemiany zależą od aktualnych potrzeb organizmu, i które w warunkach fizjologicznych przebiegają na drodze remetylacji i transsulfuracji. Pierwszy szlak

metaboliczny polega na odtworzeniu Met pod wpływem syntazy metioninowej w obecności witaminy B₁₂ jako koenzymu i metylotetrahydrofolianu jako kosubstratu. Reakcje transsulfuracji są przemianami nieodwracalnymi w kierunku utworzenia cząsteczki cysteiny (Cys), które zachodzą z udziałem kwasu foliowego i reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR). W sytuacji gdy jeden lub obydwa z wyżej wspomnianych szlaków zostaną zaburzone dochodzi do sekwencji przemian, w wyniku których cząsteczka Hcy w komórkach ulega cyklizacji do tioestru. Cząsteczka HTL powstaje, kiedy to Hcy jest błędnie wybierana i aktywowana zamiast Met przez enzym syntetazę metionilo-RNA w procesie biosyntezy białek, co jest wynikiem dużego podobieństwa strukturalnego pomiędzy obydwooma związkami. Proces ten nasila się w stanach zaburzeń genetycznych i żywieniowych, kiedy obserwuje się niedobór lub nadmierną podaż Met [11].



Rysunek 3. Uproszczony schemat szlaku metabolicznego niskocząsteczkowych związków siarki: MS: syntaza metioninowa, THF: tetrahydrofolian (FH₄), MTHFR: reduktaza metylenotetrahydrofolianowa, CBS: syntaza β-cystationinowa [1,11].

Ze względu na stosunkowo niską wartość pK_a, w warunkach fizjologicznych HTL jest neutralny dla komórek i gromadzi się głównie w płynach zewnątrzkomórkowych, takich jak mocz i osocze krwi. Stężenie HTL w moczu człowieka jest ok.100 razy wyższe niż w osoczu. Powodem tej różnicy jest fakt, że ponad 95% HTL jest usuwane z organizmu przez nerki wraz z moczem, co stanowi jeden z podstawowych sposobów detoksykacji tego szkodliwego metabolitu z komórek. Typowy poziom HTL w moczu

zdrowego człowieka waha się w granicach od 11 do 485 nmol/l (mediana 144 nmol/l), co stanowi 2,5-28% całkowitej Hcy (tHcy) występującej w moczu. Dla próbek osocza zidentyfikowano stężenia w zakresie 0,1 - 22,6 nmol/l (mediana 0,56 nmol/l) [14-16].

Podwyższone stężenie HTL w organizmie jest wynikiem osłabienia reakcji remetylacji lub transsulfuracji spowodowanego zmianami genetycznymi enzymów zaangażowanych w metabolizm Hcy. Także nieodpowiedni sposób odżywiania, dieta bogata w Met lub ograniczona podaż witamin z grupy B, przyczyniają się do wzrostu poziomu HTL w organizmach ludzi i myszy [17-18]. Udowodniono zależność pomiędzy podwyższonym stężeniem analitu w komórkach a ryzykiem wystąpienia chorób układu krążenia, podobnie jak w przypadku hiperhomocysteinemii, charakteryzującej się zwiększonym poziomem tHcy, przekraczającym 15 $\mu\text{mol/l}$ osocza [17,19].

1.3. Związek z chorobami

Odkrycie w organizmach żywych, w tym także w organizmie człowieka, HTL oraz białek posiadających w swej strukturze cząsteczkę Hcy związaną wiązaniem peptydowym, doprowadziło do postawienia hipotezy, że chemicznie reaktywny HTL stanowi wyjaśnienie dla powiązania Hcy z patologiami chorób naczyniowych [7,20], neurodegeneracyjnych [21,22] oraz schorzeń układu moczowego u ludzi [23]. Wieloletnie przekonanie badaczy różnych specjalności o bezpośrednim związku Hcy z wyżej wymienionymi chorobami zostało zachwiane. Badania prowadzone w ostatnich dwóch dekadach podważają rolę Hcy, wskazując na fakt, że odpowiedzialnym za uszkodzenia neurodegeneracyjne, czy patologie układu naczyniowo – sercowego jest jeden z jej metabolitów, a mianowicie HTL.

Ważnym patogennym efektem działania HTL jest zdolność do modyfikacji białek w procesie N-homocysteinyłacji, co ma negatywny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Proces ten wpływa na zmianę właściwości fizykochemicznych białek, ograniczenie ich funkcji, a w konsekwencji na pogorszenie stanu zdrowia całego organizmu [7, 24-26]. Przeprowadzone badania wskazują, że N-homocysteinyłacja białek w warunkach fizjologicznych inicjuje proces agregacji cząsteczek albuminy. Powstające agregaty wykazują właściwości cytotoksyczne, objawiające się przyspieszeniem apoptozy komórek ssaków [27]. Wyjaśniałoby to związek Hcy z neurologicznymi dysfunkcjami pacjentów oraz chorobą Alzheimera i upośledzeniem funkcji poznawczych występujących w ogólnej populacji [28]. Dodatkowym dowodem świadczącym o szkodliwym działaniu N-Hcy białek są wyniki badań ich proteolitycznej degradacji i odkrycie nowego

odpowiadającego im przeciwciała, IgG, które ma zdolność specyficznego rozpoznawania epitopów, czyli antygenowych fragmentów N ϵ -Hcy-Lys [29]. Autoimmunologiczna odpowiedź organizmu, indukowana przez N-Hcy białka, prowadząca do wytworzenia przeciwciała anty-N-Hcy-białkowego IgG, została zaobserwowana zarówno u królików jak i ludzi. Uważa się, że ilość wytwarzanego przez organizm antyciała jest wskaźnikiem prognozującym wystąpienie takich schorzeń jak udar [30], choroba wieńcowa [31], czy miażdżyca [32].

Udowodniono, że w wyniku reakcji HTL z albuminą w zmodyfikowanej cząsteczce następuje wzrost liczby grup karbonylowych [33]. Powstające karbonylowane białka, na skutek akumulacji w tkankach, przyczyniają się do rozwoju takich chorób jak choroba Alzheimera [34], progeria czyli tzw. przedwczesna starość [35], stwardnienie zanikowe boczne, czy zespół zaburzeń oddechowych [36].

Liczne badania potwierdzają istotny udział HTL oraz N-Hcy białek w patologii chorób układu krążenia. Wykazały one m.in., że HTL modyfikując fibrynogen, utrudnia prawidłową hydrolizę skrzepów i przyczynia się do rozwoju zakrzepicy [37]. Ponadto, podwyższone stężenie tego związku może działać jako niezależny czynnik ryzyka zawału mięśnia sercowego u pacjentów z chorobą wieńcową, co potwierdziły liczne badania prowadzone na zwierzętach i ludziach [38]. W tym kontekście zauważono złuszczenie śródbłonna naczyniowego oraz powstanie zakrzepów w tętnicach u pawianów, którym chronicznie podawano zmodyfikowane HTL białka [39]. Udowodniono także, że obecność HTL w formie D-HTL i L-HTL są niebezpieczne dla zarodków tych ssaków. Wynika to z faktu, iż oba stereoizomery wykazują jednakową reaktywność względem białek. Uważa się także, że odpowiedzialną za toksyczne działanie HTL jest jego duża chemiczna reaktywność względem rozmaitych komponentów obecnych w komórkach [40]. Inne eksperymenty prowadzone na zwierzętach doświadczalnych zmierzały do określenia wpływu regularnej podaży HTL na zmiany patofizjologiczne, podobne do obserwowanych u ludzi z hiperhomocysteinemią. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zbyt duże stężenie HTL może wywoływać drgawki u populacji myszy i szczurów, prowadząc nawet do ich przedwczesnej śmierci [41] oraz ma negatywny wpływ na prawidłowy rozwój u embrionów pisklaków [1]. Jednym z takich zaburzeń rozwojowych jest ektopia soczewki, która również objawia się u pacjentów z mutacjami w genie syntazy β -cystationinowej.

Wykazano, że HTL wywołując stres retikulum endoplazmatycznego i odpowiedź na niesfałdowane białka przyczynia się do patogenezy wspomnianych już wcześniej

chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera i Parkinsona) oraz cukrzycy. W porównaniu z Hcy to właśnie jej toksyczny metabolit jest silniejszym induktorem prowadzącym do apoptotycznej śmierci komórek obserwowanej w hodowlach komórkowych, tkankowych oraz *in vivo* [42,43].

Ostatnie doniesienia literaturowe potwierdzają przydatność HTL jako biomarkera obecnego w układzie moczowym do określenia ryzyka wystąpienia ostrej niewydolności mięśnia sercowego. Jest to dodatkowe wsparcie dla teorii, że związek ten jest zaangażowany w rozwój chorób układu krążenia [44]. Wykazano także podwyższone stężenie HTL w wielu tkankach nowotworowych, co może sugerować, że są one bardziej podatne na jego szkodliwe działanie [45]. Co ważne, wyniki wielu badań wskazują, że możliwe jest przeciwdziałanie negatywnym skutkom wysokiego poziomu HTL w organizmie, poprzez prowadzenie suplementacji witaminami z grupy B, włączając witaminę B₆, B₉ oraz B₁₂.

2. Przegląd metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny w płynach biologicznych

Jak wspomniano powyżej, przeprowadzone w ciągu ostatnich lat badania wykazały związek pomiędzy zawartością HTL w osoczu krwi i moczu a rozwojem chorób sercowo-naczyniowych. Poważnym ograniczeniem w ich prowadzeniu jest znikoma liczba metod umożliwiających efektywne oznaczanie tego istotnego z biologicznego punktu widzenia tioestru. W ciągu ostatnich 20 lat opracowano zaledwie 8 metod, które pozwalają na oznaczanie HTL, jednak posiadają ograniczenia, praktycznie wykluczające je w przypadku badań populacyjnych. Jeśli weźmiemy pod uwagę rodzaj próbek, w których oznaczanie HTL jest istotne, czyli osocze krwi człowieka oraz mocz, to techniki separacyjne stanowią tzw. narzędzie pierwszego wyboru. Złożoność matrycy biologicznych i niewielkie stężenie analitu stanowią w tym przypadku największe wyzwanie dla badaczy i zarazem jedną z głównych przyczyn niewielkiej liczby dostępnych metod. Co należy podkreślić, wszystkie opracowane procedury na etapie przygotowania próbki wykorzystują ekstrakcję w celu uproszczenia matrycy i/lub zateżenia analitu.

2.1. Mocz, osocze i ślina jako materiał diagnostyczny

Do najlepiej poznanych, a zarazem najczęściej wykorzystywanych w diagnostyce laboratoryjnej płynów ustrojowych człowieka zalicza się krew, osocze oraz mocz. Bardzo dobra znajomość poziomów referencyjnych wielu związków obecnych w wyżej wymienionych matrycach oraz względna niezmiennosc składu jest głównym powodem powszechnego ich wykorzystywania w praktyce klinicznej do wykrywania różnych stanów chorobowych oraz monitorowania efektów leczenia. Z tego względu pomimo dużego postępu jaki dokonał się w diagnostyce medycznej, znaczenie tych płynów biologicznych nie maleje, a wręcz przeciwnie, na przestrzeni kilkudziesięciu lat zyskały one miano „klasycznych” i stanowią podstawowe źródło informacji o stanie zdrowia pacjenta. Niemniej jednak, analiza tych próbek jest dość skomplikowana, począwszy od pobrania materiału do badań, poprzez odpowiednie przygotowanie próbki i końcową analizę. W pierwszym etapie postępowania analitycznego, szczególną uwagę należy zwrócić na ściśle przestrzeganie powszechnie przyjętych w laboratorium wymogów preanalitycznych, wśród których wymienia się pobranie określonej objętości krwi i moczu niezbędnych do dalszych oznaczeń oraz zachowanie reżimu czasowego i temperaturowego w dostarczeniu próbek do laboratorium. Mnogość znajdujących się substancji w każdej z tych matrycy umożliwia

oznaczenie szerokiej gamy związków w jednej analizie, ale też w znacznym stopniu utrudnia pracę analitykom przy projektowaniu selektywnych metod analitycznych. Z tego też powodu zdecydowana większość metod bazująca na analizie materiału biologicznego, w kontekście oznaczania aminokwasów tiolowych jest wieloetapowa, a przez to czaso-, koszto- i pracochłonna. Okazuje się, że najbardziej kłopotliwa jest obecność białek, które np. wprowadzone do układu chromatograficznego powodują szybki spadek sprawności kolumny a w konsekwencji jej przedwczesne zużycie. Szczególną uwagę należy również zwrócić na rzetelną interpretację otrzymanych wyników, które ze względu na niewłaściwą technikę pobrania i oceny uzyskanego materiału mogą być obarczone dużym błędem. Dlatego też ważną rolę odgrywają badania dotyczące zarówno poszukiwania potencjalnych wskaźników jak i opracowywania referencyjnych metod uwzględniających stopień rozcieńczenia próbki moczu, który wpływa na dodatnie lub ujemne zafałszowanie wyników w dokumentacji medycznej pacjenta [46].

W ciągu ostatniej dekady można zaobserwować wśród badaczy rosnące zainteresowanie materiałem biologicznym, którego pobranie do analizy odbywa się w sposób nieinwazyjny i prosty, a mianowicie śliną. Jest ona płynem ustrojowym, który wykazuje szereg zalet w porównaniu z innymi płynami biologicznymi [47-51]. Jest bowiem materiałem niezakaźnym, który każdy pacjent może samodzielnie pobrać w sposób szybki, łatwy i bezbolesny. Co więcej, zanika problem pobierania próbki w warunkach wywołujących stres oraz poczucie bólu i dyskomfortu. Wszystkie te cechy sprawiają szczególną trudność podczas uzyskiwania materiału biologicznego do badań od dzieci (niemowląt), osób w podeszłym wieku, chorych na hemofilię oraz aktywnych zawodowo, ale też pacjentów, dla których pobranie próbki moczu czy krwi jest niezgodne z przekonaniami religijnymi. Z przeprowadzonych badań jednoznacznie wynika, że ślina jest stabilna także w temperaturze pokojowej, co umożliwia dobową, a nawet miesięczną zbiórkę materiału do badań. Z tego też względu ślina może być pobierana w dowolnych warunkach, w domu lub w pracy, bez angażowania personelu medycznego. Transport takiej próbki do laboratorium nie wymaga specjalnej procedury i może odbyć się o dowolnej porze dnia. Ponadto ślina jest matrycą mniej złożoną w porównaniu z moczem i osoczem, co często pozwala uprościć całą procedurę analityczną, obniżając tym samym jej całkowity koszt. Jak podaje literatura, stężenie białek w tej matrycy jest około 10-15 razy niższe w porównaniu z osoczem [48], co minimalizuje ryzyko wiązania analitów oraz wpływa korzystnie na dokładność i precyzję wykonywanych pomiarów. Ponadto, oprócz substancji przenikających do niej bezpośrednio z krwi przez naczynia krwionośne, ślina

posiada również spektrum unikatowych związków wytwarzanych tylko w obrębie gruczołów ślinowych, które nie zawsze są obecne w krwi/moczu człowieka. Z tego też względu materiał ten stanowi cenne źródło informacji zachodzących zmian patologicznych w organizmie człowieka, dzięki czemu znajduje zastosowanie w badaniach medycznych jako medium, w którym monitoruje się stężenie leków i ich metabolitów oraz biomarkerów niektórych schorzeń [48,50,52].

Pomimo wielu korzyści, jakie można odnieść wykorzystując ślinę w diagnostyce medycznej, materiał ten nadal nie stanowi pełnej alternatywy dla osocza krwi i moczu człowieka. Dostępne na rynku komercyjne i gotowe próbki do pobierania śliny, jedynie minimalizują bardzo istotny problem związany ze standaryzacją etapu pobrania i przygotowania próbki do analizy. Skład i ilość wydzielanej śliny jest indywidualną cechą osobniczą, która w znacznym stopniu uzależniona jest od aktywności gruczołów ślinowych i zależy od metody, miejsca i rodzaju stymulacji przy pobieraniu materiału, do których zalicza się bodźce mechaniczne, smakowe, zapachowe, wzrokowe czy psychiczne. Ponadto przyjmowanie leków wpływa na zmianę składu śliny, co utrudnia uzyskanie miarodajnej informacji o stanie zdrowia pacjenta. Dlatego też otrzymane wyniki badań należy opracowywać statystycznie zgodnie z wcześniej zaprojektowanymi i zaakceptowanymi przez laboratoria kliniczne metodami, uwzględniając możliwość zawyżenia/zaniżenia wyniku.

2.2. Metody oparte o wysokosprawną chromatografię cieczową

Cząsteczka HTL wykazuje naturę heterogeniczną, dlatego też zaprojektowanie procedur umożliwiających jego oznaczenie w materiale biologicznym wciąż pozostaje dużym wyzwaniem, bez względu na zastosowaną technikę pomiarową. Głównym ograniczeniem są w tym przypadku niskie stężenie analitu, brak strukturalnych właściwości, które umożliwiłyby jego efektywną bezpośrednią detekcję oraz bardzo skomplikowana matryca. Końcowa analiza chromatograficzna wymaga zatem wcześniejszego oczyszczenia próbki i zatężenia analitu. Z tego powodu przygotowanie próbki do analizy zawiera najczęściej etapy deproteinizacji, ekstrakcji ciecz-ciecz lub ekstrakcji do fazy stałej oraz derywatywacji chemicznej.

Opracowane metody analizy próbek biologicznych (osocze, mocz) na zawartość HTL bazują głównie na technikach chromatograficznych, wśród których większość opisanych procedur opiera się na wykorzystaniu chromatografii cieczowej w odwróconym

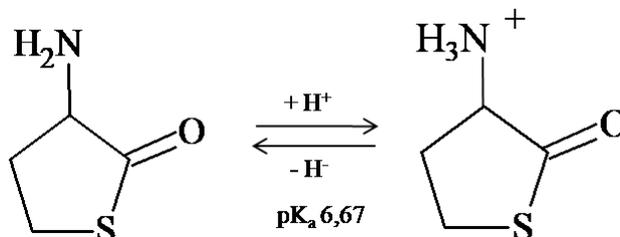
układzie faz (RP-HPLC), najczęściej z zastosowaniem wypełnień C18 lub chromatografii jonowymiennej. HTL obecny w eluacie wykrywany jest za pomocą detektorów UV przy długości fali $\lambda=240$ nm lub w postaci izoindolowej pochodnej (derywatywacja z OPA), która wykazuje właściwości fluorescencyjne. Taki sposób detekcji oznaczanego analitu w złożonych matrycach może być stosowany w laboratoriach klinicznych, głównie ze względu na ogólną dostępność do aparatury pomiarowej oraz stosunkowo niskie koszty jej eksploatacji.

Jedną z pierwszych opisanych w literaturze metod analitycznych umożliwiających oznaczanie HTL została zaproponowana przez Mukai i współpracowników [2]. W badaniach wykorzystano pokolumnową reakcję derywatywacji Hcy oraz jej cyklicznego metabolitu z wykorzystaniem OPA podczas oznaczania ich zawartości w medium pochodzącym z hodowli komórek Hep G2. Reakcja wymaga zastosowania środowiska alkalicznego, ponieważ tylko w takich warunkach ($\text{pH}>11$) HTL ulega błyskawicznej hydrolizie do Hcy, która bezpośrednio reaguje z OPA, z wytworzeniem efektywnie fluoryzującej pochodnej. Co ważne, reakcja nie wymaga obecności dodatkowego tiolu, a do zamknięcia pierścienia izoindolowego dochodzi przy udziale grup aminowej i tiolowej, pochodzących od samej Hcy. Detekcję pochodnej prowadzono przy długości fali wzbudzenia $\lambda=370$ nm i fali emisji $\lambda=480$ nm. W tym przypadku opracowana metoda nie pozwala na bezpośrednie oznaczenie HTL w osoczu ze względu na zbyt wysoką granicę wykrywalności ($\text{LOD}=10$ nmol/l).

Procedurę zaproponowaną przez Mukai i współpracowników zmodyfikowano i zaadaptowano do oznaczania HTL w osoczu krwi, bazując na chromatografii jonowymiennej, w której zastosowano kolumnę kationowymienną z polisulfoetyloaspartamidem jako fazą stacjonarną [15]. Procedura analityczna obejmuje m.in. bardzo pracochłonny etap przygotowania próbki do analizy, na który składają się usunięcie białka poprzez ultrafiltrację i selektywna ekstrakcja analitu. W pierwszym etapie osocze jest wirowane w obniżonej temperaturze na specjalnych membranach typu „cut-off”, zatrzymujących na filtrach cząsteczki większe od 10kDa. Następnie otrzymany filtrat alkalizowano do pH około 8 i ekstrahowano z wykorzystaniem węgla aktywnego jako sorbenta. W ostatnim etapie postępowania analitycznego przeprowadzono analizę chromatograficzną. Wyznaczone stężenie HTL w próbkach osocza otrzymanych od pozornie zdrowych ochotników ($n = 60$) wahało się w przedziale od $< 0,1$ nmol/l do 34,8 nmol/l. Średnia wartość stężenia HTL w zbadanych próbkach osocza to $2,82 \pm 6,13$ nmol/l.

Przedstawiona procedura została następnie wykorzystana podczas oznaczania HTL w próbkach pochodzących od ludzi i myszy.

Z uwagi na fakt, że stosunkowo duża ilość HTL powstającego w organizmie człowieka usuwana jest przez nerki, podjęto także próby opracowania metod jego oznaczania w moczu. Z powodzeniem wykorzystano do tego celu zmodyfikowaną metodę oznaczania HTL w osoczu krwi [14]. Podstawą oznaczeń HTL w moczu stała się ponownie pokolumnowa reakcja derywatyzacji z OPA oraz separacja techniką chromatografii jonowymiennej i detekcja spektrofлуometryczna [16]. Ekstrakcję analitu z moczu prowadzono w układzie ciecz-ciecz za pomocą mieszaniny składającej się z chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym 2:1. W badaniach wykorzystano fakt, że cząsteczka HTL występuje w różnych formach, naładowanej i obojętnej, w zależności od pH środowiska (Rys. 4). W pH poniżej pK_a grupa aminowa zyskuje ładunek dodatni, co powoduje retencję analitu na kolumnie kationitowej. Wykazano tym samym, że poprzez odpowiedni dobór wartości pH można radykalnie zmienić polarność HTL, a tym samym jego powinowactwo do fazy ciekłej i stacjonarnej i to zarówno na etapie ekstrakcji jak i rozdzielania chromatograficznego. Brak grupy karboksylowej oraz względnie niska wartość pK_a sprawiają, że w pH ok. 7,5 cząsteczka HTL występuje w formie neutralnej, natomiast w środowisku lekko kwaśnym posiada ładunek dodatni.



Rysunek 4. Formy HTL w zależności od pH środowiska [16].

W obu przypadkach do re-ekstrakcji analitu użyto 0,1 mol/l roztworu kwasu solnego. Ekstrakcja mieszaniną chloroform/metanol okazała się bardziej selektywna niż ekstrakcja na węglu aktywnym, co znajduje potwierdzenie w wyznaczonych parametrach walidacyjnych. W pierwszym przypadku wydajność ekstrakcji wyniosła $61,8 \pm 7,7\%$ ($n=30$), co pozwoliło obniżyć granicę wykrywalności do wartości 0,36 nmol/l [16]. Badania próbek moczu, w których zastosowano wspomnianą metodę wykazały, że stężenie HTL obecnego w moczu waha się w przedziale od 11 do 485 nmol/l ($n = 19$) i jest ok. 100-krotnie wyższe niż w osoczu krwi.

Opublikowano także inne chromatograficzne metody, które pozwalają na względnie szybkie oznaczanie zarówno Hcy jak i HTL w moczu [17,53]. Metody te, podobnie jak wspomniane wyżej, wykorzystują detekcję FLD, jednakże charakteryzują się prostszym etapem przygotowania próbki do analizy. W tym przypadku proces derywatywacji prowadzony jest bezpośrednio w kolumnie chromatograficznej PRP-1 Hamilton C-18, która umożliwia separację analitów w $\text{pH} > 11$. Warunki, w których prowadzono rozdzielanie wymagało optymalizacji dwóch przebiegających równocześnie etapów, a mianowicie warunków rozdzielania chromatograficznego i środowiska reakcji. Z analitycznego punktu widzenia ten rodzaj derywatywacji przynosi wiele korzyści. Zmniejszenie liczby kroków na etapie przygotowania próbki, pozwala w znacznym stopniu obniżyć całkowity błąd analizy, co jest odzwierciedlone w jakości parametrów walidacyjnych. Dodatkowo, prowadzenie derywatywacji analitu w kolumnie eliminuje konieczność stosowania dodatkowej aparatury, takiej jak pompa tłocząca odczynnik derywatywujący. Ogromną zaletą tej procedury jest także krótki, bo zaledwie 3 min czas analizy chromatograficznej. Zbadany zakres liniowości metody zawiera się w przedziale 0,02-3,0 $\mu\text{mol/l}$. Granica wykrywalności dla Hcy i HTL wynosi odpowiednio 0,025 i 0,02 $\mu\text{mol/l}$. Opisane metody z powodzeniem wykorzystano do analizy próbek moczu na zawartość tHcy i HTL. Stężenie tHcy obecnej w próbkach moczu pochodzących od pozornie zdrowych ochotników wynosiło od 1,5 do 6,0 $\mu\text{mol/l}$ [53], natomiast poziom HTL w tych samych próbkach zawierał się w przedziale 0,025-0,297 $\mu\text{mol/l}$ [17].

Inna metoda pozwalająca na ilościowe oznaczenie HTL, tym razem w próbkach osocza opiera się na wykorzystaniu chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) [54]. Całkowite rozdzielanie badanego analitu od homotropiny, pełniącej rolę standardu wewnętrznego (IS), uzyskano stosując elucję gradientową przez 5 min przy użyciu kolumny ZIC HILIC. Kwantyfikację przeprowadzono przy użyciu trybu monitorowania reakcji fragmentacji, obserwując dla cząsteczki HTL przejście 118 \rightarrow 56 jonów molekularnych/fragmentacyjnych. Opracowana metodologia obejmuje odbiałczenie próbki osocza metodą filtracji „cut-off”, ekstrakcję ciecz-ciecz oraz końcową analizę chromatograficzną. W zastosowanej procedurze przeprowadzono ekstrakcję analitu z dokładnością oscylującą w granicach 84,76-87,58%, wykorzystując mieszaninę acetonitrylu i wody z 1% siarczanem sodu w stosunku objętościowym 70:30 (v/v). Zwalidowaną metodę zastosowano do wyznaczenia zawartości HTL w 6 próbkach osocza człowieka, uzyskując stężenia od 0,11 do 0,25 nmol/ml.

2.3. Metody bazujące na elektroforezie kapilarnej

Struktura i charakter chemiczny cząsteczki HTL stwarzają możliwość wykorzystania technik elektromigracyjnych dla potrzeb jego oznaczania. Szczególnie istotna okazała się w tym przypadku możliwość kontroli ładunku cząsteczki HTL poprzez pH środowiska. Wykorzystano te możliwości podczas oznaczania HTL w moczu techniką elektroforezy kapilarnej (CE), gdzie zastosowano zateżanie analitu bezpośrednio w układzie pomiarowym i detekcją UV [5]. W przeciwieństwie do innych opublikowanych metod opartych o derywatyzację analitu przed etapem rozdzielania, w jego trakcie lub w trybie pokolumnowym, zaproponowana dwuetapowa procedura składa się tylko z ekstrakcji próbki w układzie ciecz-ciecz, a następnie separacji techniką CE i detekcji UV. W procedurze wykorzystano zaproponowany wcześniej [16] sposób ekstrakcji analitu do hydrofobowej fazy organicznej (chloroform:metanol w proporcji 2:1 (v/v)), bezpośrednio po dostosowaniu pH próbki buforem fosforanowym do pH=8. Aby wprowadzić przygotowany roztwór do kapilary metodą elektrokinetyczną, która wymaga obecności ładunku w cząsteczce HTL, niezbędnym okazało się odparowanie chloroformowej warstwy do sucha i rozpuszczenie pozostałości w kwasie solnym (HCl) o pH=5,5. Wyznaczone zawartości HTL w próbkach moczu pobranych od 15 pozornie zdrowych ochotników wahały się od 0,129 do 0,229 $\mu\text{mol/l}$, a wartość średnia wyniosła $0,170 \pm 0,029 \mu\text{mol/l}$. Otrzymane wartości są porównywalne z tymi otrzymanymi w przypadku wcześniej opublikowanych metod wykorzystujących techniki HPLC oraz reakcję analitu z OPA. Zaproponowana metoda jest stosunkowo szybka i nie wymaga modyfikacji chemicznej HTL. Jej dodatkową zaletą jest fakt obniżenia granicy oznaczalności poprzez zastosowanie mechanizmu zateżania analitów w trybie on-line poprzez wprowadzenie próbki ze wzmocnieniem pola i zmiatania w MEKC.

Inny zaproponowany sposób umożliwiający oznaczenie HTL w próbce rzeczywistej i jego bezpośrednią detekcję (UV-Vis), wykorzystuje mikroekstrakcję do pojedynczej kropli w układzie ciecz-ciecz-ciecz (SDME) [6]. Procedura analityczna obejmuje kilka etapów: odwirowanie próbki moczu, rozcieńczenie buforem fosforanowym i metanolem oraz dodanie chloroformu na szczyt fazy donorowej (próbka moczu), następnie ekstrakcję SDME w trybie on-line w kapilarze, rozdzielenie składników próbki za pomocą CZE (strefowa elektroforeza kapilarna) i detekcję UV-Vis przy długości fali 240 nm. Zaletą opublikowanej procedury jest w pełni zautomatyzowany proces ekstrakcji, w efekcie czego uzyskano zadowalające parametry walidacyjne. Rozdzielenie osiągnięto w

ciągu 6,04 min, przy napięciu 24 kV (~110 μ A). Wartości LOQ i LOD wyznaczone dla próbki rzeczywistej wyniosły odpowiednio 50 i 25 nmol/l. Krzywa kalibracyjna wykazywała liniowość w zakresie 50-200 nmol/l w moczu, przy $R^2 = 0,995$. Wyznaczone zawartości HTL mieszczą się w granicy 28-70 nmol/l.

2.4. Metody bazujące na chromatografii gazowej

Jedyna metoda wykorzystująca technikę GC-MS do oznaczania HTL została opublikowana w roku 2003 i dotyczy monitorowania jego zawartości w osoczu krwi [55]. W opisanym procedurze jako IS stosowany był deuterowany d_4 -HTL. Procedura przygotowania próbki wymaga etapu ekstrakcji HTL z osocza i przeprowadzenia analitu w jego pochodną na drodze przedkolumnowej reakcji derywatywacji z bezwodnikiem kwasu heptafluorobutyłowego (HFBA). W zaproponowanej metodzie jako gazu nośnego użyto metanu. Ilościowe oznaczenie HTL było możliwe dzięki zastosowaniu deuterowanego HTL jako standardu wewnętrznego. Precyzja i odtwarzalność opisywanej metody wyniosły odpowiednio 0,96% i 3,9%. Granica wykrywalności wynosiła 1,7 nmol/l, a granica oznaczalności odpowiadała wartości 5,2 nmol/l osocza krwi. W dwóch badanych próbkach osocza potwierdzono obecność HTL w stężeniu 18 i 25 nmol/l.

Tabela 2. Porównanie znanych metod oznaczania HTL w zakresie procedury przygotowania próbki do analizy.

Technika analityczna	Matryca	Modyfikacja chemiczna			Rodzaj ekstrakcji	Czas przygotowania próbki [h]	Oдноśnik
		Odczynnik derywatyzujący	Rodzaj derywatywacji	Warunki reakcji			
HPLC-FLD	Mocz	OPA	Pokolumnowa	0,0025 mol/l OPA w 0,25 mol/l NaOH	LLE	2,5	16
HPLC-FLD		OPA	W kolumnie	0,01 mol/l OPA w 0,1 mol/l NaOH; acetonitryl (30%)	SPE	1,5	17
CE-UV		-	-	-	LLE	2	5
CE-UV		-	-	-	SDME	< 1h (~ 30 min)	6
HPLC-FLD	Osocze	OPA	Pokolumnowa	0,0025 mol/l OPA w 0,25 mol/l NaOH	LLE	2,5	15
HPLC-FLD		-	-	-	SPE	*	4
LC-MS/MS		-	-	-	LLE	< 1h (~ 30 min)	54
GC-MS		HFBA	Przedkolumnowa	60°C, 30 min acetonitryl	SPE	*	55

* brak szczegółowych danych

Tabela 3. Zestawienie wybranych parametrów walidacji metod oznaczania HTL w osoczu i moczu człowieka.

Technika analityczna	Wybrane parametry walidacyjne					Oдноśnik
	Zakres liniowości [μmol/l]	RSD [%]	Odzysk [%]	LOD [μmol/l]	LOQ [μmol/l]	
HPLC-FLD	1 - 40	6,7 – 10,5	93,4 – 113,5	0,36	1	16
HPLC-FLD	0,02 - 3	3,7 – 6,5	96,3 – 106,1	-	0,02	17
CE-UV	0,1 – 1,0	3,2 – 6,1	94,7 – 101,8	0,09	0,1	5
CE-UV	50 - 200	4,0 – 14,5	92,7 – 115,5	25	50	6
HPLC-FLD	1 - 40	6,7 – 10,5	93,4 – 113,5	0,36	1	15
HPLC-FLD	0 - 80	6,4 – 7,2	-	0,5	-	4
LC-MS/MS	0,5 – 32,5	6,94 – 13,56	96,79 – 106,61	0,105	0,5	54
GC-MS	0 - 40	0,96 – 3,9	-	1,7	5,2	55

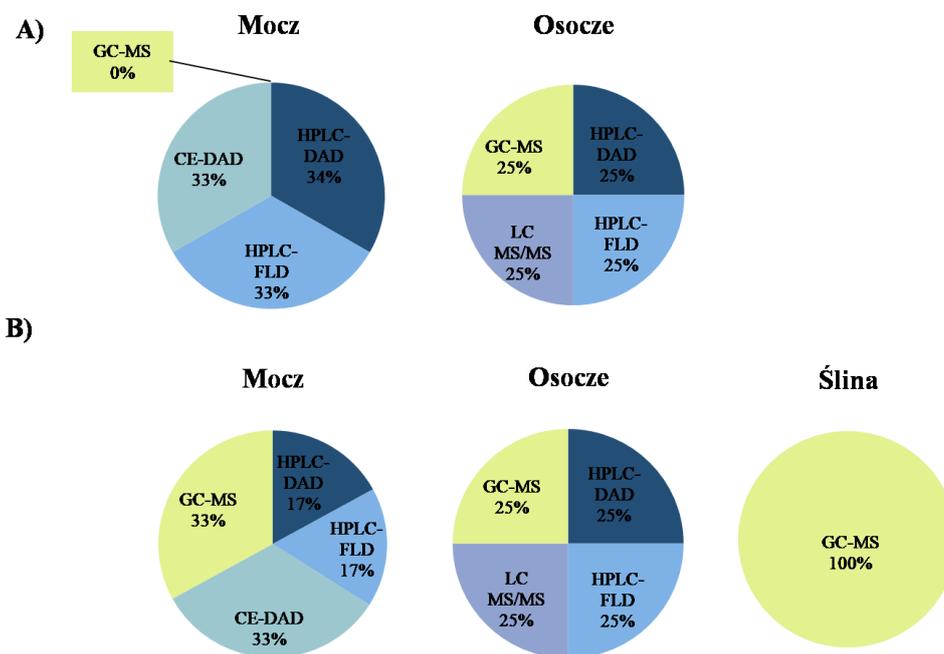
3. Uzasadnienie podjęcia tematu

Podstawowymi czynnikami, które decydują o konieczności tworzenia narzędzi analitycznych, umożliwiających oznaczanie konkretnego związku, są jego rola w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu oraz możliwości wykorzystania jako markera chorób. Rola HTL w rozwoju patologii zdrowotnych została dość dobrze udokumentowana, jednakże z punktu widzenia analityka ważna jest również dostępność metod oraz ich jakość, gwarantujące poprawność uzyskanych wyników. Dodatkowym uzasadnieniem podjęcia badań w tym zakresie może być zatem niewielka liczba wiarygodnych metodologii, względy ekonomiczne lub konieczność poszukiwania alternatywnego materiału diagnostycznego, w tym przypadku śliny.

Od lat prowadzone są szeroko zakrojone badania kliniczne zmierzające do wyjaśnienia przyczyn rozwoju chorób cywilizacyjnych, które stanowią obecnie najczęstszą przyczynę zgonów w krajach wysokorozwiniętych, w tym także w Polsce. Do tej grupy zalicza się schorzenia układu krążenia oraz choroby nowotworowe. W tym kontekście obserwuje się niesłabnące zainteresowanie endogennymi aminokwasami tiolowymi, które odgrywają znaczącą rolę w organizmach żywych, a ich zbyt wysokie bądź zbyt niskie stężenie w ustroju człowieka jest związane ze zmianami charakterystycznymi dla procesu chorobowego. Pomimo prowadzenia wielu badań w zakresie metabolizmu niskocząsteczkowych związków siarki, liczba i jakość informacji na temat ich roli w organizmie człowieka wciąż pozostaje niewystarczająca. Zatem aby wyjaśnić przyczyny anomalii stężeniowych w komórkach, koniecznym staje się opracowywanie nowych i selektywnych narzędzi analitycznych, które w następnej kolejności pozwolą wyjaśnić, na którym z etapów metabolizmu zachodzą nieprawidłowości.

Obecnie uważa się, że podwyższone stężenie Hcy w osoczu krwi jest jedną z przyczyn rozwoju chorób układu krążenia. Na przestrzeni ostatnich lat powstało kilka hipotez wyjaśniających toksyczność Hcy względem organizmów żywych. Jedna z nich sugeruje, że za szkodliwe działanie Hcy odpowiedzialny jest jej metabolit, a konkretnie HTL. Dotychczas obecność HTL została potwierdzona w płynach ustrojowych człowieka, takich jak mocz i osocze. Co ciekawe, pomimo prowadzenia intensywnych badań nad jego rolą w różnorodnych fizjologicznych i patologicznych przemianach w organizmach żywych, opracowano zaledwie kilka metod poświęconych oznaczaniu HTL w próbkach biologicznych [4-6,15-17,53-54]. Co jednak należy podkreślić, żadna z zaproponowanych procedur nie została wykorzystana do określenia zawartości badanego związku w ślinie

człowieka. Metody te w znacznej mierze opierają się na wykorzystaniu technik separacji w fazie ciekłej, w tym HPLC oraz CE i umożliwiają analizę moczu i osocza krwi na zawartość HTL. Analizując dane zebrane na rysunku 5A nie można nie zauważyć dominującej roli jaką w tym zakresie odgrywają techniki HPLC oraz CE. Powodem takiego stanu rzeczy jest natura chemiczna HTL predestynująca go właśnie do wspomnianych technik. Mając na względzie niewielką liczbę opublikowanych procedur umożliwiających oznaczanie HTL oraz ich poważne ograniczenia, postanowiłam sprawdzić jakie możliwości w tym obszarze daje chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas. Technika GC znana jest z doskonałej rozdzielczości, co jest szczególnie istotne w przypadku bardzo złożonych matryc biologicznych. Z kolei zastosowanie detektora mas, charakteryzującego się wysoką czułością, przepustowością i specyficznością gwarantuje, co najmniej zadowalające parametry detekcji. Po uwzględnieniu właściwości fizykochemicznych składników matrycy oraz analitu największym wyzwaniem pozostaje oczywiście odpowiednie przygotowanie próbki do analizy.



Rysunek 5. Zestawienie metod oznaczania HTL w płynach biologicznych człowieka: A) dane do 10.2017r – sprzed rozpoczęcia studiów doktoranckich, B) dane z 20.06.2021r – zebrane po zakończeniu części eksperymentalnej niniejszej rozprawy doktorskiej.

HTL jako zbędny produkt przemian metabolicznych jest w znakomitej większości usuwany z organizmu przez nerki wraz z moczem, w związku z czym w matrycy tej znajduje się w dużym stężeniu. Zgodnie z danymi literaturowymi zawartość HTL w moczu jest co najmniej 100-krotnie wyższa niż w osoczu, co w pewnym stopniu minimalizuje problem tworzenia niewystarczająco czułych metod, które nie pozwalają w sposób dokładny i precyzyjny określić jego zawartości. Jak wspomniano we wcześniejszej części pracy należy oczekiwać, że w najbliższej przyszłości coraz więcej uwagi będzie poświęcone ślinie. Jest to unikatowy materiał biologiczny, któremu słusznie przypisuje się duży potencjał diagnostyczny, głównie ze względu na nieinwazyjny sposób pobierania. Stąd też w ramach niniejszej pracy doktorskiej postanowiłam zbadać możliwości oznaczania HTL w ślinie, stosując jako technikę pomiarową GC-MS. Było to nowe podejście, zarówno w kontekście wyboru matrycy jak i zaproponowanej przeze mnie metodologii.

Trudno kwestionować rolę jaką związki siarki odgrywają w przemianach metabolicznych w organizmie człowieka. Opisanie mechanizmów, według których przebiegają oraz powiązanie zawartości wspomnianych związków w organizmie z chorobami, było możliwe dzięki opracowanym czułym i dokładnym narzędziom analitycznym. Jak wskazano powyżej, w momencie w którym rozpoczynałam badania istniała jednak tylko jedna metoda wykorzystująca technikę GC, umożliwiającą oznaczanie HTL w próbkach biologicznych [55]. Postanowiłam dokładniej zbadać przyczyny takiego stanu rzeczy i ewentualnie wypełnić lukę w tym obszarze.

Technika GC nie znajdowała się w polu zainteresowań naukowców, przypuszczalnie ze względu na brak kompatybilności z analitem (brak lotności), co znacznie utrudniało jego chromatografowanie w niezmienionej formie. Eksplorowanie tego zagadnienia stanowiło istotę badań, które prowadziłam w ramach pracy doktorskiej. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów udowodniłam, że GC może być wykorzystywana do identyfikacji jakościowej i oznaczania ilościowego HTL w materiale biologicznym. Zaproponowane przeze mnie w kolejnych latach i opublikowane procedury analityczne pozwalają efektywnie analizować ślinę i mocz techniką GC-MS (Rys. 5A) stanowiąc tym samym realną alternatywę dla HPLC i CE.

Podsumowując, głównymi powodami, które skłoniły mnie do podjęcia badań w tym obszarze, oczywiście oprócz związku HTL z rozwojem chorób cywilizacyjnych, były:

- znikoma liczba metod umożliwiających oznaczanie HTL w płynach biologicznych,
- brak badań dotyczących śliny w kontekście jego obecności i możliwości oznaczania,
- brak badań określających potencjał GC w oznaczaniu HTL.

4. Wyniki

Publikacja D1:

M. Wrońska, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, R. Głowacki, *Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine*, **Journal of Chromatography B**, 1099 (2018) 18–24.

Poważny i zarazem podstawowy problem w przypadku oznaczania HTL techniką GC stanowi brak jego lotności. Cząsteczka HTL posiada tylko jedną grupę funkcyjną - aminową, która może być rozważana w kontekście derywatywacji, w efekcie której taką lotność uzyska. Głównym celem takiej modyfikacji chemicznej jest oczywiście uczynienie analitu kompatybilnym ze stosowaną techniką, w tym także poprawa właściwości separacyjnych i detekcyjnych. W prezentowanej metodzie derywatyzację analitu przeprowadziłam przy pomocy chloromrówczanu izobutyłu (IBCF), a kolejny ważny etap procedury przygotowania próbki stanowiła ekstrakcja uzyskanej pochodnej do fazy chloroformowej, którą następnie odparowywałam do sucha. Pozostałość rozpuszczałam w octanie etylu i 1 μ l wprowadzałam do układu chromatograficznego. Stosowałam elucję izokratyczną, a rozdzielanie składników próbki prowadziłam na kolumnie kwarcowej HP-5MS (60 m \times 0,25 mm, 0,25 μ m) stosując hel jako gaz nośny. Ponieważ taka pochodna HTL nie była jeszcze badana, zidentyfikowałam jony molekularne związane z analitem wykorzystując tryb SCAN detektora MS. Ostatecznie do monitorowania analitu wybrałam jony o stosunku m/z równym 161,1 oraz 189,1.

Na etapie badań wstępnych skupiłam się głównie na doborze odpowiedniego odczynnika derywatyzującego, który z jednej strony uczyniłby analit lotnym, z drugiej zaś byłby „przyjazny” na etapie przygotowania próbki. Analiza specjalistycznej literatury wykazała, że IBCF efektywnie, choć nie selektywnie reaguje ze związkami posiadającymi grupę aminową, w środowisku wodnym o lekko zasadowym pH. Zdecydowałam się sprawdzić jego użyteczność w przypadku oznaczania HTL. Zoptymalizowałam trzy charakterystyczne parametry, które są kluczowe dla zapewnienia odpowiedniej wydajności i powtarzalności procesu, a mianowicie czas reakcji, nadmiar molowy odczynnika derywatyzującego oraz pH środowiska. Na tej podstawie stwierdziłam, że pochodna HTL powstaje w ciągu kilku sekund po zmieszaniu reagentów, przy zastosowaniu co najmniej 1000-krotnego nadmiaru molowego odczynnika derywatyzującego w stosunku do analitu. Do monitorowania pochodnej wykorzystałam technikę GC-MS. Przeprowadziłam również

dotkliwe eksperymenty w celu ustalenia kinetyki reakcji derywatywacji HTL z IBCF. W eksperymencie tym wykorzystałam technikę chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Po reakcji derywatywacji następowała ekstrakcja pochodnej HTL z próbek moczu do chloroformu. Przetestowałam szereg parametrów wpływających na wydajność ekstrakcji, w tym czas ekstrakcji i ilość rozpuszczalnika organicznego (ekstrahenta). Prowadzenie manualnej ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz pociągnęło za sobą konieczność stosowania standardu wewnętrznego (IS). Spośród różnych kandydatów wybrałam lakton homoseryny (HSL), który wykazuje maksymalnie duże podobieństwo strukturalne do HTL, a w konsekwencji posiada podobne właściwości fizykochemiczne. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że obecność IS na wszystkich etapach procedury, skutecznie zmniejsza całkowity błąd analizy, czyniąc metodę odtwarzalną i przydatną do oznaczania HTL w próbkach moczu człowieka.

Po zoptymalizowaniu wszystkich etapów procedury przygotowania próbki oraz dobraniu warunków rozdzielania chromatograficznego, opracowaną metodę poddałam walidacji, wyznaczając zakres liniowości, precyzję, dokładność oraz granice wykrywalności i oznaczalności. Metoda wykazuje liniowość w zakresie 0,01-0,20 nmol/ml moczu oraz charakteryzuje się dobrą precyzją (6,4%-9,5%), dokładnością (98,0%-103,2%) i czułością (LOQ 0,01 nmol/ml). Kolejnym etapem prac było wykazanie, że opracowana procedura może być stosowana podczas analizy tzw. próbek rzeczywistych, pochodzących od 12 ochotników (stan zdrowia nieznan). W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdziłam, że HTL występuje w badanym materiale w zakresie od 7 pmol/ml do 162 pmol/ml moczu. Aby zniwelować różnice w rozcieńczeniu moczu wśród uczestników badań, zawartość HTL w każdej próbce znormalizowałam w odniesieniu do poziomu kreatyniny (Crn), która jest produktem ubocznym metabolizmu mięśni, wydalany ze stałą szybkością. W przeliczeniu na Crn uzyskane wartości HTL mieściły się w przedziale od 0,51 do 13,1 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ Crn. Tym samym wykazałam użyteczność opracowanej metody w przypadku analizy próbek rzeczywistych.



Application of GC–MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine



Monika Wrońska, Grażyna Chwatko, Kamila Borowczyk, Justyna Piechocka, Paweł Kubalczyk, Rafał Głowacki*

University of Łódź, Faculty of Chemistry, Department of Environmental Chemistry, 163 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

GC–MS
Homocysteine thiolactone
Human urine
Isobutyl chloroformate
Liquid-liquid extraction

ABSTRACT

It is well established that homocysteine thiolactone (HTL) is associated with some health disorders, including cardiovascular diseases. HTL is a by-product of sulfur metabolic cycle. So far, its presence has been confirmed in human plasma and urine. It has been also shown that a vast majority of HTL is removed from human body through kidney. Thus, the aim of the current investigations has been the identification, separation and quantification of HTL in urine samples. For the first time a cheap, reliable and robust GC–MS method was developed for the determination of HTL in human urine in the form of its volatile isobutyl chloroformate derivative. Separation of the analyte and internal standard (homoserine lactone (HSL)) was achieved in 15 min followed by mass spectrometry detection (MS). Isocratic elution was accomplished with helium at a flow rate of 1 mL min^{-1} and a gradient of the column temperature was concomitant with the analysis. The mass spectrometer was set to the electron impact mode at 70 eV. The ion source, quadrupole and MS interface temperatures were set to 230 °C, 150 °C and 250 °C, respectively. Elaborated analytical procedure allows quantification of analyte in a linear range of $0.01\text{--}0.20 \text{ nmol mL}^{-1}$ urine. The LOQ and LOD values were 0.01 and $0.005 \text{ nmol mL}^{-1}$, respectively. The method accuracy ranged from 98.0% to 103.2%, while precision varied from 6.4% to 9.5% and from 10.7% to 16.9% for intra- and inter-day measurements, respectively. Finally, the method has been successfully implemented in the analysis of 12 urine samples donated by apparently healthy volunteers. Concentration of HTL ranged from $< \text{LOQ}$ to 163 pmol mL^{-1} urine (0.51 to $13.1 \text{ } \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ Crn}$).

1. Introduction

It is commonly known that identifying clinically significant biomarkers of human diseases is often like searching for the proverbial needle in a haystack. It is also well established that plasma homocysteine (Hcy) as well as other sulfur compounds, including *N*-homocysteinylated proteins, cysteine, cysteinyl-glycine, γ -glutamyl-cysteine or glutathione are associated with some disorders and are strong predictors of mortality, in cardiovascular and cancer patients [1–7]. Although homocysteine thiolactone (HTL) is metabolically related to Hcy, its role in the pathogenesis of mentioned disorders has not been intensively studied as yet. While the biological importance of HTL as proteins modifying factor is well recognized, there are only few evidences indicating HTL association with cardiovascular diseases [8–9]. Importantly, preliminary studies have revealed that urinary HTL can act as a risk predictor of acute myocardial infarction in patients with coronary artery disease independent from established risk factors

and plasma Hcy [10]. This is why determination of HTL becomes more and more important. Investigation of the role of HTL in living organisms began in the 70's but detailed studies had to await the development of advanced analytical methods from the 2000's onward. While liquid chromatography based methods are usually used for HTL determination [11–15], capillary electrophoresis (CE) based assays are still rare [16,17]. Interestingly, to the best of our knowledge, GC technique has been exploited for this purpose only once [18].

Biological fluids, including urine belong to the most complex samples, thus require a special treatment because majority of analytical instruments are designed to handle the analytes but are usually incapable of accommodating some of matrix components, in particular, proteins. Therefore, analysis of biological samples for HTL is an area of analytical chemistry where only the most robust and reliable methods can be effectively used [11–13,16–18]. Because of regular variability in urine volume and content, multiple measurements are often made in comparison to creatinine (Crn) levels within the same urine sample and

Abbreviations: Crn, creatinine; HSL, homoserine lactone; HTL, homocysteine thiolactone

* Corresponding author.

E-mail address: rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl (R. Głowacki).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.009>

Received 11 June 2018; Received in revised form 4 September 2018; Accepted 7 September 2018

Available online 12 September 2018

1570-0232/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

reported as an analyte/creatinine ratio. Crn is a by-product of muscle metabolism, and it is normally excreted into the urine at a constant rate, which is a characteristic making it useful for estimation general urine “dilution”.

An obvious way to improve selectivity and sensitivity of a chromatographic method is to remove interfering matrix components prior to separation, which can be achieved by applying different extraction techniques. On the other hand it should be noted that a large number of steps during sample preparation increase the likelihood of incorporating errors into the final measurement.

Only few assays have been developed for HTL quantification in human urine [11,12,16,19] or plasma [13,14,18] so far. Various sample preparation approaches have been also used. Some of these methods exploit ultrafiltration and further purification by liquid–liquid and/or charcoal extraction followed by HPLC separation and fluorescence detection [12,13]. Another one is based on solid phase extraction, an on-column derivatization of HTL with *o*-phthalaldehyde (OPA) and fluorescence detection [11]. Liquid-liquid extraction followed by CE separation and UV detection was also successfully used for HTL determination in urine samples [16].

At the beginning mass detection instruments have been preferably used by the narrow group of experimenters and not played a key role in the majority of chromatographic laboratories. With the advent of cheaper and smaller as well as more user friendly mass detectors, the potential of mass data is coming more and more available for most investigators [20]. With the experiments performed in this study, a relevant GC–MS based assay for the determination of HTL in human urine has been elaborated for the first time.

2. Experimental

2.1. Reagents

The following chemicals were used during the study: homocysteine thiolactone hydrochloride (HTL), homoserine lactone hydrochloride (HSL), homocysteine (Hcy) and isobutyl chloroformate were from Sigma-Aldrich; while sodium hydrogen phosphate heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ethyl acetate acetic acid, acetonitrile and chloroform were from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). All reagents used were of analytical grade. All solutions were prepared with purified water prior to use, if needed.

2.2. Instrumentation

Samples and standards analyses were carried out using an Agilent 7820A gas chromatograph equipped with automated sample injector model 7693A and 5977B mass spectrometry detector. The GC instrument was equipped with split/splitless inlet, working in split ratio of 10:1 mode to a 60 m \times 0.25 mm HP-5MS quartz capillary column with a 0.25 μm film thickness from Agilent Technologies. One microliter of the final analytical solution was injected for GC–MS analysis. Data acquisition and analysis were performed using MassHunter 5977B MSD Bundle with 7820 GC software. HPLC experiments were carried out using a 1220 Infinity LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump integrated with two channel degasser, autosampler, column oven and diode-array detector (DAD) controlled by OpenLAB CDS ChemStation software. The pH was measured using a Hanna Instrument HI 221 pH-meter (Loveland, USA). For sample shaking Multi Speed Vortex MSV-3500 from Biosan (Riga, Latvia) was used. Water was purified using a Millipore Milli-QRG system (Millipore, Vienna, Austria). During the study a Hettich Mikro 200R centrifuge with fast cool function (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) and QBD2 Grant Instruments (Cambridge) Ltd. thermostat were also exploited.

2.3. Sample preparation

Urine samples were prepared according to the following procedure: 150 μL of urine was mixed with 250 μL of 0.05 mol L⁻¹ pH 7.0 phosphate buffer and 50 μL of isobutyl chloroformate. Next, mixture was spiked with 50 μL of 20 nmol L⁻¹ HSL (IS), affording final concentration of IS 2 nmol L⁻¹ urine, and soundly shaken by hand for 20 s. Then, 300 μL of chloroform was added and the mixture was vigorously shaken by Multi Speed Vortex for 3 min (3000 \times g) followed by 3 min centrifugation at 14000 \times g. In the next step 240 μL of the chloroform layer was transferred into 1.5 mL polypropylene vials and evaporated to dryness at 60 °C. The residue was reconstituted in 80 μL of ethyl acetate with the assistance of shaking (3 min, 3000 \times g). Afterwards an aliquot of obtained solution (1 μL) was injected into the GC–MS system.

2.4. Stability and kinetic studies

For a kinetic studies and stability evaluation HPLC technique was exploited. In proposed experiments amounts of HTL/HSL were significant (100 nmol L⁻¹), thus it was easy to monitor HTL/HSL and their derivatives with the use of spectrophotometric detector at 240 nm in one analysis run. For the separation a Kinetex HILIC column (100 mm \times 4.6 mm, 2.6 μm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) was used. The column was eluted isocratically at 25 °C with a mobile phase containing 50% of 0.5% CH_3COOH and 50% MeCN at a flow rate of 1 mL min⁻¹. A 1 μL of the final analytical solution was injected onto chromatographic column.

2.4.1. Stability of HTL/HSL derivative

A 100 μL (1 mmol L⁻¹) of HTL or HSL was transferred to the polypropylene vial and diluted with 800 μL of 0.05 mol L⁻¹ pH 7.0 phosphate buffer. Next, 100 μL of isobutyl chloroformate was added, the reaction mixture was vigorously shaken by hand for 20 s and put aside at ambient temperature. At different times thereafter (from 1 to 130 min) samples were chromatographed under LC conditions described above.

2.4.2. Derivatization reaction kinetics

Samples were prepared according to the following procedure: 800 μL of 0.05 mol L⁻¹ pH 7.0 phosphate buffer was spiked with 100 μL (1 mmol L⁻¹) of standard solution of HTL or HSL affording final concentration of 0.1 mmol L⁻¹. Then, 100 μL of isobutyl chloroformate was added, the reaction mixture was vigorously shaken by hand for 20 s and left at room temperature. At different times thereafter (1, 5, 9, 13, 17 min), samples were chromatographed according to the LC procedure described above.

2.5. GC–MS conditions

Helium (99.9999%) was used as the carrier gas with a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. The injection port temperature was 270 °C. The oven temperature was kept at 120 °C for 2 min and next programmed from 120 °C to 270 °C at 30 °C min⁻¹, then temperature was kept at 270 °C for 8 min. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode at 70 eV and the ion source temperature was set at 230 °C, temperature of quadrupole was set at 150 °C, while the MS interface was set to 250 °C. The multiple-ion detector was focused on the molecular ions as follows: 161.1 and 189.1 *m/z* for HTL derivative and 146.1 *m/z* for derivative of HSL.

2.6. Validation protocol

The method had been validated before it was applied to real samples. Validation protocol involved estimation of specificity, imprecision, recovery, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

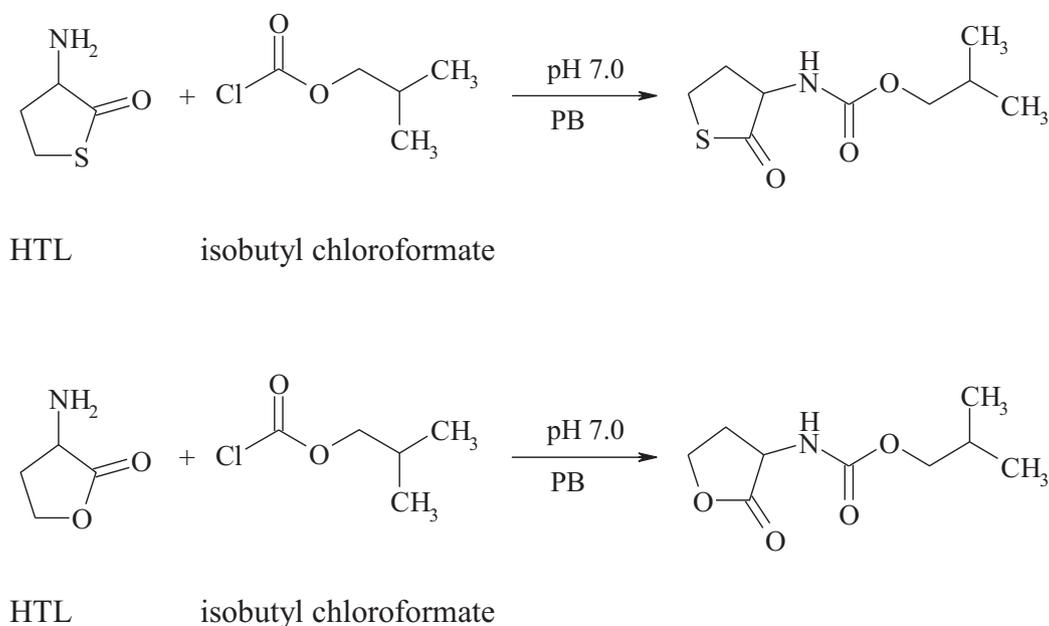


Fig. 1. Chemical derivatization reaction scheme of HTL and HSL with isobutyl chloroformate.

2.6.1. Specificity of the method

Specificity of the method, defined as the ability to assess unequivocally the analyte in the presence of components which may be expected to be present in the sample was evaluated. The experiment included Hcy, endogenous amino acid metabolically related to HTL.

2.6.2. Precision and accuracy

Precision was expressed in terms of relative standard deviation, whereas accuracy as the percentage of analyte recovery calculated by expressing the mean measured amount as percentage of added amount. Accuracy was calculated with the use of a formula:

$$\text{Accuracy (\%)} = \left[\frac{\text{measured amount} - \text{endogenous content}}{\text{added amount}} \right] \times 100\%$$

Three concentrations representing the entire range of the calibration curves were studied: one close the lower limit of quantitation, one close the center, and one near the upper boundary of the standard curve. Measured concentrations were assessed by the application of calibration curves prepared designedly for this purpose.

2.6.3. LOD and LOQ estimation

The LOD was taken as the concentration that produces a detector signal that could be easily distinguished from the baseline (larger than three times the baseline noise). The LOQ was taken as the concentration that produces a detector signal 10 times higher than the baseline noise. These values were determined by spiking a proxy matrix (0.9% NaCl in 0.01 mol mL⁻¹ pH 7.0 phosphate buffer) with decreasing concentrations of HTL until signal to noise ratio of 10:1.

2.6.4. Calibration

Urine samples (150 µL) spiked with HTL water solution affording final concentrations of 0.01, 0.025, 0.050, 0.075, 0.150, and 0.200 nmol mL⁻¹ urine were pipetted into polypropylene eppendorf vials and processed according to the procedure described in Section 2.3. The calibration standards were prepared in four replicates. The peak area ratios of HTL-isobutyl chloroformate derivative to that of IS were plotted versus analyte concentration and the curves were fitted by least-square linear regression analysis.

2.7. Urine sample collection and processing

We have studied 12 urine samples derived by apparently healthy volunteers (5 male and 7 female, 25–46 years old). The donors were not supplemented with analyte before sample collection. The first morning urine samples were analyzed just after collection or stored at –80 °C. Each sample was divided into two portions. One of them was spiked with the known amount of HTL and then both samples were assayed in triplicate according to the procedure described in Section 2.3. Obtained results for HTL concentration were also adjusted for Crn. Crn was assayed according to the HPLC based method elaborated in our laboratory and published earlier [21]. The study was approved by the Bioethical Committees of the University of Łódź.

3. Results and discussion

It should be emphasized that accurate determination of HTL by direct biological sample analysis is virtually impossible, making some level of sample preparation obligatory. An obvious way to improve selectivity and sensitivity of chromatographic methods is to remove interfering matrix components prior to chromatographic separation, which is usually achieved by applying different extraction techniques.

3.1. Sample preparation

Sample preparation procedure involved derivatization of HTL with isobutyl chloroformate followed by liquid-liquid extraction with chloroform, evaporation to dryness and dilution of the residue with ethyl acetate. Both, HTL derivatization and extraction of its derivative were critical in this approach.

3.1.1. Choosing of the internal standard

In order to minimize errors during analyte derivatization, extraction, injection variation and column deterioration, the IS mode of quantitation was applied. Among the variety of candidates homoserine lactone (HSL) was chosen. The appropriate reaction schemes are depicted in Fig. 1. As can be seen HSL exhibits a great structural similarity to HTL. Moreover HSL possess similar to analyte physic-chemical properties, thus fulfills the requirements for a good IS. Importantly, it is involved in all steps of the analytical procedure, and elutes close to the

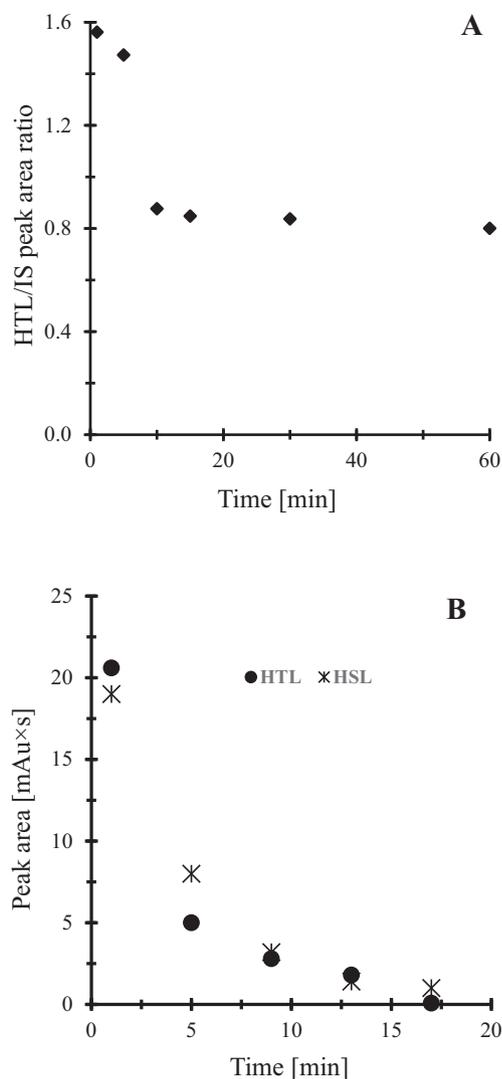


Fig. 2. Stability of HTL derivative expressed as a HTL/IS peak area ratio (A); Disappearance of HTL and HSL in reaction mixture as a result of isobutyl chloroformate derivatives formation (B).

analyte. The validation data obtained for the method unambiguously confirms correctness of the choice.

3.1.2. Derivatization

Due to the fact that HTL is not volatile our preliminary investigations were focused on finding an appropriate derivatizing reagent making analyte compatible with GC requirements. Literature data have indicated that isobutyl chloroformate effectively reacts with compounds possessing amino group moiety under slightly alkaline water conditions [22,23], so we have decided to use it in our assay. Three characteristic features that are crucial to derivatization were optimized, namely time of reaction, reagent excess and pH conditions. Provided that slightly alkaline conditions as well as at least 1000 M fold excess of isobutyl chloroformate were employed it has been shown that derivative of HTL is generated within few seconds after reagents mixing. Nevertheless, our detailed HPLC studies have revealed that obtained product is not stable in aqueous solution. It has been shown that application of Hydrophilic Interactions Liquid Chromatography (HILIC) allows separation and monitor of HTL as well as its reaction product with isobutyl chloroformate. As can be seen from Fig. 2(A) peak of HTL derivative reaches maximum within a few seconds, after mixing of the reagents, and then the progressive drop of the peak area is observed. It has been also shown that after 60–70 min decomposition definitely

slows down and derivative becomes relatively stable. It should be noted that at the same time derivative of HSL remains fairly stable. For further investigations we decided to subject the sample to next stages just after mixing of the reagents. Our findings were in a good agreement with the observations made by other investigators regarding derivatization of methionine and Hcy with the use of isobutyl chloroformate [22,23].

Additional chromatographic experiments have been conducted to establish kinetic of the derivatization reaction of HTL and HSL with isobutyl chloroformate. As mentioned above, HILIC separation and UV detection enabled us to monitor the reaction product, but also one of the unreacted substrate, namely HTL/HSL. Since HTL derivative has turned out as not stable we tested the rate of HTL/HSL disappearance in reaction mixture, reflecting their derivatives formation. As can be seen from Fig. 2(B) gradual disappearance of HTL/HSL was observed when added to reaction mixture up to 15 min, when HTL/HSL were consumed completely. Mentioned above studies clearly indicated that two processes, namely synthesis of HTL derivative and rate of its decomposition are crucial for further analysis. On the other hand, these limitations can be successfully overcome by application of an appropriate IS.

3.1.3. Extraction

It has been earlier shown that HTL can be easily extracted from urine samples with the use of liquid-liquid [13,16,19] and solid phase extraction [11] modes.

In present approach the derivatization reaction was followed by extraction of HTL derivative from urine samples to chloroform. Capitalizing on the remarkable hydrophobicity of the derivative, a number of parameters affecting extraction efficiency have been tested including time of extraction and amount of organic solvent. Such approach entailed the use of HSL as an internal standard for error depletion. In each case vials were loaded with urine samples mixed with phosphate buffer, spiked with IS and isobutyl chloroformate followed by addition of 300 μ L of chloroform acting as an extraction solvent. Then, mixture was shaken by a mechanical type of shaker to ensure good interaction of the sample and organic phase. Highly polar and ionic compounds, insoluble in the organic solvent, during extraction remained in the aqueous phase, while hydrophobic components such as HTL-isobutyl chloroformate derivative were effectively extracted into the chloroform. In the next step samples were centrifuged for good liquids separation and the chloroform layer was transferred to the polypropylene vial followed by evaporation to dryness. The residue was reconstituted in ethyl acetate. The injection of 1 μ L of the salt free sample in split ratio of 10:1 mode onto the column and separation was possible without further purification.

It should be noted that application of IS has allowed to neglect extraction efficiency, namely it was not necessary to approach this problem quantitatively. Our experiments have proven that regardless of the analyte recovery variations correctly selected IS effectively reduce the total error, making procedure reproducible and useful for HTL determination.

3.2. Chromatographic separation and detection

The variety of parameters has been leveraged to provide satisfactory separation. Though many variables have been optimized, a flow rate and type of carrier gas have hardly had an impact, while temperature of column was the most important factor influenced quality of the separation. Thus temperature gradient was thoroughly tested to establish the optimal separation conditions. It has been also shown that a change in a flow rate merely expands or compresses the chromatogram but has minimal impact on the resolution. A definite identification and quantification were possible as a result of a clear separation of matrix interferences from the analyte peak as well as its mass spectra. Seeing that HTL derivative has not been studied as yet we had to identify the molecular ions related to the analyte. For this purpose the SCAN mode of MS detector was exploited. It has been shown that two ions, namely

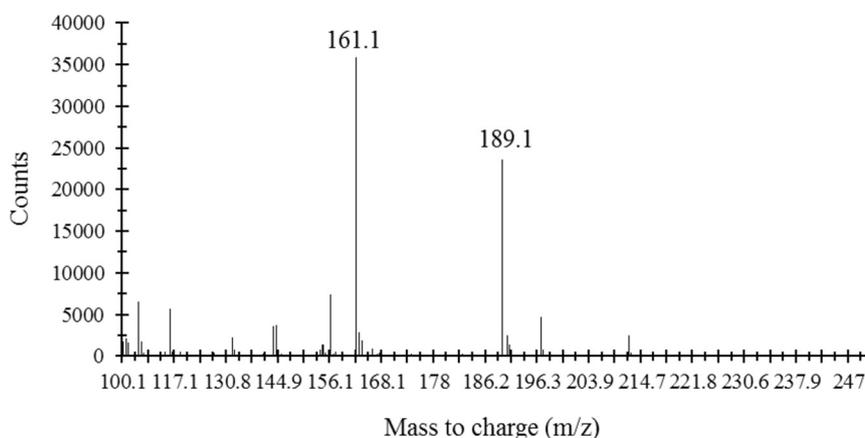


Fig. 3. Electron ionization mass spectra of the isobutyl chloroformate derivative of HTL.

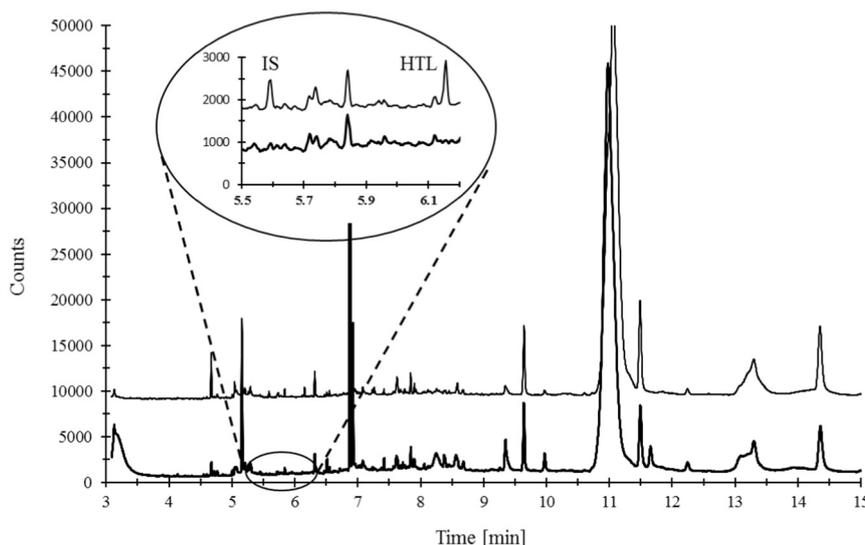


Fig. 4. Representative chromatograms of human urine (thick line) and urine spiked with HTL (30 pmol mL^{-1}) and HSL (2 pmol mL^{-1}) (thin line) after derivatization with isobutyl chloroformate. Chromatographic conditions are described in Section 2.5.

161.1 and 189.1 m/z can be used for analyte monitoring (Fig. 3) while for HSL derivative 146.1 m/z should be applied. Further analyses were conducted with SIM mode and the MS detector was set to above values. Fig. 4 shows an exemplary chromatograms, including the plot of a sample extract from urine obtained with the use of optimal separation conditions described in Section 2.5.

3.3. Validation

During method validation we abode by the rules of the guidelines for biological sample analysis [24,25]. Calibration was made with the use of real samples. As can be seen from Fig. 4 (thick line) it was possible to found urine samples actually free of HTL. These samples we utilized for calibration of the method. The linear relationship is a first step for assay validation, the second point to confirm is that the method is able to provide reproducible results. The calibration range adequately covered the variations in the amounts of analytes in the real samples. Linearity was checked in a continuous domain from 0.01 up to $0.200 \text{ nmol mL}^{-1}$. A calibration curves were prepared by measuring seven different concentrations of HTL. The peak area ratios of HTL derivative to that of HSL were plotted versus analyte concentration. At each concentration, four replicates were assayed. Obtained results confirmed that the peak area increases in proportion to the analyte concentration and the method is linear. A regression equations were

$y = 1073.7x - 2.85$ (R^2 0.986) and $y = 1.485x$ (R^2 0.999) for HTL and HTL/HSL ratio, respectively.

The LOQ and LOD values amounted to 0.01 and $0.005 \text{ nmol mL}^{-1}$, respectively. These values were comparable or better than previously published, based on HPLC/CE studies concerning HTL determination in human urine [11,12,16].

The method accuracy was demonstrated to be within 98.0% and 103.2% of the nominal concentration for all HTL levels. The %RSD was 6.4%–9.5% and 10.7%–16.9% for intra- and inter-day, respectively indicating good method precision. Detailed data are inserted in Table 1.

Specificity of the method was also tested. Since metabolically related to HTL Hcy is known to be present in human urine, the mixture containing both compounds derivatized with isobutyl chloroformate was chromatographed under recommended conditions (Section 2.5) It

Table 1
Recoveries, within- and between-day precision of HTL added to urine.

HTL added [nmol mL^{-1}]	HTL found [nmol mL^{-1}]	Recovery [%]	RSD [%]	
			Intra-day	Inter-day
0	0.000	–	–	–
0.01	0.010	103.2	6.4	16.9
0.10	0.098	98.0	8.2	12.1
0.20	0.197	98.6	9.5	10.7

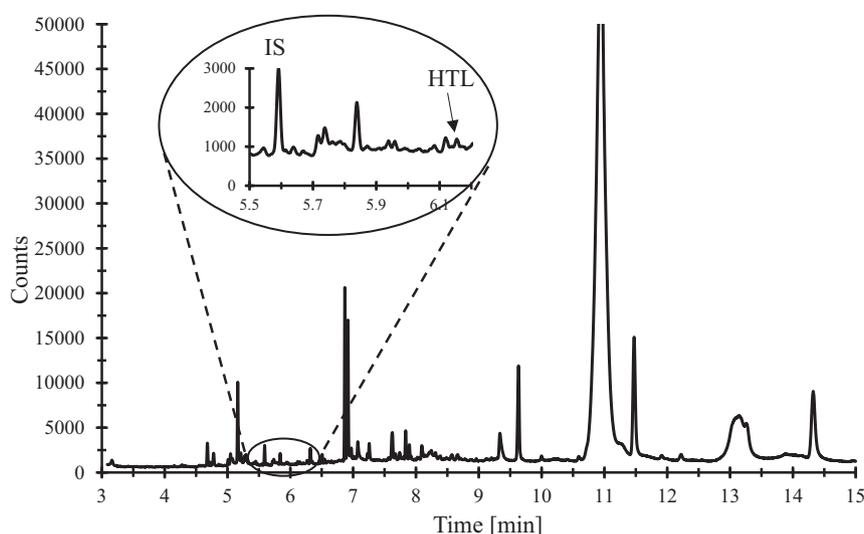


Fig. 5. Chromatogram of real urine sample prepared according to the procedure described in Section 2.3. Concentration of HTL amounts $13.5 \text{ pmol mL}^{-1}$. Chromatographic conditions as described in Section 2.5.

has been shown that HTL and Hcy derivatives firmly differ in retention times.

Validation studies have also revealed that calibration curves prepared with the use of various urine samples differ markedly in a slope, indicating that matrix composition strongly affects the final results. One of the most probably reason is that samples differ in a salt concentration and/or pH. Since linearity of the method has been proven the single standard addition method was chosen for HTL determination in samples donated by apparently healthy volunteers. Taking into account characteristics of the single standard addition method that meant that each sample had to be analyzed twice. First analysis was aimed at estimation of the quantity of HTL needed for urine sample spiking. In the next step spiked urine sample was analyzed once more time. It should be noted, that such approach was recognized as a serious limitation, leading to reduction of the number of samples analyzed per day. Having regard to that restriction presented method allows analysis of 45 samples per diem, while other methods based on HPLC and CE techniques enable to analyze daily 300 [11], 96 [12] or 100 [16] samples.

3.4. Application of the method

When the validation parameters had been evaluated, the method was applied to the analysis of urine samples donated by 12 apparently healthy volunteers. Representative chromatogram obtained for one of them is depicted on Fig. 5. It has been shown that concentration of HTL in real samples ranged from 7 pmol mL^{-1} to 162 pmol mL^{-1} urine (average $54 \pm 57 \text{ pmol mL}^{-1}$). Taking into account Crn levels these values ranged from 0.51 to $13.1 \mu\text{mol mol}^{-1}$ Crn (average $7.5 \pm 8.0 \mu\text{mol mol}^{-1}$ Crn). Moreover, in two samples concentration of HTL was found to be below the LOQ (7 and 9 pmol mL^{-1}). Due to the fact that RSD for these estimated values were less than 5%, both results were included to the calculations of the average amounts. However, it has been earlier shown that urinary concentration of HTL in healthy human subjects ranges from 25 to 297 pmol mL^{-1} [11], from 11 to 485 pmol mL^{-1} [12] or from 129 to 229 pmol mL^{-1} [16], while in some pathological conditions higher levels can be observed [10,26]. Thus, data obtained in the current study clearly indicate that proposed GC–MS assay can be useful both, in clinical as well as normal samples. It should be also mentioned that in some cases analyte was not detected. It means that proposed assay cannot be exploited for plasma samples where HTL contents are about 100-fold lower than those in urine [13]. In present approach free of HTL urine samples have been used for calibration studies.

4. Conclusions

This work demonstrates for the first time that GC–MS technique can be successfully applied to the analysis of human urine for HTL content. We have also shown that samples can be adequately assayed in a rapid and quantitative method following reliable and straightforward sample preparation. Our approach has also proven that the application of HSL as an IS for error depletion is advantageous. Overall analytical procedure involved three basic steps: derivatization of the analyte, extraction of derivative with the chloroform followed by final chromatographic separation. Importantly, extraction is not a limitation since many samples can be assayed at the same time. While there are some HPLC based methods enabling HTL determination, the cost, complexity, and time investment to carry out these assays precludes their widespread and routine use. When applied correctly, presented assay may produce valuable data that can be used to establish concentration of urinary HTL in clinical as well as normal samples. An important limitation of presented assay concerns application of the single standard addition method which limits the number of samples analyzed per day.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the National Science Center (2012/07/B/ST5/00765, 2017/27/B/ST4/01476) and the University of Łódź (B1711100001599.02).

References

- [1] J.W. Miller, S.A.A. Beresford, M.L. Neuhouser, T.-Y.D. Cheng, X. Song, E.C. Brown, Y. Zheng, B. Rodriguez, R. Green, C.M. Ulrich, Homocysteine, cysteine and risk of incident colorectal cancer in the Women's Health Initiative observational cohort, *Am. J. Clin. Nutr.* 97 (2013) 827–834.
- [2] F.-F. Chiang, S.-C. Huang, H.-M. Wang, F.-P. Chen, Y.-C. Huang, High serum folate might have a potential dual effect on risk of colorectal cancer, *Clin. Nutr.* 34 (2015) 986–990.
- [3] A. Zinellu, S. Sotgia, G. Loriga, L. Deiana, A.E. Satta, C. Carru, Oxidative stress improvement is associated with increased levels of taurine in CKD patients undergoing lipid-lowering therapy, *Amino Acids* 43 (2012) 1499–1507.
- [4] M. Kędzierska, R. Glowacki, U. Czernek, K. Szydłowska-Pazera, P. Potemski, J. Piekarski, A. Jeziorski, B. Olas, Changes in plasma thiol levels induced by different phases of treatment in breast cancer; the role of commercial extract from black chokeberry, *Mol. Cell. Biochem.* 372 (2013) 47–55.

- [5] W. de Ruijter, R.G.J. Westendorp, W.J.J. Assendelft, W.P.J. den Elzen, A.J.M. de Craen, S. le Cessie, J. Gussekloo, Use of Framingham risk score and new biomarkers to predict cardiovascular mortality in older people: population based observational cohort study, *BMJ* 338 (2009) a3083.
- [6] C.-F. Sun, T.R. Haven, T.-L. Wu, K.-C. Tsao, J.T. Wu, Serum total homocysteine increases with the rapid proliferation rate of tumor cells and decline upon cell death: a potential new tumor marker, *Clin. Chim. Acta* 321 (2002) 55–62.
- [7] L.L. Wu, J.T. Wu, Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker, *Clin. Chim. Acta* 322 (2002) 21–28.
- [8] G. Chwatko, G.H.J. Boers, K.A. Strauss, D.M. Shih, H. Jakubowski, Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine β -synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice, *FASEB J.* 21 (2007) 1707–1713.
- [9] W. Gu, J. Lu, G. Yang, J. Dou, Y. Mu, J. Meng, C. Pan, Plasma homocysteine thiolactone associated with risk of macrovasculopathy in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus, *Adv. Ther.* 25 (2008) 914–924.
- [10] H. Jakubowski, K. Borowczyk, R. Głowacki, O. Nygård, Urinary homocysteine thiolactone predicts acute myocardial infarction in a randomized controlled homocysteine-lowering B-vitamin trial, *Circulation* 132 (2015) A19250.
- [11] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, An on-column derivatization method for the determination of homocysteine-thiolactone and protein N-linked homocysteine, *Amino Acids* 41 (2011) 187–194.
- [12] G. Chwatko, H. Jakubowski, Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans, *Clin. Chem.* 51 (2005) 408–415.
- [13] G. Chwatko, H. Jakubowski, The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma, *Anal. Biochem.* 337 (2005) 271–277.
- [14] H. Jakubowski, The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples, *Anal. Biochem.* 308 (2002) 112–119.
- [15] Y. Mukai, T. Togawa, T. Suzuki, K. Ohata, S. Tanabe, Determination of homocysteine thiolactone and homocysteine in cell cultures using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 767 (2002) 263–268.
- [16] P. Furmaniak, P. Kubalczyk, R. Głowacki, 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 (2014) 36–41.
- [17] A. Zinellu, S. Sotgia, B. Scanu, E. Pisanu, M. Sanna, S. Sati, L. Deiana, S. Sengupta, C. Carru, Determination of homocysteine thiolactone, reduced homocysteine, homocystine, homocysteine-cysteine mixed disulfide, cysteine and cystine in a reaction mixture by overimposed pressure/voltage capillary electrophoresis, *Talanta* 82 (2010) 1281–1285.
- [18] P. Daneshvar, M. Yazdanpanah, C. Cuthbert, D.E.C. Cole, Quantitative assay of plasma homocysteine thiolactone by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 358–362.
- [19] H. Jakubowski, Quantification of urinary S- and N-homocysteinyllated protein and homocysteine-thiolactone in mice, *Anal. Biochem.* 508 (2016) 118–123.
- [20] D.-X. Li, L. Gan, A. Bronja, O.J. Schmitz, Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): review, *Anal. Chim. Acta* 891 (2015) 43–61.
- [21] K. Kuśmierek, R. Głowacki, E. Bald, Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 855–860.
- [22] Y. Shinohara, H. Hasegawa, K. Tagoku, T. Hashimoto, Simultaneous determination of methionine and total homocysteine in human plasma by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 758 (2001) 283–288.
- [23] Y. Shinohara, H. Hasegawa, T. Kaneko, Y. Tamura, T. Hashimoto, K. Ichida, Analysis of [$^2\text{H}_7$]methionine, [$^2\text{H}_4$]methionine, methionine, [$^2\text{H}_4$]homocysteine and homocysteine in plasma by gas chromatography–mass spectrometry to follow the fate of administered [$^2\text{H}_7$]methionine, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 417–422.
- [24] S. Braggio, R.J. Barnaby, P. Grossi, M. Cugola, A strategy for validation of bioanalytical methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 375–388.
- [25] FDA guidance for industry bioanalytical method validation, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252f1.pdf>, (2001).
- [26] A. Perla-Kajan, K. Borowczyk, R. Głowacki, O. Nygård, H. Jakubowski, Paraoxonase 1 (PON1) genotype and activity affect homocysteine thiolactone levels in humans, *FASEB J.* (2018), <https://doi.org/10.1096/fj.201800346R>.

Publikacja D2:

J. Piechocka, M. Wrońska, G. Chwatko, H. Jakubowski, R. Głowacki, *Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry*, **Journal of Chromatography B**, 1149 (2020) 122155.

Skuteczność opisanej powyżej metody (praca D1) wykorzystującej technikę GC oraz detekcję MS została potwierdzona w analizie próbek moczu, która to matryca jest mniej złożoną pod względem składu i wymaga mniejszej liczby operacji na etapie przygotowania aniżeli osocze. Z tego też powodu moje późniejsze prace skoncentrowały się na możliwościach wykrycia oraz oznaczania HTL także w próbce śliny. Co ważne, nie wykazano jak dotąd obecności HTL w tej matrycy. Uważa się jednak, że posiada ona olbrzymi potencjał diagnostyczny i może stać się w pełni przydatnym materiałem do określania poziomu ważnych biologicznie związków w celu powiązania ich obecności/stężenia z rozwojem chorób. W związku z powyższym postanowiłam przeprowadzić szereg eksperymentów, których głównym celem było wykazanie, że HTL jest obecny w ślinie człowieka. W następnej kolejności skupiałam się na zbadaniu relacji stężeniowej pomiędzy jego zawartością w moczu oraz ślinie. Optymalizacja charakterystycznych dla GC parametrów chromatograficznych (rodzaj kolumny, temperatura pieca, temperatura dozownika, objętość wprowadzanej próbki) pozwoliła na ustalenie efektywnych warunków rozdzielania zarówno dla próbek śliny jak i moczu. Zaproponowana przeze mnie procedura analityczna obejmuje ekstrakcję HTL z próbki biologicznej, liofilizację, modyfikację chemiczną analitu oraz końcową analizę chromatograficzną.

Ze względu na złożony charakter próbki (mocz, ślina), w tym obecność białek (ślina), niezbędnym krokiem przed etapem rozdzielania chromatograficznego było usunięcie potencjalnie interferujących składników matrycy w celu poprawy selektywności i czułości opracowanej metody. Uproszczenie matrycy oraz usunięcie białek wykonano jednocześnie przez zastosowanie ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz. W tym celu przetestowałam szereg różnych rozpuszczalników organicznych, jednakże podobnie jak w przypadku wcześniejszych eksperymentów mieszanina chloroform:metanol w stosunku objętościowym 2:1 (v/v) okazała się być najlepszą pod względem parametrów lotności rozpuszczalnika oraz efektywności izolacji analitu. Do przekształcenia HTL w lotną pochodną wykorzystałam reakcję silylacji, stosując odpowiednio przygotowaną mieszaninę reakcyjną składającą się z N-trimetylosililo-N-metylotrifluoroacetamidu oraz chlorku

trimetylosililowego (MSTFA/TMCS). Na tym etapie zoptymalizowałam trzy kluczowe dla reakcji derywatywacji parametry, sprawdzając nadmiar molowy odczynnika derywatyżującego, temperaturę oraz kinetykę reakcji dla próbki moczu i śliny, uzyskując zbliżone do siebie rezultaty. Zbadałam również trwałość HTL w ślinie, stosując opracowaną wcześniej w Katedrze Chemii Środowiska i opublikowaną metodę opartą na technice HPLC-FLD [56]. Było to bardzo istotne ponieważ, jak już wspomniałam, nikt wcześniej nie stwierdził obecności HTL w ślinie. W tym kontekście były to badania pionierskie, które dostarczyły informacji o możliwościach i warunkach przechowywania próbek śliny w przypadku badania zawartości HTL.

Kolejnym etapem prowadzonych przeze mnie prac była walidacja metody, obejmująca charakterystyczne dla próbek biologicznych parametry, a mianowicie granicę wykrywalności, granicę oznaczalności, zakres liniowości, a także dokładność i precyzję. Za pomocą opracowanej metody można określić ilościowo zawartość HTL w zakresie od 0,05 do 1 $\mu\text{mol/l}$ śliny i moczu. Wyznaczone doświadczalnie wartości LOD i LOQ znajdowały się na poziomie umożliwiającym śledzenie stężenia HTL w badanych próbkach rzeczywistych. Pozostałe parametry poddane walidacji były zgodne z założonymi wartościami granicznymi przyjętymi podczas analizy próbek biologicznych, co potwierdziło wiarygodność otrzymanych wyników. Następnie poddałam analizie próbki śliny i moczu zebrane od 18 pozornie zdrowych ochotników obojga płci, w różnym wieku. W przypadku pomiarów zawartości HTL w próbkach śliny były to pierwsze opublikowane w literaturze światowej wyniki. Posłużyły one do wyznaczenia relacji stężeniowej pomiędzy HTL w badanych matrycach. Było to możliwe dzięki pobraniu obydwu rodzajów próbek od każdego dawcy. Przeprowadzone eksperymenty upoważniają do stwierdzenia, że istnieje średnia korelacja pomiędzy zawartością HTL w moczu i ślinie tej samej osoby. Korelacja ta nie występowała jednak po przeliczeniu zawartości HTL na Crn. Uzyskane na niewielkiej grupie badanych wstępne wyniki pozwalają jednak sądzić, że także w przypadku HTL możliwe będzie posługiwanie się śliną jako materiałem alternatywnym w badaniach klinicznych.



Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry



Justyna Piechocka^{a,*}, Monika Wrońska^a, Grażyna Chwatko^a, Hieronim Jakubowski^{b,c}, Rafał Głowacki^{a,*}

^a Department of Environmental Chemistry, University of Lodz, Faculty of Chemistry, Łódź, Poland

^b Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Life Sciences, Poznań, Poland

^c Department of Microbiology, Biochemistry and Molecular Genetics, Rutgers-New Jersey Medical School, International Center from Public Health, Newark, NJ, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Gas chromatography – mass spectrometry
Homocysteine thiolactone
Human saliva
Human urine
N-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide
Liquid-liquid extraction

ABSTRACT

Homocysteine thiolactone (HTL) is a chemically reactive thioester that has been implicated in cardiovascular disease. So far, its presence has been documented in human and mouse plasma and urine. Here, using a new method, we show that HTL is present in human saliva. The assay involves chloroform-methanol extraction of HTL, lyophilization, and derivatization with *N*-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide (MSTFA) and trimethylchlorosilane (TMCS). The method is based on a gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and quantifies HTL in a linear range from 0.05 to 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ saliva and urine. The limit of quantification (LOQ) was 0.05 $\mu\text{mol L}^{-1}$. With respect to saliva specimen, the accuracy was 98.7–112.6%, and 90.2–100.5%, while the precision was 7.1–13.5% and 12.5–15.0% for the intra- and inter-day variation, respectively. In relation to urine samples, the accuracy was 91.9–110.9% and 91.2–103.3%, while the precision varied from 2.2% to 14.5% and 7.4% to 14.3% for intra- and inter-day measurements, respectively. Using this method, we show that in apparently healthy individuals ($n = 18$), HTL levels in saliva are not positively correlated with urinary HTL levels. Undoubtedly, larger population should be investigated to get more meaningful results.

1. Introduction

Clinical studies have established that elevated plasma homocysteine (Hcy) levels are a risk factor for cardiovascular and neurodegenerative diseases [1–7]. In those studies, a composite marker, so called ‘total Hcy’ referring to the concentration of all redox form of Hcy including reduced and oxidized or protein bound, was used. Nevertheless these studies do not include other important Hcy metabolites, such as Hcy-thiolactone (HTL) [8]. HTL is a cytotoxic metabolite of Hcy formed in an error-editing reaction in protein biosynthesis when Hcy is mistakenly selected in the place of methionine by methionyl-tRNA synthetase. However, accumulating evidence suggests that HTL, due to its chemical reactivity and the ability to modify protein lysine residues, can be mechanistically involved in cardiovascular disease [9,10]. Recent prospective studies with a cohort of coronary artery disease patients ($n = 2.086$) from the WENBIT randomized controlled trial have shown that urinary HTL is not affected by B-vitamin therapy and is a

risk predictor of acute myocardial infarction, independent from established risk factors and plasma Hcy [11]. These findings highlight the need for development of new assays to facilitate further studies of HTL in health and disease.

Although plasma and urine are the most often used in clinical, pharmacological and pharmacokinetics studies, using other biological fluids, e.g. saliva, might be preferable under certain circumstances, such as in highly contagious diseases. In contrast to blood and urine, collection of saliva is less cumbersome, less intrusive, less discomforting, and much faster. Moreover, the complexity of the saliva matrix is lower compared to plasma/urine which makes sample preparation easier and more cost effective [12]. Thus, saliva can be a more manageable alternative to blood and urine in the diagnosis of human disease. So far, several articles describing findings on drugs and metabolites as well as biomarkers in saliva have been published [12–18]. Interestingly, approximately 40% of cancer and cardiovascular disease biomarkers were found to be present also in saliva [16]. It is well established that various

Abbreviations: CMLT, 2-chloro-1-methylpiperidinium tetrafluoroborate; Crn, creatinine; Hcy, homocysteine; Hcy₂, homocystine; HTL, homocysteine thiolactone; MSTFA, *N*-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide; OPA, *o*-phthalaldehyde; PCA, perchloric acid; PB, phosphate buffer; TMCS, trimethylchlorosilane

* Corresponding authors at: Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, 163 Pomorska Street, 90-236 Łódź, Poland.

E-mail addresses: justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl (J. Piechocka), rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl (R. Głowacki).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122155>

Received 13 December 2019; Received in revised form 5 May 2020; Accepted 10 May 2020

Available online 15 May 2020

1570-0232/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

drugs and metabolites quantified in saliva correlate well with their corresponding plasma/urine levels [13,19,20]. Thus, saliva is supposed as an alternative to blood and urine in the diagnosis of some diseases.

Several HTL assays for a variety of organisms and tissues have been developed over the past two decades [9,10]. In humans and other mammals these assays have been mostly used for quantification of plasma and urinary HTL [21–28]. Ultrafiltration and purification by liquid–liquid and/or charcoal extraction has been used for sample preparation, followed by chromatographic separation, post-column derivatization with *o*-phthalaldehyde (OPA) and fluorescence detection (FLD) [23,24]. Another assay used solid phase extraction and high performance liquid chromatography (HPLC) with an on-column derivatization with OPA and FLD detection [21]. Liquid-liquid extraction was used in a urinary HTL assay followed by capillary electrophoresis with spectrophotometric detection (UV–Vis) [22] or gas chromatography – mass spectrometry (GC–MS) [26]. However, none of these methods has been used for quantification of salivary HTL since it was not known whether HTL occurs in human saliva. According to mentioned above, one can reasonably assume that HTL in saliva may serve as a non-invasive surrogate for this analyte in plasma by two reasons. First, urine itself is a non-invasive producible matrix too. Second, more important, the HTL levels in saliva are directly linked to the HTL levels in plasma because of the secretion from blood to saliva by the salivary glands. For these reasons, we have developed a GC–MS assay and used it for identification and quantitation of salivary HTL. Moreover, using the method we have verified our suppositions and examined a relationship between salivary and urinary HTL levels.

2. Experimental

2.1. Reagents

All chemicals used throughout this study were of analytical-reagent grade. D,L-homocysteine thiolactone hydrochloride (HTL), D,L-homocysteine (Hcy), D,L-homocystine (Hcy₂), *N*-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide (MSTFA), trimethylchlorosilane (TMCS), *o*-phthalaldehyde (OPA), creatinine (Crn) and pyridine were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium hydroxide, sodium hydrogen phosphate heptahydrate, sodium dihydrogen phosphate dihydrate and HPLC-grade acetonitrile (MeCN), chloroform (CHCl₃), dichloromethane, methanol (MeOH) were from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Perchloric acid (PCA), hexane, diethyl ether, ethyl acetate, and petroleum ether were from Merck (Darmstadt, Germany). 2-Chloro-1-methylpyridinium tetrafluoroborate (CMLT) was prepared as previously described [29].

2.2. Instrumentation

An Agilent 7820A gas chromatograph equipped with automated thermostated sample injector 7693A and MS detector 5977B (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used. The GC apparatus was equipped with a split/splitless inlet, working in a split ratio of 10:1 mode to an Agilent HP-5MS quartz capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm film thickness). Data acquisition and analysis were performed using MassHunter 5977B MSD Bundle with 7820 GC software.

HPLC was carried out using an Agilent 1220 Infinity LC systems equipped with a binary pump integrated with two channel degasser, autosampler, column oven, diode-array detector (DAD), and 1200 FLD detector controlled by OpenLAB CDS ChemStation software.

Samples were lyophilized using a Labconco CentriVap concentrator. Other equipment used included Multi Speed Vortex MSV-3500 (Biosan, Riga, Latvia), centrifuge with fast cool function (Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany), thermostat (QBD2, Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK) and pH-meter (HI 221, Hanna Instrument, Loveland, USA). Mili-Q water was obtained using a Millipore Milli-QRG system (Millipore, Vienna, Austria).

2.3. Biological samples collection

First early morning saliva (about 2 mL) and urine samples (50 mL) were collected from healthy individuals into sterile containers, after an overnight fasting and before teeth brushing by standard methods. Whole unstimulated saliva samples were collected by splitting method. In this method whole expectorated oral fluid was put into sterile containers and clarified by centrifugation (12 000g, 4 °C, 10 min). Samples were assayed immediately after collection using procedures described in Section 2.6. and Section 2.8., or stored at –81 °C. Obtained results for urinary HTL concentration were also adjusted for Crn. Crn was assayed according to the HPLC–UV–Vis method published earlier [30]. The apparently healthy donors were not supplemented with analyte before sample collection. The study was approved by the Ethical Committee of the University of Lodz (decision identification code 15/KBBN-UŁ/III/2018). All subjects gave their informed consent.

2.4. Stability of Hcy in saliva

Saliva was spiked with known amounts of Hcy standard (1 μmol L⁻¹) and analyzed at different time intervals, using the HPLC–UV–Vis procedure previously described [19]. Briefly, 50 μL aliquots of spiked saliva were diluted with 50 μL of 0.2 mol L⁻¹ phosphate buffer (PB) at different pH values from 6.0 to 8.0 that covers the expected pH of saliva. Then, 5 μL of 0.1 mol L⁻¹ CMLT water solution was added and the reaction mixture was vigorously mixed before keeping it for 3 min at 25 °C. Then, reaction mixtures were deproteinized with 10 μL of 3 mol L⁻¹ PCA and clarified by centrifugation (12 000g, 4 °C). Hcy was quantified by HPLC using 5 μL aliquot of the supernatant.

2.5. HTL stability in saliva

Saliva was deproteinized by ultrafiltration using a Viva Spin 10-kDa molecular weight cut-off device (Sartorius, Gottingen, Germany). Its pH was measured. The deproteinized saliva ultrafiltrate (350 μL) was spiked with 2.5 μL of an authentic HTL standard, a concentration of 1 μmol L⁻¹, aliquoted into three portions, each of which was maintained at different temperature: ambient room temperature, –81 °C, and 4 °C. At different times intervals, HTL was quantified by HPLC with on-column derivatization with OPA and FLD detection [21].

2.6. Sample preparation for HTL quantification by GC

HTL was extracted from saliva or urine using the CHCl₃–MeOH extraction procedure. Briefly, saliva or urine (300 μL) was mixed with 100 μL of 0.2 mol L⁻¹ PB pH 7.8 and the mixture was extracted by vortexing for 3 min with 800 μL of CHCl₃/MeOH (2:1, v/v). After centrifugation (12 000g, 4 °C, 2 min), the bottom organic layer (515 μL) was transferred into a 1.5 mL polypropylene microtube and dried under vacuum (15 min, 55 °C). The residue was derivatized with the MSTFA with 1% TMCS/ anhydrous pyridine reagent (25 μL or 50 μL, 50 °C, 5 min) for saliva or urine samples, respectively. Note: before heating cap was pierced with a needle to avoid an explosion. After cooling to room temperature, reaction mixture was transferred to HPLC vials and an aliquot (1 μL) was injected into the GC–MS system. Then samples were analyzed according to procedure described in Section 2.8.

2.7. Calibration of the GC–MS assay

Saliva or urine (300 μL) spiked with HTL at concentrations from 0.05 to 1 μmol L⁻¹ were pipetted into polypropylene Eppendorf microtubes and processed according to the procedures described in Section 2.6. and Section 2.8.

2.8. GC conditions

Helium (99.9999%) was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min^{-1} . The injection port temperature was $280 \text{ }^\circ\text{C}$. The oven temperature was $146 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4.2 min. The MS detector was operated in the electron impact mode at 70 eV and the ion source temperature was set to $230 \text{ }^\circ\text{C}$, temperature of quadrupole was set to $150 \text{ }^\circ\text{C}$, while the MS interface was set to $250 \text{ }^\circ\text{C}$. The MS detector was focused on the trimethylsilyl-HTL derivative ions with $m/z100.1$, $m/z115.1$, $m/z128.1$, and $m/z161.1$, while $m/z 128.1$ was selected for quantification.

3. Results and discussion

It is widely recognized that the proper selection of sample preparation as well as chromatographic conditions play a pivotal role in the quality of generated results. Thus, detailed experiments underwent to provide robustness of proposed analytical procedure.

3.1. Stability studies

We examined the stability of salivary HTL and compared it with the stability of salivary Hcy at different temperatures. We approached this problem quantitatively in order to observe potential turnover of Hcy and HTL. In the stability experiments salivary HTL and Hcy were quantified using a HPLC-FLD and HPLC-UV-Vis based methods, respectively developed in our earlier studies [19,21]. Notably, experiments concerning examination of HTL stability in saliva were conducted with the use of HPLC-FLD method enabling its convenient monitoring, provided that relatively high concentrations are studied. Such approach was advantageous from the standpoint of experiment simplification. As shown in Fig. 1A salivary HTL is stable at room temperature for at least 8 h. In contrast, salivary Hcy levels were progressively reduced, most likely by an oxidation to Hcy₂ (Fig. 1B), as described in earlier studies in plasma [31]. All salivary Hcy disappeared within 150 min and there was no change in HTL. Surprisingly, kinetics of Hcy disappearance varied greatly between saliva donors, despite similar salivary pH values of 6.5–7.0. Thus, factors other than pH were responsible for Hcy disappearance. This remains to be investigated in details. We observed that cooling of the sample is only able to delay this effect, but does not eliminate it. This should be taken into account in the case of any attempt to measure reduced thiols content in saliva samples. At $4 \text{ }^\circ\text{C}$, salivary HTL was stable for 3 days (data not shown). During the storage at $-81 \text{ }^\circ\text{C}$, the recovery for HTL from saliva was 66% after 125 days (Fig. 1C). Thawing and freezing saliva samples three times did not affect the concentration of salivary HTL in a short period of time.

3.2. Sample preparation

In the present study sample preparation involved extraction of HTL, lyophilization, treatment of the residue with anhydrous pyridine and derivatizing mixture containing MSTFA and TMCS. All experiments concerning optimization of sample preparation procedure were performed using described herein procedures based on GC-MS measurements.

3.2.1. Extraction of HTL

After examining several organic solvents including hexane, CHCl_3 , MeOH, ethyl acetate, diethyl ether, dichloromethane, petroleum ether, and their mixtures the $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1, v/v) mixture was found to be superior with regard to low solvent volatility, extraction selectivity and efficiency, in agreement with previous studies [22,26,32,33]. Very promising results were obtained when ethers or dichloromethane were used. Unfortunately, application of very volatile solutions was concomitant with pipetting problems leading to significant errors increase.

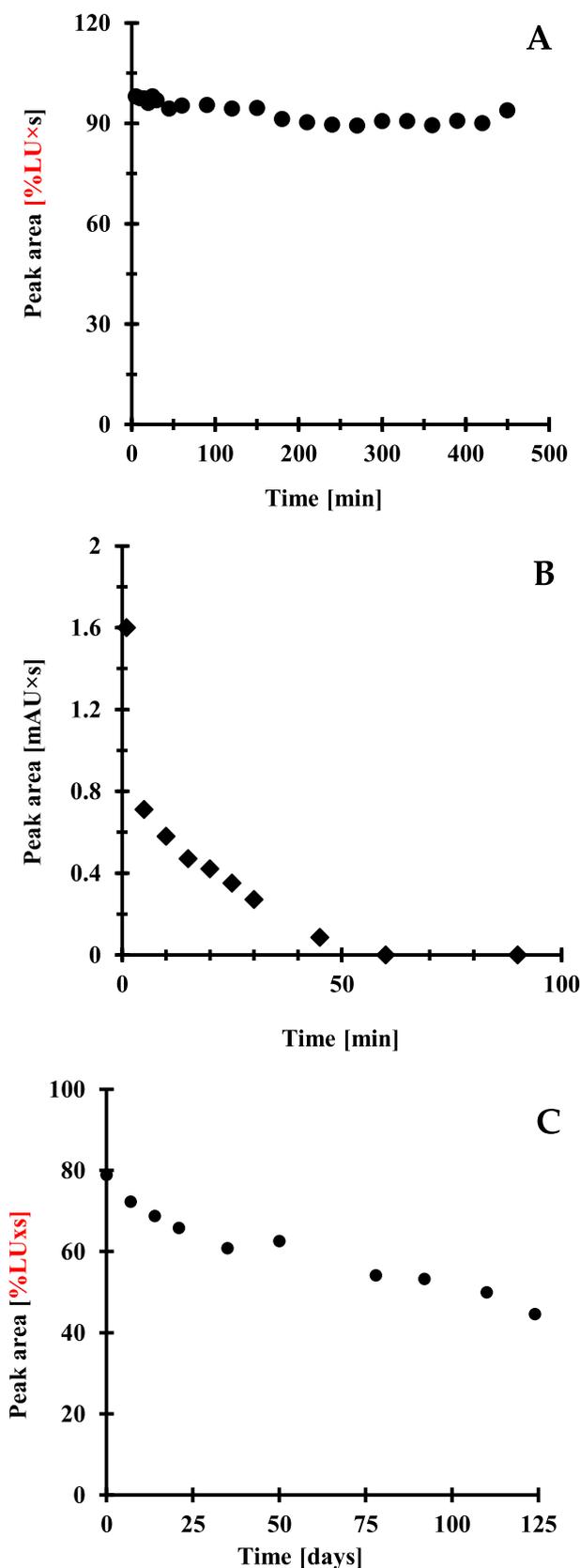


Fig. 1. Stability of homocysteine thiolactone (HTL) (A) and homocysteine (Hcy) (B) in saliva samples at room temperature, and long term stability of HTL in saliva specimen at $-81 \text{ }^\circ\text{C}$ (C), expressed as a peak area where AU and LU mean absorbance and luminescence units, respectively.

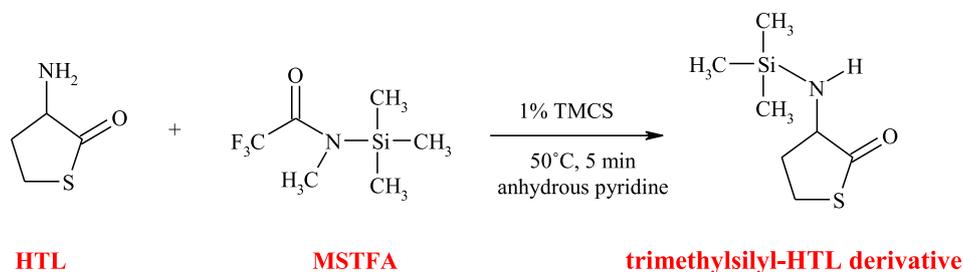


Fig. 2. Chemical derivatization reaction of homocysteine thiolactone (HTL) with *N*-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide (MSTFA) in the presence of trimethylchlorosilane (TMCS).

On the other hand, some undesirable peaks on the chromatograms were observed when hexane or ethyl acetate were exploited. Finally, extraction of HTL from saliva/urine samples was carried out according to the procedure published earlier [22,26]. The process was performed at room temperature with the use of 800 μL of the extraction mixture consisted of CHCl_3 and MeOH (2:1;v/v). It was advantageous from the standpoint of method simplification. Experiments conducted have clearly shown that isolation of HTL with CHCl_3 and MeOH mixture eliminates efficiently contamination of extract with proteins. Research carried out have also proven that application of CHCl_3 and MeOH mixture does not disturb the recovery of HTL from saliva samples.

3.2.2. Derivatization of HTL

To convert HTL to a volatile derivative we used the silylating MSTFA/TMCS reagent [34]. Upon derivatization HTL was converted into trimethylsilyl derivative (Fig. 2), which appeared as a characteristic peak on GC chromatograms.

As shown in Fig. 3A, the derivatization reaction with a standard of authentic HTL is essentially instantaneous, completed within several seconds after mixing of the reagents. The product is stable for 2 h, and then the progressively declines. Derivatization of salivary and urinary HTL proceeded with similar kinetics. Temperature, tested in the range of 40–60 $^{\circ}\text{C}$, did not significantly affect the efficiency of the HTL derivatization reaction (data not shown).

Additional experiments have been conducted to establish optimal amounts of MSTFA/TMCS mixture and pyridine for HTL derivatization. It should be noted that TMCS was purchased as a 1% solution in MSTFA. We found that the best results were obtained when 25 μL (for saliva) and 50 μL (for urine) of MSTFA/TMCS solution was used. We also found that the 1:1 ratio of pyridine to the derivatizing reagent MSTFA/TMCS was optimal (Fig. 3B).

Amount of saliva/urine in sample preparation was also optimized. We found that the volume of saliva or urine significantly affected the signal peak area and baseline noise. Of three different volumes tested (150, 300 and 450 μL), 300 μL of saliva or urine gave the best signal with the lowest baseline noise.

These experiments established the optimal procedure, in which the $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ extracted saliva or urine sample is derivatized with freshly prepared MSTFA/TMCS mixture in pyridine and immediately subjected to the GC chromatographic analysis.

3.3. Chromatographic separation and detection

A representative GC profile for HTL analysis is shown in Fig. 4. The peak of the trimethylsilyl-HTL derivative was well separated from other compounds (Fig. 4). The identity of the 3.95 min peak observed in saliva or urine samples was established by its coelution with the trimethylsilyl-HTL standard. Integration of the peak of analyte was made manually. Integration parameters were set to values with respect to limit of quantification (LOQ) value.

The chemical structure and identity of the putative trimethylsilyl-HTL derivative observed in saliva or urine samples was confirmed by

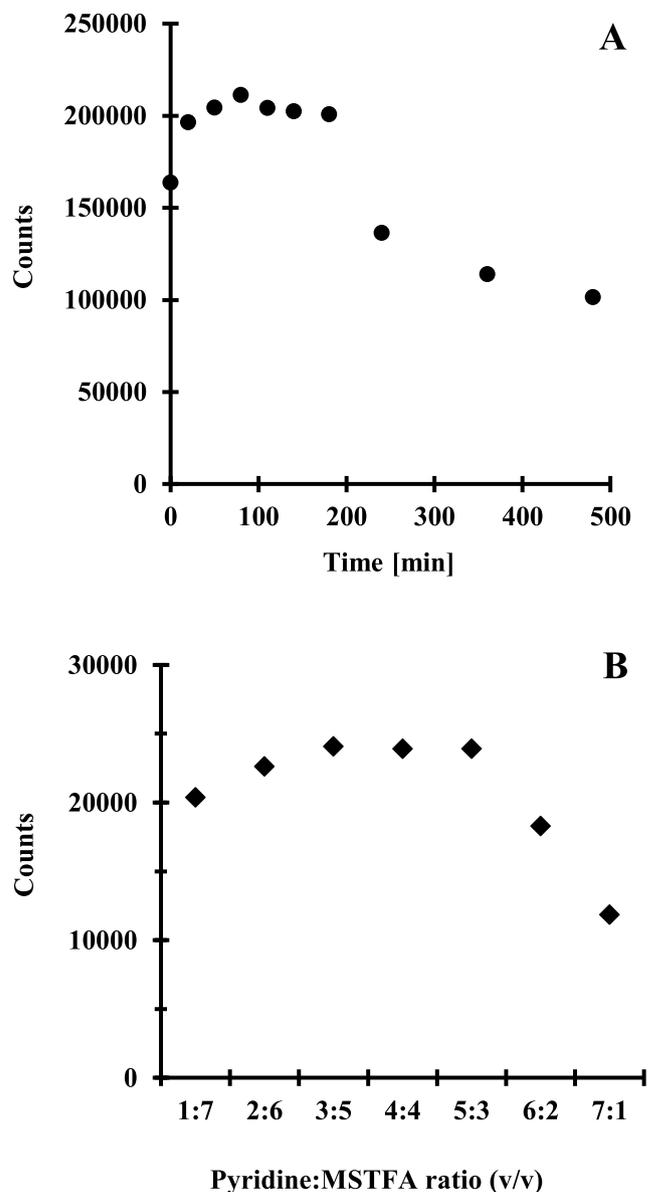


Fig. 3. Derivatization reaction yield as a function of time combined with examination of stability of the trimethylsilyl derivative of homocysteine thiolactone (HTL) in autosampler (A), and optimization of pyridine/*N*-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide (MSTFA) ratio for HTL derivatization (B), expressed as a peak area of the trimethylsilyl-HTL derivative.

mass spectrometry. The trimethylsilyl-HTL derivative has never been studied before and ions resulting from its fragmentation in a mass spectrometer were not known. We analyzed a trimethylsilyl-HTL derivative prepared from an authentic HTL standard ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$),

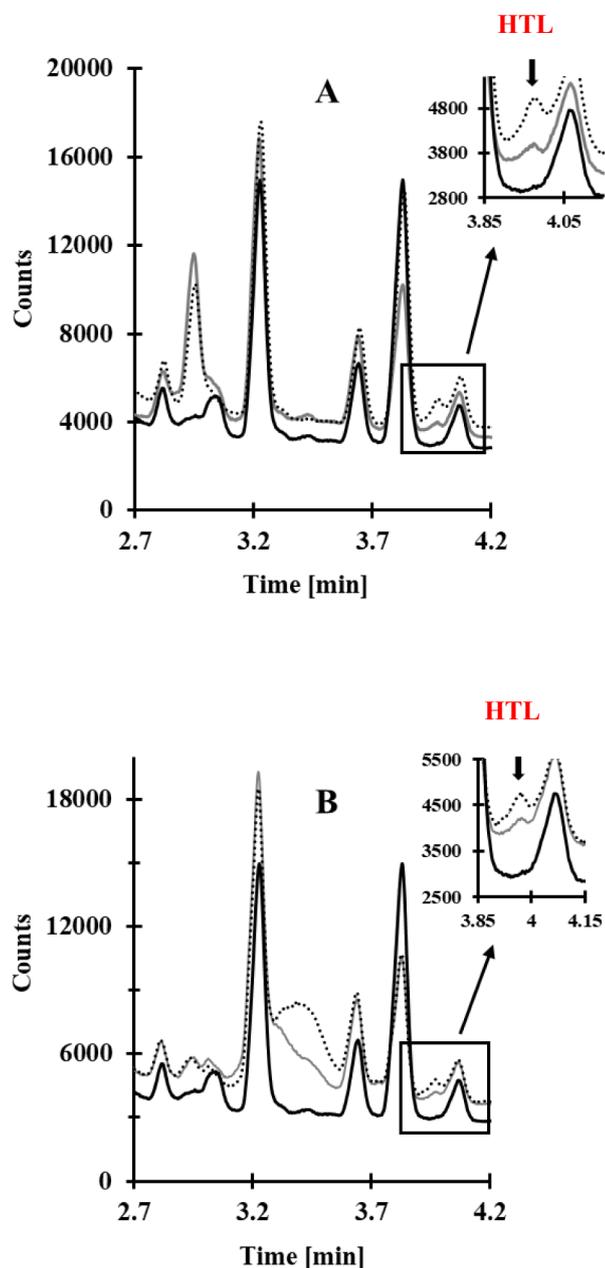


Fig. 4. Representative chromatograms of human saliva (A) and urine (B) (grey lines), the same samples spiked with homocysteine thiolactone (HTL) ($0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) (dotted lines) and blank sample (black lines), processed according to the procedures described in Section 2.6 and Section 2.8. Trimethylsilyl-HTL derivative monitored at m/z 100.1, m/z 115.1, m/z 128.1, and m/z 161.1.

according to the procedure described in Section 2.6., using MS detector operated in a SCAN mode. Four fragmentation ions of m/z 100.1, m/z 115.1, m/z 128.1 and m/z 161.1 were identified as suitable for the analyte monitoring (Fig. 5). These detection conditions were also advantageous from the standpoint of method selectivity. Subsequent analyses were conducted in a SIM mode with MS detector set to the identified m/z values, and m/z 128.1 was selected for quantification.

3.4. Method validation

The validation protocol covered all necessary parameters including selectivity, linearity, imprecision, recovery, and LOQ and has adhered to the guidelines for biological sample analysis [35]. Matrix effect,

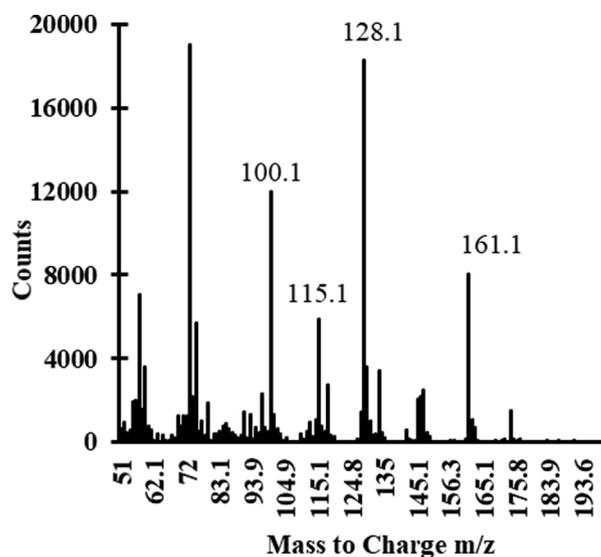


Fig. 5. Electron ionization mass spectra of the trimethylsilyl derivative of homocysteine thiolactone (HTL), obtained by analyzing standard solution of HTL ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) prepared according to procedure described in Section 2.6.

understood as the suppression or enhancement of an analyte signal due to the presence of undesirable components, was also evaluated. The LOQ was taken as the concentration that produces a detector signal that could be clearly distinguished from the baseline (ten times above the baseline noise). The LOQ was estimated as the minimum concentration of the analyte at which the resulting peak can be quantified with a defined level of certainty. In present study, LOQ accepted as the lowest standard on the calibration line was $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ for both saliva and urine. Obtained values were similar to those published earlier concerning determination of HTL in human urine [21,26]. The detailed validation data are inserted in Table 1. Precision expressed in the form of relative standard deviation, as well as accuracy defined as the percentage of analyte recovery calculated by expressing the mean measured amount as percentage of added amount were investigated. Accuracy was calculated with the use of the following formula:

$$\text{Accuracy (\%)} = \frac{[(\text{measured amount} - \text{endogenous content}) / \text{added amount}] \times 100\%}{}$$

Three different concentrations fully covering the scale of the calibration curves were studied: one close the LOQ, one near the middle, and one near the upper range of the curve. All concentrations were tested with the use of calibration curves prepared especially on that occasion. Intra- and inter-day precision, and accuracy data are shown in Table 1 and Table 2, respectively.

A standard approach was applied for the calibration of the method. Linearity understood as the reproducible regression or fit of the calibration curve compared to expected concentration values was evaluated. Calibration curves were prepared by measuring 8 different concentrations of HTL for both saliva and urine, with 3 replicates for each concentration. The calibration range adequately covered the variations in the amounts of analytes in the real samples. The peak areas of the trimethylsilyl-HTL derivative were plotted versus analyte concentration. Conducted experiments have confirmed that the peaks area increased linearly with the concentration, thus the method can be recognized as a linear. Calibration data obtained within one working day are shown in Table 1.

Validation has also included evaluation of the selectivity. When blanks and standard HTL ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) were analyzed, the elution profiles showed no interfering signals at the retention time of the trimethylsilyl-HTL derivative. Blank human urine and saliva samples from

Table 1
Calibration and validation data, n = 3.

Matrix	Linear range [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Regression equation (R)	Precision [%]		Accuracy [%]		LOQ [$\mu\text{mol L}^{-1}$]
			Min	Max	Min	Max	
Saliva	0.05–1.00	$y = 739.0x + 40.9$ (R 0.996)	7.06	13.54	98.7	112.6	0.05
Urine	0.05–1.00	$y = 761.2x + 46.4$ (R 0.998)	2.23	14.47	91.9	110.9	0.05

Table 2
Precision and accuracy of the method.

Matrix	Concentration [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	Precision [%]		Accuracy [%]	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Saliva	0.05	10.38	15.01	103.8	90.2
	0.50	11.82	13.65	104.9	99.2
	1.00	8.97	12.48	103.0	100.5
Urine	0.05	2.26	7.40	110.9	91.2
	0.50	11.68	11.65	107.0	103.3
	1.00	5.11	14.27	103.3	99.8

six individuals and the same samples spiked with HTL, assayed according to described herein procedures in Section 2.6. and Section 2.8, showed no interfering peaks from endogenous urine and saliva components (Fig. 5). Furthermore, the trimethylsilyl-HTL peak was evaluated for purity using MS detector operated in SCAN mode. It was set to acquire spectra over the entire chromatogram and the spectra obtained during the elution of the peak were compared. Importantly, we found that identical MS spectra were obtained at different sections of the 3.95 min peak, which indicates that the peak is homogenous and cannot be attributed to more than one compound.

3.5. Analysis of human samples

After validation, the GC–MS assay was applied to the analysis of saliva and urine samples from 18 apparently healthy volunteers (7 male and 11 female, 24–65 years old). An average age of male was 37.0 while average age of female was 30.0. Quantification of HTL in real samples was based on multiple standard addition method. Salivary and urinary HTL varied from 0.07 to 0.19 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and from 0.08 to 0.27 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Average salivary HTL was $0.10 \pm 0.02 \mu\text{mol L}^{-1}$ in men and $0.11 \pm 0.03 \mu\text{mol L}^{-1}$ for women, similar to urinary HTL $0.17 \pm 0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ in men and $0.19 \pm 0.04 \mu\text{mol L}^{-1}$ for women. Urinary HTL levels normalized to Crn varied from 1.04 to 9.57 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (average 4.44 ± 2.81 (men), 3.28 ± 2.34 (women) $\mu\text{mol mol}^{-1}$ Crn) and were similar to those previously reported values using different HTL assays [21,22,24,26]. These findings indicate reliability of our new GC–MS assay.

The values for salivary HTL are the first ever reported. Least squares regression model was used to describe the salivary and urinary HTL concentration response relationship. The curve's correlation coefficient was monitored. Notably, we found that there was a moderate positive correlation between salivary and urinary HTL (Fig. 6A). However, the correlation disappeared when two outliers, the lowest (left) and highest (right) pair, were removed. The same phenomenon has been observed after normalization of urinary HTL to Crn (Fig. 6B). Though very preliminary, obtained results give hope that saliva might be a valuable alternative to urine regarding HTL determination. Nevertheless, in the light of the results obtained it should be clearly stated that this supposition should be carefully re-investigated as a relatively small group of people has participated in the experiment. Moreover, to guaranty the comparability between different study centers a clear and joint protocol for sampling and saliva processing needs to be fixed [36]. This supposition remains to be thoroughly studied in the near future.

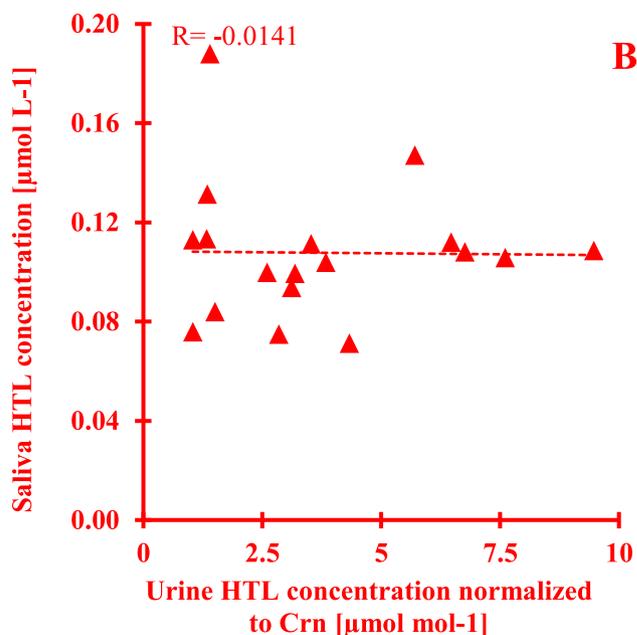
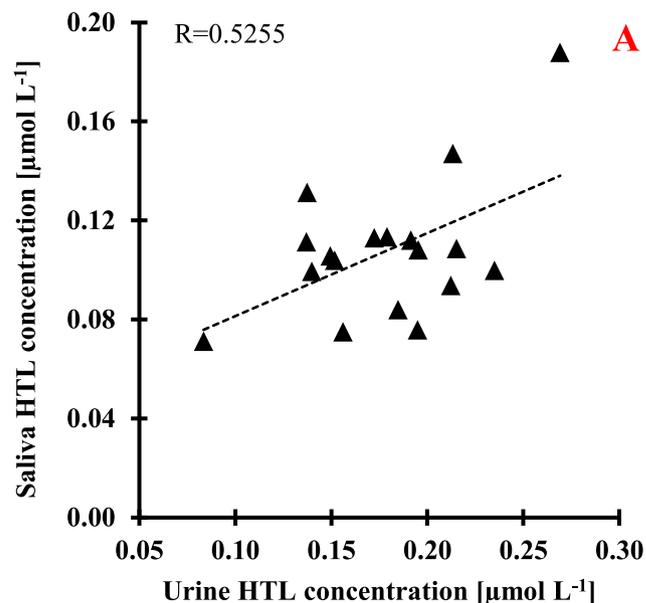


Fig. 6. The plot of individual values of urinary homocysteine thiolactone (HTL) (A) and urinary HTL levels normalized to creatinine (Crn) (B) versus corresponding salivary contents for human subjects (n = 18). Samples proceeded according to procedures described in Section 2.6. and Section 2.8.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first report documenting the presence of HTL in human saliva. We developed a sensitive and

reliable GC–MS assay and applied it for identification and quantification of human salivary and urinary HTL. The new assay quantifies HTL in the form of a volatile trimethylsilyl-HTL derivative. The attractiveness of the GC–MS assay relies on simplicity of sample preparation and low reagents consumption. An important benefit that also evidently arises is the elaboration of the procedure that exploits the same sample preparation procedure and chromatographic conditions to different matrices. The method showed very good linearity at both low and high concentrations. The GC–MS assay provides a new useful tool that will facilitate studies of the role of HTL in health and disease. Present studies conducted with the use of 18 samples have revealed that there is no correlation between urinary and salivary HTL. However, analysis of a much larger number of samples in the future will enable more comprehensive conclusions in this regard.

Author contributions

J.P. was responsible for research concept, experiments designing, performing experiments, data interpretation, literature analysis, correction of the manuscript. **M.W.** performed the analysis, prepared figures and tables. **G.Ch.** gave an input to sample preparation procedure.

H.J. was responsible for critical revision of the manuscript. **R.G.** wrote the manuscript, coordinated the study, participated in research concept. All authors have read and given their final approval of the version of the manuscript to be published.

Acknowledgments

All experiments were conducted at the Faculty of Chemistry of the University of Lodz and were supported by grants from the National Science Centre, Poland (2018/02/X/ST4/00779, 2017/27/B/ST4/01476), and the University of Lodz (B1811100001857.02). An additional financial support, mainly in the field of equipment maintenance was from National Science Centre, Poland (2016/23/B/NZ5/00573, 2018/29/B/NZ4/00771, 2019/33/B/NZ4/01760) and the American Heart Association (17GRNT32910002).

Declaration of Competing 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.

References

- [1] J.W. Miller, S.A.A. Beresford, M.L. Neuhouser, T.-Y.D. Cheng, X. Song, E.C. Brown, Y. Zheng, B. Rodriguez, R. Green, C.M. Ulrich, Homocysteine, cysteine and risk of incident colorectal cancer in the Women's Health Initiative observational cohort, *Am. J. Clin. Nutr.* 97 (2013) 827–834.
- [2] F.-F. Chiang, S.-C. Huang, H.-M. Wang, F.-P. Chen, Y.-C. Huang, High serum folate might have a potential dual effect on risk of colorectal cancer, *Clin. Nutr.* 34 (2015) 986–990.
- [3] A. Zinellu, S. Sotgia, G. Loriga, L. Deiana, A.E. Satta, C. Carru, Oxidative stress improvement is associated with increased levels of taurine in CKD patients undergoing lipid-lowering therapy, *Amino Acids* 43 (2012) 1499–1507.
- [4] M. Kędzierska, R. Głowacki, U. Czernek, K. Szydłowska-Pazera, P. Potemski, J. Piekarski, A. Jeziorski, B. Olas, Changes in plasma thiol levels induced by different phases of treatment in breast cancer; the role of commercial extract from black chokeberry, *Mol. Cell. Biochem.* 372 (2013) 47–55.
- [5] W. de Ruijter, R.G.J. Westendorp, W.J.J. Assendelft, W.P.J. den Elzen, A.J.M. de Craen, S. le Cessie, J. Gussekloo, Use of Framingham risk score and new biomarkers to predict cardiovascular mortality in older people: population based observational cohort study, *BMJ* 338 (2009) a3083.
- [6] C.-F. Sun, T.R. Haven, T.-L. Wu, K.-C. Tsao, J.T. Wu, Serum total homocysteine increases with the rapid proliferation rate of tumor cells and decline upon cell death: a potential new tumor marker, *Clin. Chim. Acta* 321 (2002) 55–62.
- [7] L.L. Wu, J.T. Wu, Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker, *Clin. Chim. Acta* 322 (2002) 21–28.
- [8] A. Undas, H. Jakubowski, Letter by Undas and Jakubowski regarding article, Relationship between homocysteine and mortality in chronic kidney disease, *Circulation* 114 (2006) e547–e547.
- [9] H. Jakubowski, *Homocysteine in Protein Structure/Function and Human Disease*, Springer Vienna, Vienna, 2013.
- [10] J. Perla-Kaján, H. Jakubowski, Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 3140–3181.
- [11] K. Borowczyk, J. Piechocka, R. Głowacki, I. Dhar, Ø. Midtun, G.S. Tell, P.M. Ueland, O. Nygård, H. Jakubowski, Urinary excretion of homocysteine thiolactone and the risk of acute myocardial infarction in coronary artery disease patients: the WENBIT trial, *J. Intern. Med.* 285 (2019) 232–244.
- [12] J. Piechocka, M. Wrońska, R. Głowacki, Chromatographic strategies for the determination of aminothiols in human saliva, *Trends Anal. Chem.* 126 (2020) 115866.
- [13] S. Djordjević, V. Kilbarda, S. Vucinić, T. Stojanović, B. Antonijević, Toxicokinetics and correlation of carbamazepine salivary and serum concentrations in acute poisonings, *Vojnosanit. Pregl.* 69 (2012) 389–393.
- [14] A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Screening and determination of drugs in human saliva utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 1188–1191.
- [15] T. Pfaffe, J. Cooper-White, P. Beyerlein, K. Kostner, C. Punyadeera, Diagnostic potential of saliva: current state and future applications, *Clin. Chem.* 57 (2011) 675–687.
- [16] J.A. Loo, W. Yan, P. Ramachandran, D.T. Wong, Comparative human salivary and plasma proteomes, *J. Dent. Res.* 89 (2010) 1016–1023.
- [17] J.N. Smith, J. Wang, Y. Lin, E.M. Klohe, C. Timchalk, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in rat saliva after chlorpyrifos administration, *Toxicol. Sci.* 130 (2012) 245–256.
- [18] J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, W. Zhang, Z. Zhang, G.A. Lajoie, B. Ma, PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification, *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) M111–010587.
- [19] J. Stachniuk, P. Kubalczyk, P. Furmaniak, R. Głowacki, A versatile method for analysis of saliva, plasma and urine for total thiols using HPLC with UV detection, *Talanta* 155 (2016) 70–77.
- [20] V. Vindenes, H.M.E. Lund, W. Andresen, H. Gjerde, S.E. Ikdahl, A.S. Christophersen, E.L. Øiestad, Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers, *Forensic Sci. Int.* 219 (2012) 165–171.
- [21] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, An on-column derivatization method for the determination of homocysteine-thiolactone and protein N-linked homocysteine, *Amino Acids* 41 (2011) 187–194.
- [22] P. Furmaniak, P. Kubalczyk, R. Głowacki, 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 (2014) 36–41.
- [23] G. Chwatko, H. Jakubowski, The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma, *Anal. Biochem.* 337 (2005) 271–277.
- [24] G. Chwatko, H. Jakubowski, Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans, *Clin. Chem.* 51 (2005) 408–415.
- [25] B. Arora, A. Narayanasamy, J. Nirmal, N. Halder, S. Patnaik, A.K. Ravi, T. Velpandian, Development and validation of a LC–MS/MS method for homocysteine thiolactone in plasma and evaluation of its stability in plasma samples, *J. Chromatogr. B* 944 (2014) 49–54.
- [26] M. Wrońska, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, R. Głowacki, Application of GC–MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine, *J. Chromatogr. A* 1099 (2018) 18–24.
- [27] K. Borowczyk, J. Tisończyk, H. Jakubowski, Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase, *Amino Acids* 43 (2012) 1339–1348.
- [28] K. Borowczyk, D. Shih, H. Jakubowski, Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase 1, *J. Alzheimer's Dis.* 30 (2012) 225–231.
- [29] R. Głowacki, K. Borowczyk, E. Bald, Determination of Nε-homocysteinyl-lysine and γ-glutamylcysteine in plasma by liquid chromatography with UV-detection, *J. Anal. Chem.* 69 (2014) 583–589.
- [30] K. Kuśmierk, R. Głowacki, E. Bald, Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 855–860.
- [31] E. Bald, G. Chwatko, R. Głowacki, K. Kuśmierk, Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 109–115.
- [32] H. Jakubowski, The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples, *Anal. Biochem.* 308 (2002) 112–119.
- [33] H. Jakubowski, Quantification of urinary S-and N-homocysteinylated protein and homocysteine-thiolactone in mice, *Anal. Biochem.* 58 (2016) 118–123.
- [34] Derivatization reagents for selective response and detection in complex matrices, Sigma-Aldrich.
- [35] S.M.R. Wille, F.T. Peters, V. Di Fazio, N. Samyn, Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods, *Accred. Qual. Assur.* 16 (2011) 279–292.
- [36] B. Michalke, B. Rossbach, T. Göen, A. Schäferhenrich, G. Scherer, Saliva as a matrix for human biomonitoring in occupational and environmental medicine, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 88 (2015) 1–44.

Publikacja D3:

J. Piechocka, **M. Wieczorek**, R. Głowacki, *Gas Chromatography–Mass Spectrometry Based Approach for the Determination of Methionine-Related Sulfur-Containing Compounds in Human Saliva*, **International Journal of Molecular Sciences**, 21 (2020) 9252.

Bazując na wynikach opisanych powyżej (praca D2) postanowiłam opracować kolejną procedurę, która umożliwi oznaczanie HTL w próbkach śliny, przy zachowaniu możliwości oznaczania innych ważnych biologicznie związków siarki, powiązanych w szlaku metabolicznym metioniny (Met). Było to istotne także w kontekście wykazania, że GC może stanowić alternatywne narzędzie dla HPLC w przypadku analizy próbek biologicznych na zawartość nielotnych związków siarki. Studia literaturowe potwierdziły, że zaproponowana przeze mnie metoda będzie pierwszą, która pozwala na oznaczanie Met, HTL oraz całkowitych form Hcy i Cys w ślinie człowieka. W opracowanej przeze mnie metodzie przygotowanie próbki obejmuje jednoczesną redukcję wiązań disiarczkowych za pomocą tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP) oraz wytrącenie białek za pomocą rozpuszczalnika organicznego – acetonitrylu (MeCN). Następnym krokiem w opracowanej procedurze jest wstępne zateżenie analitu przy pomocy koncentratora próżniowego oraz modyfikacja chemiczna mieszaniną zawierającą bezwodną pirydynę, MSTFA i TMCS. W odróżnieniu od poprzedniej procedury (praca D2) nie zastosowałam ekstrakcji. Poszczególne etapy przygotowania próbki do analizy okazały się niezbędne i zarazem wystarczające aby w jednym toku analitycznym oznaczyć HTL oraz pozostałe, wspomniane powyżej związki. Na etapie optymalizowania poszczególnych etapów procedury analitycznej wykorzystywałam różne narzędzia analityczne, w tym metodę HPLC opartą o derywatyzację chemiczną tioli za pomocą tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylolepidyniowego (CMLT) [40]. Były to eksperymenty dotyczące optymalizacji warunków redukcji wiązań disiarczkowych. Sprawdziłam szereg czynników wpływających na efektywność redukcji, takich jak rodzaj reduktora, jego stężenie, czas oraz temperatura. W celu maksymalnego skrócenia i uproszczenia procedury analitycznej etap redukcji był prowadzony jednocześnie z etapem odbiałczenia próbki śliny poprzez dodatek MeCN. Przeprowadzone w tym zakresie badania wykazały, że próbka śliny jest pozbawiona białek przy dodatku co najmniej 4-krotnego nadmiaru objętościowego rozpuszczalnika organicznego. Potwierdziłam to doświadczalnie wykorzystując pomiar absorpcji przy długości fali $\lambda = 280$ nm dla roztworów albuminy, odzwierciedlających stężenia białek

charakterystyczne dla śliny człowieka. Następnym krokiem, przeprowadzonym bezpośrednio przed modyfikacją chemiczną analitów było odparowanie uzyskanego supernatantu do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Celem takiego postępowania było zatężanie próbki jak również usunięcie wody, które zaburza/uniemożliwia reakcję silylacji w stosowanych warunkach. Mając na uwadze fakt, że mieszanina reakcyjna jest podatna na hydrolizę, zbadalam możliwy zakres temperaturowy pracy koncentratora próbek oraz czas potrzebny do usunięcia rozpuszczalnika z próbki. W tym doświadczeniu weryfikacji poddałam również skuteczność redukcji wiązań disiarczkowych za pomocą TCEP oraz stabilność analitu w zadanych warunkach.

Przeprowadzona w kolejnym etapie walidacja, obejmująca zakres liniowości, precyzję, dokładność i wyznaczone eksperymentalnie wartości LOD i LOQ (0,05 nmol/ml dla HTL), wykazała potencjalną przydatność opracowanej metody w badaniach tzw. próbek rzeczywistych. Procedura została następnie zastosowana w analizie próbek śliny na zawartość HTL oraz towarzyszących mu niskocząsteczkowych związków siarki. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów ustaliłam, że średnie stężenie Met w badanych próbkach wynosi $23,89 \pm 16,22 \mu\text{mol/l}$, $7,67 \pm 4,32 \mu\text{mol/l}$ dla Cys oraz $0,99 \pm 0,54 \mu\text{mol/l}$ dla Hcy. W badanym materiale nie stwierdzono obecności HTL najprawdopodobniej ze względu na jego ograniczoną trwałość w ślinie w warunkach *ex vivo*.



Article

Gas Chromatography–Mass Spectrometry Based Approach for the Determination of Methionine-Related Sulfur-Containing Compounds in Human Saliva

Justyna Piechocka *, Monika Wieczorek and Rafał Głowacki *

Department of Environmental Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, 163 Pomorska Str., 90-236 Łódź, Poland; m.wronska17@onet.eu

* Correspondence: justyna.piechocka@chemia.uni.lodz.pl (J.P.); rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl (R.G.); Tel.: +48-42-635-58-46 (J.P.); +48-42-635-58-35 (R.G.)

Received: 4 November 2020; Accepted: 2 December 2020; Published: 4 December 2020



Abstract: Gas chromatography–mass spectrometry technique (GC-MS) is mainly recognized as a tool of first choice when volatile compounds are determined. Here, we provide the credible evidence that its application in analysis can be extended to non-volatile sulfur-containing compounds, to which methionine (Met), homocysteine (Hcy), homocysteine thiolactone (HTL), and cysteine (Cys) belong. To prove this point, the first method, based on GC-MS, for the identification and quantification of Met-related compounds in human saliva, has been elaborated. The assay involves simultaneous disulfides reduction with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and acetonitrile (MeCN) deproteinization, followed by preconcentration by drying under vacuum and treatment of the residue with a derivatizing mixture containing anhydrous pyridine, *N*-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide (MSTFA), and trimethylchlorosilane (TMCS). The validity of the method was demonstrated based upon US FDA recommendations. The assay linearity was observed over the range of 0.5–20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Met, Hcy, Cys, and 1–20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for HTL in saliva. The limit of quantification (LOQ) equals 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Met, Hcy, Cys, while its value for HTL was 0.05 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The method was successfully applied to saliva samples donated by apparently healthy volunteers ($n = 10$).

Keywords: amino acid; aminothiols; cysteine; gas chromatography–mass spectrometry; homocysteine; homocysteine thiolactone; human saliva; methionine; *N*-trimethylsilyl-*N*-methyl trifluoroacetamide; sulfur amino acid

1. Introduction

Methionine (Met)-related compounds, such as homocysteine (Hcy), Hcy-thiolactone (HTL), and cysteine (Cys), have received continuing attention due to their physiological importance and considerable implications in so-called civilization diseases. Frequently, disturbed Met-related sulfur-containing compounds metabolism is associated with cardiovascular, cancer, and neurodegenerative diseases, among others [1–5]. Despite all extensive research is being done into the connection between the several human diseases and the above-mentioned sulfur compounds' metabolism disorders, too little is still known about their physiological and pathological role in living systems. Therefore, it seems to be essential to provide more robust and versatile platforms for a comprehensive assessment of Met and metabolically related compounds metabolome in order to increase knowledge about their role in the human body, in the near future. In addition, it would be desirable to provide new analytical tools facilitating large-scale screening, from the standpoint of an effective fight against high morbidity and mortality from these diseases.

Over the last decades, the gas chromatography–mass spectrometry technique (GC-MS) has been proved to be one of the most powerful analytical tools for biofluids analysis. Most probably, due to high-throughput potential, sensitivity, specificity, and great resolution, along with high degrees of reproducibility and accuracy, the GC-MS receives continuing interest. So far, numerous methods based on GC-MS for HTL, Met, Hcy, and Cys determination have been developed. In relation to gold standards in the field of clinical, toxicological, and forensic science, which include blood (plasma, serum) and urine tests, a few GC-MS assays have been designated for simultaneous assessment of urinary and/or blood plasma Met, Hcy, and Cys [6–15]. Interestingly, none of them allows the sensitive determination of the above-mentioned aminothiols and Met in human saliva. To the best of our knowledge, only one GC-MS assay, applied for identification and quantification of human salivary and urinary HTL, has been developed so far [16]. Since saliva is currently supposed as an alternative to blood and urine in the diagnosis of some diseases [17–23], we have decided to take on the challenge of demonstrating the usefulness of GC-MS in saliva analysis for Met-related sulfur-containing compounds. Furthermore, taking into account recent directions in bioanalysis, the present topic appears as very important. It seems to be essential to put efforts into developing new, simple, and low-price analytical tools facilitating large-scale screening of civilization diseases. Moreover, searching for new sources of biomarkers, which can be obtained in a non-invasive and non-intrusive way in order to encourage the general public to get through regular checkups, becomes crucial. Most probably non-invasive and non-intrusive nature of the saliva sampling process as well as the fact that various drugs and metabolites can be detected in saliva with high correlation to plasma/urine levels have contributed to its growing popularity [17–23]. According to several authors, the diagnosis of many pathological conditions in the human body could thus benefit from the analysis of saliva specimens. Therefore, our efforts were predominantly attributed to the development of a highly effective analytical tool based on GC-MS for simultaneous determination of salivary Met, HTL, and total Cys and Hcy content as well as the application of the assay to real samples in order to confirm or exclude the performance of the method. In particular, the article discusses essential steps, with some justification, which were taken to achieve the intended goal. Moreover, the advantages, pitfalls, and limitations of the GC-MS assay are mentioned.

2. Results and Discussion

It is commonly known that biological fluids, to which saliva belongs, consist of a large number of components representing widely varied structures and physicochemical properties. Despite technological advances in analytical and bioanalytical techniques, the complexity of biofluids attributes to tremendous challenges to analysts since a successful analysis of a crude sample still cannot be achieved without appropriate sample pretreatment. In the case of assays based on separation techniques, proper sample handling and management combined with separation and detection conditions play a key role in the quality of obtained results. Therefore, a few experiments were performed in order to provide the GC-MS assay reliability. Considerable attention has been put on optimizing sample preparation and chromatographic conditions during new method development. In general, commonly known approaches, of which the usefulness and validity have already been established, were utilized to achieve the intended purpose. In addition, an important aspect of research work was to stick to principles of green chemistry and to keep in mind that “Everything should be made as simple as possible, but no simpler”.

2.1. Sample Preparation

In the presented study, the GC-MS method has been designed to determine salivary Met, HTL, and total thiols content, including Hcy and Cys. Sample preparation involves simultaneous disulfides reduction with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and saliva deproteinization by addition of acetonitrile (MeCN). The next step is preconcentration by drying under vacuum and chemical modification by treatment of the residue with a mixture containing anhydrous pyridine,

N-trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide (MSTFA), and trimethylchlorosilane (TMCS). The choice of essential sample preparation steps was made upon knowing the chemical properties of the analyte(s) as well as the requirements and capabilities of the implemented analytical technique. In general, these steps are typical of such kind of methods. Different analytical tools have been employed to determine optimal conditions for sample preparation. In the presented study, such an approach has been notably helpful in producing significant results in a rapid and efficient way, minimizing chemicals and plastic consumption, reducing labor efforts, etc. The method is based on high-performance liquid chromatography (HPLC) with pre-column derivatization with 2-chloro-1-methyllepidinium tetrafluoroborate (CMLT) and spectrophotometric detection (UV) was used during the experiments concerning optimization of disulfide bonds reduction [24]. Experiments concerning optimization of analyte preconcentration were conducted with the use of both CMLT-based methodology and the method involving liquid-liquid extraction, lyophilization, and derivatization with MSTFA followed by GC separation [16]. Our earlier studies have indicated that these assays provide a useful tool for quantification of Hcy, Cys, and HTL in human saliva, respectively. At the stage of searching the most suitable deproteinization conditions, an approach utilizing UV spectroscopy was employed [25]. It is widely known that proteins naturally adsorb light at 280 nm, allowing direct measurements of their concentration in a quick and highly reproducible way. Indeed, spectrophotometry enables their convenient monitoring, provided that relatively high concentrations are studied. In the present study, a standard solution of human serum albumin (HSA) at 5 g L^{-1} concentration, instead of saliva, was used. Importantly, such a neat solution was provided since the chemical composition of the proteins and their structures, as well as a number of other saliva components that also absorb light at a specified wavelength, could artificially increase the result calculated from the absorption readings. The HSA solution was treated with appropriate protein precipitating agents. Subsequently, the precipitates were removed by centrifugation and the purity of obtained solution was analyzed assuming that any protein contamination gives rise to an increase in absorption at 280 nm. In fact, both the clarity of obtained solutions and the measurements of the absorption of the water-MeCN supernatants at 280 nm indicated the effectiveness of the protein precipitation. Then, experiments were performed using the described herein procedures based on GC-MS measurements (see Sections 3.5 and 3.6).

2.1.1. Disulfides Reduction

Low molecular mass thiols, to which Cys and Hcy belong, occur in multiple forms in living creatures thank to extreme ability of sulfhydryl group (-SH) to oxidation. According to literature data [26–28], the sample should be treated with a reducing agent, which cleaves disulfide bonds and releases all thiols in reduced form in order to assess the concentration of all redox forms in the assay including their total content. Moreover, this step should be carried out before or simultaneously with sample deproteinization to effectively reduce all oxidized thiols and decouple them from proteins in order to avoid loss in the concentration of analytes. In particular, the latter procedure is recommended since non-covalently bonded individuals can be easily released from denatured proteins as well as the risk of analytes binding by large molecules is reduced under denaturing conditions. Taking into account the above-mentioned considerations, in the presented study, saliva samples were simultaneously subjected to disulfide bond reduction and protein removal. Importantly, such an approach was also advantageous from the standpoint of method simplification as it made it possible to reduce essential sample preparation steps.

In the beginning, the type of reductant was selected. Several reducing agents, including dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol (2-ME), TCEP, and tris(hydroxymethyl)phosphine (THP), were tested. Among them, thiol moiety-containing reagents, to which DTT and 2-ME belong, were excluded as their application resulted in complex chromatograms hindering analytes separation and plausible identification. In relation to phosphines, TCEP was found to be superior with regard to disulfides reduction efficiency since signal intensities of 2-S-lepidinium derivatives of Hcy and Cys were about

five times greater than those registered when THP was used. As a result, TCEP was chosen, as also recommended in the literature [28].

According to the literature data [29], TCEP is generally well soluble in an aqueous medium at nearly any pH, while its water solutions exhibit the greatest stability. When TCEP is dissolved directly in water, the resulting pH is in the range of 2.0–3.0. Therefore, in the presented study, a stock solution of TCEP was prepared in deionized water. The excellent stability of reducing agent at room and elevated temperature has also been shown to be analytically advantageous (see Section 2.1).

Further experiments were conducted in order to optimize reduction conditions. The main factor affecting the disulfides reduction yield, namely the quantity of reducing agent regarding thiol, has been optimized initially. Different TCEP solutions at six concentration levels, varied from 0.25 to 1.50 mol L⁻¹, were prepared providing the concentration of TCEP in saliva samples in the range of 9.6–57.7 mmol L⁻¹. As shown in Figure 1a, the progressive increase of the peak height was observed in parallel with the concentration of TCEP in saliva samples rise from 9.6 to 38.5 mmol L⁻¹, then there were no significant changes. Finally, a 1 mol L⁻¹ solution of reducing agent was chosen since it has been recognized that a larger excess of TCEP was the source of additional baseline noises. Under these conditions, the reactions were completed in 5 min at room temperature, almost immediately after mixing of the reagents (Figure 1b).

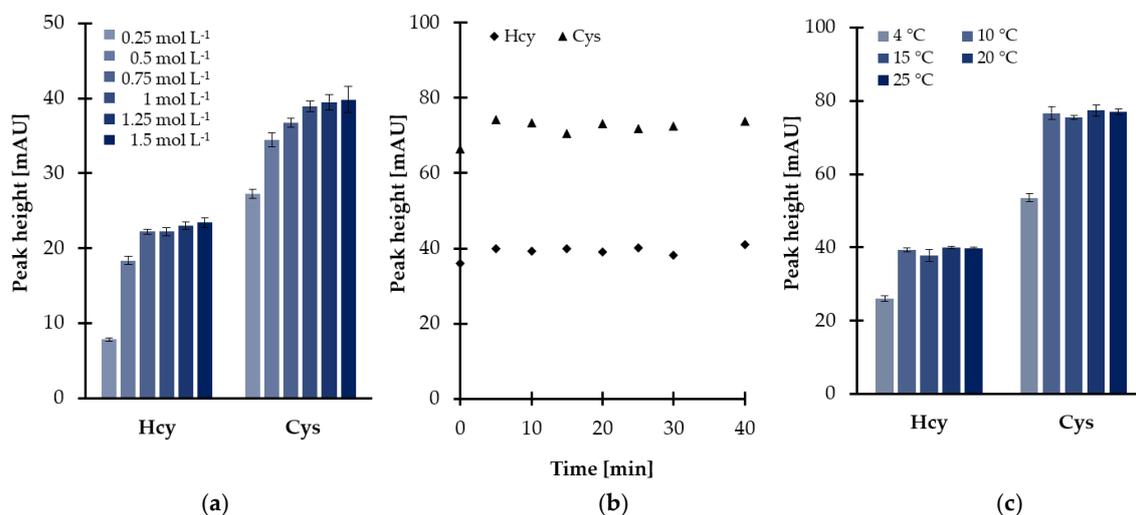


Figure 1. Disulfides reduction yield as a function of (a) reagent excess, (b) time, and (c) temperature, expressed as a peak height of 2-S-lepidinium derivatives of Cys and Hcy. Samples were analyzed according to the procedure based on HPLC-UV measurements [24]. Error bars refer to standard deviation (SD) of the data ($n = 3$).

Nevertheless, additional experimental work was undertaken to further optimize the temperature of the reduction reactions as the disulfides reduction step was carried out simultaneously with sample deproteinization. As reported elsewhere [28], protein removal including the addition of polar organic solvents (see Section 2.1.2) followed by centrifugation under reduced temperature helps to obtain a supernatant. In the presented study, it was found that temperature, tested in the range of 10–25 °C, did not markedly affect the effectiveness of the reduction process. As shown in Figure 1c, signal intensities of 2-S-lepidinium derivatives of Hcy and Cys were generally stable throughout the investigated range. Therefore, the centrifuge was kept at the temperature of 10 °C, providing the completion of the process within 5 min and saliva supernatant.

In summary, for routine analysis, 50 μ L of saliva was treated with 10 μ L 1 mol L⁻¹ TCEP in deionized water, representing the final concentration in saliva samples of 38.5 mmol L⁻¹. As described above, processing samples for 5 min at 10 °C was sufficient to effectively reduce oxidized thiols with a high level of precision.

2.1.2. Proteins Removal

Human saliva primarily consists of about 99.5% water [17–22,28], while the remaining part is made up of sample components that may attenuate the performance of the method. Among them, the presence of proteins in the saliva sample could cause practical problems since the GC-MS system is incapable of accommodating such kinds of biomolecules. Despite saliva is usually considered a low protein abundance matrix, sample deproteinization is indeed needed in order to protect the analytical system against destruction. According to literature data [28], the most commonly used techniques for effective elimination of proteins from saliva involve the addition of inorganic acid or water-miscible organic solvent and ultrafiltration over a cut-off membrane. Based on our previous findings [16,30], some of these methods have not been considered during new method development. In particular, sample acidification was not taken into account since the presence of popular proteins precipitating agents, e.g., perchloric acid (PCA) and trichloroacetic acid, adversely affected the reactivity of the target derivatization agent toward analytes. In addition, the approach utilizing centrifugal concentrators was excluded to minimize plastic consumption and reduce the quantity of the samples.

In the presented study, proteins were efficiently removed from the matrix by applying polar organic solvent to saliva samples, followed by centrifugation under reduced temperature. Moreover, the deproteinization step was conducted concomitant with disulfide bonds reduction contributing to shortening sample preparation time. This approach was also advantageous from the standpoint of increasing recovery of the analytes as non-covalently bonded Met-related sulfur-containing compounds were easier released from denatured proteins, as reported elsewhere [28]. MeCN, typically recognized as the most effective protein precipitating agent among polar organic solvents, was selected. Then, experiments were performed to establish the optimal amount of MeCN. Five different volumes, namely 50, 100, 150, 200, and 250 μL , were tested that amounted to 1–5 times the volume of saliva specimen. As shown in Figure 2, efficient protein removal was achieved by mixing the standard solution of HSA with MeCN, while the minimal crashing ratio of 4:1 was necessary to provide protein-free supernatant. Since 5 g L^{-1} HSA water solution instead of saliva specimen was examined, significantly exceeding the expected amount of salivary proteins [18,28], it was assumed that the 1:4 ratio of saliva to MeCN is optimal. It was also found that the duration of the process, tested in the range of 0–30 min, as well as shaking, did not markedly affect operational efficiency. Since the obtained results were beneficial from the standpoint of workflow simplification, no additional work was undertaken to further optimize the deproteinization step.

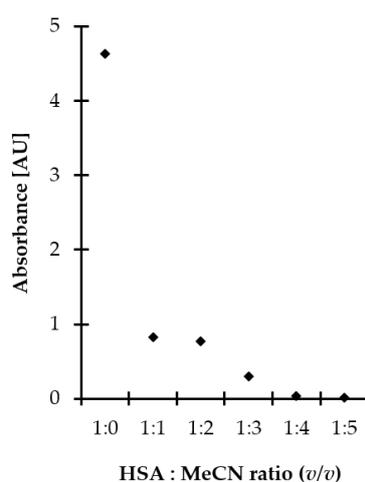


Figure 2. Influence of MeCN amount on deproteinization efficiency, expressed as signal intensity of HSA. Samples were analyzed using the spectrophotometric method based on measurements of the absorption of water–MeCN supernatants of samples at 280 nm.

Finally, for routine analysis, 50 μL of saliva was mixed with 200 μL of MeCN, vigorously shaken, and then placed in the centrifuge at $12,000\times g$ for 5 min at 10 $^{\circ}\text{C}$. Under these conditions, a protein-free supernatant was obtained. Notably, analyte dilution was not a limitation as samples were dried under a high vacuum in the subsequent processing step (see Section 2.1.3).

2.1.3. Analytes Preconcentration

In order to counteract sample dilution, caused by adding an excess of the precipitating agent, samples were evaporated to dryness before the subsequent chemical modification step. More importantly, thorough drying of the sample was essential since both derivatization agent and trimethylsilyl derivatives (TMS) are sensitive to hydrolysis [31,32]. In the presented study, saliva supernatants obtained after simultaneous disulfides reduction and saliva deproteinization were evaporated under vacuum at elevated temperature. In order to establish optimal conditions, additional experiments were performed by setting the temperature to various values. As water-MeCN supernatants were dried, temperatures close to the boiling point of MeCN and water were tested specifically. The progressive reduction of time from 45 to 25 min, needed for solvents removal from the samples, was concomitant with temperature rise from 80 to 100 $^{\circ}\text{C}$. From a purely practical point of view, the explosion and subsequent loss of the sample was not observed under any above-defined conditions. Therefore, the centrifugal vacuum concentrator was kept at the highest possible temperature of 100 $^{\circ}\text{C}$.

Since sample decomposition and TCEP could occur, further studies were conducted in order to examine both efficiency of disulfides reduction as well as the stability of analytes under set conditions. Since the reference samples were needed, the same experiments were simultaneously performed at room temperature and at elevated temperature (100 $^{\circ}\text{C}$). As a result, we were also able to conclude on the stability of the reducing agent (1 mol L⁻¹ TCEP). It has been shown that TCEP is not sensitive to temperature (Figure 3), while reduced thiols and HTL remain stable under experimental conditions. We have also found that no more than 6.4% of the reduced aminothiols and other analytes were lost if compared with reference values. The most probable reason for a great stability of reduced thiols at a temperature of 100 $^{\circ}\text{C}$ was attributed to the use of a large excess of 1 mol L⁻¹ TCEP preventing their oxidation. Moreover, it is worth mentioning that the presence of an excess of reducing and precipitating reagents has resulted in pH level of saliva changes from neutral to more acidic, providing pH values of 6.5–7.0 and 2.0–3.0, respectively, regardless of saliva donors. Therefore, this observation was also in an agreement with previous studies concerning the stability of reduced aminothiols and HTL in human biofluids ex vivo, as the analytes tend to be more stable in acidic solutions rather than alkaline [16,27,28,33,34].

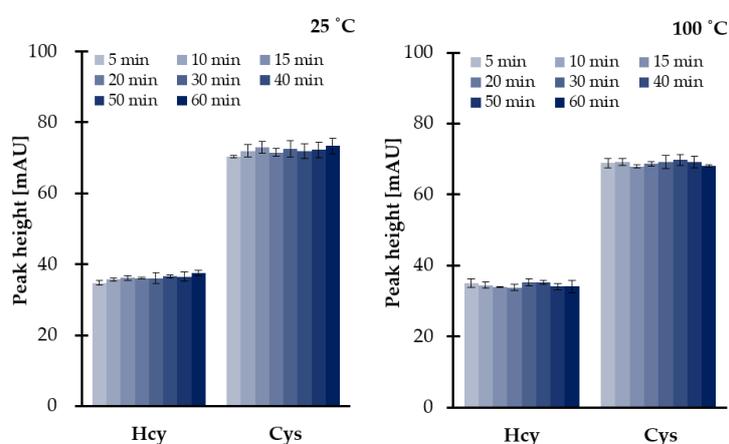


Figure 3. Influence of time and temperature on 1 mol L⁻¹ TCEP stability and disulfides reduction efficiency at 25 $^{\circ}\text{C}$ and 100 $^{\circ}\text{C}$, expressed as a peak height of 2-S-lepidinium derivatives of Cys and Hcy. Samples were assayed according to the previously published method based on HPLC-UV [24]. Error bars refer to SD of the data ($n = 3$).

2.1.4. Derivatization

It has long been known that the studied analytes are highly polar compounds that are not sufficiently volatile in the original form to meet the requirements of the GC-MS technique. So far, a few GC-MS methods have been described for the determination of Met-related sulfur-containing compounds in plasma and urine [6–15]. In all cases, a rather simple and efficient way to overcome the above-mentioned constraints, based on modification of the compounds under study into derivatives, has been employed. In the present study, the use of silylation reagent MSTFA purchased as a solution containing 1% TMCS was evaluated. In relation to Met, HTL, and aminothiols, the silylation involves the simultaneous replacement of the active hydrogen on carboxyl (-COOH), -SH, and amino (-NH₂) groups with trimethylsilyl (-Si(CH₃)₃) group resulting in less polar, more volatile and thermally more stable derivatives. Importantly, we found that chemical modification was also valuable from the standpoint of increasing the potential of electron ionization (EI) MS as gave rise to desired derivatives producing intense specific fragment-ion peaks, suitable for the analytes monitoring (Figure 4a–d). With respect to the reduced form of aminothiols, the derivatization was also essential to prevent oxidation leading to alterations in their content.

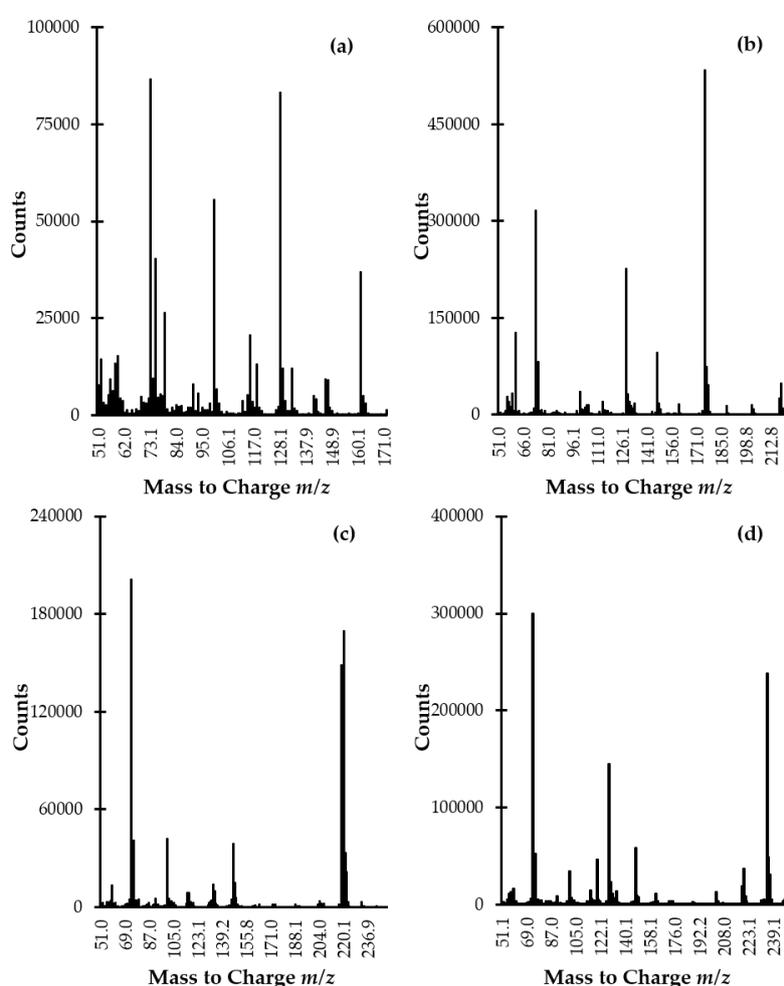


Figure 4. EI scan mode mass spectra of (a) HTL-, (b) Met-, (c) Cys-, and (d) Hcy-TMS derivatives obtained by analyzing standard solution of Met, Hcy, HTL, and Cys ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) prepared according to the procedure described in Section 3.5.

Additional experiments were performed in order to optimize derivatization conditions. In each case, the appearance of a particular product peak on chromatogram and a comparison of its height was used to determine the reaction's progress and efficiency, as well. According to the manufacturer's

instruction [35], silyl reagents are influenced by both the solvent system and the addition of a catalyst, which may be required for dissolution of the sample and/or increasing the reactivity of the reagent itself. Most commonly, pyridine is used as a solvent as it is both non-protic and catalyst facilitating the reaction. In some cases, the derivatization reagent can serve as the solvent, as well. Since pyridine is considered to be toxic, preliminary experiments were conducted to check whether its presence is essential for the derivatization reaction. Two sets of samples were prepared where the residue was treated with a mixture containing silylation MSTFA-TMCS reagent and pyridine or derivatizing reagent itself. It has been recognized that TMS derivatives were formed in both cases indicating that the reaction with MSTFA-TMCS mixture does not require any solvents. Nevertheless, more satisfactory results were obtained when the mixture consisting of MSTFA, TMCS, and pyridine was simultaneously subjected to samples. It was found that the signals were higher by about 35–45% under discussed conditions. For this reason, MSTFA-TMCS pyridinic solution was chosen. Such an approach was also advantageous as provided good repeatability of the reaction. Based on our previous studies concerning GC-MS assay dedicated to salivary and urinary HTL measurements [16], freshly prepared derivatizing mixtures were also used, where the ratio of pyridine to MSTFA with 1% TMCS was 1:1.

Then, experiments were performed to establish the optimal amount of derivatizing mixture for Met-related sulfur-containing compounds derivatization in saliva. Five different quantities, namely, 40, 50, 60, 75, and 100 μL , were tested. Based on our previous studies [16], a smaller amount of derivatizing mixture was not taken under consideration, while a higher volume of MSTFA-TMCS pyridinic solution was excluded in order to prevent further analyte dilution and eliminate the source of baseline noises. As a result, it was found that the best results were obtained when 60 μL of the derivatizing mixture was taken (Figure 5a).

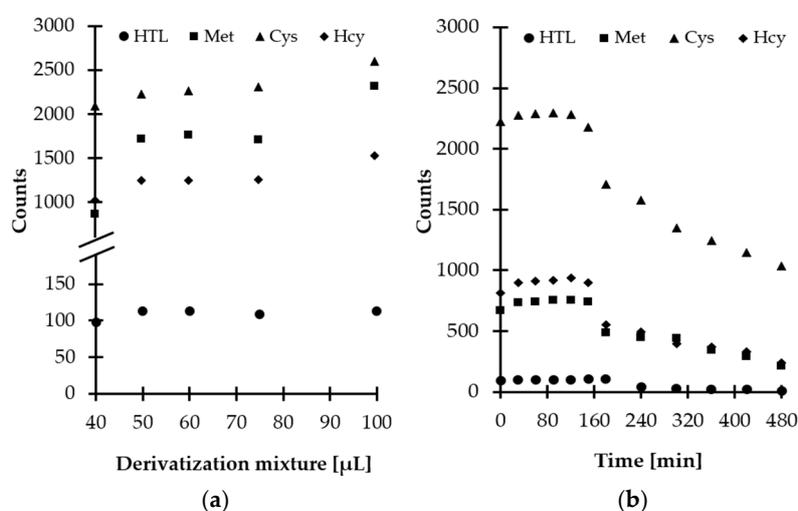


Figure 5. Derivatization reaction yield as a function of (a) reagent excess, (b) time combined with examination of HTL/Met/Cys/Hcy-TMS derivatives stability in autosampler, expressed as a peak height of HTL/Met/Cys/Hcy-TMS derivatives. Samples were analyzed according to the procedure described in Section 3.6.

Additional experiments were conducted to establish the derivatization reaction kinetics at room temperature. Importantly, it was recognized that reaction time did not vary greatly among compounds and the reactions at the above-defined conditions were completed in a matter of minutes after mixing of the reagents (Figure 5b). Therefore, no experimental work was undertaken to further optimize the temperature of the reaction. Finally, 5 min reaction time was chosen, as this was considered well within the timeframe required for processing of the samples.

Since chemical compounds can be decomposed prior to chromatographic analysis under different circumstances, the stability of obtained derivatives was also evaluated. Notably, it was found that

HTL-TMS and Met/Cys/Hcy-TMS derivatives remain stable up to 180 and 150 min, respectively, at room temperature and then are gradually decomposed owing to hydrolytic instability (Figure 5b). Similar behavior was observed when salivary and urinary HTL was studied [16]. Hence, in order to produce meaningful results, this fact cannot be neglected in any attempt to measure Met-related sulfur-containing compounds content using the proposed GC-MS assay. Moreover, it is highly recommended to analyze samples without delay.

Finally, our experiments have established an optimal procedure, in which reduced and deproteinized saliva is evaporated to dryness, treated with a freshly prepared derivatizing mixture of MSTFA and TMCS in anhydrous pyridine, and subjected to the GC system (Figure 6). The overall sample preparation time was estimated to be 45 min. In general, the duration of sample pretreatment procedure was similar to results previously reported by other research groups [28].

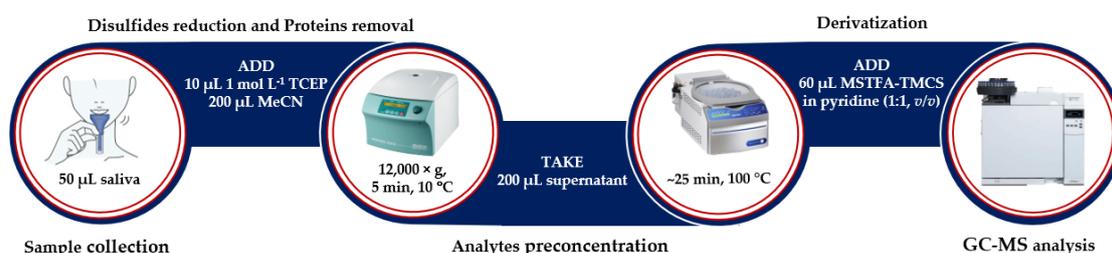


Figure 6. The experimental procedure for HTL, Met, Cys, and Hcy simultaneous determination in human saliva (see Section 3.5).

2.2. GC Separation and MS Detection

In the presented study, the initial experiments were conducted with the use of GC-MS method dedicated to salivary and urinary HTL measurements [16]. It has been recognized that most analytes were not well-resolved under isothermal temperature conditions, thus a temperature program was used. Moreover, multiple ramp rates were applied to affect smaller regions of the chromatogram, providing a better resolution of the peaks eluting in the middle of the chromatogram and later eluting peaks, as well. During method development, crucial rules have been pointed out to be followed in order to perform a successful analysis. Importantly, it has been recognized that a starting temperature should be no higher than 146 °C, and maintaining isothermal temperature conditions for 5 min was essential to provide resolution of the HTL-TMS derivative from other saliva constituents. Moreover, it was found that a ramp to 300 °C followed by slow cooling down was necessary to protect the column against contamination and to equilibrate the GC-MS system between analyses. This standard procedure was also essential to eliminate carryover between samples. Under optimized conditions (see Section 3.6), the peaks of TMS derivatives eluted within 10 min and were well-separated, from the responses of all concomitant matrix components, on the capillary column coated with HP-5MS phase.

The identification and confirmation of the target compound were performed by analyzing the standard solution of the analytes ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) prepared according to the procedure described in Section 3.5. Each solution of sulfur-containing compound was prepared separately and then was processed. The GC-MS spectra were initially acquired in scan mode and subsequently in selected ion monitoring (SIM) mode. In the beginning, the instrument was set to gather data stepping the mass filter within m/z 50–1000 range. The NIST Mass Spectral Library and EI scan mass spectra were used to identify compounds and spectrum peaks. Two ions per target compound were identified as suitable for analyte monitoring (Figure 4a–d, Table 1). Then, analyses were conducted with SIM MS mode in order to increase sensitivity and selectivity in trace analysis. Moreover, signals to be monitored were grouped into time programmed SIM groups to enhance the accuracy and precision of quantitative results. Identification and quantification of the compound of interest in real samples were based upon a comparison of retention time and specific ions with a corresponding set of data obtained by analyzing authentic compounds. The order of elution was as follows: HTL, Met, Cys,

and Hcy being in agreement with increasing, theoretically calculated molecular masses of their TMS derivatives. This phenomenon was indirect evidence that all present in the corresponding molecule active hydrogens on -COOH, -SH, and -NH₂ group were substituted by TMS group since, in relation to GC technique, it is widely known that compounds generally elute in the increasing order of their molecular masses.

Table 1. Analytical characteristics of HTL/Met/Cys/Hcy-TMS derivatives using SIM MS mode.

Analyte		HTL	Met	Cys	Hcy
Retention time	(min)	3.9	6.7	7.5	9.9
CV of retention time ($n = 10$)	(%)	0.442	0.060	0.049	0.038
Identification ions	(m/z)	128.1; 161.1	128.1; 176.1	218.1; 220.1	128.1; 234.1
Quantification ions	(m/z)	128.1	176.1	220.1	234.1
Time programmed SIM group		1st	2nd	2nd	3rd
SIM group start time	(min)	2.2	5.0	5.0	8.0

Finally, satisfactory method selectivity was achieved through the selection of temperature program and the specific ions to be monitored by MS detector. The representative SIM-chromatograms are shown in Figure 7a,b. The data on the retention time of particular target compounds and ions used for their identification and quantification are presented in Table 1.

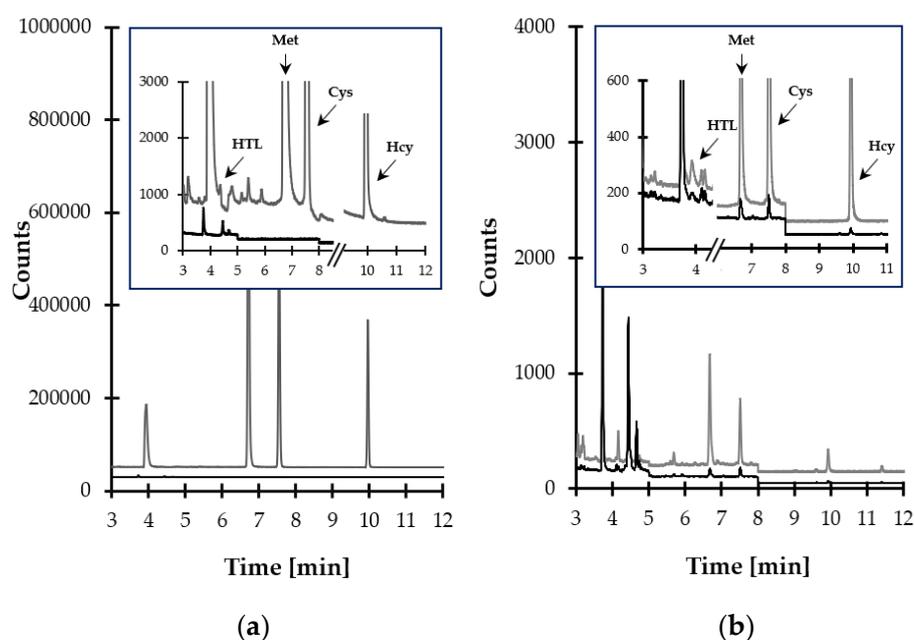


Figure 7. Representative chromatograms of standard solutions and human saliva prepared according to the procedure described in Section 3.5. Chromatographic conditions were as described in Section 3.6. (a) Blank standard solution (black line) and standard solution of HTL, Met, Cys, and Hcy ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) (grey line); (b) normal human saliva sample (black line) and the same sample spiked with the analytes ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) (grey line).

2.3. Validation of the Method

The GC-MS assay was thoroughly validated on a qualified instrument in order to establish that the performance characteristic of the procedure meets the requirements for the intended analytical application. The elements and acceptance criteria of the method development and validation were selected upon the United States Food and Drug Administration guidance for bioanalytical methods validation [36]. The validation protocol included fundamental parameters such as selectivity, linearity, the limit of quantification (LOQ), accuracy, and precision. In general, these parameters were measured

in combined experiments. Moreover, system suitability parameters such as repeatability of retention time expressed as the coefficient of variation (CV) of retention time, asymmetry factor, and number of theoretical plates were selected. System suitability test calculations were performed by analyzing a set of standard solutions of HTL, Met, Cys, and Hcy ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) in 10 replicate injections. Importantly, successful system suitability test runs indicated the proper performance of the instruments. The data regarding the system suitability tests are summarized in Table 2.

Table 2. System suitability test ($n = 10$).

	Analyte	HTL	Met	Cys	Hcy
Acceptance Criteria				Value	
CV of retention time	$\leq 1\%$	0.442%	0.060%	0.049%	0.038%
Assymetry factor	0.8–1.5	1.39	1.47	1.16	1.50
Number of theoretical plates	≥ 2000	10,384	11,375	22,278	19,274

In the beginning, some attempts have been made to verify the selectivity of the analytes in the presence of concomitant matrix components. In particular, selectivity studies assessed interferences originating from structurally and physiologically similar thiol compounds. These included biologically relevant Met-related aminothiols, such as glutathione (GSH) and cysteinyl-glycine (CysGly), which have been recognized to be also present in saliva specimen so far [28]. At first, blank standard solution and standard solution of HTL, Met, Cys, and Hcy ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) were analyzed. Moreover, each target compound solution was prepared separately in order to ascertain that a single analyte did not yield more than one chromatographic peak. As shown in Figure 7a, the elution profile is free from any interferences at the retention time of the analytes. Importantly, the same observations were made when the standard solution of GSH and CysGly ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) were assayed. Then, blank saliva samples from six individual sources and the same samples spiked with GSH and CysGly ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) were analyzed according to the procedure described in Sections 3.5 and 3.6. No increase in peak height of the target compounds was observed. In addition, selectivity studies encompassed the evaluation of peak purity. For this purpose, the MS detector was set to acquire spectra on-line throughout the entire chromatogram, and the spectra registered during the elution of each target compound peak were compared. Importantly, the same spectra, acquired in different sections of a particular analyte peak, were observed, indicating its purity.

A standard approach was applied for the calibration of the method. Multilevel calibration curves were generated for each analyte and were run in triplicate over five subsequent working days. The calibration curves consisted of a blank sample and seven calibration standards which concentrations were chosen on the basis of the concentration range expected in study samples [16,24,28]. Calibrators were prepared in laboratory-made pooled saliva by spiking the matrix with known quantities of the analytes. Since saliva samples free of HTL, Met, Cys, and Hcy were not available, the endogenous concentrations of the analytes were evaluated before calibration curve preparation by triplicate analysis. The linearity was initially evaluated graphically by visually inspecting a plot of the peak height as a function of the analyte concentration. Then, the mathematical evaluation was conducted using the least-squares regression model to describe the concentration–response relationship. In particular, curves' correlation coefficient (R) was monitored showing that the instrument response was directly proportional to the analytes' concentration within the intended quantitation range. Moreover, substantial changes in the slope of the particular regression line across a day were not observed. Nevertheless, it has been encountered that the analytical method might have been affected by matrix components. Thus, matrix effects were investigated during the validation and implementation of the method. The matrix effect evaluation involved comparing calibration curves in multiple sources of the saliva samples against a calibration curve in the pooled matrix. Importantly, it was recognized that calibration curves created from a pooled matrix did not differ substantially from the ones prepared in human saliva samples from six individual sources. In particular, the slope of the regression lines did

not deviate by more than 12.9%. In fact, this denoted the absence of any matrix effect and indicated that most of the interfering matrix components were eliminated among optimized sample preparation procedures. Indeed, with this difference in slope, there only would be a few percent errors in using any of the regression lines to quantify the sample. On the other hand, when dealing with trace amounts, these errors can have a large effect on the analytical results. Due to this variation, a standard addition method was, nonetheless, used.

Accuracy and precision of the assay were evaluated under described conditions in order to assess variability associated with measurements. The precision was expressed in the form of CV, whereas accuracy as the percentage of analyte recovery calculated by expressing the mean measured amount as a percentage of added amount using the following formula:

$$\text{Accuracy (\%)} = [(\text{measured amount} - \text{endogenous content})/\text{added amount}] \times 100 \quad (1)$$

The evaluation of the above-mentioned parameters was carried out at two levels, and experiments were completed as a part of linearity assessment. Intra-assay precision and accuracy were demonstrated by triplicate analysis of freshly prepared calibrators. They referred to pooled saliva samples spiked with the analytes at three different levels, covering quantitation range, including one close to the LOQ, one in the middle of the range, and one at upper LOQ. Experiments for estimating intermediate accuracy and precision were repeated, in the same manner, over five subsequent days. All concentrations were tested with the use of calibration curves prepared especially on that occasion. Importantly, obtained results from analytical runs met the acceptance criteria. The accuracy ranged from 88.75% to 112.92% and 91.37% to 107.58% for intra- and inter-day variation, respectively. The precision did not exceed 14.30% of CV at any examined concentration level. It varied from 3.60% to 14.30% and 4.87% to 13.72% for intra- and inter-day measurements, respectively. Detailed data on precision and accuracy from the five-day experiments, compared with intra-assay precision and accuracy, are gathered in Table 3.

Table 3. Precision and accuracy data ($n = 5$).

Analyte	Concentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Precision (%)		Accuracy (%)	
		Intra-Assay	Intermediate	Intra-Assay	Intermediate
HTL	1	12.80	11.77	89.46	92.53
	10	8.53	12.24	102.21	96.91
	20	9.46	10.98	96.04	101.51
Met	1	14.30	13.72	91.54	102.74
	10	5.75	7.83	88.75	107.58
	20	10.69	9.54	100.41	101.96
Cys	1	9.87	11.23	112.92	91.37
	10	3.60	5.89	103.15	104.15
	20	7.83	6.24	105.09	99.87
Hcy	1	10.60	12.36	99.59	103.67
	10	6.58	4.87	96.79	94.53
	20	12.03	9.56	102.91	100.22

The LOQ was determined experimentally by the signal-to-noise method. For this purpose, a proxy matrix (0.9% NaCl in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer, pH 7.4) was enriched with decreasing concentrations of the analytes and treated according to the procedure described in Sections 3.5 and 3.6. In the present study, LOQ was taken as the concentration that resulted in a peak 10 times as high as the baseline noise level, which was clearly distinguished from the baseline and reproducible. The estimated LOQ equals to 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Met, Hcy, Cys while its value for HTL amounts to 0.05 $\mu\text{mol L}^{-1}$. These concentrations of the analytes produced a detector response with a precision that did not exceed 13.72%, and accuracy ranged from 89.46% to 103.67%. The obtained LOQ values were similar to

those published earlier concerning the determination of HTL as well as total Hcy and Cys content in human saliva [16,28].

Finally, the method validation proved that the optimized GC-MS assay is suited to the analysis of the study samples. In particular, it has been demonstrated that the analytical procedure is sensitive enough and has suitable levels of precision and accuracy, falling within acceptable tolerance limits. Detailed data dealing with all validation parameters are shown in Tables 3 and 4.

Table 4. Validation data ($n = 3$).

Analyte	Regression Equation	R (R ²)	CV Slope (%)	Linear Range ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Intra-Assay Precision (%)		Intra-Assay Accuracy (%)		LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
					Min	Max	Min	Max	
HTL	$y = 2.935x + 1.890$	0.9970 (0.9940)	1.9	1.0–20	8.53	12.80	89.46	105.17	0.05
Met	$y = 26.10x + 43.51$	0.9940 (0.9880)	3.5	0.5–20	5.75	14.30	88.75	106.35	0.1
Cys	$y = 70.31x + 5.908$	0.9952 (0.9904)	1.4	0.5–20	3.60	11.57	94.93	112.92	0.1
Hcy	$y = 28.94x + 26.63$	0.9969 (0.9938)	1.2	0.5–20	1.52	13.54	94.63	102.91	0.1

2.4. Application of the Method

In order to establish the utility of the method, saliva samples from ten apparently healthy volunteers (7 women and 3 men, 24 to 62-year old, providing an average age for the experimental group of 33.70) were analyzed using the GC-MS assay. The average age was 43.00 for men and 29.71 for women. Samples were handled according to the procedures described in Sections 3.5 and 3.6. A single standard addition method was used to establish salivary levels of Met-related sulfur-containing compounds. Study samples with concentrations above the upper LOQ were diluted and re-analyzed. Concentrations of salivary Met, Cys, and Hcy varied from 12.07 to 51.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($23.98 \pm 16.22 \mu\text{mol L}^{-1}$), from 3.73 to 16.63 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($7.67 \pm 4.32 \mu\text{mol L}^{-1}$), and from 0.32 to 1.67 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($0.99 \pm 0.54 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectively. HTL was not detected in study samples, most probably due to the limited stability of HTL in saliva *ex vivo* [16]. However, it needs to be clearly emphasized that in the present study performance of the method was verified using samples collected in 2016. At first glance, these values were remarkably different from thiol levels previously reported using CMLT-based methodology [24]. In relation to samples tested in 2016, concentrations of salivary Cys and Hcy varied from 1.68 to 12.56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($6.01 \pm 3.79 \mu\text{mol L}^{-1}$), and from 0.26 to 1.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($0.76 \pm 0.42 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectively. Therefore, additional experiments were conducted to establish if the GC-MS assay meets performance requirements. The same saliva samples from donors were assayed by methods developed in our earlier studies [16,24]. Amino thiols, namely Hcy and Cys were quantified by a method using HPLC with pre-column derivatization with CMLT and UV detection [24]. The assay based on the GC-MS technique, designated for assessment of HTL content in human saliva and urine, was used for its determination [16]. To the best of our knowledge, no reference method was available to estimate Met content in saliva specimen and the presented GC-MS assay is the first one dealing with the above-mentioned issue. Importantly, the values for saliva Met-related sulfur-containing compounds were similar to those obtained using a newly developed GC-MS assay. In relation to Cys and Hcy, the results did not deviate by more than 11.9%, indicating the procedure's reliability. The greatest possible reason for the difference in levels of analytes, if compared to 2016 results, was some sample components decomposition or partial evaporation as evaluated values were about 30% higher than those estimated in 2016. On the other hand, these studies have confirmed the supposition that the stability of the analytes in saliva *ex vivo* is limited. According to literature data [28], there are no reliable experimental data on the long-term stability of amino thiols and HTL in saliva, as yet. Thus, this topic remains to be investigated in detail in the near future to ensure that samples are not exposed to decomposition upon handling process.

3. Materials and Methods

3.1. Reagents and Materials

All chemicals used throughout this study were of analytical reagent grade. D,L-HTL, D,L-Met, CysGly, symmetrical disulfides of D,L-Hcy, D,L-Cys, and L-GSH, MSTFA, TMCS, TCEP, DTT, 2-ME, THP, HSA, sodium chloride, and anhydrous pyridine were from Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA). PCA, hydrochloric acid, acetic acid, sodium hydroxide, HPLC-gradient grade MeCN, ethanol, chloroform, methanol, sodium hydrogen phosphate heptahydrate, sodium dihydrogen phosphate dihydrate were from J.T. (Baker, Deventer), the Netherlands. CMLT was prepared as previously described [24]. Deionized water was produced in our laboratory.

3.2. Instrumentation

An Agilent 7820A GC system equipped with automated sample injector model 7693A and MS detector 5977B (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used for GC experiments. The GC apparatus was equipped with a split/splitless inlet, working in a split ratio of 50:1 mode to a 30 m × 0.25 mm HP-5MS quartz capillary column with a 0.25 µm film thickness (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Data acquisition and analysis were performed using MassHunter 5977B MSD Bundle with 7820 GC software NIST MS Spectral Library version 2.3.

HPLC analyses were carried out using an Agilent 1220 Infinity LC system equipped with a binary pump integrated with two-channel degasser, autosampler, column oven, and diode-array detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) controlled by OpenLAB CDS ChemStation software. Analytes were separated on Aeris PEPTIDE XB-C18 (150 mm × 4.6 mm, 3.6 µm) column from Phenomenex, Torrance, CA, USA.

For absorbance measurements, the UV-1900 spectrophotometer with the UVProbe software (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used. Samples were dried using a CentriVap Centrifugal Vacuum Concentrator (Labconco, Kansas City, MO, USA). For sample shaking, Multi-Speed Vortex MSV-3500 (Biosan, Riga, Latvia) was used. During the study, a Mikro 220R centrifuge with fast cool function (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany), an HI 221 pH-meter (Hanna Instrument, Loveland, CO, USA), and a QBD2 thermostat (Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK) were also exploited. Samples were stored in an ultra-low-temperature freezer (Panasonic Healthcare Co., Ltd., Sakata, Japan). Water was purified using a Milli-QRG system (Millipore, Vienna, Austria).

3.3. Stock Solutions

The stock solution of TCEP (1 mol L⁻¹) was prepared by dissolving an appropriate amount of TCEP powder in deionized water. The solution of TCEP was prepared freshly and was processed without delay. Stock solution of HSA (5 g L⁻¹) was prepared in 0.9% NaCl as needed. Stock solutions of 0.1 mol L⁻¹ Met, HTL, and symmetrical disulfides of Hcy and Cys were prepared in 1 mol L⁻¹ HCl. These solutions were kept at 4 °C for no longer than 7 days without noticeable change of the analyte content. The working solutions of the analytes were prepared daily by dilution of a standard solution with deionized water.

3.4. Biological Samples Collection

First, early morning saliva samples (about 2 mL) were collected from individuals after overnight fasting and before teeth brushing. Unstimulated saliva samples were obtained by asking donors to put whole expectorated oral fluid into sterile tubes. Then, samples were cooled on ice and delivered to the laboratory, where samples were stored at -80 °C until analysis. Samples were processed immediately after defrosting at room temperature using the procedure described in Section 3.5.

In the present study saliva samples, stored at -80 °C since 2016, were tested. Such an approach was due largely to the SARS-CoV-2 pandemic. These samples were collected for the purpose of demonstrating the validity of CMLT-based methodology [24]. Ten apparently healthy volunteers,

belonging to an ethnically homogeneous group, were studied. Donors were not supplemented with analytes before sample collection. No medications were also allowed. The study was approved by the Ethical Committee of the University of Lodz (decision identification code: 2/KBBN-UŁ/III/2020, date 16 April 2020). All subjects gave their informed consent.

3.5. Saliva Specimen Preparation for Met-Related Sulfur-Containing Compounds Quantification by GC-MS

In the beginning, saliva was clarified by centrifugation (12,000× *g*, 10 min, 4 °C). Then, 50 µL of obtained supernatant was mixed with 200 µL of MeCN and 10 µL of 1 mol L⁻¹ TCEP. The mixture was vigorously shaken and kept in a centrifuge at 12,000× *g* for 5 min at 10 °C. After centrifugation, the upper organic layer (200 µL) was transferred into a 0.5 mL polypropylene microtube and dried under vacuum (~25 min at 100 °C). Thereafter, the residue was treated with 60 µL derivatizing mixture containing MSTFA with 1% TMCS in pyridine (1:1, *v/v*) and incubated at room temperature for 5 min. Afterward, the reaction mixture was transferred to a vial, and 1 µL of the sample was injected into GC-MS system without delay. Each sample was analyzed according to the procedure described in Section 3.6.

3.6. GC-MS Conditions

Helium (99.9999%) was used as the carrier gas with a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. The injection port temperature was set to 280 °C. The chromatographic separation of Met-related sulfur-containing compounds, TMS derivatives, was accomplished under thermal gradient conditions. The initial oven temperature was set to 146 °C for 5 min and increased to 200 °C in steps of 5 °C min⁻¹, then 50 °C min⁻¹ to 300 °C. Then, the oven was slowly cooled down in steps of 20 °C min⁻¹ afterward. The MS detector was operated in the EI mode at 70 eV. The ion source temperature was set at 230 °C, the temperature of quadrupole was set at 150 °C, while the MS interface was set to 250 °C. The multiple ion detector was focused on ions that represent only the portion of each target compound. These ions were grouped into three time-programmed SIM groups and the instrument was set to acquire data with a dwell time that yields 15 to 20 scans across the chromatographic peak. Information concerning the SIM MS mode of detection is gathered in Table 1.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first and the only available GC-MS assay dedicated to salivary Met-related sulfur-containing compounds measurements. The method allows simultaneous determination of a number of salivary biologically relevant compounds, namely, Met, total Cys, and Hcy as well as HTL in a single run. In addition, this is the first-ever report dealing with the presence of Met in the above-mentioned matrix as well as the first effective analytical tool enabling to determine Met in human saliva. The assay is primarily characterized by a streamlined sample preparation procedure involving simultaneous disulfides reduction with deproteinization, analytes preconcentration by drying under vacuum, and derivatization followed by GC-MS analysis. Moreover, relatively short analysis time and the possibility of carrying out chemical analysis on a very small scale combined with low consumption of hazardous chemicals and laboratory disposable plasticware make the GC-MS assay environmentally friendly. Unfortunately, the method is not free from restrictions. In order to produce meaningful results, it is highly recommended to quantify the samples using the standard addition method, which limits the number of samples analyzed per day and assay them without delay due to the limited stability of TMS derivatives under experimental conditions. Nevertheless, we hope that the proposed GC-MS assay will (1) facilitate investigations into the clarification of the role of HTL, Met, Cys, and Hcy in physiological and pathological states in living systems, as well as (2) contribute substantially to broaden our knowledge of the diagnostic potential of saliva.

Author Contributions: J.P. participated in all experiments carried throughout these studies. In principal, she coordinated the project, co-created the research concept, designed experiments, carried out statistical analysis, interpreted data, analyzed literature, wrote and edited the manuscript, and had primary responsibility for

the final content. M.W. contributed input into research work by participating in sample preparation and gas chromatographic separation conditions optimization. She has also performed chromatographic analyses and participated in data discussion. J.P. and M.W. prepared figures and tables. R.G. co-created the research concept, managed the project, participated in data discussion, critically revised the manuscript, and was responsible for funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Science Center, Poland (grant number 2017/27/B/ST4/01476).

Acknowledgments: The authors are grateful to all the volunteers, from the Faculty of Chemistry, University of Lodz, for the donation of saliva samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

CMLT	2-chloro-1-methyllepidinium tetrafluoroborate
Cys	cysteine
CysGly	cysteinyl-glycine
CV	coefficient of variation
DTT	dithiothreitol
EI	electron ionization
GC	gas chromatography
GSH	glutathione
Hcy	homocysteine
HPLC	high-performance liquid chromatography
HSA	human serum albumin
HTL	homocysteine thiolactone
LOQ	limit of quantification
MeCN	acetonitrile
Met	methionine
MS	mass spectrometry
MSTFA	N-trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide
PCA	perchloric acid
R	correlation coefficient
SD	standard deviation
SIM	selected ion monitoring mode
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
THP	tris(hydroxymethyl)phosphine
TMCS	trimethylchlorosilane
TMS	trimethylsilyl group
UV	spectrophotometric detection
2-ME	2-mercaptoethanol

References

1. Oliveira, P.; Laurindo, F. Implications of plasma thiol redox in disease. *Clin. Sci.* **2018**, *132*, 1257–1280. [[CrossRef](#)]
2. Moretti, R.; Caruso, P. The controversial role of homocysteine in neurology: From labs to clinical practice. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 231. [[CrossRef](#)]
3. Hasan, T.; Arora, R.; Bansal, A.; Bhattacharya, R.; Sharma, G.; Singh, L. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. *Exp. Mol. Med.* **2019**, *51*, 21–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. 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.* **2018**, *16*, 559–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Perla-Kaján, J.; Jakubowski, H. Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3140. [[CrossRef](#)]
6. Stabler, S.P.; Marcell, P.D.; Podell, E.R.; Allen, R.H. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 185–196. [[CrossRef](#)]

7. Kataoka, H.; Tanaka, H.; Fujimoto, A.; Noguchi, I.; Makita, M. Determination of sulphur amino acids by gas chromatography with flame photometric detection. *Biomed. Chromatogr.* **1994**, *8*, 119–124. [[CrossRef](#)]
8. Myung, S.W.; Kim, M.; Min, H.K.; Yoo, E.A.; Kim, K.R. Determination of homocysteine and its related compounds by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1999**, *727*, 1–8. [[CrossRef](#)]
9. Sigit, J.I.; Hages, M.; Brensing, K.A.; Frotscher, U.; Pietrzik, K.; Von Bergmann, K.; Lütjohann, D. Total plasma homocysteine and related amino acids in end-stage renal disease (ESRD) patients measured by gas chromatography-mass spectrometry—Comparison with the Abbott IMx homocysteine assay and the HPLC method. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2001**, *39*, 681–690. [[CrossRef](#)]
10. Hušek, P.; Matucha, P.; Vránková, A.; Šimek, P. Simple plasma work-up for a fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic amino acids. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *789*, 311–322. [[CrossRef](#)]
11. De la Flor St. Remy, R.R.; Montes-Bayón, M.; Sanz-Medel, A. Determination of total homocysteine in human serum by capillary gas chromatography with sulfur-specific detection by double focusing ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 299–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Windelberg, A.; Årseth, O.; Kvalheim, G.; Ueland, P.M. Automated assay for the determination of methylmalonic acid, total homocysteine, and related amino acids in human serum or plasma by means of methylchloroformate derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2103–2109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ueland, P.M.; Middtun, Ø.; Windelberg, A.; Svardal, A.; Skålevik, R.; Hustad, S. Quantitative profiling of folate and one-carbon metabolism in large-scale epidemiological studies by mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2007**, *45*, 1737–1745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Švagera, Z.; Hanzlíková, D.; Šimek, P.; Hušek, P. Study of disulfide reduction and alkyl chloroformate derivatization of plasma sulfur amino acids using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 2953–2963. [[CrossRef](#)]
15. Middtun, Ø.; McCann, A.; Aarseth, O.; Krokeide, M.; Kvalheim, G.; Meyer, K.; Ueland, P.M. Combined Measurement of 6 Fat-Soluble Vitamins and 26 Water-Soluble Functional Vitamin Markers and Amino Acids in 50 µL of Serum or Plasma by High-Throughput Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 10427–10436. [[CrossRef](#)]
16. Piechocka, J.; Wrońska, M.; Chwatko, G.; Jakubowski, H.; Głowacki, R. Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2020**, 122155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Roblegg, E.; Coughran, A.; Sirjani, D. Saliva: An all-rounder of our body. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *142*, 133–141. [[CrossRef](#)]
18. Ngamchuea, K.; Chaisiwamongkhol, K.; Batchelor-Mcauley, C.; Compton, R.G. Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers—A tutorial review. *Analyst* **2018**, *143*, 81–99. [[CrossRef](#)]
19. Elmongy, H.; Abdel-Rehim, M. Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis. A review. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *83*, 70–79. [[CrossRef](#)]
20. Viswanath, B.; Choi, C.S.; Lee, K.; Kim, S. Recent trends in the development of diagnostic tools for diabetes mellitus using patient saliva. *Trends Anal. Chem.* **2017**, *89*, 60–67. [[CrossRef](#)]
21. Kaczor-Urbanowicz, K.E.; Wei, F.; Rao, S.L.; Kim, J.; Shin, H.; Cheng, J.; Tu, M.; Wong, D.T.W.; Kim, Y. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2019**, *1872*, 49–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Roi, A.; Rusu, L.C.; Roi, C.I.; Luca, R.E.; Boia, S.; Munteanu, R.I. A New approach for the diagnosis of systemic and oral diseases based on salivary biomolecules. *Dis. Markers* **2019**, *2019*, 8761860. [[CrossRef](#)]
23. Ashton, N.J.; Ide, M.; Zetterberg, H.; Blennow, K. Salivary biomarkers for Alzheimer’s disease and related disorders. *Neurol. Ther.* **2019**, *8*, S83–S94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. 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* **2016**, *155*, 70–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Goldring, J.P.D. Measuring protein concentration with absorbance, Lowry, Bradford coomassie blue, or the Smith bicinchoninic acid assay before electrophoresis. In *Electrophoretic Separation of Proteins. Methods in Molecular Biology*; Kurien, B.T., Scofield, R.H., Eds.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 2019; pp. 31–39; ISBN 9781493987924.

26. Toyo'oka, T. Recent advances in separation and detection methods for thiol compounds in biological samples. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 3318–3330. [[CrossRef](#)]
27. Kuśmierk, K.; Chwatko, G.; Głowacki, R.; Kubalczyk, P.; Bald, E. Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1290–1307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Piechocka, J.; Wrońska, M.; Głowacki, R. Chromatographic strategies for the determination of aminothiols in human saliva. *Trends Anal. Chem.* **2020**, *126*, 115866. [[CrossRef](#)]
29. Yost, J.M.; Knight, J.D.; Coltart, D.M.; Li, E.W. Tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochloride. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Chemistry*; Paquette, L.A., Crich, D., Fuchs, P.L., Molander, G.A., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2001; pp. 1–9; ISBN 9780471936237.
30. 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.* **2020**, *21*, 3548. [[CrossRef](#)]
31. Halket, J.; Zaikin, V. Derivatization in mass spectrometry—1. Silylation. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2003**, *9*, 1–21. [[CrossRef](#)]
32. Hušek, P. Chromatography: Gas| Derivatization. In *Encyclopedia of Separation Science*; Poole, C., Cooke, M., Eds.; Elsevier Ltd.: New York, NY, USA, 2000; pp. 434–443; ISBN 9780080917795.
33. Kuśmierk, K.; Chwatko, G.; Głowacki, R.; Bald, E. Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 3300–3308. [[CrossRef](#)]
34. Bald, E.; Chwatko, G.; Głowacki, R.; Kuśmierk, K. Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 109–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Derivatization Reagents for Selective Response and Detection in Complex Matrices. Sigma-Aldrich. Available online: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf> (accessed on 3 December 2020).
36. FDA. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*; FDA: Rockville, MD, USA, 2018.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Publikacja D4:

M. Wrońska, J. Piechocka, R. Głowacki, *Chromatografia gazowa w analizie moczu i śliny na zawartość tiolaktonu homocysteiny*, **Analityka**, numer 1, rok (XIX) 2021, ISSN- 1509-4650.

GC jest techniką analityczną pozwalającą na rozdzielenie składników mieszanin związków lotnych. Dotyczy to także sytuacji, w której związek uzyskuje lotność dopiero w momencie dozowania do układu chromatograficznego. Niemniej, zdecydowanie większa grupa związków nie posiada właściwości fizykochemicznych pozwalających na rejestrację sygnału analitycznego techniką GC. W związku z powyższym, chromatograficzna analiza, np. nielotnych związków siarki, musi być poprzedzona modyfikacją chemiczną, która prowadzi do otrzymania pochodnych o bardziej pożądanym właściwościach fizykochemicznych, które umożliwiają rozdzielanie i następnie oznaczanie pierwotnie nielotnych związków. Ponadto, połączenie derywatywacji chemicznej z nowoczesną detekcją mas stwarza dodatkowe możliwości wpływające na czułość i selektywność opracowanej metody, a tym samym na rejestrowanie łatwiejszych do interpretacji chromatogramów i widm.

W artykule umieściłam podstawowe informacje dotyczące derywatywacji w GC, a mianowicie zalety wynikające z przekształcania analitów w odpowiednie pochodne, cele derywatywacji oraz podstawowe typy reakcji i ich mechanizmy. Szczególną uwagę zwróciłam na dwa różne odczynniki derywatywujące, które mogły reagować z cząsteczką analitu za pośrednictwem grupy $-NH_2$, czyli IBCF oraz MSTFA, które wykorzystałam we własnych badaniach nakierowanych na identyfikację jakościową i oznaczanie ilościowe HTL w próbkach rzeczywistych. Na podstawie doświadczeń praktycznych, które nabyłam podczas opracowywania metod oznaczania HTL w moczu i ślinie człowieka [D1, D2] ale także po dogłębnej analizie literatury, wskazałam jakie najczęstsze problemy pojawiają się na etapie przeprowadzania analitu w pochodną. Zaproponowałam również sposoby ich rozwiązania. Są to bardzo cenne wskazówki dla osób zajmujących się analityką HTL, które pozwolą uniknąć błędów uniemożliwiających jego efektywne oznaczenie. Co ważne, są to wskazówki uniwersalne dla próbek biologicznych i innych analitów w nich występujących, które wymagają derywatywacji chemicznej. Zdecydowana większość problemów, które towarzyszą opracowywaniu metod monitorowania poziomu HTL w płynach ustrojowych człowieka techniką GC-MS, jest bowiem ściśle związana z przebiegiem modyfikacji chemicznej analitu. Do najczęściej pojawiających się problemów należy zaliczyć małą

powtarzalność i względnie niską wydajność reakcji derywatywacji, konieczność utrzymywania ściśle określonych warunków podczas derywatywacji (środowisko oraz temperatura), a także ograniczoną trwałość utworzonej pochodnej. Wszystkie te czynniki wraz z zastosowanymi warunkami rozdzielania chromatograficznego wywierają ostateczny wpływ na jakość sygnału analitycznego generowanego przez analit. W konsekwencji odpowiadają za wyznaczone parametry walidacyjne opracowanych procedur a tym samym ich użyteczność. Świadczą tym samym o potencjale aplikacyjnym zaproponowanej metodyki.

ANALITYKA

ISSN-1509-4650

NAUKA I PRAKTYKA

1 2021



MATERIAŁY SORPCYJNE WYKORZYSTYWANE W MASKACH OCHRONNYCH

| 48

Obecna sytuacja epidemiologiczna spowodowała dynamiczny rozwój badań w zakresie efektywnych sorbentów wykorzystywanych w maskach ochronnych. Coraz więcej uwagi poświęca się nie tylko filtrom pełniącym rolę ochrony pasywnej, ale także materiałom o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.



MONIKA WIECZOREK



JUSTYNA PIECHOCKA



RAFAŁ GŁOWACKI

Najnowsze badania dostarczają przekonujących dowodów, że podczas oznaczania HTL w próbkach biologicznych technika GC MS może stanowić przydatne i precyzyjne narzędzie, konkurencyjne w stosunku do tych opartych na technikach separacji w fazie ciekłej.

Chromatografia gazowa w analizie moczu i śliny na zawartość tiolaktonu homocysteiny

Współczesna chemia analityczna mierzy się przede wszystkim z problemem oznaczania śladowych ilości związków w złożonych pod względem składu matrycach. W większości przypadków opracowanie dokładnych, precyzyjnych i selektywnych metod analitycznych jest bardzo trudne, a niekiedy wręcz niemożliwe. Składają się na to wyzwania napotymane przez badacza na wszystkich etapach procedury analitycznej, począwszy od pobrania próbki, poprzez jej odpowiednie przygotowanie aż do analizy końcowej wykorzystującej najczęściej techniki separacyjne. W związku z powyższym, konieczny jest ciągły postęp, zarówno w zakresie rozwijania nowych technik przygotowania próbek do analizy, jak i metod pomiarowych, które pozwolą na opracowywanie procedur umożliwiających selektywne i dokładne oznaczanie na przykład śladowych ilości substancji istotnych z biologicznego punktu widzenia. Jedną z takich technik jest chromatografia gazowa (GC), która w połączeniu z metodami spektroskopowymi, w tym spektrometrią mas (MS), dostarcza skutecznego narzędzi do efektywnego rozdzielania oraz identyfikacji składników próbek biologicznych. Technika ta nie jest pozbawiona ograniczeń, co jest przede wszystkim związane z wymaganiami, jakie stawiane są związkom, których to oznaczenie ma dotyczyć. W przypadku GC analit powinien być bowiem lotny w warunkach analizy oraz cechować się odpowiednią stabilnością termiczną. W praktyce oznacza to, że zdecydowana większość cząsteczek wymaga modyfikacji (derywatywacji), następującej przed etapem końcowej analizy chromatograficznej. Derywatywacja umożliwia otrzymanie pochodnych mających nowe cechy chemiczne i fizyczne, czyniąc anality kompatybilnymi z wymogami aktualnie stosowanej techniki pomiarowej, w tym wypadku GC.

Derywatywacja chemiczna w chromatografii gazowej

GC jest techniką analityczną pozwalającą na rozdzielanie składników mieszanin związków, które pierwotnie bądź wtórnie cechuje lotność w warunkach prowadzenia analizy. Szczególnym wyzwaniem dla analityka jest oznaczanie techniką GC związków, w których strukturze można wyodrębnić grupy funkcyjne zawierające tak zwane aktywne atomy wodoru. Należą do nich między innymi grupa karboksylowa (-COOH), hydroksylowa (-OH), tiolowa (-SH) czy aminowa (-NH₂). W omawianym przypadku możliwość tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych wpływa na zmniejszenie lotności i stabilności termicznej tych związków oraz zwiększenie siły ich oddziaływania z wypełnieniem kolumny chromatograficznej. W takiej sytuacji niezbędna jest chemiczna modyfikacja cząsteczki analitu. Derywatywacja chemiczna jest środkiem powszechnie stosowanym na etapie przygotowania próbki do analizy, który prowadzi do otrzymania pochodnych o bardziej pożądanych właściwościach fizykochemicznych, umożliwiających oznaczanie pierwotnie nielotnych związków. Proces przekształcenia w pochodne w znacznej mierze opiera się na modyfikacji określonego fragmentu wyjściowej struktury substancji oznaczanej, w wyniku czego powstaje produkt, a całemu procesowi mogą towarzyszyć między innymi:

- ograniczenie termicznej degradacji próbki,
- zwiększenie (lub czasami zmniejszenie) lotności analitów,
- zwiększenie czułości metody poprzez wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych przyczyniających się do wzmocnienia sygnału analitycznego,

■ zmiana polarności cząsteczek analitów poprzez zablokowanie grup funkcyjnych, służąca zwiększeniu selektywności układu chromatograficznego,

■ zwiększenie masy cząsteczkowej oznaczanego związku, przyczyniające się do zwiększenia czułości i polepszenia selektywności układu chromatograficznego.

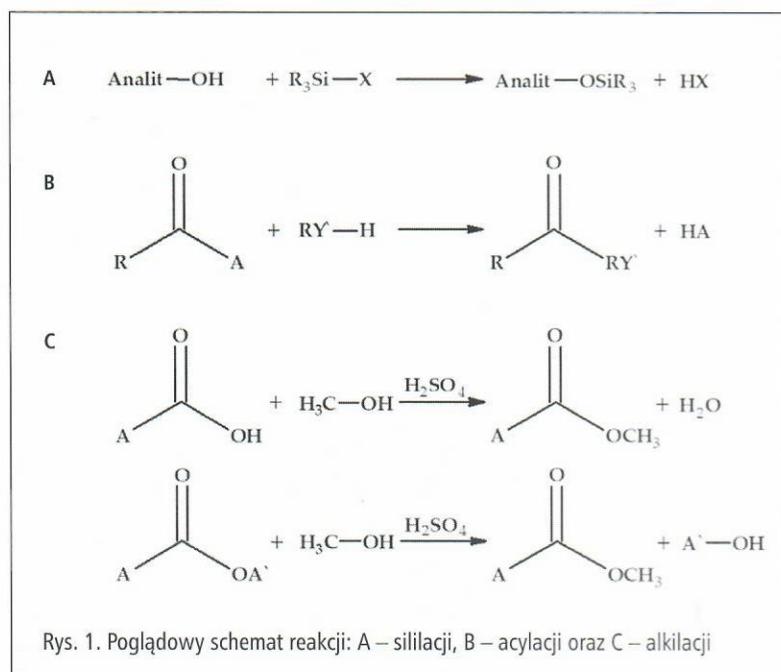
Cele, które chcemy osiągnąć, przeprowadzając modyfikację chemiczną, różnią się w zależności od tego, jakie właściwości fizykochemiczne anality pierwotnie mają i jakie cechy chcemy im nadać. Jak wcześniej wspomniano, stosując derywatyzację, oprócz osiągnięcia oczywistego i zamierzonego celu, jakim jest nadanie obiektowi badań odpowiednich właściwości fizykochemicznych, można także wpływać na czułość metody oraz jej selektywność. Fakt ten nierozdzielnie wiąże się z umiejętnością zaprojektowaną przez analityka procedurą przygotowania próbki, sprzyjającą uproszczeniu matrycy, a tym samym możliwością rejestracji łatwiejszych w interpretacji chromatogramów i/lub widm. W omawianym przypadku istotną rolę odgrywa także rodzaj zastosowanego odczynnika derywatyzyjnego i mechanizm, według którego zachodzi jego reakcja chemiczna z analitem. To właśnie cel prowadzonej modyfikacji oraz struktura cząsteczki substancji oznaczanej są podstawowym kryterium decydującym o wyborze odpowiedniego reagenta. Co więcej, idealny odczynnik derywatyzyjny powinien reagować selektywnie, ilościowo i szybko względem oznaczanych substancji, bez tworzenia produktów ubocznych. Powstała pochodna powinna być stabilna w warunkach prowadzenia analizy oraz nie powinna oddziaływać trwale z elementami układu GC, w tym z fazą stacjonarną. Należy jednak pamiętać, że włączenie etapu derywatyzyjnego do procedury analitycznej może być przyczyną generowania dodatkowych błędów, znacząco wpływających na końcową dokładność i precyzję oznaczeń.

Najważniejszym etapem podczas projektowania nowej procedury analitycznej jest dobranie najbardziej korzystnych warunków, które umożliwią jej efektywną aplikację. W przypadku procedur, w których na etapie przygotowania próbki istnieje konieczność konwersji analitów w pochodne, istotny jest dobór rodzaju stosowanego rozpuszczalnika stanowiącego środowisko reakcji, wybór odczynnika derywatyzyjnego i jego nadmiaru molowego względem analitu oraz określenie kinetyki reakcji, czy, ewentualnie, potrzeby stosowania katalizatora. Ze względu na fakt, że zazwyczaj reakcje tego typu zachodzą w podwyższonej temperaturze, dodatkowo istnieje konieczność wyboru odpowiedniej temperatury prowadzenia procesu, co łączy się często z koniecznością termostatowania próbek. Powszechnie stosowane w GC reakcje derywatyzyjacji dzieli się na trzy typy (rys. 1). Są nimi:

■ **Sililacja**, która polega na wprowadzeniu do struktury analitu grupy trimetylosililowej ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). Grupa ta zastępuje grupy polarne będące donorami protonów, takie jak $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, grupa borowa ($-\text{BOH}$) oraz grupa siarkowa ($-\text{SOH}$). Otrzymane pochodne są bardziej lotne, stabilne termicznie i mniej polarne.

■ **Acyłacja**, wiążąca się z konwersją analitów, w których strukturze pierwotnie można wyodrębnić grupy $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$, w estry, tioestry i amidy. Reakcję prowadzi się w obecności zasad organicznych, bezwodników kwasowych, halogenków czy amidków acylowych.

■ **Alkilacja**, stanowiąca typ reakcji stosowanej w przypadku konwersji związków organicznych w pochodne, które zawierają tak zwany kwaśny atom wodoru. Opiera się ona na wprowadzeniu do cząsteczki analitu łańcucha węglowodorowego. W jej obrębie wyróżnia się estryfikację, która uznawana jest za najpopularniejszą metodę alkilowania. Estryfikacja najczęściej stosowana jest w przypadku modyfikacji cząsteczek kwasów organicznych.



Oznaczanie tiolaktonu homocysteiny w moczu i ślinie człowieka

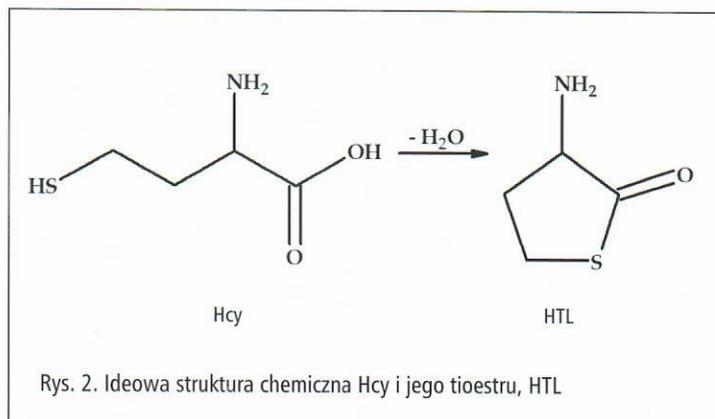
Choroby cywilizacyjne, jako jedna z najczęstszych przyczyn zgonów w krajach wysokorozwiniętych, stanowią bardzo poważny problem społeczny XXI wieku. Z tego też względu od kilkadziesiąt lat prowadzone są badania dotyczące poszukiwania szybkich sposobów wczesnego diagnozowania tego typu schorzeń, wśród których najczęściej wymienia się choroby układu krążenia oraz nowotworowe. Z tych samych powodów obserwuje się niesłabnące zainteresowanie zaliczanymi do niskocząsteczkowych związków siarki, homocysteiną (Hcy) i jej tiolaktonem (HTL). Związki te stanowią produkty przemian metabolicznych metioniny (Met), która dostarczana jest do organizmu z pożywieniem pochodzenia zwierzęcego. Hcy i HTL biorą udział w licznych reakcjach biochemicznych, odgrywając tym samym kluczową rolę w metabolizmie człowieka. Co ważne, przeprowadzone badania kliniczne wykazały związek pomiędzy zaburzeniami ich

metabolizmu a rozwojem schorzeń układu sercowo-naczyniowego oraz chorób nowotworowych.

Podwyższony poziom Hcy (hiperhomocysteinemia) w osoczu krwi jest skorelowany z rozwojem szeregu schorzeń. Jedną z hipotez sugeruje, że za toksyczność Hcy odpowiada jej cykliczny tioester, to jest HTL (rys. 2). HTL, który jako szkodliwy metabolit jest usuwany z organizmu przez nerki, powstaje na skutek upośledzenia przemian w szlaku metabolicznym związków siarki, kiedy Hcy jest błędnie wybierana zamiast Met poprzez enzym – syntetazę metionilo-tRNA w procesie biosyntezy białek. Proces ten nasila się w stanach zaburzeń genetycznych i żywieniowych. HTL jest chemicznie bardzo reaktywny, przez co zmienia strukturę białek, wpływa negatywnie na ich funkcje oraz wywiera toksyczny wpływ na komórki. W wyniku reakcji HTL z resztami lizynowymi białek powstają tak zwane N-Hcy-białka, a reakcji towarzyszy wytworzenie wiązania peptydowego. Tworzenie S-Hcy-białka jest natomiast wynikiem reakcji pomiędzy grupami -SH cysteiny wbudowanej w białka a grupą -SH, Hcy. Metabolity te wywierają negatywny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie układu krwionośnego i przyczyniają się do powstawania wielu stanów patologicznych w organizmie człowieka. Badania wykazały, że HTL, modyfikując fibrynogen, utrudnia prawidłową hydrolizę skrzepów i przyczynia się do rozwoju zakrzepicy. Ponadto, podwyższone stężenie tego związku może działać jako niezależny czynnik ryzyka zawału mięśnia sercowego u pacjen-

tów z chorobą wieńcową. Wykazano także, że oprócz chorób sercowo-naczyniowych związek ten sprzyja rozwojowi wybranych rodzajów nowotworów, chorób nerek i chorób neurodegeneracyjnych. Co ważne, najnowsze wyniki badań wskazują, że możliwe jest przeciwdziałanie negatywnym skutkom wysokiego poziomu HTL w organizmie, poprzez prowadzenie suplementacji witaminami z grupy B, włączając witaminę B₆, B₉ oraz B₁₂.

Jak dotąd potwierdzono obecność HTL w płynach biologicznych człowieka, takich jak mocz, osocze i ślina. Co ciekawe, pomimo relatywnie dużego zainteresowania badaniami nad jego rolą w fizjologicznych i patologicznych przemianach w organizmie człowieka, w szczególności mechanizmami



Rys. 2. Ideowa struktura chemiczna Hcy i jego tioestru, HTL



DONSERV®

SPRZĘT
LABORATORYJNY I PRZEMYSŁOWY
DORADZTWO TECHNICZNE • SERWIS

Najwyższej jakości sprzęt, obsługa i serwis.

Wyposażamy i obsługujemy laboratoria w branżach:

- Biologia i biotechnologia
- Farmacja i kosmetyka
- Jednostki naukowo-badawcze
- Mikrobiologia
- Ochrona i badanie środowiska
- Przemysł chemiczny
- Przemysł metalurgiczny
- Przemysł paszowy
- Przemysł petrochemiczny
- Przemysł spożywczy
- Tworzywa sztuczne;



POLON-IZOT sp. z o.o.

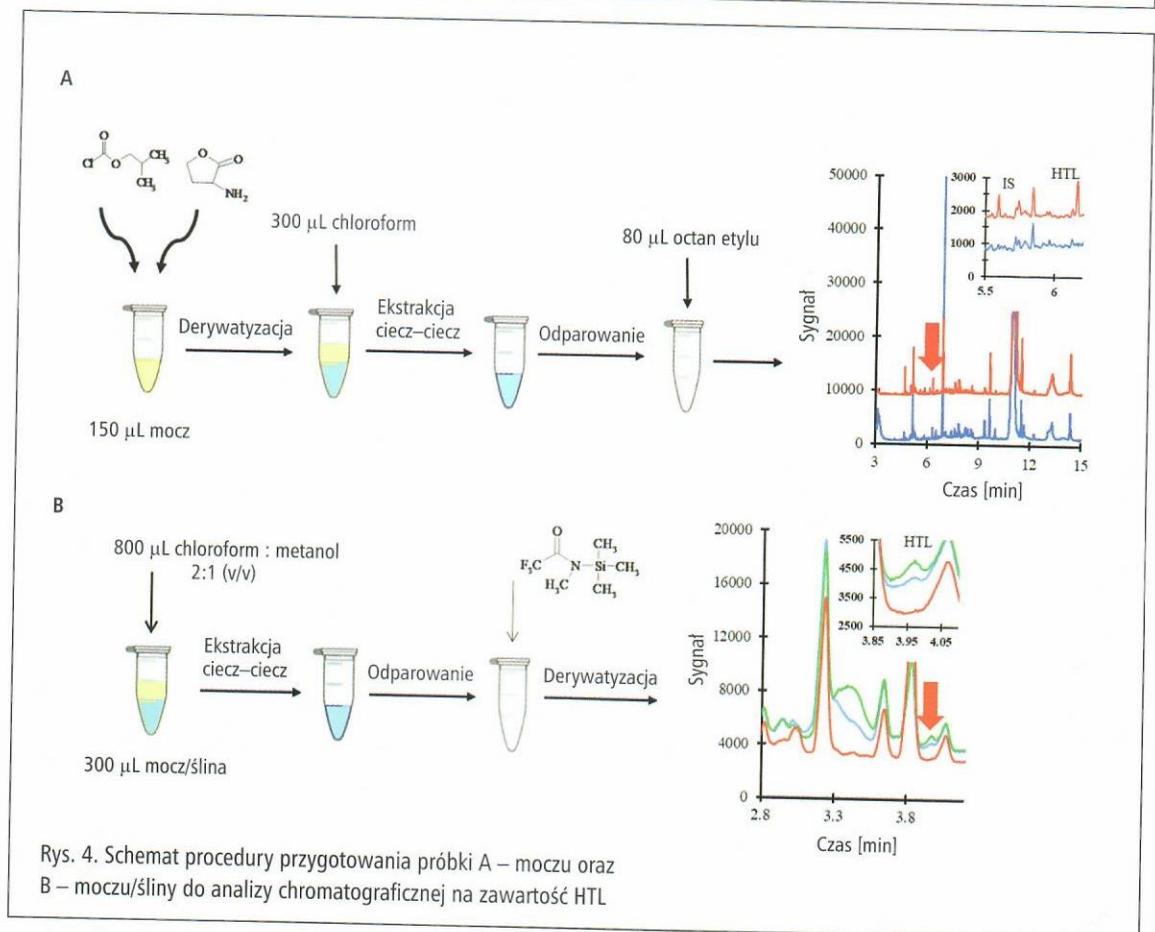
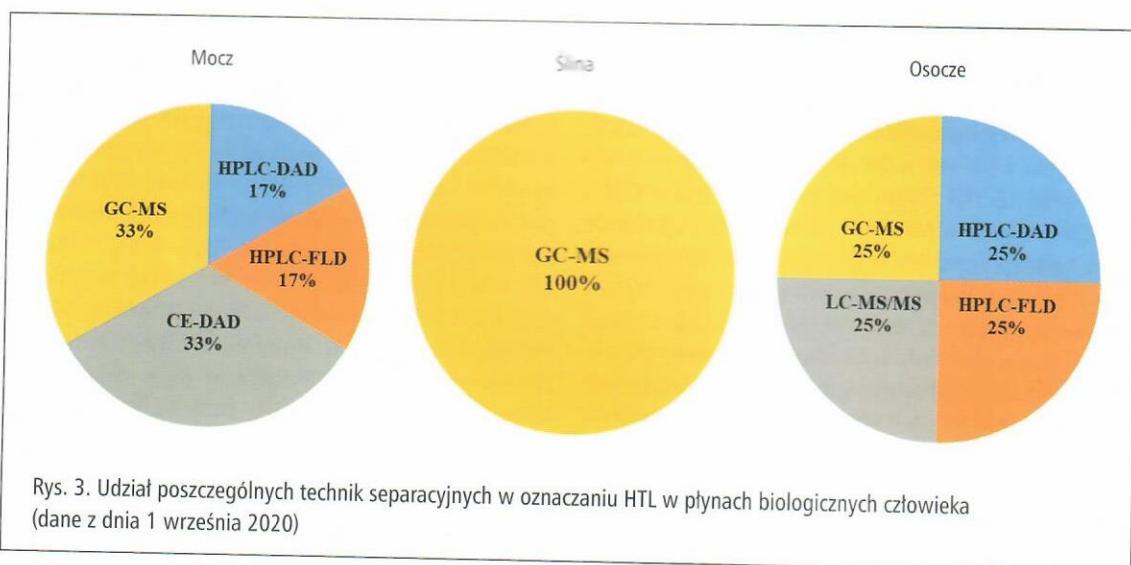
ANALIZA Paliw i olejów
Spektrometrem PI-300



DONSERV®

ul. Michała Spisaka 31, 02-495 Warszawa
tel.: 22 863-19-30, fax: 22 863-19-33
e-mail: info@donserv.pl

www.donserv.pl



tych przemian, opracowano jedynie kilka metod oznaczania HTL w próbkach biologicznych (rys. 3). Metody te w znacznej mierze opierają się na wykorzystaniu technik separacji w fazie ciekłej, w tym wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz elektroforezy kapilarnej i umożliwiają analizę moczu na zawartość HTL. Powód takiego stanu rzeczy jest dość prozaiczny. HTL, jako zbędny produkt przemian metabolicznych związków siarki, jest usuwany z organizmu przez nerki, wraz z moczem, a jego stężenie w tej matrycy jest co najmniej 100-krotnie

wyższe niż w osoczu. Biorąc jednak pod uwagę obecne trendy w bioanalizie oraz możliwości, jakie niesie ze sobą wykorzystanie nowoczesnych technik pomiarowych, należy spodziewać się, że w najbliższej przyszłości coraz to więcej uwagi będzie poświęcane ślinie. Obecnie z matrycą tą wiąże się duże nadzieje, jako materiałem odpowiednim do badań klinicznych, głównie ze względu na nieinwazyjny sposób pobrania próbki oraz zawartość szerokiego spektrum związków uznanych za wskaźniki rozwoju wielu chorób. Analizując dane zebrane na rysunku 3,

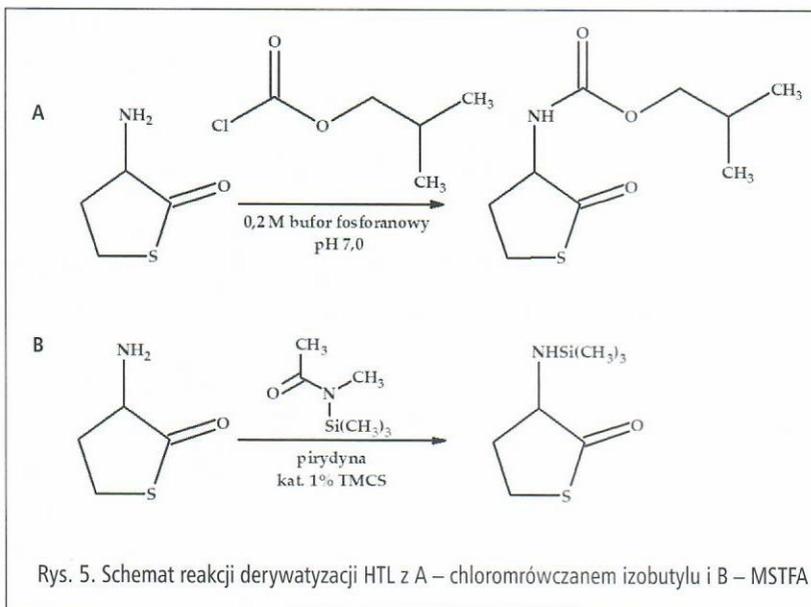
nie można nie zauważyć marginalnej pozycji, jaką metody oparte na technice GC MS zajmują w przypadku oznaczania HTL. Przypuszczalnie, do niedawna technika ta nie cieszyła się zbyt dużą popularnością wśród osób zajmujących się problematyką oznaczania HTL w płynach biologicznych, głównie ze względu na niekorzystne właściwości analitu uniemożliwiające jego bezpośrednie wykrycie.

Zaprojektowane w ostatnim czasie w naszym zespole procedury, umożliwiające oznaczenie HTL techniką GC MS w moczu i ślinie, wykazały, że derywatywacja chemiczna może efektywnie rozwiązać problem niekompatybilności analitu z wymaganiami stosowanej aparatury pomiarowej. We wspomnianych przypadkach procedura analityczna składała się z trzech etapów, a mianowicie ekstrakcji analitu w układzie ciecz–ciecz, derywatywacji chemicznej oraz następczej analizy chromatograficznej. Schemat przygotowania próbek moczu i śliny do analizy na zawartość HTL przedstawiono na rysunku 4. Kolejno prowadzone eksperymenty ujawniały szereg istotnych problemów, co pociągnęło za sobą konieczność modyfikacji poszczególnych etapów procedury analitycznej. Stosunkowo długi czas przygotowania próbki do analizy (>2h), charakterystyka kinetyki reakcji analitu z odczynnikiem derywatyżującym, ograniczona stabilność otrzymanej pochodnej oraz względnie niska precyzja opracowanej metody skłoniły nas do podjęcia próby zaprojektowania kolejnej procedury, obciążonej mniejszą liczbą ograniczeń (tab. 1). W konsekwencji pozwoliło to na oznaczenie analitu aż w dwóch matrycach, to jest w moczu oraz ślinie człowieka, przy zachowaniu tych samych warunków chromatograficznych.

Ze względu na strukturę cząsteczki HTL i wynikające z tego faktu brak lotności i stabilności termicznej oraz niską masę cząsteczkową, niezbędnym etapem w procedurze przygotowania próbki okazała się modyfikacja chemiczna. Oprócz uzyskania oczywistych korzyści, pozwalających na wykorzystanie w oznaczeniach techniki GC, otrzymano pochodną o właściwościach umożliwiających jej selektywną ekstrakcję z matrycy biologicznej do fazy organicznej. W konsekwencji zarejestrowany sygnał pochodnej HTL był łatwiejszy do identyfikacji, między innymi ze względu na usunięcie hydrofilowych składników próbki, mogących generować na chromatogramie sygnały interferujące. W badaniach testowano wyłącznie odczynniki derywatyżujące, które mogły reagować z cząsteczką analitu za pośrednictwem grupy $-NH_2$. Były nimi chloromrówczan izobutyli oraz N,O -bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid, które umożliwiły modyfikację chemiczną HTL w wyniku reakcji acylacji lub silylacji grupy $-NH_2$ (rys. 5). Przeprowadzone badania wykazały, że etapy derywatywacji i ekstrakcji można niekiedy prowadzić równocześnie, co dodatkowo pozwala na uniknięcie strat spowodowanych niewielką stabilnością otrzymywanej pochodnej. Nasze badania wykazały, że reakcja HTL z chloromrówczanem izobutyli przebiega w środowisku wodnym, bezpośrednio po

Tabela 1. Porównanie metod oznaczania HTL w moczu oraz w moczu i ślinie

Zalety	Ograniczenia
<p>HTL w moczu 2018 Application of GC MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine. Journal of Chromatography B 1099 (2018) 18–24</p>	
<ul style="list-style-type: none"> ■ zastosowanie standardu wewnętrznego ■ niska granica wykrywalności na poziomie 5 nM ■ derywatywacja prowadzona w temperaturze pokojowej ■ mała ilość zużytych odczynników 	<ul style="list-style-type: none"> ■ brak stabilności tworzonej pochodnej w środowisku wodnym ■ ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz obciążona dość dużym błędem, co utrudnia uzyskanie powtarzalnych wyników ■ czasochłonna procedura przygotowania próbki do analizy (>2h)
<p>HTL w moczu i ślinie 2020 Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B 1149 (2020) 122–155</p>	
<ul style="list-style-type: none"> ■ krótki całkowity czas analizy wynoszący ok. 4,2 minuty ■ możliwość analizy próbek moczu i śliny, przy zachowaniu tych samych warunków chromatograficznych 	<ul style="list-style-type: none"> ■ reakcja silylacji przebiega w obecności pirydyny ■ konieczność prowadzenia dość kłopotliwej i czasochłonnej ekstrakcji w układzie ciecz–ciecz



zmieszaniu reagentów. Ponieważ powstała pochodna wykazywała znacznie większą trwałość w fazie organicznej aniżeli wodnej, etapy derywatywacji i ekstrakcji połączono, oszczędzając dodatkowo czas. Kolejną korzyścią wynikającą z takiego podejścia było usunięcie białek, które mogą prowadzić do przedwczesnego zużycia, a nawet destrukcji układu chromatograficznego. Jak wiadomo, cząsteczka HTL posiada zdolność oddziaływania z powierzchnią białek, co w ostatecznym rozrachunku może skutkować zmniejszeniem odzysku analitu, a w konsekwencji podwyższeniem granicy oznaczalności metody. Zablockowanie grupy $-NH_2$

Tabela 2. Typowe trudności towarzyszące oznaczaniu HTL w moczu i ślinie techniką GC MS

Problem	Proponowany sposób rozwiązania
Zbyt niska lotność, niewielka trwałość termiczna analitu	<ul style="list-style-type: none"> ■ przeprowadzenie derywatywacji chemicznej
Znaczna złożoność matrycy, w tym obecność substancji wielkocząsteczkowych – białek	<ul style="list-style-type: none"> ■ uproszczenie matrycy na etapie przygotowania próbki do analizy, np. poprzez ekstrakcję ciecz–ciecz/ciecz–ciało stałe ■ odbiałczenie próbek poprzez dodatek kwasu nieorganicznego, rozpuszczalnika organicznego bądź na drodze ekstrakcji lub filtracji w obniżonej temperaturze na filtrach membranowych typu <i>cut-off</i>
Obecność wody w medium, w którym przebiega reakcja derywatywacji	<ul style="list-style-type: none"> ■ konieczność stosowania dokładnie osuszonych rozpuszczalników ■ odparowanie wodnych roztworów (próbek) do sucha i rozpuszczenie powstałego osadu w odpowiedniej mieszance derywatywującej
Konieczność utrzymywania podwyższonej temperatury reakcji derywatywacji	<ul style="list-style-type: none"> ■ prowadzenie reakcji derywatywacji w termostacie ■ prowadzenie derywatywacji w trybie online, z wykorzystaniem tzw. „nastrzyków kanapkowych”
Mała powtarzalność i względnie niska wydajność reakcji derywatywacji	<ul style="list-style-type: none"> ■ wprowadzenie do procedury analitycznej standardu wewnętrznego
Ograniczona trwałość utworzonej pochodnej	<ul style="list-style-type: none"> ■ określenie trwałości utworzonej pochodnej w różnych rozpuszczalnikach, do których utworzona pochodna będzie ekstrahowana ■ ekstrakcja analitu z roztworu wodnego do fazy organicznej ■ ścisła kontrola temperatury przechowywania próbki po etapie derywatywacji
Utworzenie więcej niż jednej pochodnej podczas derywatywacji	<ul style="list-style-type: none"> ■ optymalizacja warunków rozdzielania, w tym praca w trybie programowej temperatury pieca i detektora MS ■ detekcja w trybie SCAN lub SIM, podział czasu analizy na segmenty ■ optymalizacja temperatury dozownika próbek oraz trybu jego pracy, w tym określenie potrzeby wprowadzania próbki z lub bez podziału strumienia gazu nośnego
Niestabilność warunków chromatograficznych (piki „duchy”)	<ul style="list-style-type: none"> ■ praca układu GC w trybie programowej zmiany temperatury pieca ■ kondycjonowanie układu chromatograficznego pomiędzy analizami
Wysoka granica oznaczalności opracowanej metody	<ul style="list-style-type: none"> ■ optymalizacja temperatury dozownika oraz objętości próbki wprowadzanej do układu GC ■ optymalizacja parametrów pracy detektora MS ■ zażyczenie próbki na etapie jej przygotowania do analizy

w cząsteczce HTL w wyniku reakcji derywatywacji pozwoliło na znaczne ograniczenie tego problemu. W trakcie opracowywania procedur przygotowania próbek moczu oraz śliny do ich analizy na zawartość HTL, jak również na etapie doboru optymalnych warunków chromatograficznych, pojawiało się wiele problemów, które wynikały przede wszystkim z charakteru chemicznego analitu, ale i specyfiki badanego materiału biologicznego. W tabeli 2 zostały zestawione typowe trudności oraz możliwe sposoby ich rozwiązania. Ostatecznie, obydwie metody zostały z powodzeniem wykorzystane w analizie próbek pobranych od potencjalnie zdrowych ochotników. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości metody te mogą znaleźć zastosowanie w badaniach klinicznych prowadzonych na dużych populacjach.

Podsumowanie

Powszechnie przyjmuje się, że technika GC MS stanowi skuteczne narzędzie do efektywnego rozdzielania i identyfikacji lotnych składników próbek biologicznych. Z tego względu, w wielu przypadkach może wydawać się, że

jej wykorzystanie na okoliczność oznaczania związków nielotnych jest zadaniem irracjonalnym, a już na pewno trudnym do zrealizowania. Najnowsze badania dostarczają przekonujących dowodów, że podczas oznaczania HTL w próbkach biologicznych technika GC MS może stanowić przydatne i precyzyjne narzędzie, konkurencyjne w stosunku do tych opartych na technikach separacji w fazie ciekłej. Oczywiście niezbędnym lub wręcz kluczowym etapem procedury analitycznej jest w tym przypadku derywatywacja analitu. W wyniku tego procesu HTL przekształcany jest w lotną i termicznie stabilną pochodną, wykazującą właściwości fizykochemiczne sprzyjające rejestracji sygnału analitycznego. Co ważne, uproszczenie matrycy, będące wynikiem prowadzonej jednocześnie ekstrakcji ciecz–ciecz jest nie mniej ważne i stanowi o przydatności opracowanych metod.

Monika Wieczorek, Justyna Piechocka, Rafał Głowacki*

Katedra Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

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

5. Podsumowanie

Uwzględniając rolę HTL w patogenezie chorób cywilizacyjnych oraz małą dostępność metod umożliwiających jego oznaczenie w materiale powszechnie wykorzystywanym w diagnostyce, jako główny cel mojej pracy doktorskiej obrałam stworzenie odpowiednich narzędzi analitycznych. Postawiłam także hipotezę, że HTL jest obecny w ślinie człowieka, a następnie dokonałam jej pozytywnej weryfikacji. W ramach rozprawy doktorskiej opracowałam trzy nowe metody analityczne, umożliwiające oznaczenie zawartości HTL w próbkach moczu i śliny [D1, D2, D3]. W badaniach zastosowałam odmienne od klasycznego podejście w zakresie doboru techniki analitycznej. Po raz pierwszy wykazałam bowiem przydatność GC-MS do oznaczenia HTL w tak złożonych matrycach. Zaproponowałam oryginalne procedury przygotowania próbki do analizy, uwzględniając specyfikę GC. Szczególną uwagę zwróciłam na możliwość wykorzystania technik ekstrakcyjnych, także do odbiaływania próbki oraz odpowiednią modyfikację chemiczną analitu. Nowatorski charakter przeprowadzonych przeze mnie badań dotyczył również wykrycia HTL w ślinie człowieka. Dzięki temu możliwe było wstępne zbadanie relacji pomiędzy zawartością HTL w ważnych pod kątem diagnostyki płynach biologicznych, takich jak mocz oraz ślina [D2]. Opracowałam także procedurę oznaczania HTL w obecności Met, Cys i Hcy w ślinie [D3]. Jest to pierwsze doniesienie na temat możliwości wykorzystania GC do tego celu.

W trakcie opracowywania procedur przygotowania próbek moczu oraz śliny do ich analizy na zawartość HTL techniką GC-MS [D1, D2, D3], jak również na etapie doboru optymalnych warunków chromatograficznych, pojawiało się wiele problemów, które stały się inspiracją do napisania artykułu w czasopiśmie *Analityka*, w którym zestawiałam podstawowe trudności wraz z proponowanymi sposobami ich rozwiązania [D4].

Opracowane przeze mnie metody mogą stanowić w przyszłości użyteczne narzędzia analityczne, konkurencyjne w stosunku do tych opartych na technikach separacji w fazie ciekłej. Może się to przyczynić do lepszego zrozumienia fizjologicznej i patologicznej roli HTL w organizmach żywych, a także poszerzenia wiedzy na temat potencjału diagnostycznego śliny. Z punktu widzenia możliwości oznaczania HTL, opracowane przeze mnie metody istotnie wzbogacają wiedzę praktyczną z zakresu jego analityki.

5.1. Zalety i ograniczenia opracowanych metod

W każdej zaprojektowanej przeze mnie procedurze wykorzystałam klasyczne techniki przygotowania próbki do analizy, takie jak ekstrakcja, odbiańczanie oraz derywatywacja, które wywierają ogromny wpływ na dokładność i precyzję uzyskiwanych wyników. Aby otrzymać pochodną HTL kompatybilną z GC-MS, kluczowym etapem było przeprowadzenie reakcji chemicznej z odpowiednim odczynnikiem derywatyżującym. Okazało się to szczególnym wyzwaniem. Pomimo rygorystycznego przestrzegania stabilności warunków reakcji (stosunek molowy reagentów, czas, temperatura), powracał problem niskiej powtarzalności i wydajności. W efekcie obserwowałam znaczne fluktuacje wartości parametrów walidacyjnych, które nie zawsze spełniały kryteria przypisane dla próbek biologicznych.

Obecnie żaden z komercyjnie dostępnych odczynników derywatyżujących nie jest pozbawiony wad, dlatego też mając na uwadze znikomą ilość informacji na temat derywatywacji HTL, szczególną uwagę poświęciłam poszukiwaniom odpowiedniego reagenta. W swoich badaniach testowałam dwa odczynniki derywatyżujące, a mianowicie IBCF oraz MSTFA, które umożliwiły modyfikację chemiczną grupy aminowej HTL, odpowiednio w wyniku reakcji acylacji i silylacji. Moje badania wykazały, że reakcja HTL z IBCF może przebiegać w środowisku wodnym, bezpośrednio po zmieszaniu reagentów, co wymaga jednak od eksperymentatora przygotowania próbek w ścisłym reżimie czasowym. Jest to związane ze stosunkowo niewielką trwałością pochodnej. Ponieważ powstała pochodna wykazywała większą stabilność w fazie organicznej niżeli wodnej, etapy derywatywacji i ekstrakcji połączono, oszczędzając przy tym czas oraz minimalizując ewentualne straty wynikające z rozkładu pochodnej. Inne podejmowane przeze mnie działania zmierzające do ograniczenia całkowitego błędu popełnianego na etapie przygotowania próbki oraz jej końcowej analizy, polegały na wprowadzeniu standardu wewnętrznego (lakton homoseryny), który był obecny w badanym roztworze na każdym etapie procedury analitycznej (D1). Takie podejście potwierdziło, że obecność IS, który wykazuje duże podobieństwo strukturalne do oznaczanego analitu, a tym samym posiada podobne właściwości fizykochemiczne, wpływa korzystnie na precyzję metody. Co jednak należy podkreślić, stosunkowo długi czas przygotowania próbki do analizy (~2h), brak automatyzacji poszczególnych etapów, charakterystyka kinetyki reakcji oraz ograniczona stabilność pochodnej w roztworze wodnym są czynnikami, które w znacznym stopniu utrudniają przygotowanie dużej serii próbek, co może być problematyczne w przypadku badań populacyjnych. Mając na względzie powyższe fakty dotyczące wykorzystania IBCF

do derywatyzacji HTL, w kolejnym etapie podjęłam próbę znalezienia innego odczynnika derywatyzującego, dla którego reakcja z analitem przebiegałaby z większą wydajnością i powtarzalnością. Wybrałam do tego celu mieszaninę MSTFA i 1% TMCS, dzięki czemu, w wyniku reakcji otrzymałam trimetylosililową lotną pochodną (D2). W konsekwencji pozwoliło to na oznaczanie analitu w dwóch matrycach biologicznych, tj. moczu i ślinie, przy zachowaniu tej samej procedury przygotowania próbki oraz tych samych warunków rozdzielania chromatograficznego. Podobnie jednak jak w przypadku procedury opisanej w pracy D1, metoda nie jest wolna od ograniczeń. Pomimo, że całkowity czas analizy jednej próbki wynosi mniej niż 5 min, to ze względu na stosunkowo niską stabilność otrzymanej pochodnej HTL, próbki należy przygotowywać bezpośrednio przed analizą, zachowując stałe interwały czasowe podczas kolejnych operacji. Utrudnia to w oczywisty sposób analizę dużej serii próbek. Dodatkowo, reakcja sililacji zachodzi wyłącznie w obecności bezwodnej pirydyny, co wymaga pracy pod dygestorium przy zachowaniu niezbędnych środków ostrożności, ale także dokładnego osuszenia odczynników. W moich badaniach do odparowania pozostałości po etapie ekstrakcji wykorzystałam próżniowy koncentrator próbek, czego efektem była oszczędność czasu a także zmniejszenie szybkości rozkładu badanego związku. Złożoność matrycy biologicznej oraz obecność substancji przeszkadzających, takich jak białka w przypadku śliny, były głównym powodem wykorzystania ekstrakcji, która z jednej strony zwiększa selektywność poprzez wyeliminowanie z badanej próbki związków hydrofilowych, z drugiej zaś, prowadzona w sposób manualny przyczynia się do wzrostu całkowitego błędów analizy. Zakończone sukcesem eksperymenty, w których wykorzystałam reakcję sililacji do uczynienia HTL lotnym (D2), skłoniły mnie do kontynuowania badań w tym zakresie, przy założeniu, że w próbkach biologicznych znajdują się inne biologicznie ważne związki siarki, które powinny być oznaczane z HTL w jednym toku analitycznym (D3). Opracowana przeze mnie nowa procedura charakteryzuje się tym, że etap deproteinizacji prowadzony jest jednocześnie z redukcją wiązań dwusiarczkowych. Podejście to okazało się odpowiednie w kontekście skrócenia czasu przygotowania próbki. Z analitycznego punktu widzenia jest to również bardzo korzystne z powodu zwiększenia odzysku HTL oraz pozostałych analitów, a mianowicie Met, Cys i Hcy. Metoda została wykorzystana do oznaczania wspomnianych związków w próbkach śliny. Niestety, próby zaadoptowania tej metodyki do próbek moczu zakończyły się niepowodzeniem. Wybrane warunki chromatograficzne pozwoliły natomiast na efektywną separację poszczególnych składników próbki śliny, w wyniku czego uzyskałam cztery, dobrze rozdzielone sygnały analityczne, w tym pochodzący od

obiektem moich badań, czyli HTL. W konsekwencji metoda umożliwia jednoczesne oznaczanie czterech składników, w tym HTL i Met. Co należy podkreślić, prezentowana w ramach niniejszej rozprawy praca (D3) stanowi pierwsze doniesienie na ten temat. Podobnie jak w wyżej wymienionych przypadkach (D1, D2), postępowanie analityczne rozpoczynałam od usunięcia białek z materiału biologicznego, które skutecznie wytrącałam poprzez dodatek MeCN w wyznaczonym eksperymentalnie stosunku objętościowym 4:1 (v/v). Analogicznie do przypadku opisanego w pracy D2 pewnym utrudnieniem była konieczność stosowania bezwodnej pirydyny na etapie derywatyzacji, z wykorzystaniem mieszaniny MSTFA i 1% TMCS oraz ograniczona trwałość siliilowej pochodnej HTL, która utrudniała aplikację metody do badań populacyjnych.

5.2. Wnioski dotyczące śliny jako potencjalnego zamiennika moczu i osocza

Wykorzystywana w diagnostyce medycznej analiza płynów ustrojowych stanowi jedno z głównych źródeł informacji o stanie zdrowia pacjenta oraz występujących w jego organizmie zmianach patologicznych. Liczne badania naukowe potwierdzają, że wiele związków obecnych w ustroju człowieka pełni rolę markerów chorób. Istnieje zatem konieczność poszukiwania nowych, bardziej specyficznych wskaźników w różnych matrycach oraz opracowywania wysoce selektywnych i czułych metod analitycznych, które umożliwią ich oznaczanie. Kluczem do sukcesu jest odpowiednie pobranie materiału biologicznego do badań oraz jego obróbka przed pomiarem, co wymaga od badacza staranności na każdym etapie postępowania analitycznego. Zdecydowana większość opisanych badań klinicznych zmierza w kierunku oznaczenia jak największej liczby biomarkerów w płynach biologicznych, takich jak mocz i krew (osocze/surowica), które ze względu na złożoność matrycy dostarczają szeregu istotnych informacji o stanie fizjologicznym organizmu. Niemniej jednak istnieje konieczność poszukiwania nowych rozwiązań, które umożliwiłyby wczesne i trafne rozpoznanie schorzeń. Dlatego też w ostatnim czasie coraz więcej uwagi poświęca się tzw. niekonwencjonalnym matrycom, spośród których ślina cieszy się największym zainteresowaniem. Zebrane dowody potwierdzają, że może ona pełnić funkcję realnego zamiennika dla wyżej wspomnianych płynów ustrojowych. Przeprowadzone przeze mnie eksperymenty mogły umożliwić weryfikację tezy, która zakładała, że ślina może zastąpić w badaniach klinicznych tradycyjne płyny ustrojowe w kontekście badań nad związkiem HTL z rozwojem niektórych chorób. Przeprowadzone przeze mnie wstępne badania dotyczące korelacji pomiędzy zawartością HTL w moczu oraz ślinie nie dają w tej kwestii jednoznacznej

odpowiedzi. Bez wątplenia wymagają rozszerzenia na dużą grupę badawczą i to zarówno w odniesieniu do osób zdrowych jak i chorych. Co jednak należy podkreślić, opracowane przez mnie narzędzia analityczne, pomimo pewnych ograniczeń, umożliwiają oznaczanie HTL w obydwu tych matrycach i stwarzają możliwość takich badań.

Ślina to łatwo dostępny płyn biologiczny, którego pobranie do analizy odbywa się w sposób nieinwazyjny z minimalnym ryzykiem zarażenia personelu medycznego. Niemniej jednak atrakcyjność tej matrycy przypisywana jest głównie obecnym w niej związkom, których pozyskanie z innych źródeł byłoby niemożliwe. Co ważne, złożoność składu śliny jest mniejsza w porównaniu z krwią/moczem, co zapewnia zadawalającą rozdzielczość pomiędzy wszystkimi składnikami próbki w przypadku stosowania technik separacyjnych, a niższe stężenie białek minimalizuje ryzyko wiązania analitów przez duże biocząsteczki i ich utratę na etapie odbiałczania. Z drugiej strony, mniejsza w ujęciu stężeniowym zawartość analitów w ślinie, w porównaniu z ich poziomem we krwi, powoduje trudności w opracowaniu dostatecznie dokładnych, precyzyjnych i selektywnych metod analitycznych. Jest to szczególnie ważne w badaniach medycznych, których celem jest oparcie diagnozy na wynikach bazujących na wspomnianych narzędziach. Stwarza to konieczność pracy z wykorzystaniem bardzo czułych detektorów, które nie zawsze stanowią podstawowe wyposażenie laboratoriów naukowych, głównie ze względu na wysoki koszt zakupu i eksploatacji. W rezultacie, niewystarczająco czułe techniki detekcji, niskie stężenia analitów, zmienność składu matrycy, brak standaryzacji pobrania materiału do badań powodują, że ślina nadal nie stanowi pełnej alternatywy dla tradycyjnych płynów biologicznych. Niemniej jednak są to ograniczenia, które głównie poprzez intensywny rozwój technik przygotowania próbki do analizy mogą być znacząco zminimalizowane, zwłaszcza że ostatnie doniesienia literaturowe jednoznacznie potwierdzają pozytywną korelację stężeniową pomiędzy niektórymi analitami zawartymi w ślinie, moczu i osoczu krwi. Z pewnością wnioski dotyczące śliny, jako materiału odpowiedniego do badań zawartości HTL należy poddać dalszej weryfikacji, prowadząc rozszerzone eksperymenty na dużej grupie badawczej, zróżnicowanej pod względem płci, wieku, a być może też wagi oraz prowadzonego trybu życia i związanym z nim stanem zdrowia. Reasumując, pomimo niewątpliwych zalet wynikających z wykorzystania śliny w diagnostyce, w tym również korzyści ekonomicznych, materiał ten nadal nie stanowi pełnej alternatywy dla tradycyjnych płynów ustrojowych. Dzieje się tak głównie ze względu na bardzo niskie stężenia analitów i wynikające z tego faktu trudności z detekcją oraz problemy ze

standaryzacją próbki na etapie pobierania. Nie zmienia to jednak faktu, że badania w tym obszarze powinny być kontynuowane.

6. Wnioski końcowe

Na podstawie przeprowadzonych, w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej eksperymentów można sformułować szereg ważnych, z praktycznego punktu widzenia, wniosków.

1. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas może być z powodzeniem wykorzystywana jako technika analityczna podczas oznaczania HTL w próbkach moczu i śliny człowieka.
2. Najsłabszym ogniwem całej procedury analitycznej jest etap przygotowania próbki do analizy, a w szczególności moment przeprowadzania analitu w lotną pochodną.
3. Komercyjnie dostępne odczynniki takie jak chloromrówczan izobutyli oraz N-trimetylosililo-N-metylotrifluoroacetamid, mogą być wykorzystane do derywatywacji HTL, niemniej jednak w sposób szczególny należy kontrolować warunki, w których prowadzona jest reakcja.
4. Trwałość uzyskanych pochodnych jest ograniczona, toteż próbka powinna być przygotowywana bezpośrednio przed analizą, co z kolei może utrudniać potencjalne badania przesiewowe.
5. Przygotowanie próbki biologicznej do analizy, w tym przypadku śliny oraz moczu, wymaga zastosowania ekstrakcji w celu uproszczenia matrycy oraz zateżenia analitu.
6. HTL jest obecny w ślinie człowieka.
7. Stężenie HTL w ślinie jest zbliżone do tego, obserwowanego w próbkach moczu.
8. Nie stwierdzono jednoznacznie pozytywnej korelacji pomiędzy zawartością HTL w moczu i ślinie tych samych osób, co jednak może być wynikiem małej liczby zbadanych próbek.
9. Opracowane narzędzia analityczne są pierwszymi bazującymi na technice GC-MS, które umożliwiają oznaczanie HTL w moczu oraz ślinie człowieka i pomimo swoich ograniczeń, mogą stanowić realną alternatywę dla metod wykorzystujących HPLC i CE.

Abstract

The subject of the research conducted as a part of the dissertation was focused on elaboration of a new, reliable and robust methods based on gas chromatography-mass spectrometry technique (GC-MS), enabling determination of homocysteine thiolactone (HTL) in biological specimens in the presence of low molecular mass thiols, methionine (Met), homocysteine (Hcy), and cysteine (Cys). As a result the work provided convincing evidence that GC-MS technique can be successfully used in analysis of human urine and saliva for mentioned above non-volatile sulfur-containing compounds.

Taking into account the requirements of GC-MS, one of the main goals of my studies was to elaborate reliable and useful sample preparation procedures. On this field special attention I have paid on the possibilities of using extraction techniques, deproteinization, analytes preconcentration by drying under vacuum and appropriate chemical modification/derivatization of the compounds studied.

During the study three original methods I have developed. Moreover, I have proven that each of them is able to deliver valuable data concerning concentration of HTL in human urine and saliva. In this way, I was able to show for the first time that HTL is present in human saliva. It should be noted that saliva exhibit multiple distinct advantages over blood (plasma/serum) and urine as a diagnostic specimen. Measured values for salivary HTL are the first ever reported. Moreover, I have also examined a correlation between salivary concentration of HTL and its urinary levels. One of elaborated methodologies has been designed to simultaneous determination in a single run of HTL in the presence of a number of salivary biologically relevant compounds, such as Met, total Cys and Hcy. To the best of my knowledge, this is the first and the only available GC-MS based assay dedicated to salivary methionine related sulfur-containing compounds determination.

Elaborated assays are primarily characterized by a robust sample preparation procedure followed by GC-MS analysis. Finally, each of developed methodologies is characterized by satisfactory validation parameters, expressed as linearity, precision, accuracy and limit of quantification (LOQ). I have also shown that elaborated assays can act as an exquisite tools for determination of HTL in saliva as well as urine samples donated by apparently healthy volunteers. Thus, despite some limitations, they can be used in the future as an analytical tools facilitating finding of evidences supporting thesis dealing with association of aminothiols with cardiovascular diseases.

Wykaz cytowanej literatury

- [1] H. Jakubowski, Homocysteine in Protein Structure/Function and Human Disease, Chemical Biology of Homocysteine-containing Proteins, Springer, XIII (2013)7-18.
- [2] Y. Mukai, T. Togawa, T. Suzuki, K. Ohata, S. Tanabe, Determination of homocysteine thiolactone and homocysteine in cell cultures using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, J. Chromatogr. B, 767 (2002) 263-268.
- [3] R. F. Anderson, J. E. Packer, The radiolysis of aqueous solution of homocysteiny thiolactone, Int. J. Radiat. Phys. Chem., 6 (1974) 33-46.
- [4] H. Jakubowski, The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples, Anal. Biochem., 308 (2002) 112-119.
- [5] P. Furmaniak, P. Kubalczyk, R. Głowacki, Determination of homocysteine thiolactone in urine by field amplified sample injection and sweeping MEKC method with UV detection, J. Chromatogr. B, 961 (2014) 36-41.
- [6] K. Purgat, P. Olejarz, I. Kośka, R. Głowacki, P. Kubalczyk, Determination of homocysteine thiolactone in human urine by capillary zone electrophoresis and single drop microextraction, Anal. Biochem., 596 (2020) 113640.
- [7] H. Jakubowski, Molecular basic of homocysteine toxicity in humans, Cell Mol. Life Sci., 61 (2004) 470-487.
- [8] H. Jakubowski, Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans, J. Nutr., 130 (2000) 377-381.
- [9] H. Jakubowski, Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels, J. Biol. Chem., 272 (1997) 1935-1942.
- [10] H. Jakubowski, Mechanism of the Condensation of Homocysteine Thiolactone with Aldehydes, Chem-Eur. J., 12 (2006) 8039-8043.
- [11] J. Perła-Kaján, H. Jakubowski, Dysregulation of Epigenetic Mechanisms of Gene Expression in the Pathologies of Hyperhomocysteinemia, Int. J. Mol. Sci., 20 (2019) 3140.
- [12] A. Undas, J. Perła, M. Łaciński, W. Trzeciak, R. Kazimierski, H. Jakubowski, Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis, Stroke, 35 (2004) 1299-1304.
- [13] A. Undas, M. Jankowski, A. Padjas, H. Jakubowski, A. Szczeklik, Antibodies to N-homocysteinylated albumin as a marker for early-onset coronary artery disease in men, Thromb. Haemostasis, 93 (2005) 346-350.

- [14] G. Chwatko, H. Jakubowski, The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma, *Anal. Biochem.*, 337 (2005) 271-277.
- [15] G. Chwatko, H. Jakubowski, Urinary excretion of homocysteine-thiolactone in humans, *Clin. Chem.*, 51 (2005) 408-415.
- [16] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, An on-column derivatization method for the determination of homocysteine-thiolactone and protein N-linked homocysteine, *Amino Acids*, 41 (2011) 187-194.
- [17] G. Chwatko, G. H. J. Boers, K. A. Strauss, D. M. Shih, H. Jakubowski, Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine β -synthase gene, or a highmethionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice, *FASEB J.*, 21 (2007) 1707-1713.
- [18] H. Jakubowski, L. Zhang, A. Bardeguet, A. Aviv, Homocysteine Thiolactone and Protein Homocysteinylation in Human Endothelial Cells, *Circ. Res.*, 87 (2000) 45-51.
- [19] W. Gu, J. Lu, G. Yang, J. Dou, Y. Mu, J. Meng, C. Pan, Plasma homocysteine thiolactone associated with risk of macrovasculopathy in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus, *Adv. Ther.*, 25 (2008) 914-924.
- [20] A. Undas, H. Jakubowski, Letter by Undas and Jakubowski regarding article, Relationship between homocysteine and mortality in chronic kidney disease, *Circulation*, 114 (2006) 547.
- [21] S. R. Lentz, Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis, *J. Thromb. Haemostasis*, 3 (2005) 1646-1654.
- [22] S. Seshadri, A. Beiser, J. Selhub, P. F. Jacques, I. H. Rosenberg, R. B. D'Agostino, P. W. Wilson, P. A. Wolf, Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease, *N. Engl. J. Med.*, 346 (7) (2002) 476-483.
- [23] R. Moretti, P. Caruso, The controversial role of homocysteine in neurology: From labs to clinical practice. *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (2019) 231.
- [24] H. Jakubowski, Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels, *FASEB. J.*, 13 (1999) 2277-2283.
- [25] R. Głowacki, H. Jakubowski, Cross-talk between Cys-34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 10864-10871.

- [26] G. Ferretti, T. Bacchetti, E. Marotti, G. T. Curatola, Effect of homocysteinylation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity, *Metabolism*, 52 (2003) 146-151.
- [27] P. Paoli, F. Sbrana, B. Tiribilli, et al., Protein N-homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils, *J. Mol. Biol.*, 400 (2010) 889-907.
- [28] A. D. Smith, S. M. Smith, C. A. de Jager, et al., Homocysteine-Lowering by B Vitamins Slows the Rate of Accelerated Brain Atrophy in Mild Cognitive Impairment: A Randomized Controlled Trial, *PLoS ONE*, 5 (9) (2010) 12244.
- [29] R. Głowacki, E. Bald, H. Jakubowski, Identification and origin of *Nε*-homocysteinyll-lysine isopeptide in humans and mice, *Amino Acids*, 39 (2010) 1563-1569.
- [30] A. Undas, J. Perła, M. Łaciński, W. Trzeciak, R. Kazimierski, H. Jakubowski, Autoantibodies Against *N*-Homocysteinyllated Proteins in Humans, *Stroke* 35 (2004) 1299-1304.
- [31] A. Undas, M. Jankowski, A. Padjas, H. Jakubowski, A. Szczeklik, Antibodies to *N*-homocysteinyllated albumin as a marker for earlyonset coronary artery disease in men, *Thromb. Haemostasis*, 93 (2005) 346-350.
- [32] H. Jakubowski, Anti-*N*-homocysteinyllated protein autoantibodies and cardiovascular disease, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 43 (2005) 1011.
- [33] M. Sibrian-Vazquez, J. O. Escobedo, S. Lim, G. K. Samoei, R. M. Strongin, Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins, *PNAS*, 107 (2010) 551-554.
- [34] C. D. Smith, J. M. Carney, P. E. Starke-Reed, et al., Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease, *PNAS*, 88 (1991) 10540-10543.
- [35] C. N. Oliver, B. W. Ahn, E. J. Moerman, S. Goldstein, E. R. Stadtman, Age-related changes in oxidized proteins, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987) 5488-5491.
- [36] I. M. Gladstone Jr, R. L. Levine, Oxidation of proteins in neonatal lungs., *Pediatrics* 93 (1994) 764.
- [37] D. L. Sauls, E. Lockhart, M. E. Warren, A. Lenkowski, S. E. Wilhelm, M. Hoffman, Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia, *Biochemistry*, 45 (2006) 2480-87.
- [38] K. Borowczyk, J. Piechocka, R. Głowacki, I. Dhar, Ø. Midtun, G. S. Tell, P. M. Ueland, O. Nygård, H. Jakubowski, Urinary Excretion of Homocysteine Thiolactone and

the Risk of Acute Myocardial Infarction in Coronary Artery Disease Patients; the Western Norway B-Vitamin Intervention Trial, *J. Int. Med.*, 285 (2019) 232-244.

[39] L. A. Harker, S. J. Slichter, C. R. Scott, R. Ross, Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis, *N. Eng. J. Med.*, 291 (1974) 537-543.

[40] H. Jakubowski, Protein *N*-homocysteinylolation: implications for atherosclerosis, *Biomed. Pharmacother.*, 55 (2001) 443-447.

[41] K. Borowczyk, J. Tisończyk, H. Jakubowski, Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase, *Amino Acids*, 43 (2012) 1339-1348.

[42] R. J. Kaufman, Orchestrating the unfolded protein response in health and disease, *J. Clin. Invest.*, 110 (2002) 1389-1398.

[43] R. C. Austin, S. R. Lentz, G. H. Werstuck, Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease, *Cell Death Differ*, 11 (2004) 56-64.

[44] K. Borowczyk, J. Piechocka, R. Głowacki, I. Dhar, Ø. Midtun, G. S. Tell, P. M. Ueland, O. Nygård, H. Jakubowski, Urinary Excretion of Homocysteine Thiolactone and the Risk of Acute Myocardial Infarction in Coronary Artery Disease Patients; the Western Norway B-Vitamin Intervention Trial, *J. Int. Med.*, 285 (2019) 232-244.

[45] H. Jakubowski, Synthesis of homocysteine thiolactone in normal and malignant cells
W: Homocysteine metabolism: from basic science to clinical medicine, Rosenberg I H, Graham I, Ueland P M, Refsum H (red) Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (1997) 157-165.

[46] K. Kuśmierk, R. Głowacki, E. Bald, Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 855-860.

[47] E. Kaufman, I. B. Lamster, The diagnostic applications of saliva — a review, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 13 (2) (2002) 197–212.

[48] P. de Almeida, A. Gregio, M. Machado, A. de Lima, L. Azevedo, Saliva composition and functions: a comprehensive review, *J. Contemp. Dent. Pract.*, 9 (2008) 72-80.

[49] E. Gallardo, J. Queiroz, The role of alternative specimens in toxicological analysis, *Biomed. Chromatogr.*, 22 (2008) 795-821.

[50] K. Ngamchuea, K. Chaisiwamongkhol, C. Batchelor-Mcauley, R. G. Compton, Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers - a tutorial review, *Analyst*, 143 (2018) 81-99.

- [51] Tina Pfaffe, J. Cooper-White, P. Beyerlein, K. Kostner, C. Punyadeera, Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications, *Clin. Chem.*, 57 (5) (2011) 675–687.
- [52] D. Szydłarska, W. Grzesiuk, A. Kupstas, E. Bar-Andziak, Ślina jako materiał diagnostyczny, *Forum Medycyny Rodzinnej* tom 2, nr 6 (2008) 454-464.
- [53] R. Głowacki, K. Borowczyk, E. Bald, H. Jakubowski, On-column derivatization with o-phthalaldehyde for fast determination of homocysteine in human urine, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 2363-2366.
- [54] B. Arora, A. Narayanasamy, J. Nirmal, N. Halder, S. Patnaik, A. K. Ravi, T. Velpandian, Development and validation of a LC–MS/MS method for homocysteine thiolactone in plasma and evaluation of its stability in plasma samples, *J. Chromatogr. B*, 944 (2014) 49-54.
- [55] P. Deneshvar, M. Yazdanpanah, C. Cuthbert, D.E.C. Cole, Quantitative assay of plasmahomocysteine thiolactone by gas chromatography/mass spektrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003) 358-362.
- [56] J. Stachniuk, P. Kubalczyk, P. Furmaniak, R. Głowacki, A versatile method for analysis of saliva, plasma and urine for total thiols using HPLC with UV detection, *Talanta*, 155 (2016) 70–77.

Życiorys/dorobek naukowy

Przebieg wykształcenia

10.2017– obecnie	Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, studia stacjonarne, kierunek Studia Doktoranckie Chemii, specjalność chemia analityczna
10.2015 – 06.2017	Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, studia stacjonarne, kierunek chemia, specjalność analityka chemiczna, temat pracy: Woltamperometryczne oznaczanie monenzyny, tytuł zawodowy: Magister
10.2012 – 07.2015	Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii, studia stacjonarne, kierunek chemia, specjalność analityka chemiczna, temat pracy: Chromatografia gazowa w kryminalistyce, tytuł zawodowy: Licencjat

Efekty działalności naukowo–badawczej na etapie studiów II stopnia

Publikacje naukowe:

- K. Rudnicki, P. Landová, **M. Wrońska**, S. Domagała, J. Čáslavský, M. Vávrová, S. Skrzypek, *Quantitative determination of the veterinary drug monensin in horse feed samples by square wave voltammetry (SWV) and direct infusion electrospray ionization tandem mass spectrometry (DI-ESI-MS/MS)*, *Microchemical Journal*, 141 (2018) 220-228 (IF=4,821).

Rozdział w monografii:

- K. Rudnicki, **M. Wrońska**, S. Domagała, S. Skrzypek, *Zastosowanie elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra do oznaczania monenzyny w paszy dla koni*, Współczesne metody i sensory elektrochemiczne (red. B. Baś, M. Jakubowska, W. W. Kubiak); Wydawnictwo Naukowe AKAPIT, Kraków 2018.

Komunikaty konferencyjne - referaty

- 29.09.2018, Łódź, Konferencja "ZrozumiećNaukę", *Voltammetric assay of veterinary ionophore antibiotics and their determination in natural matrixes*, K. Rudnicki, **M. Wrońska**, S. Domagała, S. Skrzypek.
- 27.02.18, Delf – The Netherlands, International Seminar on Organic Materials & Interfaces, *The application of voltammetric techniques (SWV/SWAdSV) for the*

determination of veterinary drugs in environmental samples and the commercial formulation, K. Rudnicki, M. Brycht, **M. Wrońska**, S. Domagała, S. Skrzypek

- 30.03-02.04.2017, Białystok, Ogólnopolskie Studenckie Mikrosymposium Chemików, *Elektrochemiczne badanie monenzyny z wykorzystaniem elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra*, K. Rudnicki, **M. Wrońska**, S. Domagała, S. Skrzypek
- 05-09.04.2017, Stegna, Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Zastosowanie elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra do oznaczania wybranych antybiotyków weterynaryjnych w próbkach środowiskowych*, K. Rudnicki, **M. Wrońska**, S. Domagała, S. Skrzypek
- 18-19.05.2017, Warszawa, X Międzyuczelniane Seminarium Kół Naukowych, *Zastosowanie technik woltamperometrycznych (SWV/SWAdSV) do oznaczania antybiotyków weterynaryjnych w próbkach środowiskowych i w preparacie handlowym*, K. Rudnicki, M. Brycht, **M. Wrońska**, S. Domagała, S. Skrzypek
- 28-30.06.2017, Mestre, Wenecja, Włochy, YISAC 2017, 24th Young Investigators Seminar on Analytical Chemistry, *Electrochemical study of the ionophoric antibiotic – monensin and its voltammetric determination in a forage for horses*, K. Rudnicki, **M. Wrońska**, S. Domagała, S. Skrzypek.

Komunikaty konferencyjne - plakaty

- 22.06.2017, Łódź, VIII Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, *Woltamperometryczne oznaczanie monenzyny*, **M. Wrońska**, K. Rudnicki, S. Skrzypek.
- 30.03-02.04.2017, Białystok, Ogólnopolskie Studenckie Mikrosymposium Chemików, *Elektrochemiczne badanie monenzyny z wykorzystaniem elektrody srebrnej z odnawialnym filmem amalgamatu srebra*, K. Rudnicki, **M. Wrońska**, S. Domagała, S. Skrzypek.

Efekty działalności naukowo–badawczej uzyskane w trakcie studiów doktoranckich

Publikacje naukowe

- J. Piechocka, **M. Wieczorek**, R. Głowacki, *The First Gas Chromatography – Mass Spectrometry Based Method Enabling Determination of Methionine – Related Sulfur Containing Compounds In Human Saliva*, **International Journal of Molecular Sciences**, 21(23) (2020) 9252; (IF=5,923).

- J. Piechocka, **M. Wrońska**, R. Głowacki, *Chromatographic strategies for determination of aminothiols in human saliva*, **Trends in Analytical Chemistry**, 126 (2020) 115866; (IF=12,296).
- 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*, **International Journal of Molecular Sciences**, 21 (2020) 3548; (IF=5,923).
- J. Piechocka, **M. Wrońska**, G. Chwatko, H. Jakubowski, R. Głowacki, *Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry*, **Journal of Chromatography B**, 1149 (2020) 122155; (IF=3,205)
- **M. Wrońska**, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, R. Głowacki, *Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine*, **Journal of Chromatography B**, 1099 (2018) 15-24; (IF=3,205).

Rozdziały w monografii

- **M. Wrońska**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Chromatografia gazowa w analizie moczu i śliny na zawartość tiolaktonu homocysteiny*, **Analityka**, numer 1, rok (XIX) 2021, ISSN- 1509- 4650.
- K. Borowczyk, **M. Wrońska**, J. Piechocka, R. Głowacki, *Derywatyżacja w kolumnie-możliwości i ograniczenia*, **Analityka**, numer 2, rok (XIX) 2018, ISSN- 1509- 4650.

Komunikaty konferencyjne - referaty

- 23-27.06.2021, Opole, Quo Vadis Life Sciences, *Gas chromatography-mass spectrometry based approaches for the determination of nonvolatile sulfur-containing compounds in human biofluids*, J. Piechocka, **M. Wiczorek**, R. Głowacki.
- 10-12.09.2020, I Ogólnopolska Konferencja Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Problematyka oznaczania tiolaktonu homocysteiny w próbkach biologicznych techniką chromatografii gazowej*, **M. Wrońska**, D. Pietrzyk, J. Piechocka, R. Głowacki.
- 02-06.09.2019, Warszawa, 62 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Chromatograficzne badania tiazolidynowej pochodnej witaminy B₆*, **M. Wrońska**, J. Piechocka, I. E. Głowacka, R. Głowacki.

- 20-23.03.2019, Bremen, 21 JCF Fruhjahrssymposium, *First attempt to homocysteine thiolactone measurements in human saliva*, J. Piechocka, **M. Wrońska**, R. Głowacki.
- 17-21.09.2018, Kraków, 61 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Wykorzystanie technik separacyjnych do oznaczania tiolaktonu homocysteiny (HTL) w moczu człowieka*, **M. Wrońska**, J. Piechocka, G. Chwatko, R. Głowacki.
- 17-21.09.2018, Kraków, 61 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, *Chromatograficzne badania śliny pod kątem trwałości i obecności tiolaktonu homocysteiny (HTL)*, J. Piechocka, K. Wiśniewska, **M. Wrońska**, R. Głowacki.

Komunikaty konferencyjne - plakaty

- 25.09.2020, Poznań, *Homocysteine Mini-Conference, The GC-MS assay for homocysteine thiolactone quantification in human saliva*, J. Piechocka, **M. Wieczorek**, G. Chwatko, H. Jakubowski, R. Głowacki.
- 10-12.09.2020, Łódź, I Ogólnopolska Konferencja Online SSPTChem 2020, *Wykorzystanie techniki chromatografii gazowej do oznaczania nielotnych związków siarki w płynach biologicznych człowieka*, D. Pietrzyk, **M. Wieczorek**, J. Piechocka.
- 15-18.09.2019, Łódź, 25th International Symposium on Separation Sciences, *Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human saliva*, **M. Wrońska**, J. Piechocka, G. Chwatko, R. Głowacki.
- 9-10.05.2019, Łódź, VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, *A rapid method for the determination of pyridoxine in pharmaceutical preparation by HPLC*, **M. Wrońska**, K. Jałmużna, R. Głowacki.
- 8.12.2018, Warszawa, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej PTChem 2018, *A simple chromatographic assay for the determination of clorsulon in milk samples*, **M. Wrońska**, R. Głowacki.
- 1-5.07.2018, Lublin, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, *Zastosowanie chromatografii gazowej z detekcją mas do oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka*, **M. Wrońska**, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, R. Głowacki.
- 10 - 11.05.2018, Łódź, VI Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, *Oznaczanie retinolu i kwasu askorbinowego techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej*, **M. Wrońska**, R. Głowacki.
- 11-12.05.2017, Łódź, V Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, *Woltamperometryczne (SWV) oznaczanie monenzyny w paszy dla koni*, K. Rudnicki, **M. Wrońska**, S. Domagała, S. Skrzypek.

Udział w projektach badawczych

- 10.2019-12.2020, **Wykonawca** w projekcie nr 2017/27/B/ST4/01476: *Creation of chromatographic tools for examination of thiazolidine derivatives of vitamin B6* (źródło: Narodowe Centrum Nauki, Opus).
- 10.2018-10.2019, **Wykonawca** w projekcie nr 2018/02/X/ST4/00779: *Badania trwałości tiolaktonu homocysteiny (HTL) w ślinie* (źródło: Narodowe Centrum Nauki, Miniatura).

Prowadzenie zajęć dydaktycznych:

- 03.2019-04.2021, Prowadzenie zajęć dydaktycznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego obejmujących konwersatoria oraz laboratoria z przedmiotu: Techniki elektromigracyjnie w analizie chemicznej, Chromatografia cieczowa w analizie chemicznej, Pracownia specjalizacyjna, Nowoczesne techniki analizy instrumentalnej, Czynniki chemiczne w środowisku.

Działalność organizacyjna:

Udział w organizacji konferencji naukowych:

- 15-18.09.2019, Łódź, 25th International Symposium on Separation Sciences
- 9-10.05.2019, Łódź, VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii

Dodatkowe osiągnięcia:

- Stypendium dla najlepszych doktorantów (10.2018, 10.2020)
- Zwiększenie stypendium doktoranckiego z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych (10.2020)
- Nagrody II stopnia za najlepszą publikację naukową Wydziału Chemii w roku 2020 (współautorzy: prof. dr hab. Rafał Głowacki, dr Justyna Piechocka, **mgr Monika Wieczorek**).
- Zespołowa Nagroda Rektora stopnia I za cykl publikacji zatytułowany *Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie próbek biologicznych na zawartość endo- i egzogennych związków siarki*, 2021.

Oświadczenia współautorów

dr Kamila Borowczyk

Łódź, 19.10.2021 r.

Katedra Chemii Środowiska
Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 163
90-236 Łódź

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w pracę zatytułowaną *Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine (Journal of Chromatography B 1099 (2018) 18–24)*, włączoną przez Panią mgr Monikę Wieczorek (Wrońską) do rozprawy doktorskiej polegał na konsultacjach naukowych w zakresie przygotowania próbki biologicznej do analizy.

Kamila Borowczyk



WYDZIAŁ
CHEMII

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 15.07.2021 r.

dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ
Katedra Chemii Środowiska
tel. 042-635-58-43

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w wymienionych poniżej pracach, włączonych przez Panią mgr Monikę Wrońską (Wieczorek) do rozprawy doktorskiej polegał na konsultacji naukowych dotyczących przygotowania próbki do analizy.

1. J. Piechocka, M. Wrońska, G. Chwatko, H. Jakubowski, R. Głowacki, Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. B, 1149 (2020) art. nr 122155. (5%)
2. M. Wrońska, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, R. Głowacki, Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine. J. Chromatogr. B, 1099 (2018) 18-24. (5%)

Grażyna Chwatko



WYDZIAŁ
CHEMII

Uniwersytet Łódzki

prof. dr hab. Rafał Głowacki
Katedra Chemii Środowiska

Łódź, 18.10.2021

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w nizej wymienionych pracach, włączonych przez Panią mgr Monikę Wieczorek (Wrońska) do rozprawy doktorskiej polegał na zarysowaniu koncepcji badawczej, pomocy w dyskusji wyników oraz pomocy w redakcji manuskryptów.

1. M. Wrońska, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, **R. Głowacki**, Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine, *Journal of Chromatography B*, 1099 (2018) 18–24.
2. J. Piechocka, M. Wrońska, G. Chwatko, H. Jakubowski, **R. Głowacki**, Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 1149 (2020) 122155.
3. J. Piechocka, M. Wieczorek, **R. Głowacki**, Gas Chromatography–Mass Spectrometry Based Approach for the Determination of Methionine-Related Sulfur-Containing Compounds in Human Saliva, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2020), 21(23), 9252.
4. M. Wrońska, J. Piechocka, **R. Głowacki**, Chromatografia gazowa w analizie moczu i śliny na zawartość tiolaktonu homocysteiny, *Analityka* - numer 1, rok (XIX) 2021, ISSN-1509- 4650.

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w pracy zatytułowanej *Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry*, opublikowanej w *Journal of Chromatography B*. 1149 (2020) 122155, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej mgr Moniki Wieczerek polegał na konsultacjach naukowych oraz korekcie językowej manuskryptu.



Prof. dr. hab. Hieronim Jakubowski

dr hab. Paweł Kubalczyk, prof. UŁ

Łódź, 19.10.2021 r.

Katedra Chemii Środowiska
Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 163
90-236 Łódź

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w pracę zatytułowaną *Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine (Journal of Chromatography B 1099 (2018) 18-24)*, włączoną przez Panią mgr Monikę Wieczorek (Wrońską) do rozprawy doktorskiej polegał na konsultacjach naukowych w zakresie przygotowania próbki do analizy.



dr Justyna Piechocka
Katedra Chemii Środowiska
Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 163
90-236 Łódź

Łódź, 18.10.2021

Oświadczenie

Oświadczam, że mój udział w niżej wymienionych pracach, włączonych przez Panią mgr Monikę Wieczorek (Wrońską) do rozprawy doktorskiej polegał na współdziałaniu w tworzeniu koncepcji badawczej, pomocy w dyskusji wyników oraz pomocy w redakcji manuskryptów.

1. M. Wrońska, G. Chwatko, K. Borowczyk, J. Piechocka, P. Kubalczyk, **R. Głowacki**, Application of GC-MS technique for the determination of homocysteine thiolactone in human urine, *Journal of Chromatography B*, 1099 (2018) 18–24.
2. J. Piechocka, M. Wrońska, G. Chwatko, H. Jakubowski, **R. Głowacki**, Quantification of homocysteine thiolactone in human saliva and urine by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 1149 (2020) 122155.
3. J. Piechocka, M. Wieczorek, **R. Głowacki**, Gas Chromatography–Mass Spectrometry Based Approach for the Determination of Methionine-Related Sulfur-Containing Compounds in Human Saliva, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2020), 21(23), 9252.
4. M. Wrońska, J. Piechocka, **R. Głowacki**, Chromatografia gazowa w analizie moczu i śliny na zawartość tiolaktonu homocysteiny, *Analityka* - numer 1, rok (XIX) 2021, ISSN-1509-4650.

