

UNIwersYTET ŁÓDZKI

Wydział Chemii

Katedra Chemii Środowiska

Zakład Dydaktyki Chemii i Popularyzacji Nauki

***Wykorzystanie soli piryliowych do oznaczania jonów
siarczkowych w wybranych matrycach biologicznych
za pomocą techniki HPLC/DAD***

*The use of pyrylium salts for the determination of sulfide ions in selected
biological matrices using the HPLC/DAD technique*

mgr Wiktoria Frankiewicz

Tryb studiów: stacjonarne studia doktoranckie

Specjalność: chemia analityczna

Nr albumu: 5902

*Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
dra hab. Roberta Zakrzewskiego, prof. UŁ*

Łódź, 2023

Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania dla
dra hab. Roberta Zakrzewskiego, prof. UŁ
za każdą cenną poradę,
liczne wskazówki merytoryczne,
za wskazanie fachowej literatury, a także
za wiele życzliwych słów i poświęcony czas w trakcie
wykonywania niniejszej pracy doktorskiej.*

*Bardzo dziękuję dr Katarzynie Urbaniak za pomoc
w syntezie oraz identyfikacji
związku chemicznego chloranu(VII)
4-[p-(N,N-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu (LN1),
która przyczyniła się do pomyślnego zrealizowania
założonych celów badawczych.*

*Pragnę podziękować też wszystkim
pracownikom Katedry Chemii Środowiska za życzliwość,
która spotykała mnie na każdym kroku
i okazaną pomoc.*

*Serdecznie dziękuję mojemu mężowi Patrykowi
i rodzicom za nieocenione wsparcie,
ogromną cierpliwość i wyrozumiałość.*

Spis treści

Spis treści

1. Wprowadzenie

1.1. Wstęp.....	7
1.2. Cel pracy	8

2. Część teoretyczna

2.1. Właściwości, zastosowania i reaktywność soli piryliowych	11
2.2. Właściwości i zastosowania jonów siarczkowych - siarkowodór i siarczki nieorganiczne	14
2.3. Metody oznaczania jonów siarczkowych.....	25

3. Część doświadczalna

3.1. Sprzęt laboratoryjny	36
3.2. Aparatura pomiarowa.....	36
3.3. Odczynniki chemiczne	40
3.3.1. Synteza odczynnika derywatyizującego LN1	40
3.4. Przygotowanie roztworów.....	41
3.5. Procedury analityczne	45
3.6. Oznaczanie jonów siarczkowych za pomocą soli piryliowych	54
3.6.1. Badania wykonane na próbkach standardów.....	54
3.6.1.1. Optymalizacja warunków chromatograficznych	54
3.6.1.2. Optymalizacja warunków reakcji derywatyizacji.....	57
3.6.1.3. Wyznaczenie zakresu oznaczalności metod.....	67
3.6.2. Badania wykonane na próbkach z ludzkim moczem.....	73
3.6.2.1. Optymalizacja warunków reakcji derywatyizacji.....	73
3.6.2.2. Wyznaczenie zakresu oznaczalności metod.....	76
3.6.2.3. Oznaczanie jonów siarczkowych w ludzkim moczu	81
3.6.3. Badania wykonane na próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej.....	89
3.6.3.1. Optymalizacja procesu homogenizacji.....	89
3.6.3.2. Optymalizacja warunków reakcji derywatyizacji.....	92
3.6.3.3. Wyznaczenie zakresu oznaczalności metod.....	95
3.6.3.4. Oznaczanie jonów siarczkowych w homogenacie tkanki wątroby kurzej	101
3.7. Podsumowanie oraz wnioski	108

Streszczenie	112
---------------------------	-----

Abstract	115
-----------------------	-----

Wykaz skrótów	118
----------------------------	-----

Bibliografia	121
---------------------------	-----

1.

Wprowadzenie

1.1. Wstęp

Już od wielu lat następuje prężny rozwój wielu gałęzi przemysłu (przykładowo: chemiczny, farmaceutyczny, lotniczy, kosmiczny, elektroniczny, elektrotechniczny itp.) oraz rolnictwa. Łączy się to również z wykorzystywaniem oraz generowaniem ogromnej ilości toksycznych związków chemicznych, ścieków oraz odpadów, które przenosząc się do środowiska, przyczyniają się do jego zanieczyszczenia. Substancjami zanieczyszczającymi środowisko naturalne są m.in.: tlenek węgla(II), tlenek węgla(IV), tlenek siarki(IV), tlenek siarki(VI), siarkowodor, tlenki azotu, metale ciężkie (kadm, chrom, nikiel, miedź, bizmut, ołów, rtęć), sole (siarczki, chlorki, azotany, siarczany), pierwiastki promieniotwórcze spowodowane skażeniami radioaktywnymi oraz związki pochodzenia organicznego (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, polichlorowane bifenyle, detergenty, dioksyny, pestycydy, fenole). Duża ilość tych substancji gromadzi się w wodzie, glebie i organizmach żywych, co więcej charakteryzują się zdolnością do migracji i transformacji, wywołując destrukcyjny wpływ na ludzi i środowisko przyrodnicze.

Dlatego istotną funkcją stawianą współczesnej chemii analitycznej jest systematyczne kontrolowanie stężenia związków chemicznych wykorzystywanych w różnych dziedzinach działalności człowieka oraz stopnia zanieczyszczenia środowiska. W związku z tym stosuje się metody pozwalające na dokładną, szybką i zarazem mało kosztowną analizę jakościową i ilościową analizowanych próbek. Stosowane procedury odznaczają się wysoką czułością i możliwością oznaczania związków chemicznych w skomplikowanych matrycach. Dzięki nieustającemu rozwojowi różnych metod analizy instrumentalnej staje się możliwe tworzenie nowych i lepszych procedur oznaczania związków chemicznych, które będą lepiej spełniać powyżej wymienione kryteria.

W chwili obecnej obszerne zastosowanie w chemii analitycznej, z powodu swoich wielu zalet, odnalazły techniki separacyjne. Cechują się wysoką selektywnością i czułością, oraz możliwością jednoczesnego oznaczenia dużej ilości związków w złożonych i różnorodnych matrycach (np. mocz, surowica, krew, osocze, tkanki zwierzęce, gleba, ścieki, powietrze, woda). W metodach wykorzystujących chromatografię cieczową, gazową i nadkrytyczną często koniecznym etapem w procedurze przygotowania próbki jest derywatyzacja. Stosuje się ją w celu ulepszenia właściwości separacyjnych samego analitu oraz zwiększenia czułości metody. Jednakże odczynnik derywatyzujący musi spełniać wiele warunków. Powinien on reagować szybko z analitem oraz ze 100%-ową wydajnością, w dodatku tworząc wyłącznie jedną i trwałą w warunkach chromatografowania pochodną. Poza tym sygnał analityczny

odczynnika derywatyzującego nie może zakłócać sygnału analitycznego pochodzącego od pochodnej analitu. Dodatkowo wszystkie składniki próbki poza składnikiem analitycznym nie mogą utrudniać przebiegu reakcji derywatywacji, mowa o tzw. efekcie matrycowym, który może zarówno podwyższać, jak i obniżać wyniki oznaczenia ilościowego badanego analitu. W związku z tym zagadnienie dotyczące reakcji derywatywacji cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem wśród analityków chemicznych. Ciągłe opracowywane są nowoczesne, selektywne, precyzyjne, rutynowe i mało kosztowne metody oznaczania związków chemicznych z zastosowaniem nowych reakcji derywatywacji. Obecnie do jednych z najbardziej popularnych technik separacyjnych stosowanych w analizie instrumentalnej należy wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) sprzężona z różnymi technikami detekcji (np. FLD, CD, LC-MS, RID, FTIR, NMR itp.). Jej najistotniejszą cechą jest możliwość wykonywania analiz jakościowych i ilościowych wielu oznaczanych związków chemicznych podczas pojedynczego cyklu badawczego, w dodatku przy ich niskich stężeniach oraz skomplikowanej matrycy próbki. Oprócz tego kolejną zaletą tej techniki jest krótki czas analizy (od kilku do kilkunastu minut) oraz potrzebna niewielka objętość próbki (od 1 μ l do 100 μ l), w celu wykrycia lub oznaczenia w niej badanego składnika.

1.2. Cel pracy

Celem moich badań naukowych było opracowanie dwóch czułych, selektywnych i rutynowych metod analitycznych polegających na oznaczaniu jonów siarczkowych w wybranych matrycach biologicznych (ludzki mocz oraz wątroba kurza). Ze względu na dużą tendencję do utleniania, brak barwy oraz niską trwałość badanego analitu w analizowanych próbkach wykorzystałam reakcję derywatywacji. Posłużyły do tego dwa specyficzne odczynniki derywatywujące, które są solami piryliowymi:

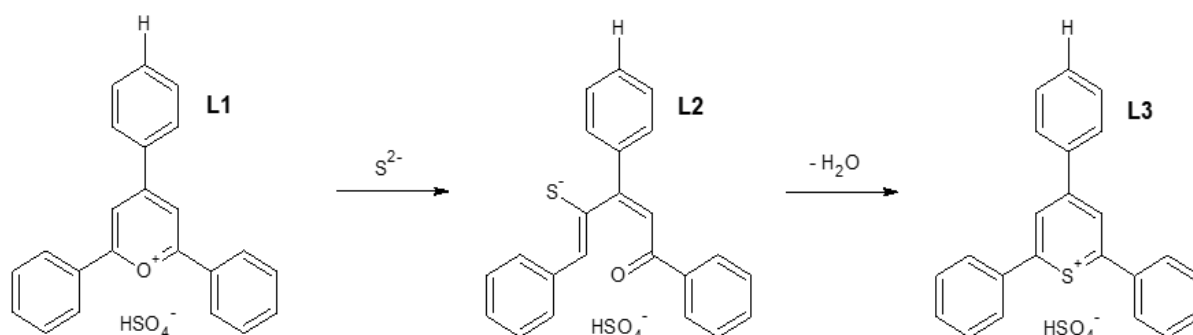
- ◆ wodorosiarczan(VI) 2,4,6-trifenylopirylu (L1),
- ◆ chloran(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu (LN1).

Za pomocą których otrzymałam odpowiednio następujące barwne pochodne:

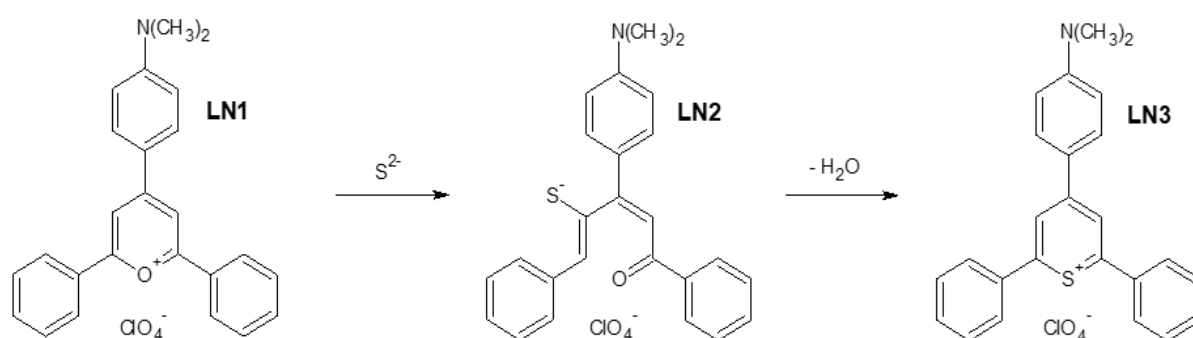
- ◆ wodorosiarczan(VI) 2,4,6-trifenylopirotiopyrylu (L3 - ciemnożółta barwa),
- ◆ chloran(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirotiopyrylu (LN3 - ciemnoniebieska barwa).

Charakteryzujące się o wiele korzystniejszymi właściwościami fizykochemicznymi (Rysunek 1. i 2.). Powstałe związki chemiczne to sole tiopyryliowe. W swoich badaniach naukowych wykorzystałam technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z detekcją

UV/VIS oraz matrycą fotodiodową (HPLC/DAD). Technika ta nadal intensywnie się rozwija i znajduje coraz szersze zastosowanie, nie tylko w analizie chemicznej, toksykologicznej czy farmakologicznej, ale także w oczyszczaniu substancji oraz badaniach nad ich czystością.



Rysunek 1. Proponowany schemat reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą wodorosiarczynu(VI) 2,4,6-trifenylopirylu (L1), metoda 1.



Rysunek 2. Proponowany schemat reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą chloranu(VII) 4-[p-(N,N-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu (LN1), metoda 2.

Oznaczane jony siarczkowe znalazły na przestrzeni lat różne zastosowania, m.in. w medycynie (leczenie egzemy, trądziku, reumatoidalnego zapalenia stawów, osteoporozy, dyskopatii, dny moczanowej, miażdżycy, cukrzycy), kosmetologii (szampony, kremy, kosmetyki do kąpieli), chemii gospodarczej (preparaty przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne) oraz stały się obiektem wielu badań analizy instrumentalnej (techniki elektrochemiczne, spektroskopowe, chromatograficzne oraz ich odmiany). Wykrywanie i oznaczanie ich jest istotne również ze względu na wysoką toksyczność jaką wykazują w stosunku do człowieka i środowiska naturalnego. Dwoista natura tych jonów uzależniona jest ściśle od ich stężenia.

Część doświadczalna niniejszej pracy doktorskiej składa się z kilku głównych elementów takich jak: optymalizacji warunków chromatograficznych, optymalizacji przebiegu reakcji derywatywacji, walidacji opracowanych metod analitycznych, oznaczenia anionów siarczkowych w matrycach pochodzenia biologicznego, optymalizacji procesu homogenizacji materiału biologicznego (dotyczy wyłącznie badań naukowych nad zawartością jonów siarczkowych w homogenacie tkanki wątroby kurzej), podsumowania i wniosków.

2.

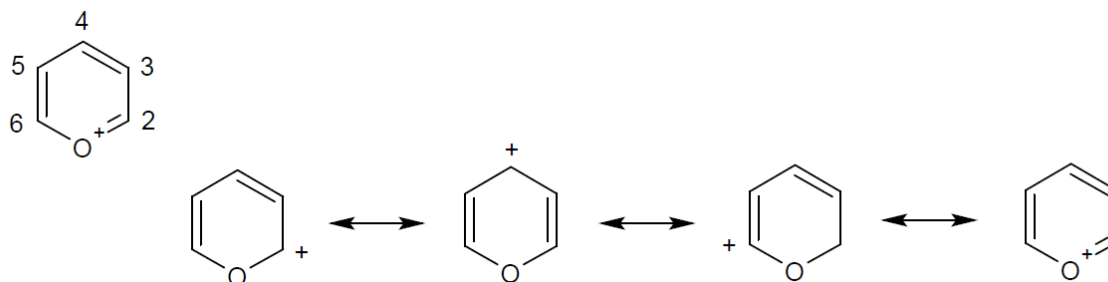
*Część
teoretyczna*

2.1. Właściwości, zastosowania i reaktywność soli piryliowych

Na przestrzeni lat sole piryliowe odnalazły zastosowanie m.in. w biotechnologii, farmacji, chemii, analityce medycznej czy różnych gałęziach przemysłu. Przede wszystkim sole piryliowe wykorzystuje się do syntezy innych związków heterocyklicznych, takich jak: pochodne pirydyny, sole betainy, pochodne furanu, sole pirydyniowe, barwniki, fosfiny, sole tiopiryliowe, pochodne benzenu itp., które stanowią zazwyczaj ważne substraty w syntezach totalnych złożonych substancji aktywnych (np. alkaloidy). Świadczy to o tym, że tak otrzymane związki chemiczne zazwyczaj są nieosiągalne innymi drogami lub ich synteza jest zbyt kosztowna. Przeszło sto lat temu, czyli przed tym, jak poznano budowę chemiczną soli piryliowych, zauważono, że tetrafluoroboran 2,4,6-trifenylopiryliowy charakteryzuje się silną fluorescencją. W związku z właściwościami fluorescencyjnymi wyżej wspomnianej soli piryliowej, znalazła zastosowanie jako ośrodek czynny laserów [1]. Przyczyniając się do znacznej poprawy skuteczności lasera, zbliżoną do rodaminy 6G - wysoce fluorescencyjny barwnik organiczny. Dzięki wysokiej fotostabilności oraz wydajności kwantowej fluorescencji wykorzystuje się go do wskaźników ciągu wody, które określają kierunek i szybkość przepływu [2, 3]. Następnym zastosowaniem soli piryliowych są czujniki chemiczne i biologiczne, dla przykładu chlorek 4-(3-amino-4-hydroksyfenylo-2,6-bis(4-metoksyfenylo)piryliowy służy do wykrywania amin, tlenków azotu oraz w aminokwasach grup aminowych [4]. Natomiast związek chemiczny trifluorometanosulfonian 4-metylo-2,6-difenylopiryliowy stosowany jest do wykrywania jonów cyjankowych [5]. Ponadto w 2015 roku wykorzystano sole piryliowe jako związki matrycowe. Dzięki którym stało się możliwe wykrycie śladowych ilości amin pierwszorzędowych, takich jak: neuroprzekąźniki (np. dopamina) oraz analogi fenyletyloaminy (np. amfetamina) za pomocą techniki MALDI/MS (laserowa desorpcja i jonizacja próbki wspomagana matrycą połączoną ze spektrometrią masową) [6]. W środowisku naturalnym również odnajdziemy wiele układów piryliowych, takimi związkami chemicznymi dla przykładu są antocyjany. To naturalne barwniki pochodzenia roślinnego, a ich barwa zależy od pH środowiska, w jakim się one znajdują. Większość z nich znalazła zastosowanie w barwieniu produktów żywnościowych [7]. Wśród innych zastosowań soli piryliowych możemy również wymienić medycynę, są one w niej wykorzystywane jako środki fototerapeutyczne i przeciwrakowe [8, 9].

Sole piryliowe zostały skasyfikowane do grupy heterocyklicznych związków chemicznych posiadających budowę jonową, które wykazują dużą reaktywność chemiczną. Zawierają kation o budowie pierścieniowej (jon oksoniowy), posiadający trójwartościowy oraz

dotatnio naładowany atom tlenu (Schemat 3.) [10]. Obecność anionu, który nie jest nukleofilem, ale pochodzi od mocnego kwasu zapewnia trwałość solą piryliowym [11]. Anion jest podatny na atak czynników nukleofilowych z powodu deficytów elektronów. Natomiast atak czynników elektrofilowych jest trudny, ponieważ na atomie tlenu znajduje się dodatni ładunek, który powoduje silną dezaktywację atomu węgla w pierścieniu (Rysunek 3.) [12].

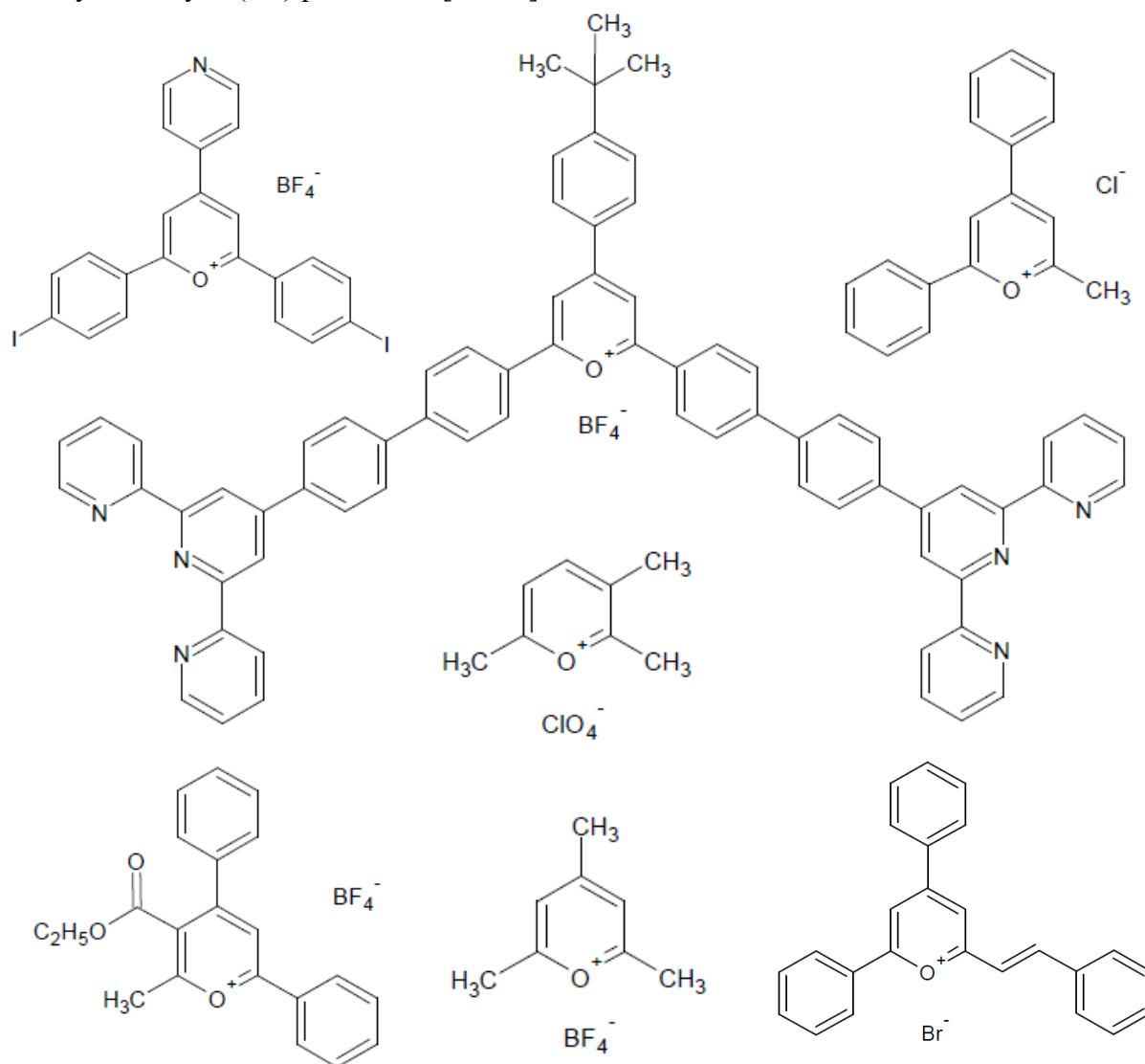


Rysunek 3. Kation piryliowy i jego struktury rezonansowe według [10]

Na atak nukleofilowy najbardziej podatne są pozycje α . Jest to związane z dużym deficytem elektronów. W sytuacji, kiedy w pozycji α znajduje się podstawnik (np. arylowy), atak skierowany jest na atom γ . W konsekwencji powstają odpowiednie pochodne (np. pirany, fosfiny, sole pirydyniowe i tiopiryliowe oraz pochodne benzenu, furanu i pirydyny), zależne od zastosowanego czynnika nukleofilowego [13]. Sole piryliowe reagują z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, które znajdują się w zróżnicowanych cząsteczkach (np. białka). W tej specyficznej reakcji chemicznej atom tlenu jest zastępowany atomem azotu, w związku z tym sól piryliowa przekształca się w sól pirydyniową. Reakcja ta zachodzi w temperaturze pokojowej oraz zgodnie z mechanizmem substytucji nukleofilowej, w którym można wyróżnić etapy: atak nukleofilowy, otwarcie oraz zamknięcie pierścienia. Pierwsza faza charakteryzuje się odwracalnością, dzięki temu prawdopodobny atak w pozycji γ nie powoduje wytworzenia pośrednich związków w konsekwencji braku ponownego zamknięcia pierścienia [14]. Sole piryliowe ze względu na obecność oksoniowego atomu tlenu posiadają deficyt elektronów, dlatego związki te nie ulegają reakcjom substytucji elektrofilowej. Reakcja chloranu(VII) 2,4,6-trimetylopiryliowego albo chloranu(VII) 2,4,6-trifenylpiryliowego z deuterowanym kwasem octowym stanowi wyjątek, i zachodzi według mechanizmu podstawienia elektrofilowego [13]. Proces otrzymywania soli piryliowych jest łatwy, ponieważ syntezowany produkt w bardzo szybki i prosty sposób oczyszcza się od produktów ubocznych oraz nieprzereagowanych substratów. Jest to związane z jonowym charakterem soli piryliowych. Oznacza to, że nie rozpuszczają się w rozpuszczalnikach niepolarnych (np. dichlorometan, chloroform, benzen, toluen, heksan, octan etylu, ksylen, eter dietylowy). Łatwo usuwa się więc

zarówno główny produkt jak i produkty uboczne przez proste przemywanie, na przykład za pomocą eteru [14, 15]. Takie aniony jak: wodorosiarczanowy, sulfooctanowy, fluorkowy, pikrynianowy i tetrachlorożelazianowy, przyczyniają się do wzrostu rozpuszczalności soli piryliowej w rozpuszczalnikach niepolarnych. Powoduje to trudniejsze jej oddzielenie od pozostałych reagentów i należy wtedy skorzystać z innych metod oczyszczania [12]. Na Rysunku 4. zostały przedstawione wzory przykładowych soli piryliowych, które tłumaczą ich specyficzną budowę chemiczną.

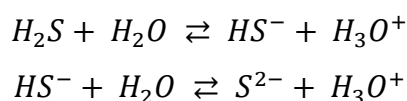
Oprócz syntezy różnych małowartościowych heterocyklicznych pochodnych, sole piryliowe biorą udział w wytwarzaniu polimerów z ugrupowaniami pirydyniowymi. Poza zastosowaniem jako fotokatalizatory i inicjatory w wielu procesach polimeryzacji, same sole piryliowe są szeroko stosowane jako elementy budulcowe wielu jednowymiarowych (1D) oraz dwuwymiarowych (2D) polimerów [16, 17].



Rysunek 4. Wzory przykładowych soli piryliowych według [18, 19]

2.2. Właściwości i zastosowania jonów siarczkowych - siarkowodór i siarczki nieorganiczne

Siarkowodór (zwany inaczej sulfanem lub siarczkiem wodoru) to nieorganiczny związek chemiczny z grupy wodoroków kowalencyjnych. W środowisku wodnym występuje w różnych formach. Jest bezbarwnym, łatwopalnym, cięższym od powietrza gazem o przykrym zapachu zgniłych jaj. Dobrze rozpuszcza się w wodzie tworząc wodę siarkowodorową lub w większych stężeniach kwas siarkowodorowy. Jego rozpuszczalność w wodzie przy temperaturze 37°C wynosi około 80 mmol/l. Posiada właściwości redukujące. Siarkowodór to hormeza, czyli jest substancją chemiczną w wysokich stężeniach toksyczną dla organizmu. Z kolei przy niskich stężeniach działa na niego leczniczo-terapeutycznie oraz jest niezbędna do jego codziennego prawidłowego funkcjonowania [20]. Niezdysocjowany siarkowodór to lipofilny związek chemiczny, który swobodnie dyfunduje przez błony komórkowe. Jednakże ze względu na jego częściową dysocjację proces ten nie jest tak wydajny jak w przypadku tlenku azotu(II) i tlenku węgla(II) [21]. W środowisku wodnym posiada właściwości słabego kwasu i ulega procesowi dysocjacji elektrolitycznej dwustopniowej, ponieważ jest kwasem dwuprotonowym. Proces ten zachodzi zgodnie z równaniami reakcji zaprezentowanymi poniżej (Rysunek 5.).



Rysunek 5. Dwuetapowy proces dysocjacji elektrolitycznej kwasu siarkowodorowego w wodzie według [22-24]

W roztworach wodnych o $pH < 6$ podstawową formą jest niezdysocjowana cząsteczka siarkowodoru (H_2S). Natomiast przy odczynie obojętnym występują dwie formy - niezdysocjowana cząsteczka siarkowodoru (H_2S) oraz anion wodorosiarczkowy (HS^-), a ich stosunek stężeń wynosi 1. Anion wodorosiarczkowy (HS^-) jest formą dominującą dla $pH > 8$, ale już przy $pH > 10$ przeważają jony siarczkowe (S^{2-}). Na podstawie czego z perspektywy chemii analitycznej w wodnych roztworach można oznaczać stężenie:

- ◆ niezdysocjowanego siarkowodoru,
- ◆ niezdysocjowanego siarkowodoru oraz siarczków rozpuszczalnych,
- ◆ niezdysocjowanego siarkowodoru oraz siarczków rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych [22-24].

Jon siarczkowy odnajdziemy w wodzie jako produkt uboczny różnych procesów przemysłowych. Ponadto powstaje na skutek mikrobiologicznej działalności bakterii, które znajdują się w materii organicznej, oraz innych procesów naturalnych, na przykład erupcji

wulkanów i rozkładu wietrzejących skał [25-28]. W związku z tym badany jon siarczkowy występuje pod różnymi postaciami (środowisko wodne - rozpuszczalne lub nierozpuszczalne siarczki oraz gazowy siarkowodór) w wielu elementach środowiska przyrodniczego, takich jak: gleba, woda, powietrze, skały czy materia organiczna [29].

Siarkowodór z łatwością przedostaje się z wody do powietrza atmosferycznego. Natomiast siarczki również łatwo uwalniane są do wód z gleby, powietrza, gazów wulkanicznych, skał osadowych, pyłów, ilów, osadów ściekowych, ścieków miejskich i przemysłowych oraz odpadów [25, 26]. Ponadto związki te powstają w dużej ilości jako produkt uboczny podczas oczyszczania ropy naftowej oraz zakwaszonego gazu ziemnego, a także w wyniku koksowania węgla [30-32].

Siarkowodór i siarczki metali są podstawowymi związkami chemicznymi uczestniczącymi w naturalno-biochemicznym obiegu siarki w środowisku [33, 34]. Ten obieg zachodzi przy udziale bakterii siarkowych (np. *Sulfolobus*, *Chromatium*, *Chlorobium*), które utleniają siarkę elementarną i siarkowodór, bądź redukują siarczany(VI) i związki organiczne [25, 35]. Zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych zachodzi mikrobiologiczna przemiana siarki. Podczas reakcji rozkładu materii organicznej uwalniana jest siarka w postaci siarczku dimetylu lub siarkowodoru. Proces redukcji siarczanów(VI) zachodzi także dzięki mikroorganizmom i ma miejsce m.in. w morzach, oceanach i jeziorach. Ten proces przebiega również przy niskim pH, dając aniony siarkowodorowe, a przy pH większym niż 5,5 generuje wolną siarkę [34].

Siarkowodór z łatwością przedostaje się do organizmu głównie przez płuca i w mniejszym stopniu przez skórę, przypuszczalnie w postaci anionu wodorosiarczkowego. Ten jon powstaje w procesie dysocjacji elektrolitycznej siarkowodoru w warunkach fizjologicznego pH, które wynosi około 7,4. W wyżej wspomnianych warunkach 1/3 siarkowodoru występuje w formie niezdisocjowanej. Pozostała część ulega dysocjacji elektrolitycznej, w pierwszym etapie na kation wodoru i anion wodorosiarczkowy, a następnie w drugim etapie na anion siarczkowy. Ostatni wymieniony etap zachodzi tylko i wyłącznie przy wysokim pH. W związku z tym anion siarczkowy w warunkach *in vivo* (wewnątrz żywego organizmu) występuje w niewielkich ilościach [36]. W dostępnej światowej literaturze odnajdziemy informacje odnoszące się do rozmieszczenia w organizmie siarkowodoru. Według *E. Łowickiej* i *J. Beltowskiego* [21] w osoczu krwi (plazma) oraz większości tkanek stężenie siarkowodoru jest podobne i wynosi około 50 μM . Największa produkcja tego związku chemicznego zachodzi w mózgu, wątrobie, układzie krwionośnym oraz nerkach, co wiąże się z tym, że jego stężenie w tych organach jest

największe. Natomiast według danych zawartych w artykule (*H. Savolainen*) [37], siarczek sodu (znaczony izotopem siarki S-35) znajdowano zazwyczaj w wątrobie, ale małe stężenie tego związku chemicznego oznaczono też w płucach i nerkach. U zmarłych ludzi z powodu ostrego zatrucia siarkowodorem (od 750 do 1400 mg/m³) wykryto we krwi jony siarczkowe o stężeniu od 1,7 mg/dm³ do 3,75 mg/dm³. Niebezpieczeństwo związane z zatruciem siarkowodorem może być spowodowane m.in. wchodzeniem do studzienek kanalizacyjnych lub niewentylowanych korytarzy podziemnych, studni, podczas prac związanych z opróżnianiem podziemnych zbiorników asenizacyjnych, wierceniem oraz kopaniem studni. Zatrucia także wywołuje praca zawodowa związana z przemysłem tworzyw sztucznych, hutniczym czy rafineryjnym.

Jon siarczkowy w organizmie ulega przekształceniu do tiosiarczanów i siarczanów(VI). Proces ten przede wszystkim ma miejsce w wątrobie i nerkach w układzie enzymatycznym za pomocą oksydazy siarczkowej. Proces detoksykacji siarkowodoru zachodzi w błonie śluzowej jelit również przy udziale *S*-metylotransferazy tiolowej. Częściowe wydalanie siarkowodoru w postaci niezmienionej zachodzi przez płuca oraz w postaci wolnych lub sprzężonych siarczanów(VI) z moczem. Natomiast wchłonięty w pewnej ilości ulega rozkładowi we krwi oraz w tkankach z wytworzeniem siarki, która z kolei z nierozłożonym siarkowodorem łączy się tworząc wielosiarczki (H₂S_n). Według *H. Savolainen* [37] nie wykryto siarkowodoru w wydychanym powietrzu przez myszy, którym podawano do otrzewnej siarczek sodu znaczony izotopem siarki S-35. Z kolei po wprowadzeniu go do żołądka około połowa zaaplikowanej dawki została wydalona wraz z moczem po upływie jednej doby. Ponadto umieszczenie badanego analitu w jelitach skutkowało znalezieniem w trakcie jednej doby 90% podawanej dawki w moczu oraz w kale. Należy zaznaczyć, że w kale ta ilość w porównaniu z moczem była śladowa. W ogólnie dostępnym piśmiennictwie jest brak danych o szybkości wydalania z organizmu siarkowodoru. Na podstawie szybkości powrotu do zdrowia ludzi zatrutych ustalono, że półokres wydalania tego związku chemicznego w przybliżeniu wynosi od jednej do kilku godzin. Stwierdzono, że związki chemiczne powstałe podczas związania się jonu siarczkowego z makromolekułami posiadającymi żelazoporfirynę ulegają dysocjacji i wolniej utleniają się.

Siarkowódór działa destrukcyjnie na organizm poprzez hamowanie aktywności enzymów posiadających w grupie prostetycznej metale. Toksyczne działanie tego związku chemicznego również jest związane z blokowaniem w komórkach aktywnego żelaza oksydazy cytochromowej i jest to końcowy enzym łańcucha oddechowego w mitochondriach. Ponadto

hamuje pracę kolejnego enzymu jakim jest anhydraza karbonylowa. Najbardziej podatne na jego szkodliwe działanie są tkanki tworzące błony śluzowe i mięsień sercowy, ale także układ nerwowy. Przypuszcza się, że kolejną niekorzystną właściwością siarkowodoru jest blokowanie aktywności grup sulfhydrylowych glutationu. Co więcej, tworzące się w wyniku różnych procesów jony siarczkowe hamują aktywność enzymu oksydazy monoaminowej oraz supresję aktywności synaps. W wyniku tego może to przyczyniać się do zaburzeń w funkcjonowaniu ośrodka oddechowego i nadaktywności receptorów glutaminowych zlokalizowanych w mózgu [38]. Siarkowodor nie łączy się z hemoglobina, natomiast wiąże się z methemoglobina, na skutek tego procesu powstaje sulfhemoglobina. Związek ten również powoduje deficyt tlenu w tkankach i narządach, wymioty, mdłości, podrażnienie śluzówek, bóle głowy, wzrost ciśnienia krwi, utratę przytomności, drgawki, śpiączkę, a ostatecznie nawet śmierć [39].

Siarkowodor w organizmach żywych pełni funkcję regulatora procesów życiowych, a jego synteza zachodzi u ssaków przede wszystkim w ich tkankach. Fakt, że jest wydzielany podczas fizjologicznych procesów, w pewnym sensie tłumaczy jego istotną funkcję jako czynnika regulującego. W ostatnim czasie prowadzono badania nad związkami chemicznymi, które mogą stanowić źródło siarkowodoru w warunkach *in vivo* (wewnątrz żywego organizmu) oraz *in vitro* (poza wnętrzem żywego organizmu). Zmodyfikowane leki przeciwzapalne są zdolne do jego uwalniania. W ten sposób uzyskany siarkowodor przyczynia się do hamowania procesu powstawania cytokin prozapalnych, a także zmniejsza przyleganie krwinek białych do komórek śródbłonna naczyń krwionośnych oraz tworzenie obrzęków. Poza tym pełni rolę ochronną zarówno dla błony śluzowej układu pokarmowego jak również przyspiesza jej odbudowę [40].

Przeprowadzono badania naukowe nad pochodną popularnego niesteroidowego leku przeciwzapalnego, przeciwbólowego, przeciwzakrzepowego i przeciwgorączkowego, jakim jest aspiryna (ASA), pod kątem uwalniania siarkowodoru oraz jego wpływu na organizm. Wynika z nich fakt, że analizowana pochodna aspiryny, czyli ester kwasu 2-acetyloksybenzenowego 4-(3-tioakso-3*H*-1,2-ditiol-5-yl)fenylu (ACS-14) działa całkowicie skutecznie oraz bezpiecznie, w szczególności na błony śluzowe żołądka [41]. Innym związkiem chemicznym nad którym prowadzono identyczne eksperymenty był ester kwasu 2-(6-metoksynaftaleno-2-yl) propanowego 4-tiokarbamoylfenylu (ATB-346). Jest to pochodna multifunkcjonalnego niesteroidowego leku przeciwzapalnego naproksenu. Hamuje ona aktywność cyklooksygenazy-2 oraz proces odkładania się białych krwinek. ATB-346 nie

wpływa uszkadzająco na błony śluzowe wyścielające żołądek, ponadto przyczynia się do regenerowania owrzodzeń, które utworzyły się wcześniej. Stwierdzono, że zmodyfikowana pochodna naproksenu jest od niego bardziej wydajniejsza [42]. Przeprowadzono również badania związane z uwalnianiem siarkowodoru dla czterech pochodnych lewodopaminy. Są to:

- ◆ kwas 4-(3-tiokso-3*H*-1,2-ditiol-4-yl)benzenowy (ACS-48),
- ◆ kwas [2-metoksy-4-(3-tiokso-3*H*-1,2-ditiol-5-yl)-fenoksy]octowy (ACS-50),
- ◆ kwas 1,3-ditiolo-2-tiokso-4-karboksylowy (ACS-5),
- ◆ kwas 3-(prop-2-en-1-yl)disulfanylopropanowy (ACS-81).

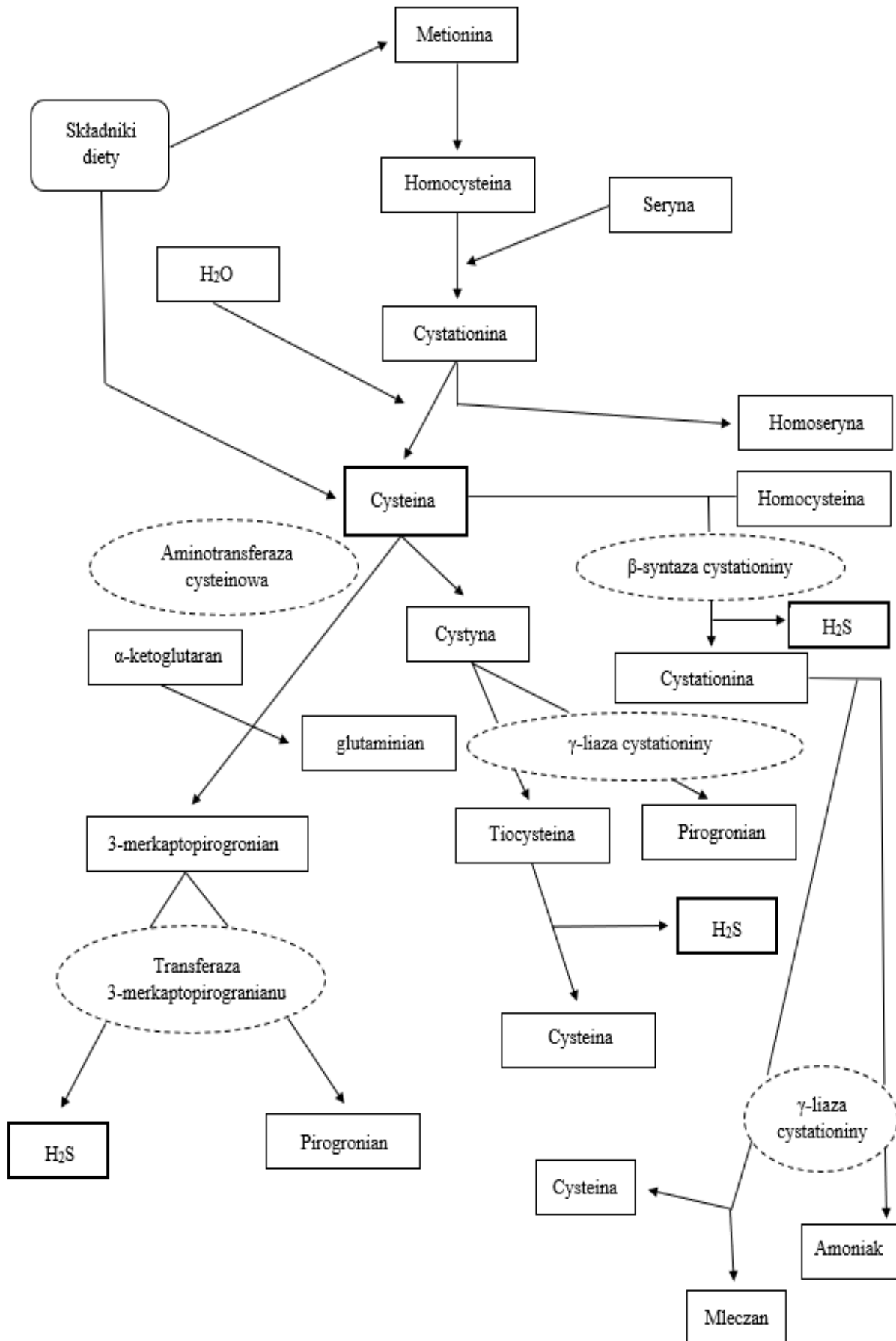
Samą lewodopaminę wykorzystuje się w leczeniu choroby neurodegeneracyjnej jaką jest Parkinson. Podczas tej choroby niszczeniu ulegają komórki nerwowe dopaminergiczne zawarte w istocie czarnej, proces ten ma charakter postępowy. Uwalniany siarkowodór z ACS-48, ACS-50, ACS-5 i ACS-81 działa jak antyoksydant (neutralizuje wszystkie toksyczne procesy metaboliczne w organizmie), ponadto wykazuje właściwości przeciwzapalne oraz zapewnia powrót odpowiedniego stężenia dopaminy [43]. Jeszcze innym związkiem chemicznym, który stanowi źródło siarkowodoru jest pochodna mesalazyny (czynny produkt rozkładu sulfasalazyny), o nazwie systematycznej ester kwasu 5-amino-2-hydroksybenzoesowego 4-(5-tiokso-5*H*-[1,2]ditiol-3yl)-fenylu (ATB-429). Lek jakim jest mesalazyna jest popularnie wykorzystywany w leczeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego oraz choroby Leśniowskiego-Crohna. W wielu przypadkach leczenie mesalazyną nie niesie żadnych oczekiwanych rezultatów. Doświadczenia na myszach donoszą, że użycie ATB-429 przyczynia się do sukcesywnego zwalczania wyżej wymienionych gastrologicznych chorób. Jest to związane z tym, że siarkowodór aktywowany z ATB-429 działa terapeutycznie na jelita, gdyż reguluje odpowiedź zapalną oraz oddziałuje na kanały potasowe wrażliwe na nukleotyd adeninowy adenozylo-5'-trifosforan [44, 45]. Jeszcze inny związek chemiczny, który również emituje siarkowodór to fosforoditionian morfolino-4-ium-4-metoksyfenylu (morfolina) (GYY4137). To powolny proces zachodzący w środowisku *in vivo* oraz *in vitro*. Szybkość uwalniania siarkowodoru z GYY4137 jest uzależniona od pH roztworu. Proces ten ma miejsce w warunkach podobnych do tych, które powstają w organizmie po wytworzeniu endogenego siarkowodoru. Badania nad tym związkiem były przeprowadzane na szczurach. Wykazały one, że GYY4137 wykazuje właściwości przeciwzapalne. Jednak potrzebne są kolejne doświadczenia na innych organizmach zwierzęcych w celu dokładniejszego przebadania GYY4137 [46].

Istnieje również naturalne i zarazem bogate źródło siarkowodoru - czosnek pospolity, tzw. „naturalny antybiotyk”. Roślina ta posiada właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciw pasożytnicze, przeciwgrzybiczne oraz przeciwzapalne. Po za tym działa leczniczo na liczne schorzenia układu krążenia, zmniejsza poziom cholesterolu, obniża ciśnienie krwi, hamuje agregację trombocytów, spowalnia procesy starzenia się, poprawia wydajność nerek, zwalcza infekcje dróg moczowych i oddechowych, łagodzi bóle menstruacyjne, oczyszcza wątrobę, niszczy pasożyty jelitowe, przeciwdziała miażdżycy i nowotworowi jelita grubego. Właściwości biochemiczne czosnku najprawdopodobniej są związane z tym, że w jego składzie znajdują się liczne związki chemiczne zawierające siarkę, które stanowią substraty do syntezy siarkowodoru. Należy do nich m.in. disiarczek diallilu, trisiarczek diallilu, tiosulfonian diallilu (allicyna) i sulfotlenek *S*-allilocysteiny (allina). Liczne badania naukowe potwierdzają fakt, że terapeutyczne właściwości czosnku pospolitego są ściśle związane z obecnością w nim siarkowodoru [47, 48].

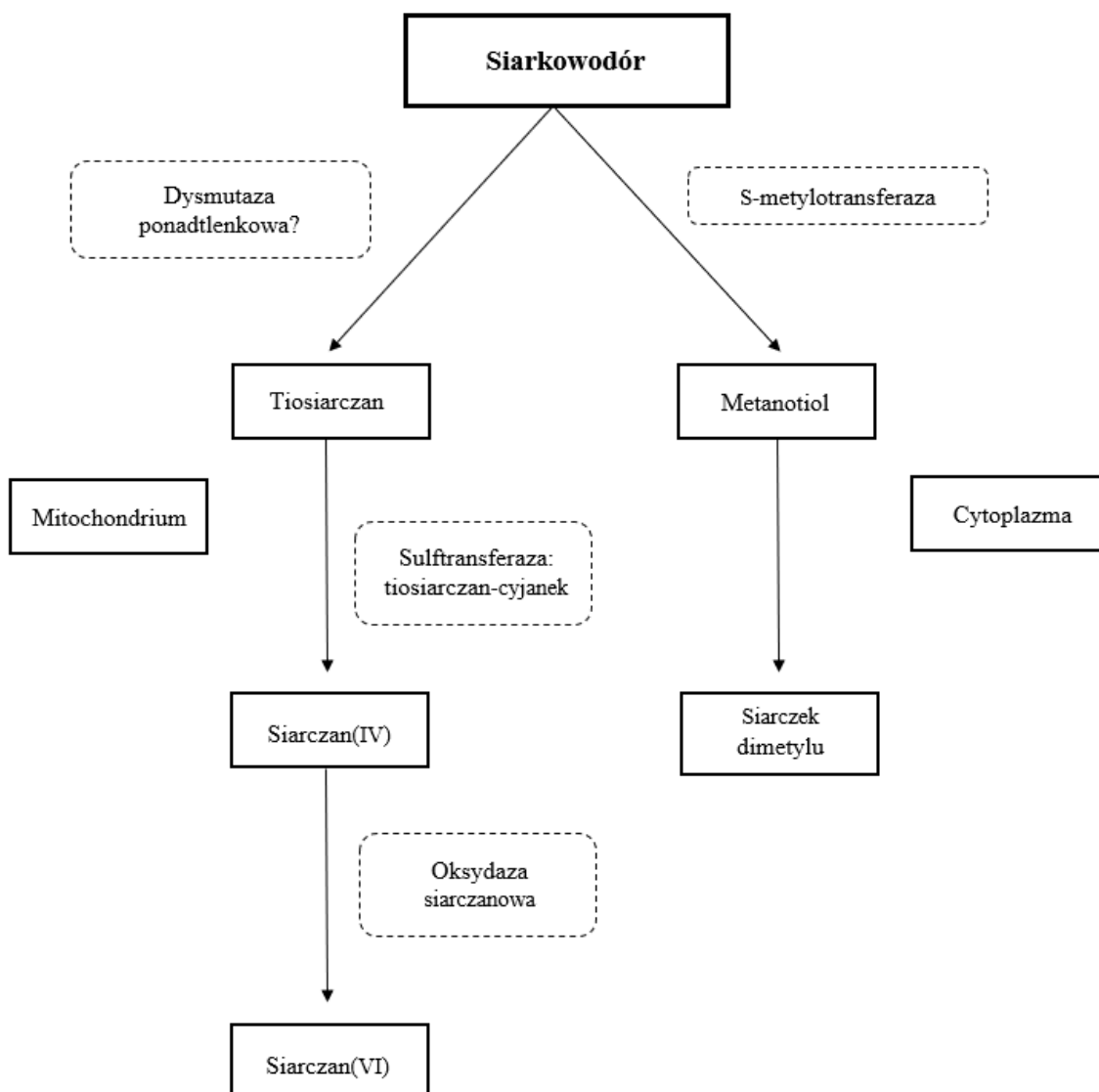
Endogenny siarkowódor jest głównie wytwarzany z L-cysteiny. Jednakże według *N. Shibuya* i in. [49] również D-cysteina stanowi źródło tego związku chemicznego. W cząsteczce cysteiny znajduje się atom siarki. Forma L-cysteiny powstaje w wyniku transsulfuracji L-metioniny. Metionina ulega przekształceniu do homocysteiny, która potrafi wiązać się z seryną tworząc cystationinę. Cystationina ulega procesowi hydrolizy w następstwie czego powstaje homoseryna oraz cysteina [21, 50, 51]. Synteza siarkowodoru z cysteiny może zachodzić w wyniku trzech ścieżek z użyciem następujących enzymów: β -syntazy cystationiny (CBS), γ -liazy cystationiny (CSE) i transferazy siarkowej 3-merkaptopirogranianu (3MST). Dwa pierwsze enzymy zależne są od fosforanu pirydoksalu. Cysteina przekształca się do cystyny, a ta w obecności CSE ulega rozpadowi na tiocysteinę oraz pirogronian. Z kolei tiocysteina ulega przekształceniu do cysteiny, temu procesowi towarzyszy uwalnianie siarkowodoru. Cysteina przy udziale CBS łączy się z homocysteiną tworząc cystationinę i siarkowódor. Cystationina w obecności CSE rozpada się na cysteinę, mleczan i amoniak. Powstawanie siarkowodoru z użyciem CBS opiera się na reakcji cysteiny z homocysteiną. CSE oraz CBS powstają w wielu narządach i układach narządów. W ośrodkowym układzie nerwowym to przede wszystkim CBS odpowiedzialne jest za produkcję siarkowodoru. Z kolei w układzie krwionośnym dominującą rolę w syntezie tego związku chemicznego pełni enzym CSE. W organizmie żywym między innymi w wątrobie i nerkach CBS oraz CSE pełnią równoważną rolę w powstawaniu siarkowodoru [21]. Ostatni wymieniony enzym transferaza siarkowa 3-merkaptopirogranianu łącząc się z aminotransferazą cysteinową (CAT) reguluje

powstawanie siarkowodoru z L-cysteiny przy udziale α -ketoglutaranu. W mózgu i komórkach śródbłonna aorty piersiowej następuje ekspresja 3MST. Aminotransferaza cysteinowa stanowi katalizator w transaminacji pomiędzy L-cysteiną oraz α -ketoglutaranem. W wyniku czego powstaje 3-merkaptopirogronian i L-glutaminian. Siarkę do kwasu siarkowego(VI) przenosi transferaza siarkowa 3-merkaptopirogronianu tworząc pirogronian i tiosiarczan, a ten następnie ulega redukcji do siarkowodoru. Reakcja redukcji zachodzi przy udziale zredukowanego glutationu (GSH) [52]. Siarkowódor ulega utlenieniu najpierw do tiosiarczanu, a ten następnie przekształca się w siarczan(IV) i ostatecznie w siarczan(VI). Ma to miejsce przede wszystkim w organelum komórkowym jakim jest mitochondrium. Przekształcenie siarkowodoru do tiosiarczanu jest zapewne reakcją nieenzymatyczną. Jednak istnieją przypuszczenia, że w tej przemianie uczestniczy enzym z grupy oksydoreduktaz czyli dysmutaza ponadtlenkowa, ponieważ z procesem katabolicznym siarkowodoru związany jest transport elektronów w łańcuchu oddechowym. Reakcja oksydacji tiosiarczanu do siarczanu(IV) katalizowana jest przez siarkotransferazę tiosiarczanową (rodanaza - TST). Polega ona na transferze atomu siarki pochodzącego z jonu tiosiarczanowego do jonu cyjankowego, co powoduje powstanie tiocyjanianu i siarczanu(IV). Przekształcenie siarczanu(IV) w siarczan(VI) katalizuje oksydaza siarczanowa, czyli końcowym produktem metabolizmu siarkowodoru jest siarczan(VI). Inny mechanizm metabolizmu siarkowodoru polega na metylacji za pomocą S-metylotransferazy tiolowej, co wiąże się z otrzymaniem metanotiolu, a w następnym etapie siarczku dimetylu. Proces ma miejsce w cytozolu [21]. Siarkowodorów łączy się methemoglobina, tworząc sulfhemoglobinę. Natomiast z hemoglobina wiąże się tlenek azotu(II) oraz tlenek węgla(II). Wspomniane trzy nieorganiczne gazy nazywane są najważniejszymi gazotransmiterami w prawidłowej fizjologii całego organizmu żywego, dlatego że odgrywają istotne funkcje w jego regulacji, m.in. są odpowiedzialne za proces apoptozy, stresu oksydacyjnego czy cyklu komórkowego [21, 54].

W powyższym akapicie zostały opisane mechanizmy dotyczące powstawania oraz metabolizmu siarkowodoru, które mają miejsce wewnątrz organizmu żywego czyli w warunkach *in vivo*. Zostały one również przedstawione na Rysunku 6. i 7.



Rysunek 6. Powstawanie siarkowodoru wewnątrz organizmu (in vivo) według [53]



Rysunek 7. Mechanizm metabolizmu siarkowodoru wewnątrz organizmu (in vivo) według [53]

Granica pomiędzy działaniem toksycznym, a protekcyjnym siarkowodoru jest bardzo wąska i zależy od jego stężenia w tkankach. Działanie pozytywne tego związku wykorzystuje się w leczeniu nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych i układu sercowo-naczyniowego. Gaz ten również reguluje mechanizmy komórkowe, czyli apoptozę, proliferację i autofagię [55]. Ponadto wywiera silne działanie antyapoptotyczne i antyoksydacyjne, chroni mitochondria, zwiększa poziom oddychania komórkowego oraz utrzymuje proliferację w warunkach stresu oksydacyjnego spowodowanego toksynami [56]. Najprawdopodobniej siarkowodór jest czynnikiem hamującym szereg mechanizmów przyczyniających się do starzenia organizmu [57, 58].

Woda siarczkowo-siarkowodorowa to taka, w której stężenie siarkowodoru przekracza 1 mg/dm^3 . Na terenie Polski znajdują się naturalne tego typu wody o zawartości siarkowodoru w przedziale od 1 mg/dm^3 aż do 160 mg/dm^3 [59]. W polskich miejscowościach takich jak:

Busko-Zdrój, Horyniec, Swoszowice, Krzeszowice, Solec-Zdrój, Szaflary znajdują się kompleksy basenowe, które w swojej ofercie umożliwiają terapię siarczkowo-siarkowodorową [60]. W chwili obecnej kąpiele siarczkowo-siarkowodorowe są popularną formą terapii, ponieważ posiadają szeroki zakres zastosowań. Zalecane są one osobom z różnymi problemami zdrowotnymi m.in. chorobami ze strony układu rodnego, skórnyimi, reumatycznymi, na tle nerwowym, miażdżycą, dną moczanową, chorobą zwyrodnieniową stawów. Wody te odtruwają organizm z metali ciężkich oraz korzystnie wpływają na jego gospodarkę tłuszczową. Posiadają one swój ściśle określony skład i stwierdzone działanie terapeutyczne. Pacjent podczas zabiegu poddawany jest wpływowi siarkowodoru w ściśle określonych stężeniach oraz krótkotrwale (15-20 minut). Dłuższe zażywanie takich kąpiele przyczynia się do uzyskiwania niepożądanych efektów, wręcz odwrotnych do zamierzonych. Kąpiele siarczkowo-siarkowodorowe nie są jednak dla wszystkich. Nie powinny z nich korzystać osoby z problemami układu krążenia, stanami pozawałowymi, zaawansowanym zapaleniem żył, niskim i niestabilnym ciśnieniem, nowotworami, chorobą wieńcową, arytmia, przewlekłymi stanami zapalnymi trzustki i wątroby, a także kobiety w ciąży i karmiące piersią. Niezalecane są one również podczas stanów podgorączkowych oraz infekcji. Osoby w podeszłym wieku powinny przed skorzystaniem z zabiegu koniecznie skonsultować się z lekarzem [61-63].

Wówczas wysokie stężenie tego gazu hamuje oddychanie komórkowe oraz proliferację, wpływa proapoptotycznie, powoduje nadprodukcję reaktywnych form tlenu [55, 64, 65]. Również poraża nerw węchowy, układ oddechowy, układ nerwowy, prowadzi do zapalenia spojówek, bolesnych nadżerek rogówki, obrzęków płuc, odoskrzelowego zapalenia płuc, migren, nudności, zawrotów głowy, duszności, zmniejszenia masy ciała, męczliwości, ogólnego wyniszczenia organizmu, sinicy skórnej, trwałych zmian neurobehawioralnych, neuropsychologicznych i neurologicznych, a nawet do zgonu. [22]. Pozytywne funkcje tego związku chemicznego są przeciwieństwem w stosunku do jego negatywnych funkcji.

Według normy Centralnego Instytutu Ochrony Pracy w Polsce górne dopuszczalne stężenie siarkowodoru wynosi 7 mg/m^3 , natomiast chwilowe 14 mg/m^3 [22, 66]. Z kolei próg wyczuwalności tego gazu przez ludzki zmysł węchu to $0,007 \text{ mg/m}^3$. Przy dawce 20 mg/m^3 ten związek chemiczny powoduje bóle głowy, nudności, a także wykazuje działanie drażniące na błony śluzowe i spojówki [67]. Przy ekspozycji w stężeniach większych niż 100 mg/m^3 obserwuje się nadwrażliwość na światło, objawy zapalenia oskrzeli, zaburzenia rytmu serca, wymioty, nudności, biegunkę, zmętnienie rogówki, łzawienie oczu, przyśpieszenie częstości oddechów, duszności [68]. Większość tych dolegliwości ustaje po zaprzestaniu działania

czynnika wywołującego. Pomimo to przez kilka następnych tygodni mogą pojawiać się zaburzenia węchu, polegające na nieprawidłowym odczuwaniu zapachów, halucynacjach węchowych i na jego osłabieniu. Oprócz tego dodatkowo może wystąpić męczący i przewlekły kaszel [67]. Ze względu na tzw. zmęczenie węchu, odczuwanie siarkowodoru powyżej 100 mg/m^3 może być mylne do jego rzeczywistego stężenia [69]. Eksperymenty naukowe prowadzone na zwierzętach dowiodły, że zmysł powonienia jest najbardziej podatny na toksyczne działanie tego gazu [70]. Kilkuminutowe narażenie na siarkowodór w stężeniach od 100 mg/m^3 do 250 mg/m^3 doprowadza do różnych powikłań na tle motoryki, równowagi i pamięci, oprócz tego powoduje paraliż węchu [37]. Kilkuminutowe narażenie w stężeniach ponad 500 mg/m^3 , tak samo jak dłuższa ekspozycja w stężeniach powyżej 100 mg/m^3 prowadzi do zaburzeń zagrażającym życiu, dla przykładu obrzęk płuc [69]. Pobyt w miejscu, które jest na ogół przynajmniej częściowo zamknięte, gdzie stężenie tego gazu wynosi więcej niż 1000 mg/m^3 , wywołuje już nawet po jednym lub dwóch wdechach utratę przytomności, zaburzenia oddechowe, arytmie serca, sinicę skórną, drgawki i śmierć [71]. Zgon spowodowany jest uszkodzeniem w mózgu ośrodka oddechowego oraz zahamowaniem w mitochondriach oksydazy cytochromu c łańcucha oddechowego. Zatrucie cyjankiem generuje podobne zjawiska. Odtrucie organizmu z tych dwóch substancji polega na pozajelitowej podaży czynnika indukującego methemoglobinę. Łączy ona aniony wodorosiarczkowe do sulfmethemoglobiny, przez co uwalniana jest oksydaza cytochromu c związana przez siarkowodór [69]. Światowa literatura nie donosi o działaniu genotoksycznym, mutagennym i rakotwórczym siarkowodoru. Dodatkowo siarkowodór nie wykazuje właściwości embriotoksycznych oraz teratogennych, a także przy stężeniu od 14 mg/m^3 do 112 mg/m^3 nie upośledza płodności (liczebność miotów, liczba żywych noworodków i ich wymiary a także liczba implantacji, jak i również długość cyklu płciowego) u samic szczura narażonych na jego ekspozycję przed i w czasie ciąży. Nie wpływa również na dalszy wzrost i rozwój potomstwa oraz na odchylenia w testach behawioralnych i wydolnościowych [72]. Badania innego zespołu naukowego wykazały, że u potomstwa samic szczura, które zostały poddane działaniu tego gazu o stężeniu 28 mg/m^3 zaobserwowano zaburzenia rozwojowe komórek Purkiniego oraz architektonikę ich dendrytów [73]. Według jeszcze innych eksperymentów to samo stężenie siarkowodoru (28 mg/m^3) obniża poziom serotoniny i noradrenaliny w mózdzku i korze czołowej u potomstwa samic szczura. Stwierdzono również uszkodzenia komórek Purkiniego na tle morfologicznym [74]. Z kolei inna grupa badawcza wykazała, że siarkowodór w dawce wynoszącej 105 mg/m^3 wywiera wpływ na obniżenie

w mózgu poziomu glutaminianów, GABA oraz asparaginianów u narodzonych noworodków szczurów. Natomiast w ich mózdzku zmniejsza zawartość asparaginianów i GABA [75].

Siarkowódór posiada kilka istotnych dla człowieka zastosowań, od metalurgii po produkcję. Na przykład takie zakłady jak spożywcze, browarnicze czy papiernicze, huty żelaza, wysypiska śmieci wytwarzają go jako produkt uboczny podczas swoich procesów produkcyjnych lub go do nich wykorzystują. Jeżeli podczas nich jest on w niewłaściwy sposób utylizowany albo przypadkowo uwalniany do atmosfery, to stanowi źródło niepożądanego emisji, która może zagrażać całemu środowisku naturalnemu. Przede wszystkim siarkowódór wykorzystywany jest w laboratoriach chemicznych do syntezy kwasu siarkowodorowego oraz siarki elementarnej. Właśnie ten związek chemiczny służy do uzyskiwania siarczków nieorganicznych (wodorosiarczek sodu, siarczek sodu i wiele innych siarczków nieorganicznych), a te producenci na co dzień wykorzystują do otrzymywania barwników, farmaceutyków, pestycydów, wyrobów garbarskich itp. Służy on również jako odczynnik lub związek pośredni do syntezy różnych zredukowanych związków siarki. W rolnictwie siarkowódór pełni rolę środka dezynfekującego. Natomiast w energetyce jądrowej używa się go do otrzymywania ciężkiej wody. Stanowi ona alternatywę dla zwykłej wody, ponieważ umożliwia reaktorom jądrowym wykorzystywanie paliwa uranowego zamiast wzbogacanego uranem. W metalurgii swoje zastosowanie odnalazł jako jeden ze składników niektórych olejów do cięcia. Są to specjalnie zaprojektowane chłodziwa i smary do obróbki metali. Ten gaz był również wykorzystywany jako broń chemiczna podczas I wojny światowej [76].

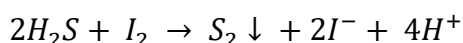
2.3. Metody oznaczania jonów siarczkowych

W chwili obecnej jest wiele metod pozwalających na oznaczanie siarki w większości związków chemicznych ją posiadających, dodatkowo w najróżniejszych matrycach środowiskowych i biologicznych. Pomimo tego nadal stanowią one obiekt zainteresowania środowiska naukowców i lekarzy. Wykrywanie i oznaczanie siarkowodoru oraz siarczków stanowi szczególne wyzwanie w analityce chemicznej z powodu ich toksycznej natury. Obszerne zastosowanie tych związków chemicznych w różnych sektorach przemysłu generuje możliwe niebezpieczne skutki dla osób, które stykają się w miejscu pracy z obróbką surowców zanieczyszczonych tymi substancjami. Dlatego stwarza to potrzebę tworzenia szybkich oraz czułych procedur wykrywania i oznaczania zawartości siarkowodoru i siarczków w miejscach pracy gdzie są one emitowane. Zwiększona świadomość dbałości o środowisko naturalne w ostatnich latach przyczyniła się do ciągłego monitoringu zawartości ścieków oraz odpadów

przemysłowych i komunalnych przez chemików analityków. Oznaczanie stężenia siarkowodoru oraz siarczków od dawna jest również szczególnym przedmiotem zainteresowań wśród naukowców, ponieważ wykazują zdolność do zróżnicowanego wpływu na organizmy żywe i środowisko. Wobec tego na przestrzeni wielu lat powstał cały szereg metod wykorzystujących klasyczne techniki analityczne, na przykład elektrochemiczne, spektrofotometryczne, chromatograficzne i ich pokrewne odmiany, które umożliwiają to oznaczanie [77, 78]. Ze względu na wysoką reaktywność siarczków do ich oznaczania wykorzystuje się pośrednie metody polegające na reakcjach z innymi odczynnikami chemicznymi [79-82]. Stworzone procedury umożliwiają oznaczanie siarczków w najróżniejszych próbkach o charakterze zarówno biologicznym jak i środowiskowym, mimo to każda procedura jest dostosowana do specyficznej matrycy [77].

Na podstawie światowej literatury techniki spektroskopowe [35, 83], chromatograficzne [84-88] oraz elektrochemiczne [89-91] są najczęściej wykorzystywane do detekcji i oznaczania stężenia anionów siarczkowych.

Metody normatywne pozwalają na oznaczenia siarkowodoru oraz siarczków rozpuszczalnych w matrycach środowiskowych, takich jak różne rodzaje ścieków oraz wód. Jednakże są to metody mające liczne wady. Przykładem takiej metody jest jodometryczne oznaczanie siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych w wodzie o odczynie kwaśnym (siarczki ogólne) zawartej w Polskiej Normie (PN-C-04566-03:1974). Metoda ta jest odpowiednia dla próbek wód powierzchniowych, podziemnych jak i również ścieków. Składa się ona z kilku etapów, co wiąże się z nakładem dużej ilości czasu w celu jej wykonania. Ponadto można ją wykorzystywać tylko i wyłącznie do próbek o stężeniu siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych powyżej 2 mg/dm³. Dodatkowo badanie należy rozpocząć niezwłocznie po pobraniu próbki, ponieważ takie czynniki jak powietrze i niskie pH roztworu przyczyniają się do strat analitu. W sytuacji, gdy nie jest to możliwe, dodaje się octanu cynku, który powoduje związanie anionów siarczkowych w postaci trudnorozpuszczalnego osadu (wody o pH kwaśnym w takim przypadku należy zobojętnić). Substancjami przeszkadzającymi są reduktory wchodzące w reakcje z jodem, co przyczynia się do dodatnich błędów analizy. Powyższa wspomnianą normą w chwili obecnej posiada status wycofanej [92]. Podczas miareczkowania jodometrycznego siarkowodoru zachodzi następująca reakcja chemiczna zobrazowana poniższym równaniem (Rysunek 8.).

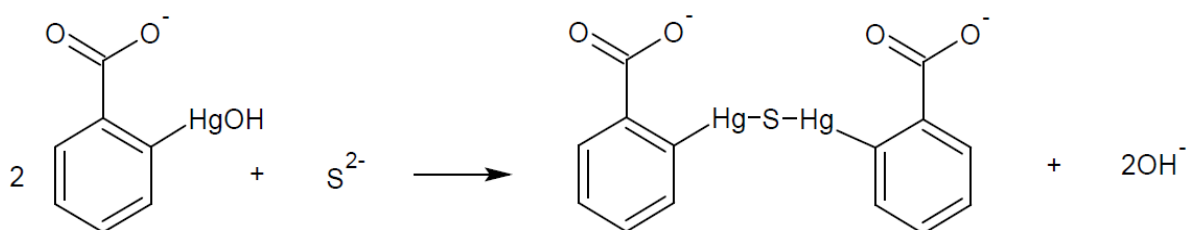


Rysunek 8. Równanie reakcji zachodzącej podczas miareczkowania jodometrycznego siarkowodoru według [92]

Następna metoda polega na oznaczaniu sumy siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych w wodzie w zakresie stężeń od 0,02 mg/dm³ do 20 mg/dm³ za pomocą elektrody jonoselektywnej (PN-C-04566-05:1981). Metoda jest odpowiednia dla zróżnicowanych matryc, czyli wody podziemne, powierzchniowe oraz ścieków. Opiera się ona na pomiarze potencjału elektrody siarczkowej względem elektrody odniesienia w próbce o odczynie silnie alkalicznym. Miarą sumy stężenia siarkowodoru i rozpuszczalnych w wodzie siarczków jest różnica potencjałów pomiędzy dwoma elektrodami. Elektroda siarczkowo-srebrowa reaguje na zmiany stężenia anionów siarczkowych. Ze względu na skłonność do protonowania tych jonów (tworzą się nieoznaczalne przez elektrodę formy, czyli jony wodorosiarczkowe oraz cząsteczki siarkowodoru) należy utrzymywać bardzo silnie zasadowy odczyn badanego roztworu (pH powyżej 13). Umożliwia to oznaczenie tylko i wyłącznie sumarycznej zawartości rozpuszczonych form siarkowodoru z wykluczeniem analizy specyjnej. Wszelkie inne formy należy przeprowadzić w postaci anionów siarczkowych. Czynnikiem utrudniającym poprawny pomiar w środowisku alkalicznym jest duża tendencja do utleniania się jonów siarczkowych, dlatego dodaje się kwasu askorbinowego (wiąże rozpuszczony w roztworze tlen) w celu wyeliminowania czynników utleniających. Według sugestii producenta elektrody jonoselektywnej należy do przygotowania roztworów wzorcowych użyć dziewięciowodnego siarczku sodu. Jest to związek chemiczny wykazujący silne właściwości higroskopijne, co znacząco utrudnia dokładne przygotowanie odważki. Wiąże się to z określeniem stężenia siarczków w roztworach wzorcowych za pomocą niezależnej metody. Ponadto siarczek sodu ulega procesowi hydrolizy, ze względu na fakt, iż jest to sól słabego kwasu i mocnej zasady. To z kolei wymusza utrzymywanie wysokiego pH dla sporządzonych roztworów. Ten związek chemiczny również nie może zostać wysuszony, gdyż w temperaturze ok. 50°C topi się oraz jest substancją silnie żrącą i niebezpieczną dla środowiska naturalnego. Natomiast w kontakcie z kwasami emituje toksyczne gazy. Wpływa silnie destrukcyjnie na organizmy wodne oraz powoduje rozległe poparzenia. Ta norma także została wycofana [93].

Kolejna metoda to tzw. tiomerkurymetryczna (PN-C-04566-03:1982) pozwala ona na oznaczanie sumy siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych w wodzie podziemnej, powierzchniowej oraz w ściekach w stężeniach powyżej 0,04 mg/dm³. Metoda ta opiera się na miareczkowaniu kompleksometrycznym badanej próbki za pomocą roztworu soli kwasu *o*-hydroksyrtęciobenzoesowego, wobec barwnego wskaźnika jakim jest difenylotiokarbazon (ditizon). Po związaniu jonów siarczkowych, powstały nadmiar titranta (roztwór soli kwasu *o*-hydroksyrtęciobenzoesowego) łączy się z ditizonem (barwny wskaźnik) tworząc kompleks

o barwie purpurowej (śliwkowej). Na końcowy wynik analizy wpływ wywiera szereg różnych czynników interferujących. Zakres stosowania metody ograniczony jest przez mętność roztworu ($>50 \text{ mg SiO}_2/\text{dm}^3$) oraz barwę ($>50 \text{ mg Pt}/\text{dm}^3$). Jeżeli oznaczenie zostanie wykonane w ciągu doby od chwili pobrania próbki to zostanie zredukowany wpływ powietrza na zmniejszenie trwałości związków chemicznych obecnych w analizowanym roztworze. Z kolei dodatek formaliny (35% - 40% nasycony roztwór wodny aldehydu mrówkowego) powoduje eliminację cyjanków posiadających właściwości kompleksujące, które przeszkadzają podczas prowadzenia analizy. Opisana w tym akapicie metoda została zawarta w Polskiej Normie o numerze PN-C-04566-03:1982, także posiada status normy wycofanej [94]. Poniżej znajduje się schemat (Rysunek 9.) obrazujący przebieg reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą roztworu soli kwasu *o*-hydroksyrtęciobenzoesowego.



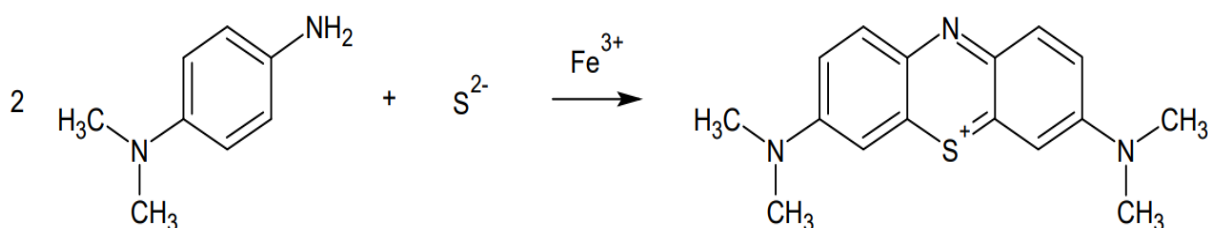
Rysunek 9. Schemat reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą soli kwasu *o*-hydroksyrtęciobenzoesowego według [94]

Według metody zawartej w Polskiej Normie PN-C-04566-02:1982 sumę siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych o stężeniu od $0,005 \text{ mg}/\text{dm}^3$ do $0,04 \text{ mg}/\text{dm}^3$ można oznaczyć kolorymetrycznie z wykorzystaniem dwóch odczynników chemicznych tiofluoresceiny oraz soli kwasu *o*-hydroksyrtęciobenzoesowego w matrycy środowiskowej (woda podziemna i powierzchniowa). Metoda polega na dodaniu do analizowanej próbki nadmiaru roztworu soli kwasu *o*-hydroksyrtęciobenzoesowego. W wyniku czego tworzą się bezbarwne kompleksy nie reagujące z tiofluoresceiną. W następnym kroku roztworem tiofluoresceiny miareczkuje się nadmiar roztworu soli kwasu *o*-hydroksyrtęciobenzoesowego aż do uzyskania lekko niebieskiej barwy. Opisana powyżej metoda została wycofana [95].

Z kolei kolorymetryczną metodę normatywną o numerze PN-C-04566-02:1974 wykorzystuje się w analizie próbek wody oraz ścieków do oznaczania siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych w wodzie i kwasach czyli tzw. siarczków ogólnych. Jeżeli analizę przeprowadza się na próbkach, w których nie usunięto zawiesin i siarkowodoru oraz siarczków ogólnych, to zakres tej metody mieści się w przedziale od $0,02 \text{ mg}/\text{dm}^3$ do $0,2 \text{ mg}/\text{dm}^3$. W przypadku wykonywania oznaczania za pomocą tej samej metody, ale w sklarowanych próbkach, jej zakres jest inny i wynosi powyżej $0,2 \text{ mg}/\text{dm}^3$ do $2 \text{ mg}/\text{dm}^3$. Przedstawiona norma posiada status wycofanej [96].

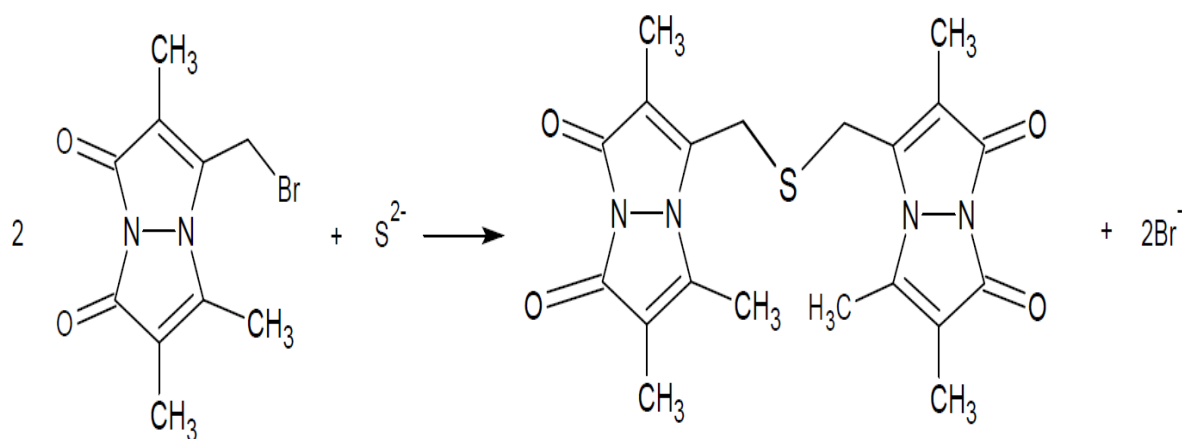
Z kolei następną metodą normatywną PN-C-04566-13:1985 dotyczy oznaczania merkurymetrycznego siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych ze wstępnym zagęszczaniem w postaci siarczku tributyllocynowego. Stosuje się ją do oznaczania sumarycznej zawartości siarkowodoru oraz siarczków rozpuszczalnych w próbkach wód podziemnych i powierzchniowych w zakresie stężeń od 0,001 mg/dm³ do 0,025 mg/dm³. W związku z niskim zakresem stężeń analitu w pierwszym etapie metody przeprowadza się tzw. wstępne zagęszczanie. W kolejnej fazie badania wykonuje się ekstrakcję siarkowodoru w postaci siarczku tributyllocynowego za pomocą heksanu. Natomiast ostatni krok całej metody to miareczkowanie ekstraktu przy użyciu soli kwasu *o*-hydroksyrtęciobenzoowego aż do zmiany koloru z żółtego na purpurowy w obecności ditizonu jako wskaźnika. Jeżeli stężenie analitu przekracza 0,04 mg/dm³ oznaczenia przeprowadza się bez zagęszczania. Metale i barwne związki kompleksujące utrudniają przeprowadzenie precyzyjnej analizy. Można temu zapobiec poprzez zastosowanie substancji maskującej wersenianu sodowego oraz substancji redukującej siarczanu(IV) sodu. Powyższa norma również została wycofana [97].

Metody instrumentalne są częściej wykorzystywane niż metody normatywne. Wśród nich przeważają te, które wykorzystują spektrofotometrię. Procedura błękitu metylenowego należy do najbardziej popularnej procedury analizy siarczków lub siarkowodoru w różnorodnych matrycach biologicznych oraz środowiskowych. Opiera się na reakcji anionów siarczkowych z *N,N*-dimetylo-*p*-fenylenodiaminą w obecności kationów żelaza(III), środowisko roztworu musi być kwaśne. Podczas tej reakcji powstaje heterocykliczny związek chemiczny jakim jest błękit metylenowy, który pochłania promieniowanie w zakresie światła widzialnego (maksimum absorpcji pochodnej wynosi 670 nm) [86, 98]. Według artykułu naukowego [91] kationy żelaza(III) pełniące rolę utleniacza zastąpiono źródłem elektrochemicznym. Poza tym reakcję tworzenia błękitu metylenowego wykorzystano do badań kinetycznych [99]. Zbliżone właściwości wykazuje również *p*-fenylenodiamina. Reaguje ona z anionami siarczkowymi w obecności kationów żelaza(III) tworząc tioninę, a jej maksimum absorpcji wynosi 600 nm [100, 101]. Rysunek 10. przedstawia w formie schematu reakcję derywatywacji badanego analitu za pomocą *N,N*-dimetylo-*p*-fenylenodiaminy.



Rysunek 10. Schemat reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą *N,N*-dimetylo-*p*-fenylenodiaminy według [86, 98, 91, 99]

Znane są również w analizie procedury spektrofotometryczne, podczas których odczynnik derywujący reaguje z jonami siarczkowymi dając pochodną o właściwościach fluorescencyjnych. Przykładem takiego oznaczenia jest reakcja derywacji monobromobimanu z anionami siarczkowymi w środowisku zasadowym. Powstała pochodna wykazuje maksimum absorbancji przy 480 nm (Rysunek 11.). Procedurę tę wykorzystuje się zarówno do próbek biologicznych oraz środowiskowych. Należy wspomnieć, że wspomniany odczynnik derywujący reaguje z siarczanami(VI), tiosiarczanami i tiolami. Fakt ten generuje konieczność wprowadzenia kolejnego etapu polegającego na separacji chromatograficznej [87, 102, 103].



Rysunek 11. Schemat reakcji derywacji jonów siarczkowych za pomocą monobromobimanu według [87, 102, 103]

Światowa literatura naukowa donosi o wielu elektrochemicznych metodach oznaczania stężenia siarczków oraz siarkowodoru, a wśród nich największym zainteresowaniem cieszy się potencjometria [82, 104]. Podczas tych badań stosuje się elektrodę jonoselektywną posiadającą membranę, która zbudowana jest z trudno rozpuszczalnego siarczku srebra. Elektrodę charakteryzuje niska granica wykrywalności kationów srebra oraz anionów siarczkowych i wynosi ona $C_m = 1 \cdot 10^{-20}$ mol/dm³. Procedurę tę stosuje się do zróżnicowanych matryc środowiskowych (różne rodzaje wody) i biologicznych (surowica, osocze) [105, 106]. Mankamentami tej metody są zanieczyszczenia elektrody odniesienia anionami siarczkowymi oraz długi czas odpowiedzi elektrody.

Inną metodą elektrochemiczną służącą do oznaczania stężenia siarczków i siarkowodoru jest amperometria [89]. Podczas amperometrycznych oznaczeń anion siarczkowych ulega utlenieniu na skutek reakcji z powierzchnią elektrody rtęciowej albo srebrnej. W wyniku zastosowania potencjału anodowego następuje proces ponownej redukcji do anionów siarczkowych. Pozytywną stroną tej metody jest znacznie szybszy czas odpowiedzi elektrody niż w przypadku metod potencjometrycznych.

Jeszcze inną elektrochemiczną procedurą pozwalającą na badanie zawartości tych związków chemicznych w próbkach biologicznych jest polarografia. Jej zaletą jest zastosowanie czujnika z membraną przepuszczalną wyłącznie dla oznaczanego związku chemicznego. Ten fakt sprawia, że inne składniki próbki nie zakłócają przebiegu całej analizy [107, 108].

W celu analizy jakościowej oraz ilościowej siarkowodoru i siarczków naukowcy również wykorzystują metody chromatograficzne, przykładowo wysokosprawną chromatografię cieczową, chromatografię gazową lub chromatografię cienkowarstwową [84, 85, 109, 110]. Zastosowano je w różnorodnych matrycach: w próbkach biologicznych (krew, osocze, surowica, płyny ustrojowe) [84], próbkach środowiskowych (woda, gleba, powietrze) [111] oraz preparatach farmaceutycznych [85]. Mocną stroną technik separacyjnych jest fakt, że za ich pomocą można rozdzielić składniki próbki w procesie chromatograficznych nawet w bardzo skomplikowanych matrycach. Istnieje wiele procedur polegających na bezpośrednim oznaczaniu anionu siarczkowego przy pomocy elektrochemicznych technik detekcji sprzężonych z chromatografią jonową [112-114]. Stworzono czułe procedury oznaczania zawartości siarkowodoru oraz siarczków nawet w tak złożonych matrycach jak pełna krew człowieka oraz kał [112].

W oparciu o artykuł *T. Ubuka* i in. [113] można oznaczyć zawartość siarkowodoru w próbkach homogenatu mięśnia sercowego oraz gruczołu jakim jest wątroba przy pomocy detektora konduktometrycznego. Opracowano również procedury, które zawierają etap związany z derywatyzacją oznaczanego jonu siarczkowego. Wśród nich jest reakcja derywatywacji jonu siarczkowego za pomocą monobromobimanu [102]. Proces rozdzielania uzyskanej pochodnej od pozostałych składników analizowanej próbki wykonano w odwróconym układzie faz za pomocą kolumny niepolarniej. Natomiast do rejestracji uzyskiwanych sygnałów analitycznych zastosowano detekcję fluorescencyjną [102, 103]. Reakcje chemiczne odczynników derywatyzujących takich jak: monobromobiman, *N,N*-dimetylo-*p*-fenylenodiamina czy sól kwasu *o*-hydroksyrtęciobenzoesowego, z innymi składnikami badanej próbki stanowią znaczącą zaletę w technikach separacyjnych. Ze względu na fakt, iż umożliwia to jednoczesne oznaczanie nie tylko siarczków, ale także siarczanów(IV) i tiosiarczanów.

Według artykułu *Y. Ogasawara* i in. [84], zespół badawczy oznaczył śladowe ilości siarczków w ludzkich erytrocytach w zakresie stężeń od $0,123 \mu\text{mol}/\text{dm}^{-3}$ do $0,189 \mu\text{mol}/\text{dm}^{-3}$. W tym badaniu wykorzystano reakcję fluorescencyjnej derywatywacji przedkolumnowej oraz

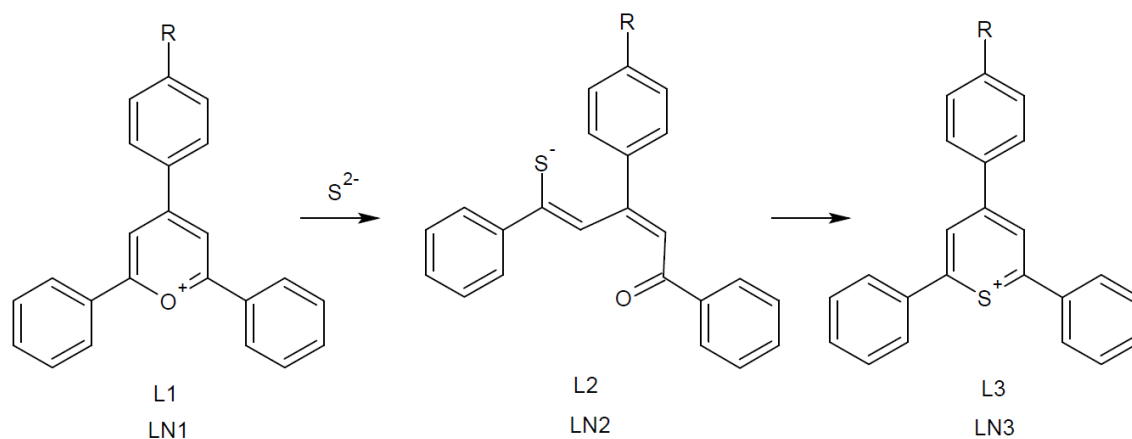
technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej. W reakcji siarczku z *p*-fenylenodiaminą oraz kationami żelaza(III) następuje jego przekształcenie w fluorescencyjną pochodną tioninę, a następnie jej rozdzielanie przy pomocy kolumny w odwróconym układem faz oraz wykrycie za pomocą detekcji fluorymetrycznej. Zarówno technikę chromatografii cieczowej sprzężoną z detektorem chemiluminescencyjnym lub płomieniowo-fotometrycznym można z dużym powodzeniem wykorzystać do badań związanych z zawartością siarkowodoru w tkankach zwierzęcych taki jak: wątroba, mózg i serce, a także w powietrzu miejskim [113, 115-117]. Detektor płomieniowo-fotometryczny umożliwia wykrywanie bardzo małych stężeń siarkowodoru, granica wykrywalności wynosi 1 ppb. Celem zgłębienia wiedzy o chorobie Alzheimera ten detektor został także wykorzystany do badań nad zawartością siarkowodoru w mózgu człowieka [118].

Obok wielu technik chromatograficznych dużą popularnością cieszy się wśród chemików analityków technika elektroforezy kapilarnej. Można ją wykorzystywać do oznaczania siarkowodoru w odpadach przemysłu garbarskiego oraz papierniczego [88, 111, 119]. Połączenie techniki elektroforezy kapilarnej z detektorem konduktometrycznym czy UV daje możliwość prostego rozdzielania i detekcji często występujących w matrycach środowiskowych anionów siarczkowych, siarczanowych(IV), siarczanowych(VI), tiosiarczanowych, tiocyjanowych, azotanowych(III), azotanowych(V), węglanowych, wodorotlenkowych, fluorkowych, chlorkowych, jodkowych i bromkowych oraz kationów sodu i potasu [88, 111, 116, 119].

W chwili obecnej jest tylko kilka artykułów naukowych, w których wykorzystano chromatografię cienkowarstwową do oznaczania stężenia siarkowodoru i siarczków. Według jednego z pierwszych doniesień (*M. H. Hashmi* i in.) można za pomocą metody półilościowej ocenić zawartość siarczków w analizowanej próbce z dokładnością 5%. Jest ona szybka, prosta oraz ekonomiczna [120].

Następna praca naukowa [121] dotyczy detekcji jonów siarczkowych za pomocą kationów 2,4,6-trifenylopiryliowych z zastosowaniem techniki chromatografii cienkowarstwowej. Według jej autorów *R. Zakrzewskiego* i in. podczas reakcji derywatywacji tworzą się w pierwszym etapie pośrednie pochodne, a w drugim etapie powstają barwne pochodne 2,4,6-trifenylopiryliowe. Oznaczone na poniższym schemacie symbolami L2, L3, LN2 oraz LN3 (Rysunek 12.). W celu detekcji związków chemicznych L2 oraz L3 wykorzystano płytki chromatograficzne typu HPTLC, które były pokryte żelazem krzemionkowym 60 F₂₅₄. Natomiast fazę ruchomą stanowiła mieszanina składająca się z metanolu oraz dichlorometanu (1:5 v/v).

Z kolei do detekcji pośredniej pochodnej LN2 oraz głównej pochodnej LN3 zastosowano fazę stacjonarną w postaci płytek celulozowych, a mieszanina odczynników chemicznych takich jak: bufor fosforanowy o pH = 6, acetonitryl i 1,4-dioksan, zmieszanych w stosunku objętościowym 4:2:1 stanowiła fazę ruchomą. Opracowanie ilościowej procedury oznaczania anionów siarczkowych z zastosowaniem soli piryliowych stało się możliwe dzięki rozwojowi techniki analizy obrazu. Rysunek 12. przedstawia w formie schematu przebieg reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą kationów 2,4,6-trifenylopiryliowych.



R - H

R - $(NH_3)_2$

Rysunek 12. Schemat reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą kationów 2,4,6-trifenylopiryliowych według [121, 122, 123, 125]

Jeszcze inne metody oznaczania anionów siarczkowych w próbkach wody polegają na zastosowaniu błękitu metylenowego jako odczynnika derywatyzującego oraz techniki TLC połączoną z densytometrią lub HPTLC z oprogramowaniem TLSee. W przypadku obu metod analitycznych zastosowano żel krzemionkowy 60 jako fazę stacjonarną. Natomiast mieszaninę dichlorometanu, metanolu, eteru dietylowego i 25% roztworu amoniaku (8:1:1:0,2 v/v/v/v) jako fazę ruchomą. W pierwszej metodzie uzyskane plamki skanowano przy 660 nm, a w drugiej metodzie otrzymane plamki przekształcano w chromatogramy przy użyciu oprogramowania TLSee. Jedna i druga metoda została zwalidowana. Otrzymano granice oznaczalności dla dwóch metod w zakresie od 20 pmol/plamkę do 100 pmol/plamkę. Granice wykrywania i oznaczania ilościowego wynosiły odpowiednio 10 pmol na plamkę ($3,2 \text{ mg/dm}^3$) i 20 pmol na plamkę ($6,4 \text{ mg/dm}^3$) dla pierwszej metody oraz drugiej metody [124].

Na podstawie pracy naukowej (Ż. Rembisz i in.) [125] można oznaczyć zawartość jonów siarczkowych w próbkach wód źródłanych z polskich uzdrowisk Busko Zdrój i Uniejów wykorzystując technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężoną z detektorem UV/VIS. Do reakcji derywatywacji anionów siarczkowych użyto dwie sole piryliowe, przez co

uzyskano barwne pochodne tiopiryliowe. Zastosowano kolumnę C18 jako fazę stacjonarną, a mieszaninę buforu fosforanowego i acetonitrylu jako fazę ruchomą.

Istnieje jednak wiele wątpliwości, co do wiarygodności opisanych w tym podrozdziale (2.3. *Metody oznaczania jonów siarczkowych*) metod oznaczania. Oznaczanie siarczków oraz siarkowodoru w postaci jonów siarczkowych jest często utrudnione przez liczne czynniki, takie jak:

- ◆ niska trwałość,
- ◆ duża lotność,
- ◆ duża podatność na utlenianie,
- ◆ przyczepność do różnych materiałów (np. szkła).

Może to prowadzić do sztucznie podwyższonych lub obniżonych wyników analizy [126]. W dostępnej światowej literaturze odczuwa się brak odpowiednich procedur oznaczenia ilościowego siarczków czy siarkowodoru w materiale biologicznym, przeważają matryce pochodzenia środowiskowego. Proponowane metody są przeważnie skomplikowane, wymagają użycia dużej ilości materiałów do badań i czasu. Z tego powodu nie mogą być zastosowane w rutynowej analizie. Potwierdzenie obecności tych związków chemicznych oraz określenie ich stężenia w materiale biologicznym (np. mocz, krew, tkanki różnych narządów) jest istotne dla praktyki sądowo-lekarskiej, pozwala to na wyjaśnienie przyczyny niektórych przypadków nagłej śmierci. Z kolei przy podejrzeniach o zatrucie przewlekłe, które nie wykazuje charakterystycznych objawów klinicznych, tego typu badania umożliwiają postawienie odpowiedniej diagnozy oraz podjęcie właściwego leczenia. Stąd konieczność dalszych badań ujętych w niniejszej rozprawie doktorskiej.

3.

*Część
doświadczalna*

3.1. Sprzęt laboratoryjny

Podczas wykonywania badań do pracy doktorskiej korzystałam z następującego sprzętu laboratoryjnego (Tabela 1.).

Nazwa sprzętu laboratoryjnego	Nazwa producenta
Dejonizator wody	POLWATER
Elektroda szklana	EUROSENSOR
Ependorfy o pojemności 1 oraz 2 ml	NEOLAB
Falkony o pojemności 50 ml	NEOLAB
Fiolki chromatograficzne z zakrętkami i septami	AGILENT
Homogenizator Labortechnik T2	IKA
Końcówki do pipet o różnej pojemności (10-5000 µl)	HIRSCHMANN
Lodówka laboratoryjna chłodząca do 4°C	LIEBHERR
Łaźnia ultradźwiękowa	POLONIC
Mieszadło magnetyczne z funkcją grzania IKAMAG RET-GS	IKA
Pipety automatyczne o różnej pojemności (10-5000 µl)	LABMATE, BRAND, BIOHIT
pH-metr CP-315M	ELMETRON
Waga analityczna z dokładnością 0,01 mg	OHAUS
Wirówka laboratoryjna MIKRO 120	HETTICH
Wytrząsarka typu vortex MULTI SPEED VORTEX MSV-3500	BIOSAN
Wyparka próżniowa RE-100-PRO automatyczna LCD	CHEMLAND
Zamrażalka niskotemperaturowa laboratoryjna chłodząca do -80°C	PANASONIC
Zamrażalka w lodówce laboratoryjnej chłodząca do -20°C	LIEBHERR

Tabela 1. Sprzęt laboratoryjny wykorzystywany podczas badań

3.2. Aparatura pomiarowa

Chromatograf cieczowy sprzężony z detektorem UV/VIS z matrycą fotodiodową (AGILENT 1260 Infinity II) (Rysunek 13.), który głównie wykorzystywałam w całym cyklu badawczym składał się z:

- ♦ Pompy czterokanałowej G7111A (AGILENT 1260 Infinity II VL), która charakteryzowała się rozszerzonym zakresem mocy i umożliwiała dostarczanie ciśnienia w zakresie 400 bar. Pompa zapewniała bezimpulsowy, stabilny przepływ i dobre wymieszanie rozpuszczalników. Dwa pływające, dokładnie sterowane

serwonapędem tłoki dostosowywały objętość suwu do wybranej prędkości przepływu. Pompa oferowała jednoczesny dostęp do maksymalnie czterech rozpuszczalników, co zapewniało największą elastyczność w zakresie automatycznego mieszania ich. W związku z czym jest ona zalecana do rutynowych badań analitycznych i zastosowań badawczych (sektor spożywczy, farmaceutyczny i ochrony środowiska) oraz do opracowywania procedur analitycznych.

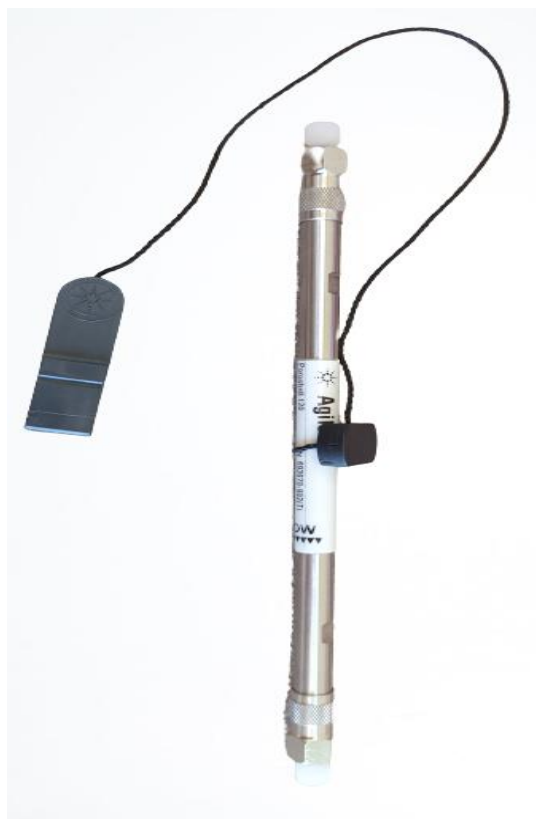
- ◆ Dozownika G7129A (AGILENT 1260 Infinity II Vialsampler), który zapewniał niezawodność, bezpieczeństwo oraz łatwość stosowania wymagane w badaniach kontroli jakości, farmaceutycznych, żywnościowych i ochrony środowiska. Dozownik posiadał opcjonalny zintegrowany przedział kolumny dla dwóch kolumn LC z kontrolą temperatury do 80°C i chłodnicę kolumn podtrzymującą stabilną temperaturę do 4°C (wszystko w jednym module). Do innych zalet można wymienić: dozowanie w zakresie objętości od 1 µl do 100 µl, pojemność do 132 fiolek chromatograficznych, port przemywania igły (umożliwiający przemywanie zewnętrznej części igły w celu uzyskania możliwe najmniejszego przeniesienia w trakcie rutynowej pracy), nakładane dozowania pozwalające na zwiększenie produktywności oraz program dozowania pozwalający dostosowanie opcji dozowania i etapów przygotowania próbki poprzedzających dozowanie.
- ◆ Urządzenia MCT G7116A (AGILENT 1260 Infinity II Multicolumn Thermostat), które umożliwiał precyzyjne termostatowanie kolumny w szerokim zakresie temperaturowym (zastosowanie chłodzenia i ogrzewania modulem Peltiera w dwóch niezależnych strefach temperaturowych od 10°C poniżej temperatury otoczenia do 85°C), dając dużą elastyczność do optymalizacji szybkości i selektywności rozdzielania. Dużą zaletą tego elementu HPLC/DAD była zwiększona pojemność do czterech kolumn w pojedynczym module MCT oraz nowy wymiennik Quick-Connect Heat Exchanger umożliwiający termostatowanie fazy ruchomej przed kolumną (łatwy w montażu dla każdej z czterech kolumn i zoptymalizowany dla jak najmniejszej objętości wewnętrznej). Również wysoka dokładność temperatury dla uzyskiwania niezmiennych czasów retencji pików.
- ◆ Detektora G7115A (1260 Infinity II DAD WR), który pozwalał na uzyskiwanie najwyższej wydajności optycznej. Ten detektor to perfekcyjne rozwiązanie do szybkich aplikacji chromatograficznych, dzięki szybkości zbierania 120 Hz. Umożliwiał uzyskanie wysokiej intensywności promieniowania oraz niższych granic

wykrywalności w zakresie długości fal (190-950 nm) za pomocą lampy deuterowej o przedłużonej żywotności. Szybką weryfikację dokładności długości fali umożliwił wbudowany filtr z tlenku holmu. Natomiast poprawę stabilności linii bazowej uzyskiwano za pomocą wbudowanego kontrolera temperatury.



Rysunek 13. Widok ogólny na HPLC/DAD (Źródło: wykonanie własne.)

- ◆ Kolumny chromatograficznej InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4,6 × 150 mm; 4 μm) (Rysunek 14.), która charakteryzowała się następującymi parametrami: średnica wewnętrzna kolumny 4,6 mm, długość kolumny 150 mm, wielkość porów 120 Å, wielkość cząsteczek 4 μm, powierzchnia 130 m²/g, obciążenie węglem 10%, podwójne zakończenie, wypełnienie kolumny C18 (RP18, ODS, Oktadecyl), zakres pomiaru pH od 2 do 9, limit temperatury 60°C, maksymalne ciśnienie 600 bar (9000 psi).



Rysunek 14. Widok ogólny na kolumnę chromatograficzną (Źródło: wykonanie własne.)

- ◆ Komputera z oprogramowaniem Agilent ChemStation oraz sterownikami LC, dzięki czemu kontrola nad HPLC/DAD była wydajniejsza i elastyczniejsza. Dostępne były dwie wersje oprogramowania, jedna tzw. „online”, która w połączeniu z modułami chromatografu umożliwiała sterowanie ich parametrami i prowadzenie eksperymentów. Druga tzw. „offline”, która bez połączenia z modułami chromatografu przeznaczona była do analizy uzyskiwanych danych.

Stosowaną aparaturą pomiarową do badań naukowych były również spektrometry:

- ◆ NMR 600 MHz Bruker Avance III (spektroskopia NMR pozwalająca m.in. na wykonanie widm 1D takich jąder jak ¹H i ¹³C{¹H}),
- ◆ Nexus FT-IR Thermo Nicole (spektroskopia IR),
- ◆ MAS Varian 500-MS LC Ion Trap (spektroskopia MS).

3.3. Odczynniki chemiczne

Przy realizacji części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej zastosowałam poniższe odczynniki chemiczne z uwzględnieniem ich producenta oraz czystości (Tabela 2.):

Odczynniki chemiczne	Producent	Czystość [%]
Acetofenon	SIGMA-ALDRICH	98,5
Acetonitryl	POCH	99,9
Aldehyd <i>p</i> - <i>N,N</i> -dimetyloaminobenzoesowy	SIGMA-ALDRICH	98,5
Chloran(VII) 4-[<i>p</i> -(<i>N,N</i> -dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu ^a	-	-
Chlorek sodu	WARCHEM	99,8
Diwodorofosforan(V) sodu jednowodny	POCH	98,0
Etanol	CHEMPUR	96,0
Jod krystaliczny	WARCHEM	99,5
Jodek potasu	WARCHEM	99,0
Kreatynina	SIGMA-ALDRICH	98,0
Kwas chlorowy(VII)	CHEMPUR	70,0
Kwas siarkowy(VI)	POCH	98,0
Kwas solny	POCH	35,0-38,0
Kwas trichlorooctowy	CHEMPUR	10,0
Manganian(VII) potasu	WARCHEM	98,0
Metanol	SIGMA-ALDRICH	99,9
Siarczek sodu dziewięciowodny	POCH	95,0
Skrobia rozpuszczalna	CHEMPUR	100,0
Tiosiarczan sodu	POCH	97,0
Tris(hydroksymetylo)aminometan	POCH	99,8
Węglan sodu	CHEMPUR	99,5
Woda dejonizowana ^b	-	-
Wodorosiarczan(VI) 2,4,6-trifenylopirylu	SIGMA-ALDRICH	99,0
Wodorotlenek sodu	POCH	98,8

Tabela 2. Odczynniki chemiczne wykorzystywane podczas badań

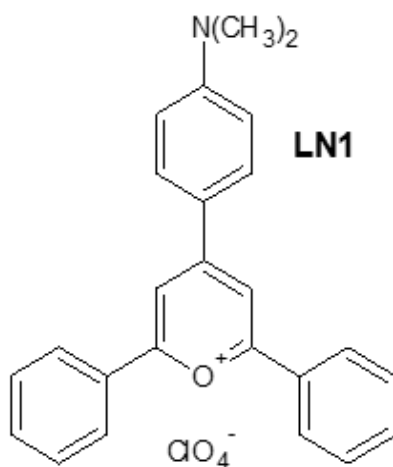
^a - związek chemiczny zsyntezowany i zidentyfikowany w Katedrze Chemii Organicznej i Stosowanej Uniwersytetu Łódzkiego

^b - otrzymywana przed każdym eksperymentem za pomocą dejonizatora, a następnie odgazowywana za pomocą myjki ultradźwiękowej. W wyniku czego zawsze była świeża oraz o zmniejszonej zawartości tlenu, dwutlenku węgla i powietrza. Przyczyniało się to do zmniejszenia procesu utleniania oznaczanego analitu.

3.3.1. Synteza odczynnika derywatyizującego LN1

Odczynnik derywatyizujący wykorzystywany podczas moich prac eksperymentalnych na studiach doktoranckich - chloran(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu

(LN1), został zsyntezowany i zidentyfikowany w Katedrze Chemii Organicznej i Stosowanej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego przy współpracy jej pracowników. Wzór LN1 został zaprezentowany na Rysunku nr 15. Synteza polegała na tym, że do kolby okrągłodennej dodałam 0,1 mola aldehydu *p*-*N,N*-dimetyloaminobenzoesowego, 0,2 mola acetofenonu oraz kamyczki wrzenne. Następnie składniki mieszałam w temperaturze pokojowej przez 30 minut i jednocześnie dodawałam małymi porcjami 6 ml 98% kwasu siarkowego(VI). Później całą mieszaninę reakcyjną ponownie mieszałam przez 60 minut w temperaturze 100°C, po czym dodałam 200 ml 96% etanolu i 10 ml 70% kwasu chlorowego(VII). Od tego momentu kolbę okrągłodenną z całą jej zawartością pozostawiłam na 24 godziny, w celu wykrystalizowania pożądanego związku chemicznego. W dalszej kolejności wykrystalizowany odczynnik derywatyżujący LN1 sączyłam, oczyszczałam z zbędnych zanieczyszczeń oraz suszyłam. Cała synteza została przeprowadzona według następujących danych literaturowych: [127, 128]. W celu identyfikacji powstałego związku chemicznego (LN1) zostały wykonane widma spektroskopowe za pomocą aparatu NMR 600 MHz Bruker Avance III, Nexus FT-IR Thermo Nicole oraz MAS Varian 500-MS LC Ion Trap.



Rysunek 15. Wzór chloranu(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopiryliu (LN1) według [125]

3.4. Przygotowywanie roztworów

♦ *Roztwór podstawowy siarczku sodu o stężeniu $C_m = 2,6 \cdot 10^{-3}$ mol/l*

Odważkę stałego siarczku sodu dziewięciowodnego o masie $m = 0,0624$ g przeniosłam ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. Potem ustaliłam dokładne miano roztworu podstawowego siarczku sodu poprzez miareczkowanie jodometryczne według przepisu [129, 130].

◆ **Roztwór roboczy siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$**

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml wprowadziłam 0,2 ml roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu $C_m = 1 \text{ mol/l}$ i 3,8 ml mianowanego jodometrycznie roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 2,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. Następnie uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór buforu tris(hydroksymetylo)aminometanu (TRIS) o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1} \text{ mol/l}$ i odpowiednim pH**

Odważkę stałego TRIS o masie $m = 1,2114 \text{ g}$ rozpuściłam w ok. 80 ml wody, następnie doprowadziłam powstały roztwór do odpowiedniego pH (wykorzystując wykalibrowaną na wzorce buforowe elektrodę szklaną). Potem uzyskany roztwór przenieśliśmy ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór buforu fosforanowego o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1} \text{ mol/l}$ i objętości 100 ml oraz odpowiednim pH**

Odważkę stałego diwodorofosforanu(V) sodu jednowodnego o masie $m = 1,3800 \text{ g}$ rozpuściłam w ok. 80 ml wody, następnie doprowadziłam powstały roztwór do odpowiedniego pH (wykorzystując wykalibrowaną na wzorce buforowe elektrodę szklaną). Potem uzyskany roztwór przenieśliśmy ilościowo do kolby miarowej o objętości 100 ml, uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Kwas solny o stężeniu $C_m = 0,5 \text{ mol/l}$**

4,2 ml stężonego kwasu solnego umieściłam w kolbie o pojemności 10 ml z niewielką ilością wody. Następnie uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu $C_m = 1 \text{ mol/l}$**

Odważkę stałego wodorotlenku sodu o masie $m = 2 \text{ g}$ przenieśliśmy ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór manganianu(VII) potasu o stężeniu $C_m = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$**

Odważkę stałego manganianu(VII) potasu o masie $m = 0,3160 \text{ g}$ przenieśliśmy ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Następnie uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór podstawowy odczynnika derywatyzującego chloranu(VII)**

4-[p-(N,N-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu (LN1) o stężeniu

$$C_m = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$$

Odważkę stałego LN1 o masie $m = 0,0452$ g przenieśliśmy ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Następnie uzupełniłam acetonitrylem do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór roboczy odczynnika derywatyzującego chloranu(VII)**

4-[p-(N,N-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu (LN1) o stężeniu

$$C_m = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

Do kolby miarowej o pojemności 50 ml przenieśliśmy 5 ml roztworu podstawowego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Następnie uzupełniłam acetonitrylem do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór podstawowy odczynnika derywatyzującego wodorosiarczany(VI)**

2,4,6-trifenylopirylu (L1) o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/l

Odważkę stałego L1 o masie $m = 0,0406$ g przenieśliśmy ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Następnie uzupełniłam acetonitrylem do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór roboczy odczynnika derywatyzującego wodorosiarczany(VI)**

2,4,6-trifenylopirylu (L1) o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l

Do kolby miarowej o pojemności 50 ml przenieśliśmy 5 ml roztworu podstawowego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Następnie uzupełniłam acetonitrylem do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór chlorku sodu (soli fizjologicznej) o stężeniu $C_p = 0,9\%$**

Odważkę stałego chlorku sodu o masie $m = 18$ g przenieśliśmy ilościowo do kolby miarowej o pojemności 2000 ml. Następnie uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ **Roztwór kreatyniny o odpowiednim stężeniu**

Odpowiednią odważkę stałej kreatyniny (Tabela 3.) przenieśliśmy ilościowo do kolbki o pojemności 1 ml, rozpuściłam w 950 μ l kwasu solnego o stężeniu $C_m = 0,5$ mol/l i uzupełniłam 36-38% kwasem solnym do kreski. Następnie tak przygotowany roztwór umieściłam na 30 sekund na wytrząsarce typu vortex pracującej z prędkością obrotową 3500 rpm/min. W celu całkowitego rozpuszczenia się kreatyniny

w użytych rozpuszczalnikach. Roztwór kreatyniny wykonywałam według przepisu [131].

Masa odważki kreatyniny [g]	Stężenie molowe kreatyniny [$\mu\text{mol/ml}$]
0,0057	50
0,0283	250
0,0849	750
0,1697	1500

Tabela 3. Masa odważek oraz uzyskane stężenia kreatyniny

◆ *Roztwór buforu fosforanowego o odpowiednim stężeniu i pH*

Odpowiednią odważkę stałego diwodorofosforanu(V) sodu jednowodnego (Tabela 4.) rozpuściłam w ok. 900 ml wody, następnie doprowadziłam powstały roztwór do odpowiedniego pH (wykorzystując wykalibrowaną na wzorce buforowe elektrodę szklaną). Potem uzyskany roztwór przeniósłam ilościowo do kolby miarowej o objętości 1000 ml, uzupełniłam wodą kreski i całość dokładnie wymieszałam.

Masa odważki diwodorofosforanu(V) sodu jednowodnego [g]	Stężenie molowe roztworu diwodorofosforanu(V) sodu jednowodnego [mol/l]
0,6900	$5 \cdot 10^{-3}$
1,3798	$1 \cdot 10^{-2}$
2,7598	$2 \cdot 10^{-2}$
6,8994	$5 \cdot 10^{-2}$

Tabela 4. Masa odważek oraz uzyskane stężenia molowe diwodorofosforanu(V) sodu jednowodnego

◆ *Roztwór tiosiarczanu sodu o stężeniu ok. $C_m = 1 \cdot 10^{-1} \text{ mol/l}$*

Odważkę stałego tiosiarczanu sodu o masie $m = 15,8110 \text{ g}$ przeniósłam ilościowo do kolby miarowej o pojemności 1000 ml i rozpuściłam w przegotowanej wodzie. Następnie dodałam ok. 0,1 g węgla sodu, a po jego rozpuszczeniu uzupełniłam kolbę przegotowaną wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam.

◆ *Roztwór jodu w jodku potasu (płyn Lugola) o stężeniu $C_p = 5\%$*

Odważkę stałego jodku potasu o masie $m = 10 \text{ g}$ przeniósłam ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 ml i rozpuściłam w wodzie. Następnie całość mieszałam aż do całkowitego rozpuszczenia i odstawiłam na 60 minut. Po tym czasie odważkę stałego krystalicznego jodu o masie $m = 5 \text{ g}$ przeniósłam ilościowo do tej samej kolby, po czym intensywnie całą zawartość mieszałam i odstawiłam na 12 godzin. Na sam koniec uzupełniłam kolbę wodą do kreski.

3.5. Procedury analityczne

Oznaczanie jonów siarczkowych w próbkach standardów w postaci pochodnej L3 i LN3 z odczynnikami derywatyzującymi L1 i LN1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD

Procedura analityczna dla L3, n = 3

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 1 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 9, 3 ml acetonitrylu, 300 μ l roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 600 μ l roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 μ l 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności przenieśliam uzyskane mieszaniny reakcyjne do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Procedura analityczna dla LN3, n = 3

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 μ l roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 10, 3 ml acetonitrylu, 300 μ l roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 600 μ l roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 μ l 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności przenieśliam uzyskane mieszaniny reakcyjne do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Wyznaczanie zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w postaci pochodnej L3, n = 6

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 1 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 9, 3 ml acetonitrylu, odpowiednią objętość (20, 50, 100, 150, 300, 500, 750, 1500 μ l) roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, odpowiednią objętość (40, 100, 200, 300, 600, 1000, 1500, 3000 μ l) roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 μ l 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności przenieśliam uzyskane mieszaniny reakcyjne do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Wyznaczanie zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w postaci pochodnej LN3, n = 6

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 μl roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 10, 3 ml acetonitrylu, odpowiednią objętość (10, 20, 50, 100, 150, 300, 500 μl) roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, odpowiednią objętość (20, 40, 100, 200, 300, 600, 1000 μl) roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności przenieśliam uzyskane mieszaniny reakcyjne do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Badanie trwałości pochodnej L3, n = 3

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 1 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 9, 3 ml acetonitrylu, 300 μl roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 600 μl roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. Uzyskane mieszaniny reakcyjne przenieśliam do ependorfów, które umieściłam w temperaturze: 25°C, 4°C, -20°C oraz -80°C. W następnej kolejności przed każdym doświadczeniem przenosiłam mieszaniny reakcyjne z ependorfów do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Przed każdą analizą chromatograficzną doprowadzałam zamrożone próbki do temperatury pokojowej. Trwałość L3 mierzyłam w przedziale czasowym od 0 do 24 godzin w temperaturze 25°C, natomiast w pozostałych temperaturach w zakresie czasowym od 0 do 3 dni. Od momentu zmieszania roztworu siarczku sodu z roztworem odczynnika derywatyzującego L1 zaczęłam mierzyć czas eksperymentu.

Badanie trwałości pochodnej LN3, n = 3

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 μl roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 10, 3 ml acetonitrylu, 300 μl roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 600 μl roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. Uzyskane mieszaniny reakcyjne przenieśliam do ependorfów,

które umieściłam w temperaturze: 25°C, 4°C, -20°C oraz -80°C. W następnej kolejności przed każdym doświadczeniem przenosiłam mieszaniny reakcyjne z ependorfów do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Przed każdą analizą chromatograficzną doprowadzałam zamrożone próbki do temperatury pokojowej. Trwałość LN3 mierzyłam w przedziale czasowym od 0 do 24 godzin w temperaturze 25°C, natomiast w pozostałych temperaturach w zakresie czasowym od 0 do 3 dni. Od momentu zmieszania roztworu siarczku sodu z roztworem odczynnika derywatyzującego LN1 zaczęłam mierzyć czas eksperymentu.

Badanie reaktywności odczynnika derywatyzującego L1 z innymi jonami, n = 3

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 1 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 9, 3 ml acetonitrylu, 300 µl roztworu zawierającego odpowiedni anion (NO_3^- , Cl^- , I^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-}) o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 600 µl roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 µl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności przeniosłam uzyskane mieszaniny reakcyjne do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Badanie reaktywności odczynnika derywatyzującego LN1 z innymi jonami, n = 3

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 µl roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 10, 3 ml acetonitrylu, 300 µl roztworu zawierającego odpowiedni anion (NO_3^- , Cl^- , I^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-}) o stężeniu $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 600 µl roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 µl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności przeniosłam uzyskane mieszaniny reakcyjne do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Oznaczanie jonów siarczkowych w próbkach z ludzkim moczem w postaci pochodnej L3 i LN3 z odczynnikami derywatyzującymi L1 i LN1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD

Analiza ilościowa jonów siarczkowych w postaci pochodnej L3 w mieszaninie reakcyjnej z moczem człowieka, n = 6

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 1 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 9, 3 ml acetonitrylu, 1 ml porannego moczu, 3000 μ l roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 μ l 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przenieśliam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przenieśliam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Analiza ilościowa jonów siarczkowych w postaci pochodnej LN3 w mieszaninie reakcyjnej z moczem człowieka, n = 6

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 μ l roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 10, 3 ml acetonitrylu, 1 ml porannego moczu, 3000 μ l roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 μ l 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przenieśliam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przenieśliam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Wyznaczanie zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w postaci pochodnej L3 w mieszaninie reakcyjnej z moczem człowieka, n = 6

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 0,5 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 9, 3 ml acetonitrylu, 1 ml porannego moczu, odpowiednią objętość (20, 50, 100, 150, 300, 500, 750, 1500 μ l) roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 3000 μ l roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 μ l 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie

wymieszałam. W następnej kolejności mieszaniny reakcyjne przeniosłam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przeniosłam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Po wprowadzeniu próbki moczu do serii mieszanin reakcyjnych umieszczałam ją w zamrażalce niskotemperaturowej laboratoryjnej chłodzącej do temperatury -80°C , a przed każdą analizą chromatograficzną odmrażałam ją do temperatury pokojowej. Badania wykonywałam przez 3 dni kolejne dni i wykorzystywałam do nich jedną próbkę porannego moczu człowieka.

Wyznaczanie zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w postaci pochodnej LN3 w mieszaninie reakcyjnej z moczem człowieka, $n = 6$

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 μl roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i $\text{pH} = 10$, 3 ml acetonitrylu, 1 ml porannego moczu, odpowiednią objętość (10, 20, 50, 100, 150, 300, 500 μl) roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 3000 μl roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przeniosłam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przeniosłam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Po wprowadzeniu próbki moczu do serii mieszanin reakcyjnych umieszczałam ją w zamrażalce niskotemperaturowej laboratoryjnej chłodzącej do temperatury -80°C , a przed każdą analizą chromatograficzną odmrażałam ją do temperatury pokojowej. Badania wykonywałam przez 3 dni kolejne dni i wykorzystywałam do nich jedną próbkę porannego moczu człowieka.

Badanie trwałości pochodnej L3 w mieszaninie reakcyjnej z moczem człowieka, $n = 3$

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 1 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i $\text{pH} = 9$, 3 ml acetonitrylu, 1 ml porannego moczu, 300 μl roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 3000 μl roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przeniosłam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez

10 minut. Pozyskany supernatant przeniosłam do ependorfów, które umieściłam w temperaturze: 25°C, 4°C, -20°C oraz -80°C. Następnie przed każdym doświadczeniem przenosiłam supernatant z ependorfów do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Przed każdą analizą chromatograficzną doprowadzałam zamrożone próbki do temperatury pokojowej. Trwałość L3 mierzyłam w przedziale czasowym od 0 do 24 godzin w temperaturze 25°C, natomiast w pozostałych temperaturach w zakresie czasowym od 0 do 3 dni. Od momentu zmieszania roztworu siarczku sodu z roztworem odczynnika derywatyzującego L1 zaczęłam mierzyć czas eksperymentu.

Badanie trwałości pochodnej LN3 w mieszaninie reakcyjnej z moczem człowieka, n = 3

Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 µl roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 10, 3 ml acetonitrylu, 1 ml porannego moczu, 300 µl roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 3000 µl roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 µl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przeniosłam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przeniosłam do ependorfów, które umieściłam w temperaturze: 25°C, 4°C, -20°C oraz -80°C. Następnie przed każdym doświadczeniem przenosiłam supernatant z ependorfów do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Przed każdą analizą chromatograficzną doprowadzałam zamrożone próbki do temperatury pokojowej. Trwałość LN3 mierzyłam w przedziale czasowym od 0 do 24 godzin w temperaturze 25°C, natomiast w pozostałych temperaturach w zakresie czasowym od 0 do 3 dni. Od momentu zmieszania roztworu siarczku sodu z roztworem odczynnika derywatyzującego LN1 zaczęłam mierzyć czas eksperymentu.

Wyznaczanie zakresu oznaczalności kreatyniny w mieszaninie reakcyjnej z moczem człowieka, n = 6

Do kolbek o pojemności 1 ml wprowadziłam kolejno: 500 µl porannego moczu, 10 µl roztworu kreatyniny o odpowiednim stężeniu (0, 50, 250, 750, 1500 µmol/ml), uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. Następnie tak uzyskane mieszaniny reakcyjne przeniosłam w objętości 250 µl do kolbek o pojemności 5 ml, uzupełniłam wodą do kreski

i znów całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności sporządzone mieszaniny reakcyjne przenieśliam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Procedurę analityczną wykonywałam według przepisu [131].

Analiza ilościowa kreatyniny w mieszaninie reakcyjnej z moczem człowieka, n = 6

Do kolbek o pojemności 2 ml wprowadziłam 40 µl porannego moczu, uzupełniłam wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. Następnie tak uzyskane mieszaniny reakcyjne przenieśliam w objętości 50 µl do kolbek o pojemności 1 ml, uzupełniłam wodą do kreski i znów całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności sporządzone mieszaniny reakcyjne przenieśliam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam ich analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Procedurę analityczną wykonywałam według przepisu [131].

Oznaczanie jonów siarczkowych w próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej w postaci pochodnej L3 i LN3 z odczynnikami derywatyzującymi L1 i LNI z zastosowaniem techniki HPLC/DAD

Analiza ilościowa jonów siarczkowych w postaci pochodnej L3 w mieszaninie reakcyjnej z homogenatem wątroby kurzej, n = 6

Odważyłam około 1 g świeżej wątroby kurzej, następnie odważkę umieściłam w falkonie i dodałam 12 ml roztworu soli fizjologicznej. W czasie procesu homogenizacji utrzymywałam niską temperaturę poprzez umieszczenie falkonu z całą jego zawartością w łaźni lodowej. Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 1 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 9, 3 ml acetonitrylu, 1 ml homogenatu, 3000 µl roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 µl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przenieśliam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przenieśliam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Analiza ilościowa jonów siarczkowych w postaci pochodnej LN3 w mieszaninie reakcyjnej z homogenatem wątroby kurzej, n = 6

Odważyłam około 1 g świeżej wątroby kurzej, następnie odważkę umieściłam w falkonie i dodałam 10 ml roztworu soli fizjologicznej. W czasie procesu homogenizacji utrzymywałam

niską temperaturę poprzez umieszczenie falkonu z całą jego zawartością w łaźni lodowej. Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 μl roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 10, 3 ml acetonitrylu, 1 ml homogenatu, 3000 μl roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przeniosłam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przeniosłam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD.

Badanie trwałości pochodnej L3 w mieszaninie reakcyjnej z homogenatem wątroby kurzej, n = 3

Odważyłam około 1 g świeżej wątroby kurzej, następnie odważkę umieściłam w falkonie i dodałam 12 ml roztworu soli fizjologicznej. W czasie procesu homogenizacji utrzymywałam niską temperaturę poprzez umieszczenie falkonu z całą jego zawartością w łaźni lodowej. Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 1 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 9, 3 ml acetonitrylu, 1 ml homogenatu, 300 μl roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 3000 μl roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przeniosłam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przeniosłam do ependorfów, które umieściłam w temperaturze: 25°C, 4°C, -20°C oraz -80°C. Następnie przed każdym doświadczeniem przenosiłam supernatant z ependorfów do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Przed każdą analizą chromatograficzną doprowadzałam zamrożone próbki do temperatury pokojowej. Trwałość L3 mierzyłam w przedziale czasowym od 0 do 24 godzin w temperaturze 25°C, natomiast w pozostałych temperaturach w zakresie czasowym od 0 do 3 dni. Od momentu zmieszania roztworu siarczku sodu z roztworem odczynnika derywatyzującego L1 zaczęłam mierzyć czas eksperymentu.

Badanie trwałości pochodnej LN3 w mieszaninie reakcyjnej z homogenatem wątroby kurzej, n = 3

Odważyłam około 1 g świeżej wątroby kurzej, następnie odważkę umieściłam w falkonie i dodałam 10 ml roztworu soli fizjologicznej. W czasie procesu homogenizacji utrzymywałam niską temperaturę poprzez umieszczenie falkonu z całą jego zawartością w łaźni lodowej. Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 μl roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 10, 3 ml acetonitrylu, 1 ml homogenatu, 300 μl roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 3000 μl roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przenieśliam do ependorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przenieśliam do ependorfów, które umieściłam w temperaturze: 25°C, 4°C, -20°C oraz -80°C. Następnie przed każdym doświadczeniem przenosiłam supernatant z ependorfów do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Przed każdą analizą chromatograficzną doprowadzałam zamrożone próbki do temperatury pokojowej. Trwałość LN3 mierzyłam w przedziale czasowym od 0 do 24 godzin w temperaturze 25°C, natomiast w pozostałych temperaturach w zakresie czasowym od 0 do 3 dni. Od momentu zmieszania roztworu siarczku sodu z roztworem odczynnika derywatyzującego LN1 zaczęłam mierzyć czas eksperymentu.

Wyznaczanie zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w postaci pochodnej L3 w mieszaninie reakcyjnej z homogenatem wątroby kurzej, n = 6

Odważyłam około 1 g świeżej wątroby kurzej, następnie odważkę umieściłam w falkonie i dodałam 12 ml roztworu soli fizjologicznej. W czasie procesu homogenizacji utrzymywałam niską temperaturę poprzez umieszczenie falkonu z całą jego zawartością w łaźni lodowej. Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 0,5 ml roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 9, 3 ml acetonitrylu, 1 ml homogenatu, odpowiednią objętość (20, 50, 100, 150, 300, 500, 750, 1500 μl) roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, 3000 μl roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Po 10 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 200 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przenieśliam do ependorfów

i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przeniosłam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Po procesie odważania wątroby kurzej do serii mieszanin reakcyjnych umieszczałam ją w zamrażalce laboratoryjnej chłodzącej do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a przed każdą analizą chromatograficzną odmrażałam ją do temperatury pokojowej. Badania wykonywałam przez 3 dni kolejne dni i wykorzystywałam do nich jedną i tą samą wątrobę kurzą.

Wyznaczanie zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w postaci pochodnej LN3 w mieszaninie reakcyjnej z homogenatem wątroby kurzej, n = 6

Odważyłam około 1 g świeżej wątroby kurzej, następnie odważkę umieściłam w falkonie i dodałam 10 ml roztworu soli fizjologicznej. W czasie procesu homogenizacji utrzymywałam niską temperaturę poprzez umieszczenie falkonu z całą jego zawartością w łaźni lodowej. Do kolbek o objętości 10 ml wprowadziłam kolejno: 500 μl roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1} \text{ mol/l}$ i $\text{pH} = 10$, 3 ml acetonitrylu, 1 ml homogenatu, odpowiednią objętość (10, 20, 50, 100, 150, 300, 500 μl) roztworu siarczku sodu o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$, 3000 μl roztworu odczynnika derywatyzującego LN1 o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. Po 2 minutach od momentu zmieszania ze sobą wszystkich reagentów wprowadziłam 400 μl 70% kwasu chlorowego(VII), uzupełniłam kolbki wodą do kreski i całość dokładnie wymieszałam. W następnej kolejności uzyskane mieszaniny reakcyjne przeniosłam do endorfów i odwirowywałam je z prędkością obrotową 14000 obr./min przez 10 minut. Pozyskany supernatant przeniosłam do fiolek chromatograficznych i przeprowadziłam jego analizę instrumentalną za pomocą techniki HPLC/DAD. Po procesie odważania wątroby kurzej do serii mieszanin reakcyjnych umieszczałam ją w zamrażalce laboratoryjnej chłodzącej do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a przed każdą analizą chromatograficzną odmrażałam ją do temperatury pokojowej. Badania wykonywałam przez 3 dni kolejne dni i wykorzystywałam do nich jedną i tą samą wątrobę kurzą.

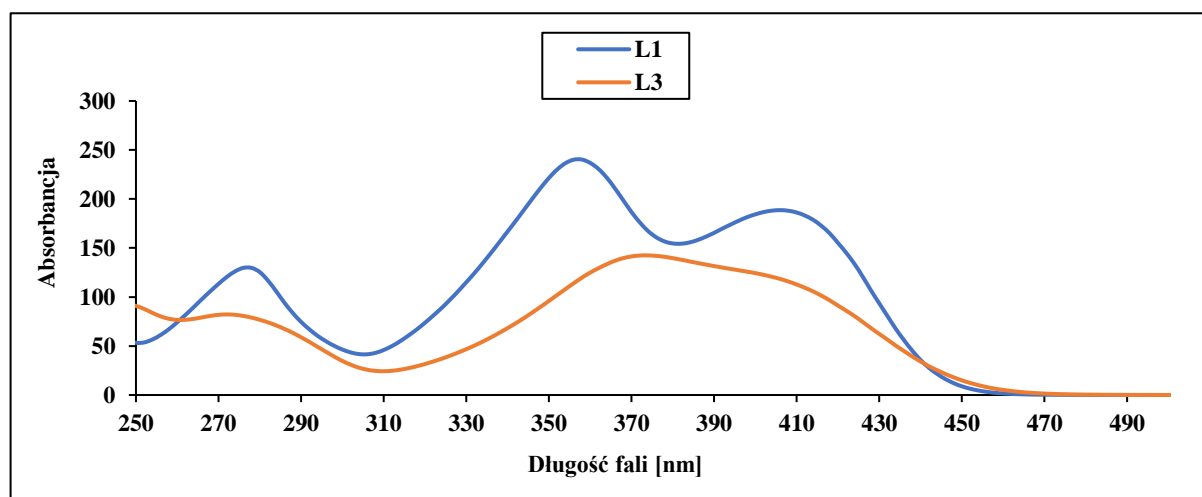
3.6. Oznaczanie jonów siarczkowych za pomocą soli piryliowych

3.6.1. Badania wykonane na próbkach standardów

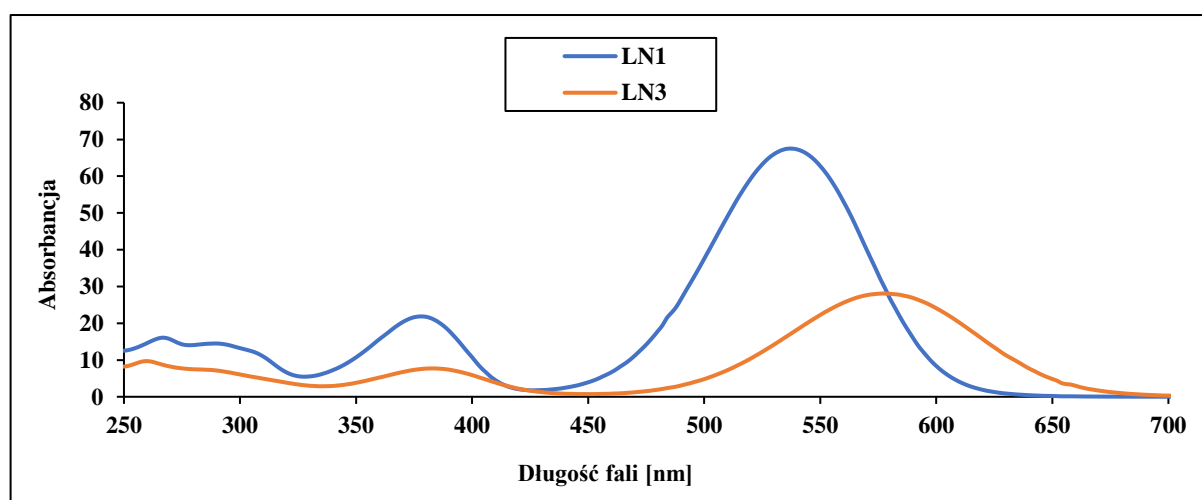
3.6.1.1. Optymalizacja warunków chromatograficznych

W metodach oznaczania jonów siarczkowych z wykorzystaniem soli piryliowych za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wykorzystywałam detektor

UV/VIS z matrycą fotodiodową (DAD). Dlatego dobrałam odpowiednie długości fali, przy których L1, L3, LN1 oraz LN3 wykazują maksimum absorpcji. Na podstawie uzyskanych widm wynika, że związek L1 wykazuje swoje maksimum absorpcji przy 356 nm, natomiast pochodna L3 przy 371 nm. Związek LN1 absorbuje przy 540 nm, a związek LN3 przy 580 nm (Wykres 1. i Wykres 2.).



Wykres 1. Widmo dla związku chemicznego L1 oraz L3



Wykres 2. Widmo dla związku chemicznego LN1 oraz LN3

Przystępując do optymalizacji metod oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynników derywatyzujących L1 i LN1 w pierwszym etapie dobrałam odpowiednie parametry chromatograficzne. W tym celu przygotowałam roztwory pochodnych L3 i LN3, które wprowadzano do kolumny chromatograficznej InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4,6×150 mm; 4 μm). Dobierając odpowiednie parametry chromatograficzne modyfikowałam kolejno:

- ◆ %-ową zawartość modyfikatora organicznego czyli acetonitrylu w fazie ruchomej,
- ◆ prędkość przepływu fazy ruchomej,

- ◆ pH roztworu buforu fosforanowego,
- ◆ stężenie roztworu buforu fosforanowego.

Natomiast za optymalne warunki chromatograficzne dla dwóch metod analitycznych przyjął:

- ◆ objętość wprowadzanego roztworu na kolumnę chromatograficzną (25 μ l),
- ◆ temperaturę automatycznego podajnika próbek (4°C),
- ◆ temperaturę termostatu kolumn (25°C).

Wybierając optymalną wartość danego parametru chromatograficznego zwracałam uwagę na:

- ◆ całkowite rozdzielenie badanych pochodnych od nadmiaru odczynnika derywatyzyjnego,
- ◆ minimalną powierzchnię pików względem maksymalnego stosunku sygnału do szumu,
- ◆ odporność metody analitycznej (tj. stabilność otrzymywanych wyników w przedziale niewielkich modyfikacji warunków pomiarowych opisanych w metodzie analitycznej),
- ◆ kształt pików,
- ◆ dopuszczalne ciśnienie (tj. < 138 bar),
- ◆ pola powierzchni pików,
- ◆ czas retencji związku chemicznego L1, LN1, L3 i LN3 (tj. < 10 min),
- ◆ niewielki czas oraz wysiłek potrzebny eksperymentatorowi do opracowania metody analitycznej [132, 133].

Ostatecznie fazę ruchomą stanowiła mieszanina składająca się z acetonitrylu oraz roztworu buforu fosforanowego z elucją izokratyczną. W metodzie oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzyjnego L1 optymalne warunki chromatograficzne zapewniała faza ruchoma składająca się z roztworu buforu fosforanowego o stężeniu 0,01 mol/l i pH 3 oraz acetonitrylu. Stosunek objętościowy zmieszanych z sobą składników eluentu wynosił 60:40 v/v, który poruszał się z prędkością przepływu 0,90 ml/min. Natomiast optymalne warunki chromatograficzne dla pochodnej LN3 uzyskałam stosując fazę ruchomą składającą się z roztworu buforu fosforanowego o stężeniu 0,02 mol/l i pH 3,5 oraz acetonitrylu. Stosunek objętościowy zmieszanych z sobą składników eluentu wynosił 35:65 v/v, który poruszał się z prędkością przepływu 0,55 ml/min. Przy tych warunkach chromatograficznych czasy retencji dla pików pochodzących od związku L1 i pochodnej L3 wynoszą odpowiednio 7,3 min oraz 8,4 min. Natomiast dla pików pochodzących od LN1 czas retencji wynosi 4,6 min, a dla pików od pochodnej LN3 5,0 min. Zoptymalizowane parametry chromatograficzne dla obu metod

analitycznych, polegających na oznaczaniu jonów siarczkowych z zastosowaniem odczynników derywatyzujących L1 oraz LN1 przy pomocy techniki HPLC/DAD zostały zaprezentowane w Tabeli nr 5.

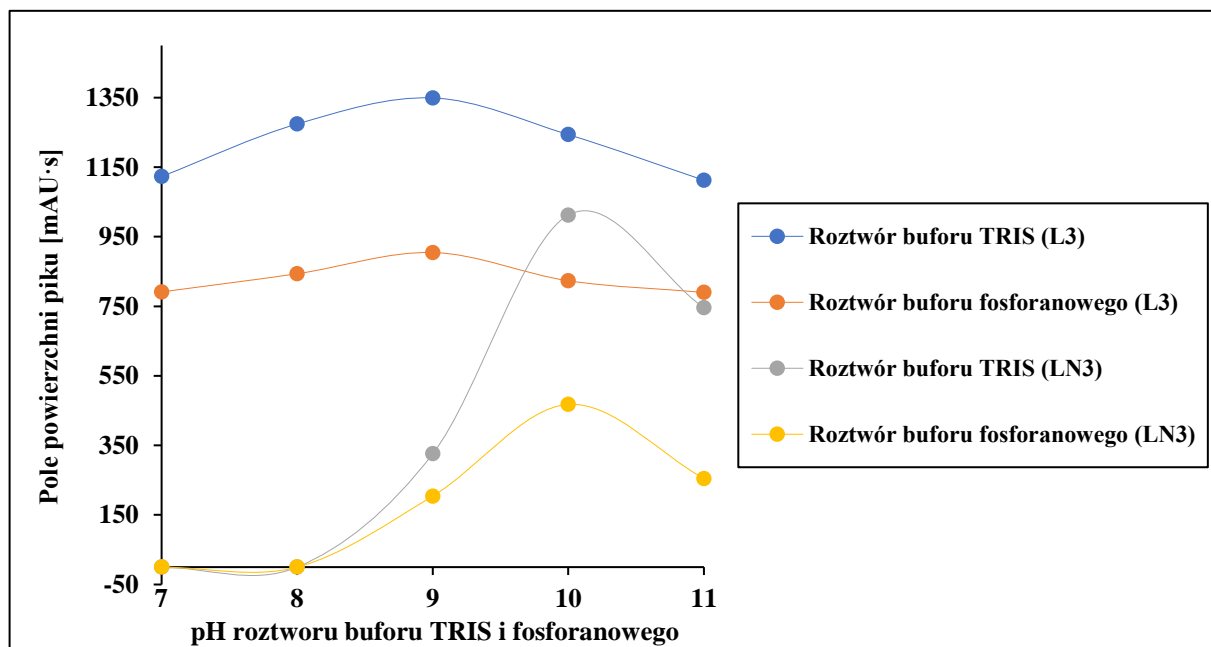
Parametr	Pochodna L3	Pochodna LN3
Kolumna chromatograficzna	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4,6 × 150 mm; 4 μm)	
Skład fazy ruchomej	acetonitryl : roztwór buforu fosforanowego (40:60 v/v)	acetonitryl : roztwór buforu fosforanowego (65:35 v/v)
pH roztworu buforu fosforanowego	3	3,5
Stężenie roztworu buforu fosforanowego	0,01 mol/l	0,02 mol/l
Prędkość przepływu fazy ruchomej	0,90 ml/min	0,55 ml/min
Objętość roztworu wprowadzanego do kolumny chromatograficznej	25 μl	
Temperatura automatycznego podajnika próbek	4°C	
Temperatura termostatu kolumn	25°C	
Czas analizy	9 min	6 min
Analityczna długość fali	371 nm	580 nm

Tabela 5. Optymalne warunki chromatograficzne oznaczania jonów siarczkowych w postaci pochodnej L3 oraz LN3 za pomocą techniki HPLC/DAD

3.6.2.1. Optymalizacja warunków reakcji derywatywacji

Drugim etapem optymalizacji metod oznaczania jonów siarczkowych z zastosowaniem odczynników derywatyzujących L1 i LN1, był dobór odpowiednich warunków reakcji derywatywacji. W tym celu zbadalam wpływ pH roztworu buforu TRIS i buforu fosforanowego o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l na wydajność reakcji derywatywacji. Reakcja derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą soli piryliowych jest dwuetapowa (Rysunek 1. i 2., str. 9.), pierwszy etap zachodzi w środowisku zasadowym. Dlatego dopierałam odpowiedni bufor oraz jego pH i stężenie w mieszaninach reakcyjnych. Na podstawie danych zebranych na Wykresie 3. wynika, że lepsze warunki przebiegu reakcji derywatywacji dla obu metod zapewnia roztwór buforu TRIS niż buforu fosforanowego. Odczynnik derywatyzujący L1 reaguje z jonami siarczkowymi w środowisku roztworu buforu TRIS, osiągając największą wydajność przy pH

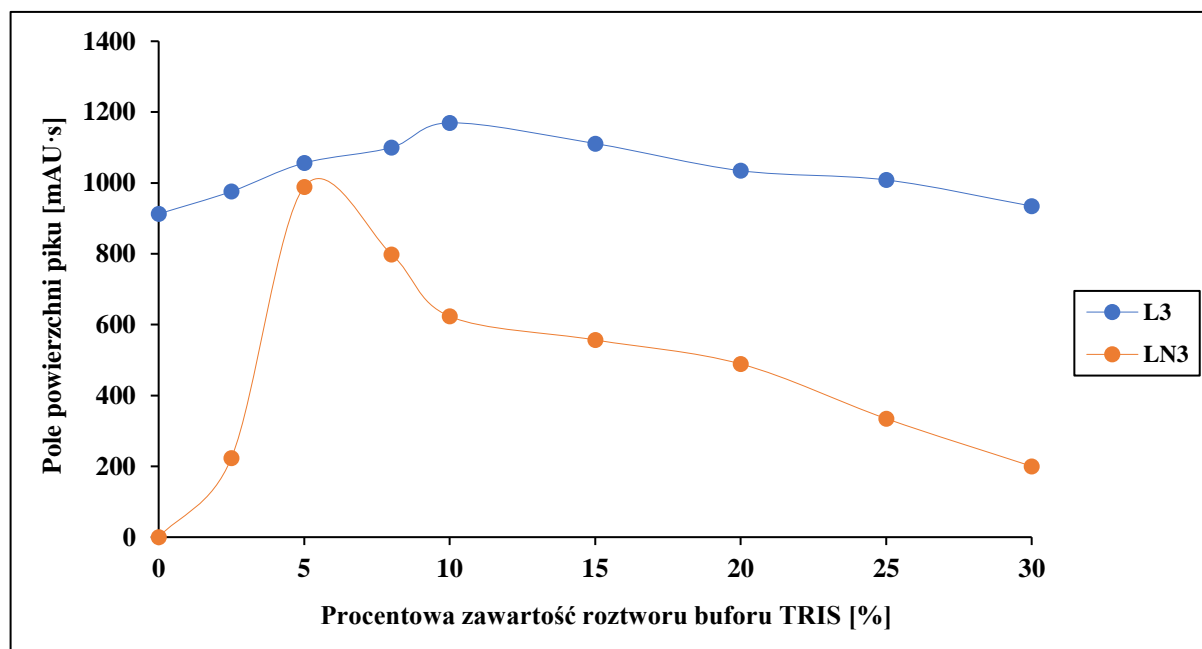
równe 9. Z otrzymanych wartości pola powierzchni pików LN3 wynika, że optymalną wartością jest pH 10, dla mieszaniny reakcyjnej z dodatkiem roztworu buforu TRIS o tym pH uzyskano największe wartości sygnału analitycznego. Przy pH 7 oraz 8 nie zaobserwowałam niebieskiego zabarwienia roztworu charakterystycznego dla powstałej pochodnej LN3, jak również na chromatogramach nie był obecny pik pochodzący od związku LN3. Można to tłumaczyć tym, że w wyniku protonowania jonu siarczkowego powstaje o mniej nukleofilowym charakterze lotny siarkowodór, co uniemożliwia zajście reakcji derywatywacji. Na podstawie uzyskanych wyników można wywnioskować, że dla pH 9 reakcja przebiega z niską wydajnością, ponieważ uzyskano niską wartość sygnału analitycznego. Natomiast dodatek buforu TRIS o wyższej wartości pH niż 10 również skutkuje otrzymaniem niższych wartości pól powierzchni pików. Ponieważ zbyt zasadowe środowisko, najprawdopodobniej ma niekorzystny wpływ na trwałość produktu pośredniego reakcji derywatywacji. Według pracy [134] autorzy alkaliczowali środowisko reakcji poprzez wprowadzenie roztworu buforu TRIS o pH 9 i $C_m = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Natomiast w innej pracy [127] roztwór wodorotlenku sodu o $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l posłużył do zalkalizowania środowiska. Jednak w wyżej cytowanych czasopismach naukowych brak jest informacji o etapie optymalizacji tego parametru, jak również powodach wyboru takich odczynników chemicznych.



Wykres 3. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od pH roztworu buforu TRIS i fosforanowego, $n = 3$

Kolejnym krokiem był dobór optymalnej procentowej zawartości roztworu buforu TRIS w celu polepszenia wydajności derywatywacji jonów siarczkowych. Sporządziłam roztwory o zmiennej objętości dodawanego roztworu buforu TRIS o stężeniu $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l

i pH 9 oraz 10 (w zależności od metody analitycznej) w zakresie od 0% do 30% objętości mieszaniny reakcyjnej. Z przeprowadzonego eksperymentu wynika, że dla pochodnej L3 przy 10%-owej zawartości reagenta uzyskujemy największe pole powierzchni pików. Natomiast dla pochodnej LN3 przy 5%-owej zawartości roztworu buforu TRIS uzyskujemy największe pole powierzchni. Brak roztworu buforu TRIS uniemożliwia zajście reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzyjnego LN1. Zbyt duże stężenie roztworu buforu TRIS wpływa niekorzystnie na jej przebieg, co zauważono spadkiem wartości sygnału analitycznego. W kolejnych etapach optymalizacji reakcji derywatywacji sporządzałam mieszaniny reakcyjne z odczynnikiem derywatyzyjnym L1, które zawierały 1 ml roztworu buforu TRIS (10%) o pH 9, oraz mieszaniny reakcyjne z odczynnikiem derywatyzyjnym LN1 zawierające 0,5 ml badanego reagenta (5%) o pH 10. Wyniki wyżej opisanego eksperymentu zaprezentowałam na Wykresie 4.



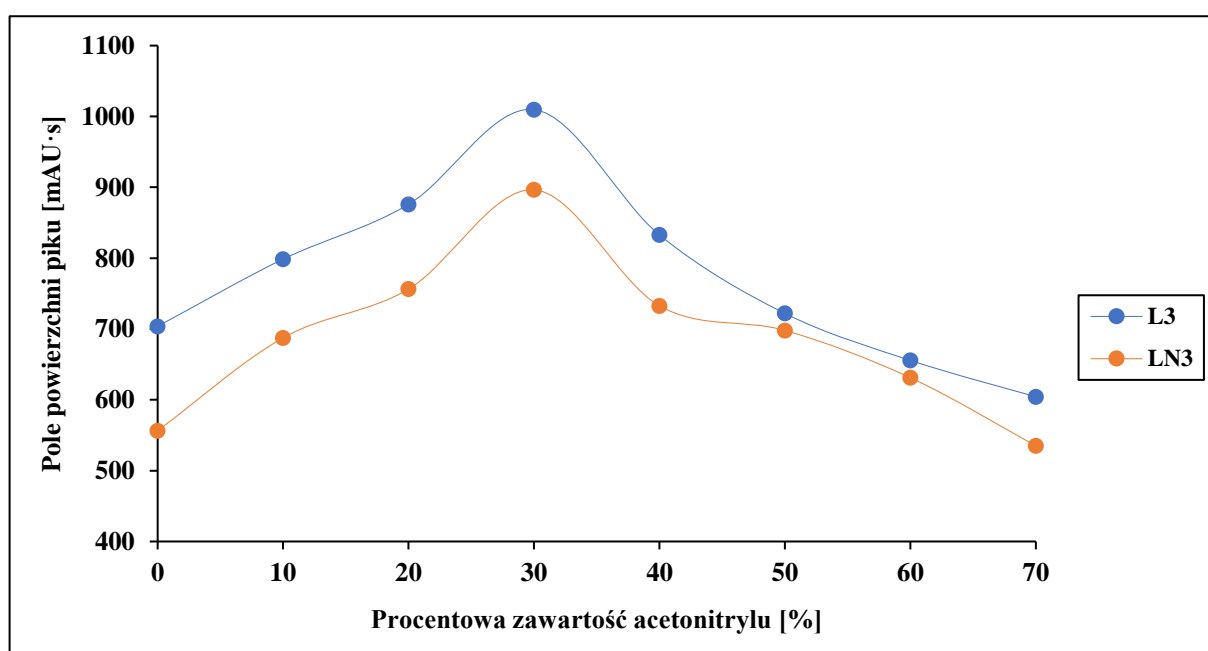
Wykres 4. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od procentowej zawartości roztworu buforu TRIS, $n = 3$

Sprawdziłam wpływ zmiany objętości acetonitrylu w mieszaninie reakcyjnej na wydajność derywatywacji jonów siarczkowych. Zarówno odczynnik derywatyzyjny L1 jak i LN1 bardzo dobrze rozpuszczają się w acetonitrylu. Z uzyskanych wyników zaprezentowanych na Wykresie 5. wynika, że zwiększanie procentowej zawartości acetonitrylu w mieszaninie reakcyjnej wpływa znacząco na wartość otrzymywanego sygnału analitycznego. Osiągnęłam ją maksymalną przy 30%-owej (3 ml) zawartości optymalizowanego parametru dla obu opracowywanych procedur analitycznych. Jest to zbliżona wartość analizowanego parametru do danych literaturowych [134]. Uzyskanie nieco innej optymalnej wartości badanego

parametru wpływającego na przebieg reakcji derywatywacji, niż autorzy cytowanej pracy naukowej, może wynikać z wielu czynników. Takich jak:

- ◆ sporządzanie mieszanin reakcyjnych za pomocą odczynników chemicznych pochodzących od innych producentów,
- ◆ stosowanie innego sprzętu (chromatograf, kolumna chromatograficzna itp.),
- ◆ precyzja i zdolności manualne eksperymentatora.

Zarówno dla metody 1. oraz metody 2. dalsze zwiększanie objętości fazy organicznej w próbce wpływa niekorzystnie na wydajność reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą L1 i LN1. W związku z czym dla kolejnych próbek zarejestrowałam mniejsze pola powierzchni pików pochodnej L3 i LN3.



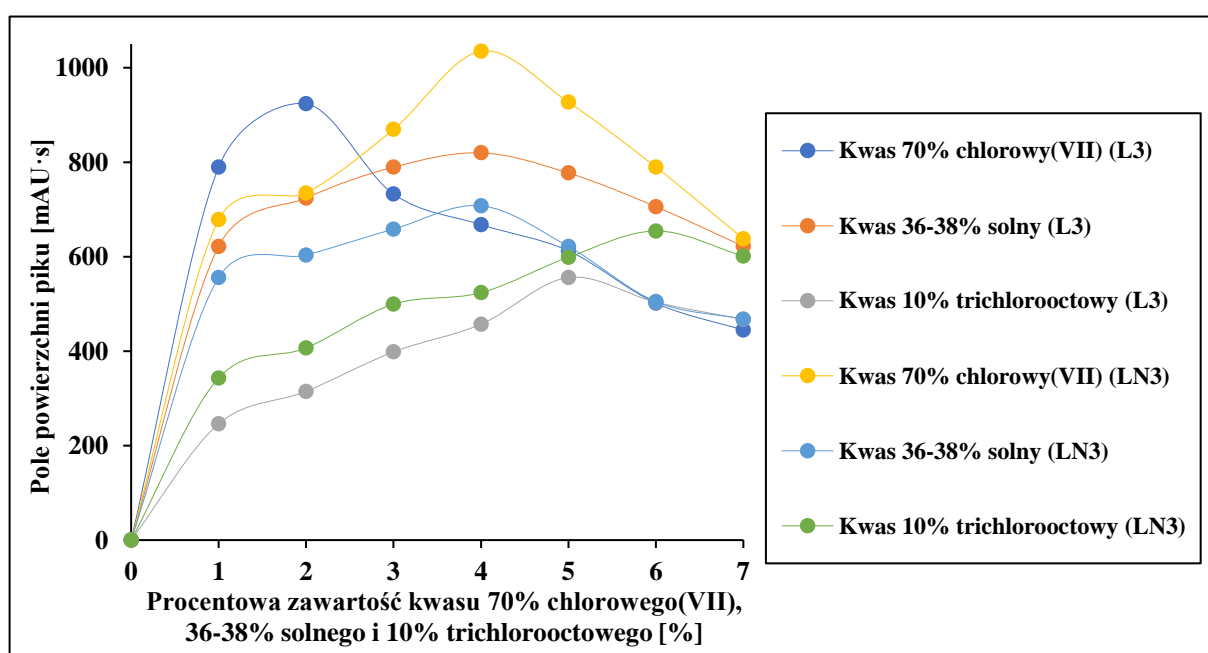
Wykres 5. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od procentowej zawartości acetonitrylu, $n = 3$

Derywatywacja jonów siarczkowych za pomocą soli piryliowych wymaga zakwaszenia środowiska mieszaniny reakcyjnej. W celu cyklizacji i aromatyzacji produktu pośredniego (Rysunek 1. i 2., str. 9.). W tym celu dobrałam odpowiedni kwas:

- ◆ 36-38% solny,
- ◆ 70% chlorowy(VII),
- ◆ 10% trichlorooctowy

oraz jego objętość. Autorzy cytowanych prac naukowych [127, 134] analizowali tylko wpływ kwasu solnego 36-38% na przebieg reakcji derywatywacji. Podczas moich prac badawczych zdecydowałam sprawdzić wpływ jeszcze innych kwasów (wymienione powyżej) na przebieg tej reakcji. Wybrane kwasy silnie niszczą struktury i związki biologiczne (błony komórkowe,

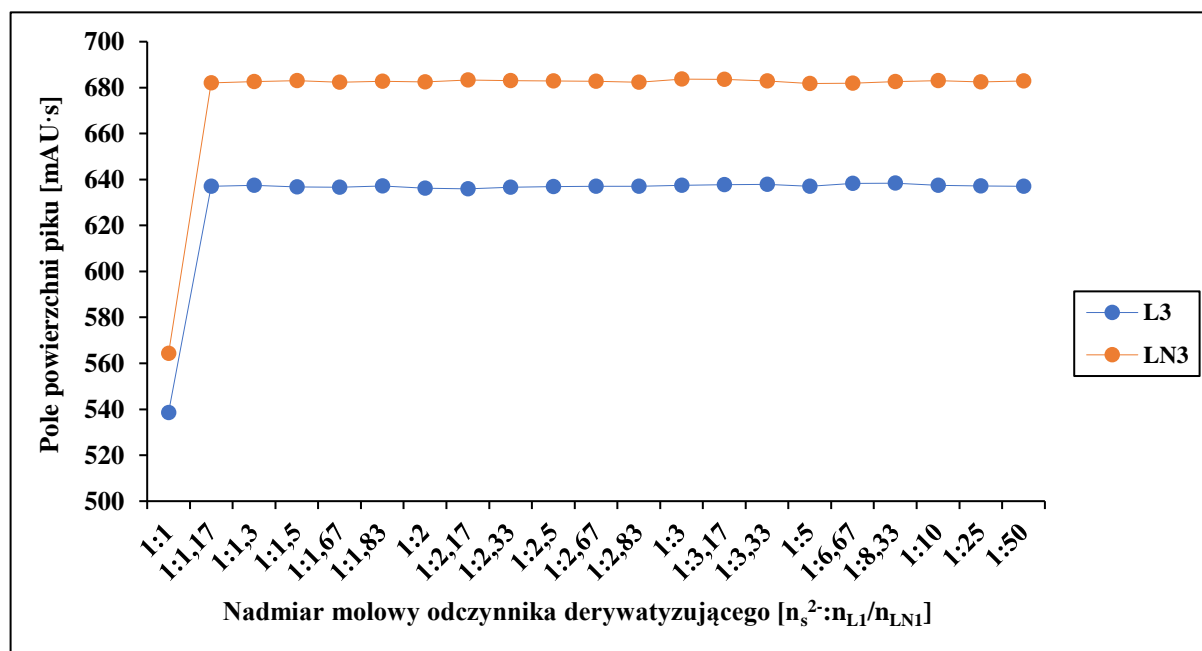
ściany komórkowe, organelle komórkowe, kwasy nukleinowe, białka, itp.) oraz opóźniają, hamują lub przyspieszają niektóre procesy organiczne (denaturacja białek, zatrzymywanie reakcji enzymatycznych, itp.). Wybór tych konkretnych kwasów jest związany z faktem, iż opracowywane metody analityczne postanowiłam wykorzystać do oznaczania jonów siarczkowych w złożonych i skomplikowanych matrycach biologicznych, takich jak: ludzki mocz oraz wątroba kurza. Dla mieszanin reakcyjnych, których środowisko nie było zakwaszane, nie zauważyłam pików pochodzących od pochodnych L3 i LN3 (Wykres 6.). Reakcja derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą odczynników derywatyzujących L1 i LN1 zachodzi w obecności trzech wyżej wymienionych kwasów. Jednakże próbki z zawartością kwasu 70% chlorowego(VII) wykazywały większe wartości pól powierzchni dla pików pochodnej L3 i LN3. Dla pików pochodnej L3 przy 2%-owej zawartości (200 μ l) kwasu 70% chlorowego(VII) zarejestrowałam największe pole powierzchni. Natomiast dla pochodnej LN3 przy 4%-owej zawartości (400 μ l) kwasu 70% chlorowego(VII) uzyskano pik o największej wartości pola powierzchni. Większy dodatek badanego reagenta wpływał niekorzystnie na wydajność reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą odczynników derywatyzujących L1 i LN1.



Wykres 6. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od procentowej zawartości kwasu 70% chlorowego(VII), 36-38% solnego i 10% trichlorooctowego, $n = 3$

W kolejnym kroku zbadałam wpływ nadmiaru molowego odczynnika derywatyzującego L1 i LN1 w stosunku do liczby moli jonów siarczkowych na wydajność reakcji derywatywacji. Z otrzymanych chromatogramów odnotowałam wartości pól powierzchni i zaprezentowałam je na Wykresie 7. Największe pola powierzchni dla pików pochodnej L3 zarejestrowałam dla

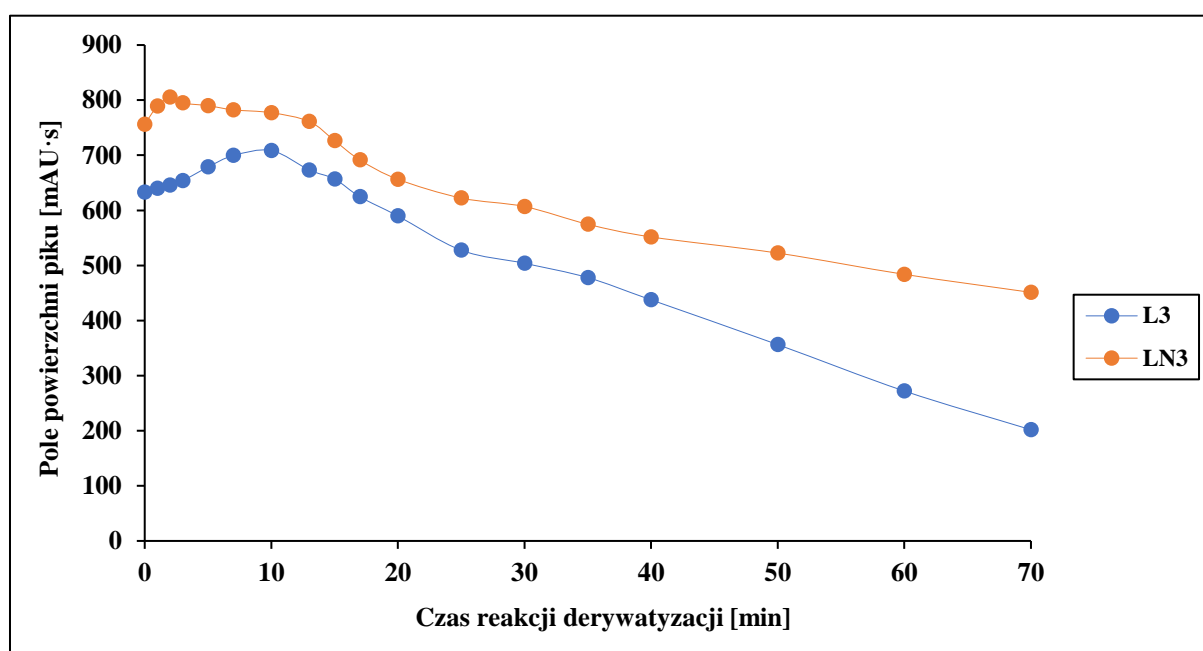
mieszanin reakcyjnych, w których stosunek liczby moli jonu siarczkowego do liczby moli odczynnika derywatyzyzującego L1 mieścił się w przedziale od 1:1,17 do 1:50. W tym przedziale mierzony sygnał analityczny wykazywał stałe wartości. Zatem postanowiłam, że w kolejnych etapach badań do roztworu będę dodawać 2-krotny nadmiar odczynnika derywatyzyzującego L1. Więc przygotowując mieszaninę reakcyjną dodawałam 300 μl roztworu siarczku sodu o $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l oraz 600 μl roztworu odczynnika derywatyzyzującego L1 o $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Natomiast dla pochodnej LN3 zarejestrowałam największe wartości pól powierzchni piku dla próbki, w której stosunek molowy jonu siarczkowego do liczby moli odczynnika derywatyzyzującego również mieścił się w przedziale od 1,17: do 1:50. W tym przedziale zaobserwowałam plateau mierzonego sygnału analitycznego. Zatem zdecydowałam, że w dalszych etapach eksperymentu do roztworu będę dodawać 2-krotny nadmiar odczynnika derywatyzyzującego LN1. Więc przygotowując roztwory dodawałam 300 μl roztworu siarczku sodu o $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l i 600 μl roztworu odczynnika derywatyzyzującego LN1 o $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l.



Wykres 7. Zależność pola powierzchni piku pochodnej L3 oraz LN3 od stosunku molowego jonu siarczkowego od odczynnika derywatyzyzującego, $n = 3$

Kolejnym parametrem jakim zbadałam, który również ma wpływ na wydajność reakcji derywatyzyzacji jonów siarczkowych jest jej czas przebiegu. Czas reakcji derywatyzyzacji mierzyłam w przedziale czasowym od 0 minut do 70 minut. Czas 0 minut oznacza, że kwas 70% chlorowy(VII) dodawałam niezwłocznie po uprzednim zmieszaniu roztworu siarczku sodu z odczynnikiem derywatyzyzującym. Na podstawie wyników zamieszczonych na Wykresie 8. największe pole powierzchni pików dla pochodnej L3 zarejestrowałam dla mieszanin

reakcyjnych, które zakwaszałam po 10 minutach od momentu dodania odczynnika derywatyżującego do próbki. Wydłużanie czasu reakcji wpływało niekorzystnie na jej przebieg, czego skutkiem są mniejsze pola powierzchni pików L3. Największe pole powierzchni pików pochodzącego od związku LN3 zarejestrowałam dla mieszanin reakcyjnych, które zakwaszałam po 2 minutach od momentu wprowadzenia LN1 do kolbki. Porównanie uzyskanego wyniku dla związku LN3 z danymi literaturowymi [125, 127, 134], skłania do wysunięcia wniosku, że wprowadzone modyfikacje w parametrach reakcji derywatyżacji wpływają znacząco na jej czas przebiegu, powodują jego obniżenie.



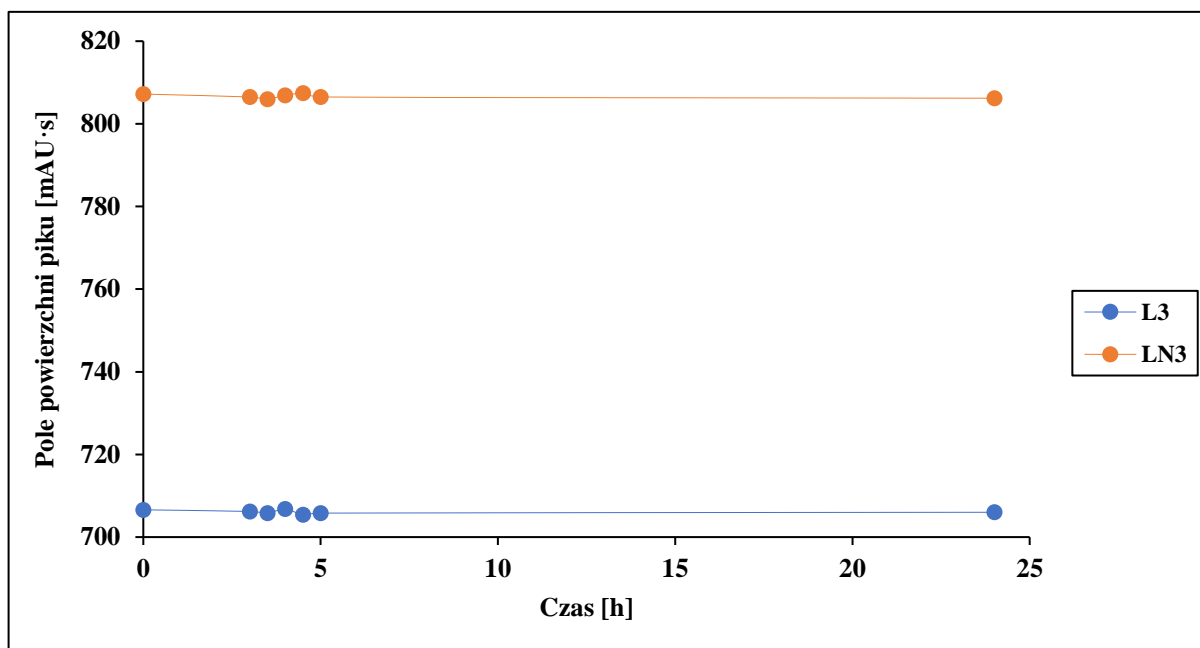
Wykres 8. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od czasu reakcji derywatyżacji, $n = 3$

Poniższa Tabela 6. przedstawia zestawienie zoptymalizowanych warunków reakcji derywatyżacji jonu siarczkowego za pomocą związku L1 i LN1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD. W kolejnym etapie eksperymentu parametry te wykorzystałam do wyznaczenia zakresu oznaczalności opracowanych metod analitycznych.

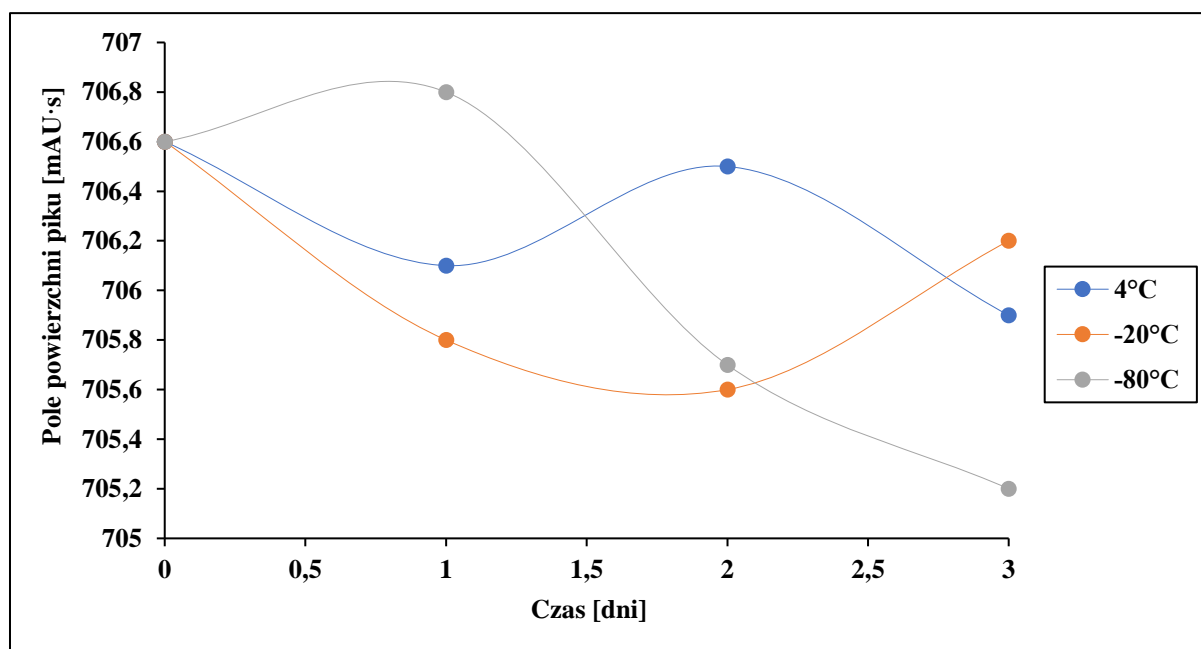
Parametr	Pochodna L3	Pochodna LN3
pH roztworu buforu TRIS	9	10
Zawartość %-owa roztworu buforu TRIS w mieszaninie reakcyjnej	10%	5%
Zawartość %-owa acetonitrylu w mieszaninie reakcyjnej	30%	
Zawartość %-owa kwasu 70% chlorowego(VII) w mieszaninie reakcyjnej	2%	4%
Stosunek molowy S²⁻:L1/LN1 [n_{S²⁻}:n_{L1}/n_{LN1}] (wyznaczony za pomocą techniki HPLC/DAD)	1:2	
Czas reakcji derywatyzacji	10 minut	2 minut

Tabela 6. Optymalne parametry reakcji derywatyzacji jonu siarczkowego z wykorzystaniem odczynnika derywatyzującego L1 oraz LN1 za pomocą techniki HPLC/DAD

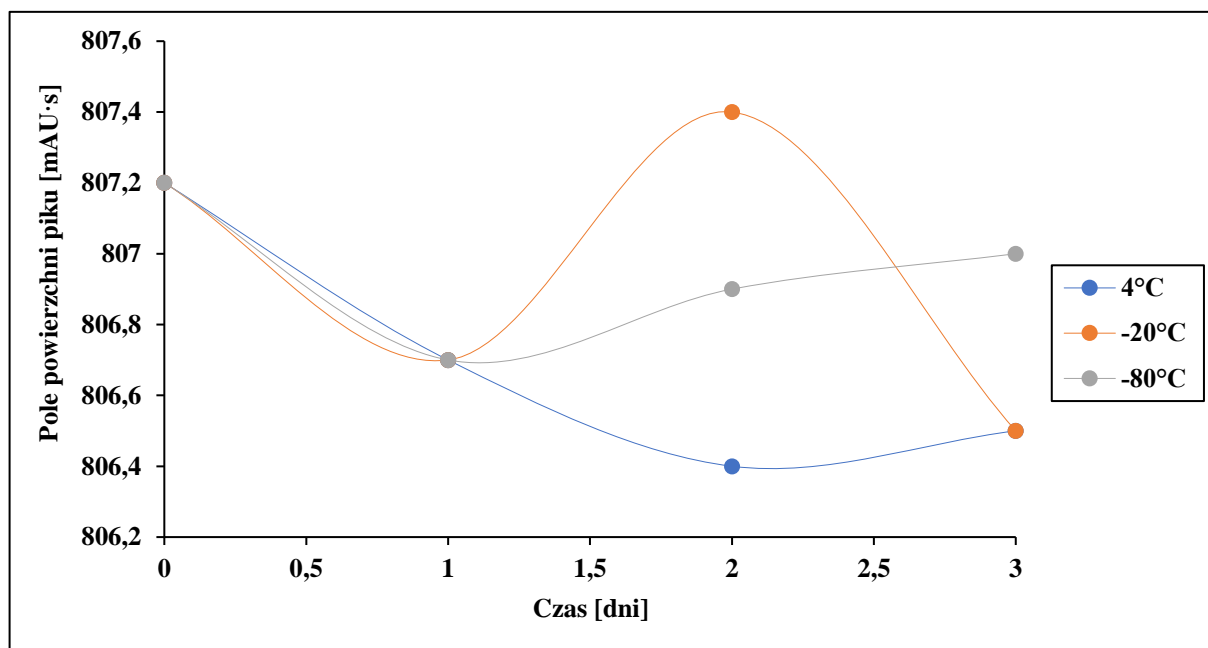
Istotnym parametrem jest również trwałość powstałych pochodnych. Wyzaczyłam ją w 25°C w przeciągu 24 h, oraz w 4°C, -20°C i -80°C w przeciągu 3 dni. W celu ustalenia przedziału czasowego, w którym należy wykonać analizę chromatograficzną dla badanych mieszanin reakcyjnych, a także w jakiej temperaturze je przechowywać. Z przedstawionych wyników na Wykresach od nr 9. do 11. wynika, że pola powierzchni pików badanych pochodnych wykazują stałe wartości w trakcie analizy. Zatem nasuwa się jeden wniosek, że związki L3 oraz LN3 są trwałe we wszystkich analizowanych temperaturach i przedziałach czasowych. Trwałość związku chemicznego L3 i LN3 była także wyznaczana przez innych badaczy. Mierzono ją za pomocą techniki cienkowarstwowej chromatografii cieczowej, w zakresie od 0 minut do 360 minut, a przygotowane mieszaniny reakcyjne przechowywano w temperaturze otoczenia [123]. Wyznaczano ją również przy pomocy techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej, w przedziale czasowym od 0 minut do 426 minut, również wcześniej sporządzone roztwory reakcyjne były w przechowywane temperaturze otoczenia [125]. Zgodnie z danymi zawartymi w cytowanym piśmiennictwie, otrzymywane pola powierzchni pików badanych pochodnych wykazywały stałe wartości w trakcie trwania całego eksperymentu, zatem związki chemiczne L3 i LN3 są trwałe.



Wykres 9. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od czasu w 25°C, $n = 3$



Wykres 10. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 od czasu w 4°C, -20°C oraz -80°C, $n = 3$



Wykres 11. Zależność pola powierzchni pików pochodnej LN3 od czasu w 4°C, -20°C oraz -80°C, $n = 3$

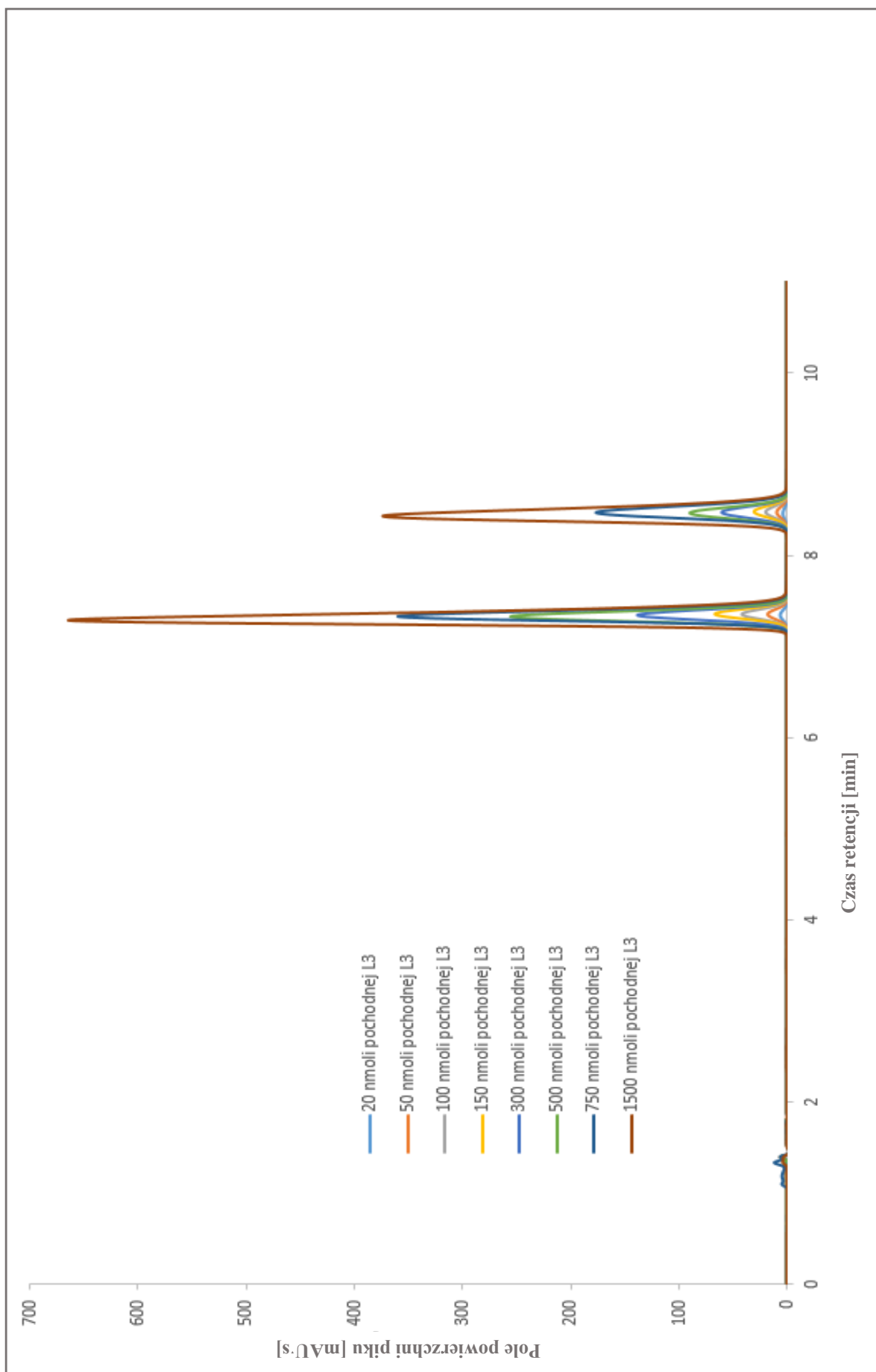
Zgodnie z danymi literaturowymi [127, 134] reakcja derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzującego LN1 jest selektywna względem nich. Autorzy cytowanych prac donoszą, że związek LN1 nie reaguje z innymi anionami nieorganicznymi oraz organicznymi, oprócz jonu siarczkowego. W światowej literaturze nie odnalazłam informacji na temat reaktywności związku L1 z innymi jonami nieorganicznymi, czy organicznymi. W celu potwierdzenia informacji z cytowanych prac zbadalam reaktywność związku LN1 z różnymi jonami takimi jak:

- ◆ chlorkowe,
- ◆ jodkowe,
- ◆ azotanowe(V),
- ◆ fosforanowe(V),
- ◆ węglanowe,
- ◆ siarczanowe(VI).

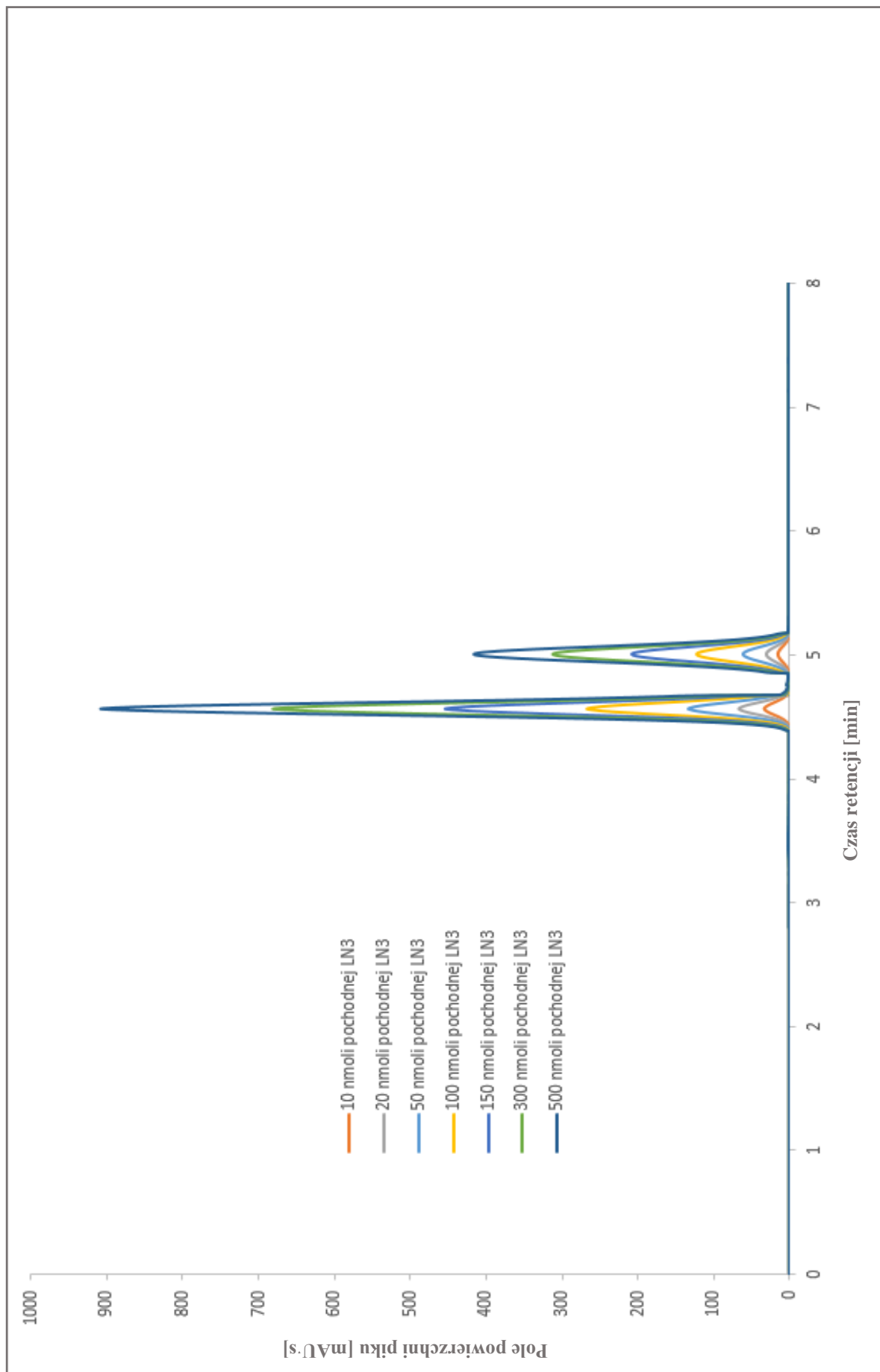
Również te same badania wykonałam dla związku L1. Przygotowane mieszaniny reakcyjne poddałam analizie chromatograficznej. Wykazała ona, że badane odczynniki derywatyzujące w opisanych parametrach reakcji derywatywacji (Tabela 6.) nie reagują z innymi jonami, oprócz jonu siarczkowego. Dlatego, że analizując mieszaniny reakcyjne zawierające roztwór z innymi anionem niż siarczkowym, nie otrzymywałam na wygenerowanych chromatogramach pików pochodzącego od pochodnej L3 i LN3. Zatem obie sole piryliowe są selektywne względem anionu siarczkowego.

3.6.1.3. Wyznaczenie zakresu oznaczalności metod

W celu wyznaczenia zakresu oznaczalności dla metod oznaczania jonów siarczkowych z zastosowaniem soli piryliowych L1 oraz LN1 za pomocą techniki HPLC/DAD sporządziłam roztwory w 6 seriach pomiarowych. Następnie w ciągu trzech dni poddałam przygotowane roztwory analizie chromatograficznej. Każdego dnia przygotowałam nowe roztwory. Poniżej przedstawiłam przykładowe chromatogramy (Wykres 12. i Wykres 13.) oraz wyniki kalibracji metod (Tabela od 7. do 10. oraz Wykres 14. i 15.).



Wykres 12. Przykładowy chromatogram otrzymany podczas wyznaczania zakresu oznaczalności jonów siarczkowych za pomocą techniki HPLC/DAD (pik L1: 7,3 min, pik L3: 8,4 min). Układ chromatograficzny opisalam w Tabeli 5.



Wykres 13. Przykładowy chromatogram otrzymany podczas wyznaczania zakresu oznaczalności jonów siarczkowych za pomocą techniki HPLC/DAD (pik LN1: 4,6 min, pik LN3: 5,0 min). Układ chromatograficzny opisalam w Tabeli 5.

Posługując się metodą najmniejszych kwadratów uzyskałam prostoliniową zależność pola powierzchni pików pochodnych L3 oraz LN3 od liczby moli jonu siarczkowego odpowiednio w zakresie od 20 do 1500 nmoli oraz od 10 do 500 nmoli (Wykres 14. oraz 15.). Przyjęłam, że stężenie pochodnych L3 oraz LN3 jest równe wyjściowemu stężeniu oznaczanego jonu siarczkowego. W Tabeli 7. i 9. zawarłam również precyzję metody wyrażoną względnym odchyleniem standardowym (RSD) oraz odzysk. Niskie wartości RSD oraz wysokie wartości odzysku dla obu metod dowodzą, że opracowane procedury są odpowiednie do ilościowego oznaczania jonów siarczkowych. Tabela 8. oraz 10. przedstawiają parametry uzyskanych prostych. W tabelach tych zawarłam:

- ◆ zakres liniowości,
- ◆ współczynnik nachylenia prostej,
- ◆ wyraz wolny równania prostej,
- ◆ współczynnik korelacji R^2 ,
- ◆ granicę wykrywalności (LOD - *limit of detection*),
- ◆ granicę oznaczalności (LOQ - *limit of quantification*).

Wartość granicy wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ) wyznaczyłam statystycznie. Granica wykrywalności jest to najmniejsza ilość badanej substancji w próbce, która może być wykryta, jednak niekoniecznie oznaczona. Natomiast granica oznaczalności (LOQ – *limit of quantitation*) to najmniejsza ilość badanej substancji w próbce, która może być ilościowo oznaczona. LOD i LOQ można obliczyć z następujących wzorów:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot s}{c_b}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{c_b}$$

gdzie:

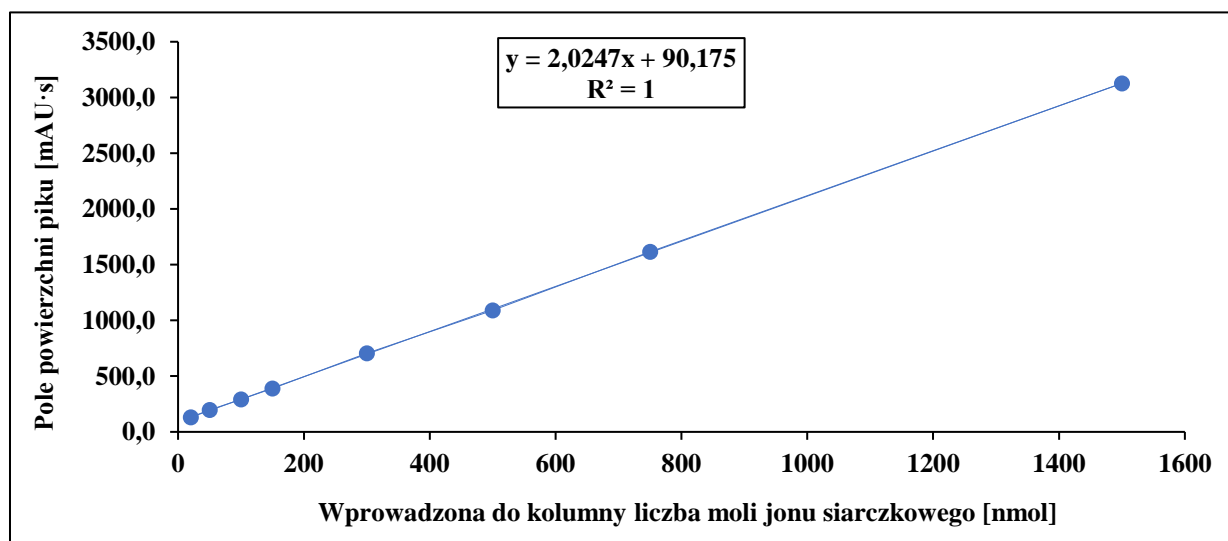
s - wartość odchylenia standardowego wyrazu a prostej kalibracji,

c_b - nachylenie prostej kalibracji.

Walidacja metody oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z wykorzystaniem techniki HPLC/DAD na próbkach standardów - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia

Wprowadzona do kolumny liczba moli jonu siarczkowego [nmol]	Znaleziona liczba moli jonu siarczkowego [nmol]			Średnia [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Odzysk [%]
	Dzień 1 intre-day	Dzień 2 up-day	Dzień 3 intra-day				
20	20,3	20,3	20,4	20,3 ± 0,2	0,07	0,33	102
50	52,0	52,0	51,9	52,0 ± 0,2	0,07	0,13	104
100	99,2	99,1	99,3	99,2 ± 0,2	0,10	0,10	99
150	147,9	147,9	148,0	147,9 ± 0,1	0,05	0,04	99
300	303,9	304,0	303,8	303,9 ± 0,2	0,09	0,03	101
500	493,7	493,7	493,8	493,7 ± 0,1	0,05	0,01	99
750	753,0	753,2	753,3	753,2 ± 0,4	0,15	0,02	100
1500	1499,9	1499,9	1499,9	1499,9 ± 0	0	0	100

Tabela 7. Statystyczna ocena odtwarzalność metody oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3



Wykres 14. Zależności pola powierzchni pików pochodnej L3 od wprowadzonej do kolumny liczby moli jonu siarczkowego - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

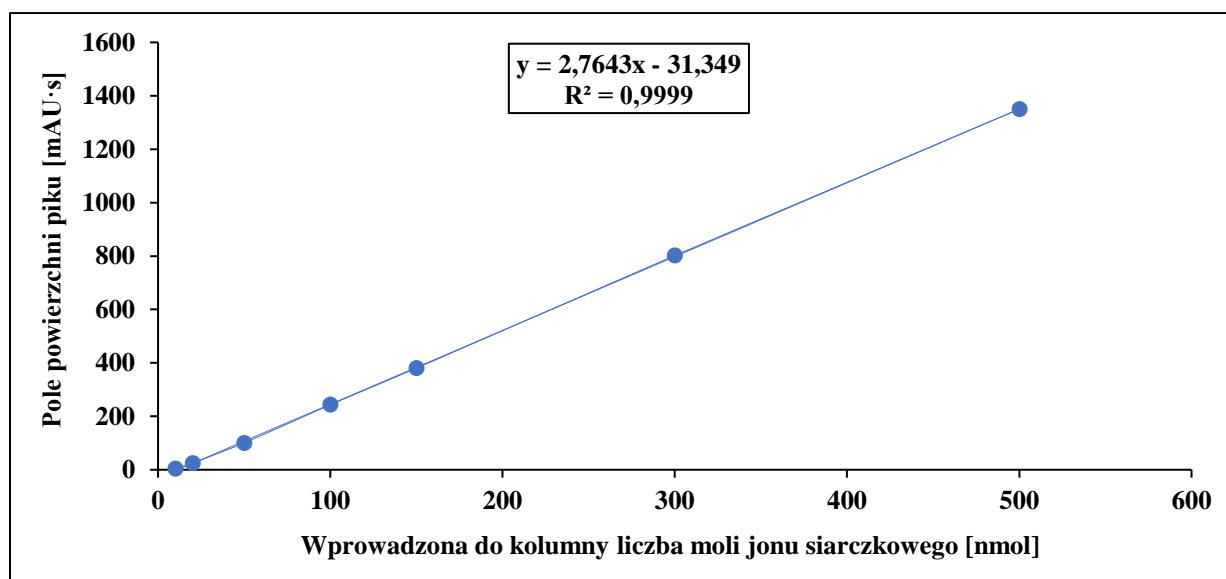
Parametr prostej wzorcowej	Wyznaczona wartość [L3]
Zakres liniowości [nmol]	20-1500
Współczynnik nachylenia prostej	2,0247
Wyraz wolny równania prostej	90,175
Współczynnik korelacji R ²	1
Granica wykrywalności [nmol]	5,6
Granica oznaczalności [nmol]	16,9

Tabela 8. Parametry wyznaczonych zależności prostoliniowych w metodzie oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

Walidacja metody oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyizującego LN1 z wykorzystaniem techniki HPLC/DAD na próbkach standardów - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia

Wprowadzona do kolumny liczba moli jonu siarczkowego [nmol]	Znaleziona liczba moli jonu siarczkowego [nmol]			Średnia [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Odzysk [%]
	Dzień 1 intre- day	Dzień 2 up-day	Dzień 3 intra-day				
10	12,8	12,8	12,9	12,8 ± 0,2	0,04	0,30	128
20	20,0	20,0	20,1	20,0 ± 0,1	0,05	0,25	100
50	47,5	47,5	47,6	47,5 ± 0,2	0,07	0,14	95
100	99,6	99,7	99,4	99,6 ± 0,3	0,13	0,13	100
150	148,8	148,8	148,8	148,8 ± 0	0,01	0,01	99
300	301,5	301,5	301,5	301,5 ± 0	0,01	0,01	101
500	499,7	499,7	499,8	499,7 ± 0,1	0,06	0	100

Tabela 9. Statystyczna ocena odtwarzalność metody oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyizującego LI z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3



Wykres 15. Zależności pola powierzchni piku pochodnej LN3 od wprowadzonej do kolumny liczby moli jonu siarczkowego - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

Parametr prostej wzorcowej	Wyznaczona wartość [LN3]
Zakres liniowości [nmol]	10-500
Współczynnik nachylenia prostej	2,7643
Wyraz wolny równania prostej	-31,349
Współczynnik korelacji R ²	0,9999
Granica wykrywalności [nmol]	3,3
Granica oznaczalności [nmol]	10,0

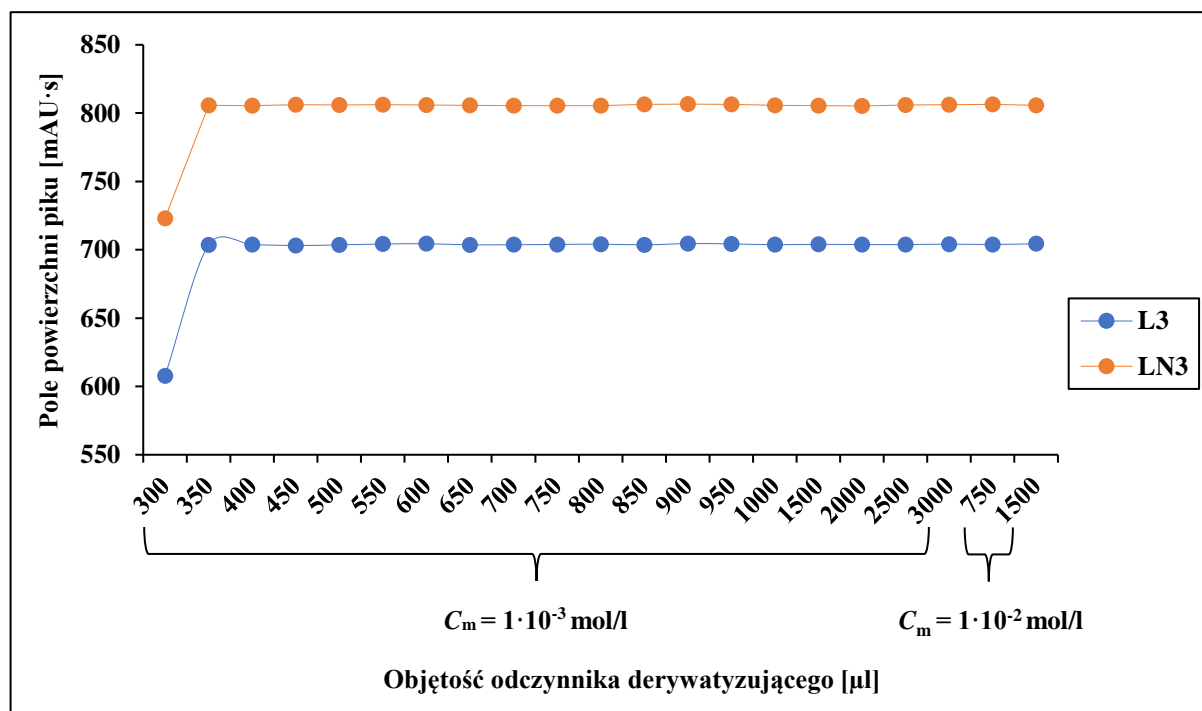
Tabela 10. Parametry wyznaczonych zależności prostoliniowych w metodzie oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyizującego LN1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

Wartości analizowanych parametrów walidacyjnych były analogiczne z wymogami normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 [135] oraz wytycznymi organizacji ICH [136]. Opracowane metody są czułe, na co dowodem są otrzymane wartości granicy wykrywalności. Metody charakteryzuje także, powtarzalność oraz precyzja, co potwierdzają statystycznie opracowane wyniki. Optymalizacja parametrów procesu chromatograficznego pozwoliła uzyskać dobrze rozdzielone piki pochodzące od pochodnych oznaczanego obiektu oraz nadmiaru odczynników derywatyzujących. Odpowiednie parametry pozwoliły prowadzić reakcje derywatacji jonów siarczkowych za pomocą związku L1 oraz LN1 z dużą wydajnością.

3.6.2. Badania wykonane na próbkach z ludzkim moczem

3.6.2.1. Optymalizacja warunków reakcji derywatacji

Przystępując do ilościowego oznaczenia jonów siarczkowych w mieszaninie reakcyjnej z ludzkim moczem. W pierwszym etapie dobrałam odpowiednią objętość odczynnika derywatyzującego L1 oraz LN1 dodawaną do niej, aby móc z jak największą wydajnością oznaczyć analit. W tym celu przygotowałam mieszaniny reakcyjne w 3 seriach pomiarowych. Poranny moczu dodawany do badanych roztworów pochodził od zdrowej trzydziestoletniej ochotniczki. Otrzymane wyniki zaprezentowałam na poniższym Wykresie nr 16.

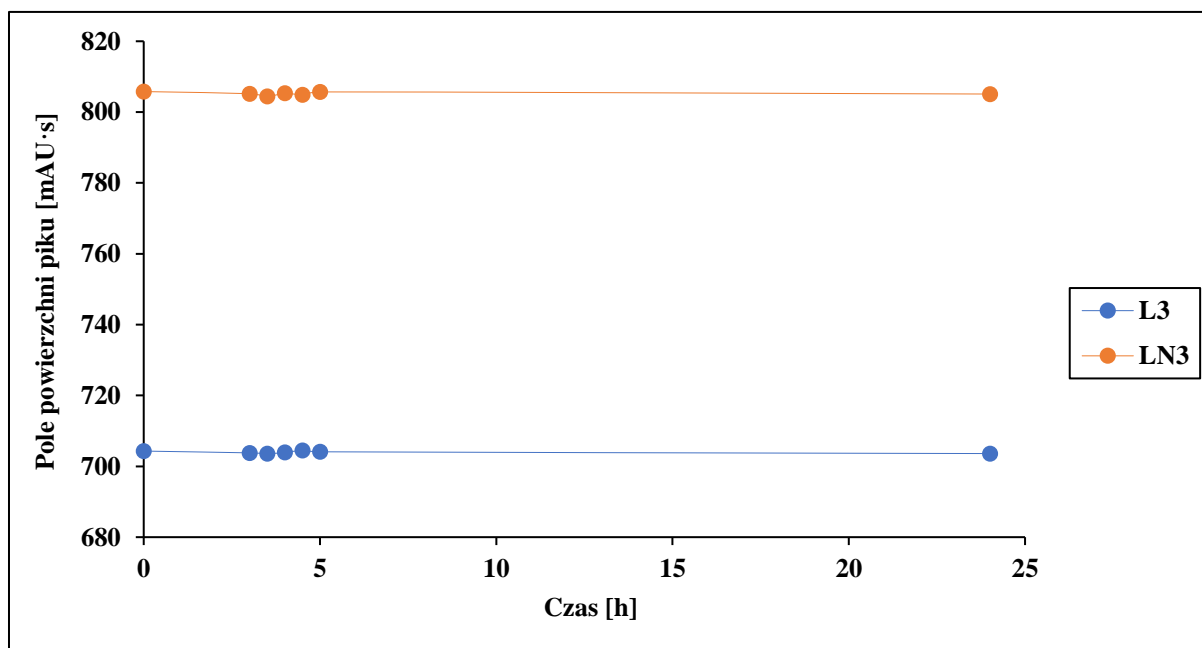


Wykres 16. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od objętości odczynnika derywatyzującego dodawanej do próbek z ludzki moczem, $n = 3$

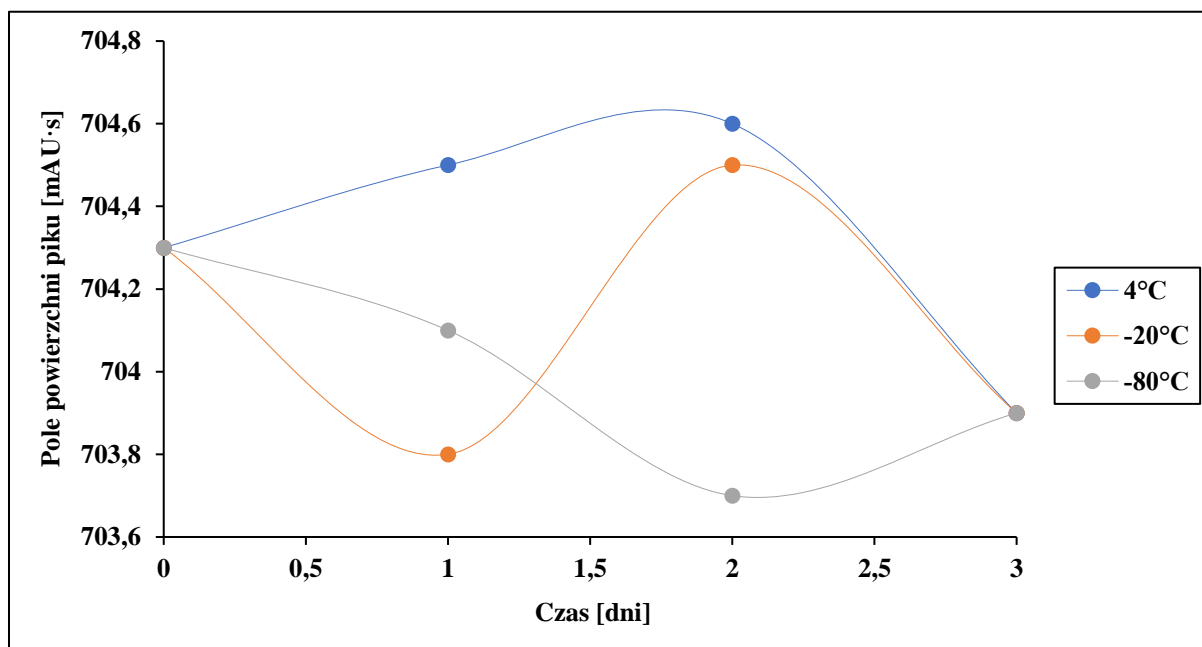
Największe a zarazem stałe wartości pola powierzchni dla piku pochodnej L3 zarejestrowałam dla próbek do których dodawałam odczynnik derywatyzującego L1 w zakresie od 350 μl o $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l do 1500 μl o $C_m = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Poniżej tego przedziału zaobserwowałam zdecydowanie mniejsze wartości pola powierzchni piku pochodzącego od pochodnej L3. Zatem postanowiłam, że w kolejnych etapach badań do mieszaniny reakcyjnej będę dodawać 3000 μl roztworu odczynnik derywatyzującego L1 o $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Natomiast dla pochodnej LN3 zarejestrowałam największe oraz stałe wartości pól powierzchni piku dla roztworów reakcyjnych wzbogacanych moczem, gdzie również dodawałam odczynnik derywatyzującego LN1 w zakresie od 350 μl o $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l do 1500 μl o $C_m = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Dla próbek do których dodawałam odczynnik derywatyzującego LN1 poniżej 350 μl o $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l zaobserwowałam mniejszy sygnał analityczny. Zatem zdecydowałam, że w dalszych etapach badań do mieszanin z ludzkim moczem będę dodawać 3000 μl związku L1 lub LN1 o $C_m = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Kolejnym etapem badań naukowych było zbadanie trwałości pochodnych L3 oraz LN3 w mieszaninach reakcyjnych z ludzkim moczem. W tym celu przygotowałam roztwory, które zawierały poranny mocz od jednego zdrowego ochotnika, którym był mężczyzna w wieku 40 lat. Trwałość wyżej wymienionych w tym akapicie związków chemicznych badałam w temperaturze 25°C, 4°C, -20°C oraz -80°C. W przedziale czasowym od 0 do 24 godzin w temperaturze 25°C, natomiast w pozostałych temperaturach trwałość związku L3 oraz LN3 badałam w zakresie czasowym od 0 do 3 dni. Przed każdą analizą chromatograficzną doprowadzałam zamrożone próbki do temperatury pokojowej. Od momentu zmieszania roztworu siarczku sodu z roztworem odczynnik derywatyzującego zaczęłam mierzyć czas eksperymentu. Uzyskane wyniki przedstawiłam na Wykresach od nr 17. do 19. Z uzyskanych danych wynika, że związki L3 oraz LN3 w badanych próbkach są trwałe we wszystkich analizowanych temperaturach i przedziałach czasowych. Również żadne składniki matrycy nie wpływają na ich trwałość. Dużą zaletą jest fakt, że obie pochodne mogą być przechowywane nawet przez kilka godzin w temperaturze pokojowej zanim zostaną poddane analizie. Nie zdecydowałam się na zbadanie trwałości oznaczanego analitu, ponieważ jest on z natury bardzo nietrwały. Na przykład według światowej literatury [137] z próbki moczu po upływie około 2 godzin w temperaturze 4°C ubywa praktycznie w 80% swojej początkowej zawartości. Dlatego przy oznaczaniu jonów siarczkowych występujących w ludzkim moczu, zaraz po wypróżnieniu się przez ochotnika, jego mocz niezwłocznie wprowadzałam do mieszaniny reakcyjnej. Dzięki temu od razu przeprowadzałam jony siarczkowe w pochodne, które w porównaniu z analitem

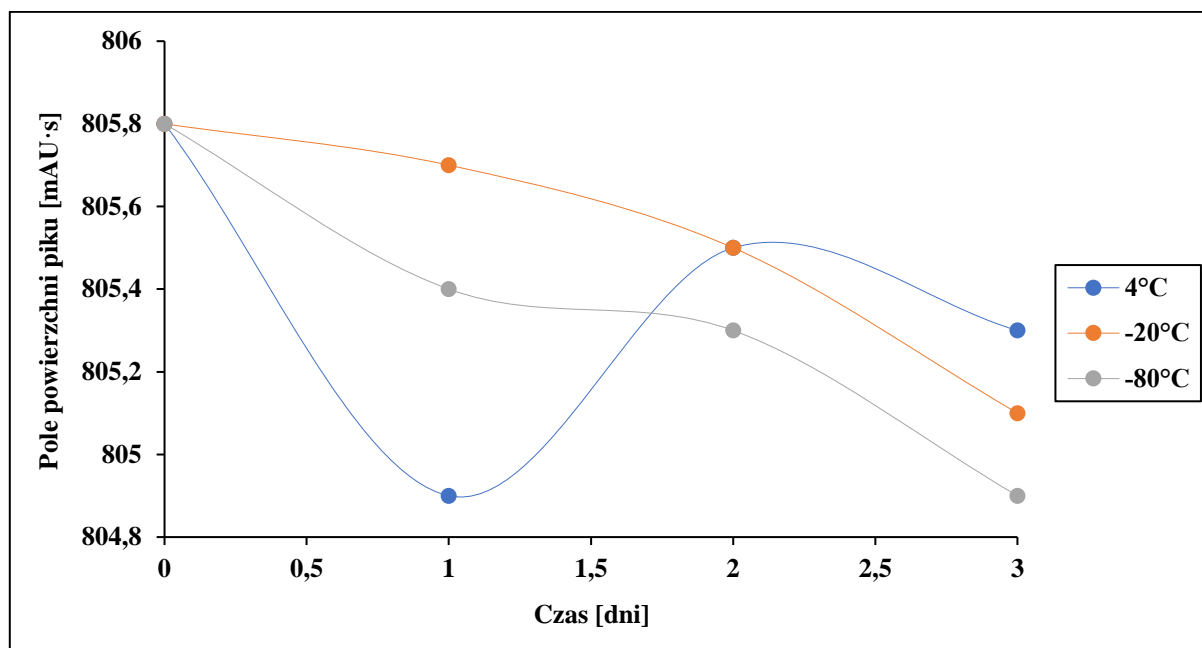
są bardziej trwałe, co zapewniało przeprowadzenie reakcji derywatywacji z jak największą wydajnością. Analizowany mocz pochodził od zdrowych ludzi, który był oddawany nad czoło oraz był moczem porannym.



Wykres 17. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 w próbkach z ludzkim moczem od czasu w 25°C, n = 3



Wykres 18. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 w próbkach z ludzkim moczem od czasu w 4°C, -20°C oraz -80°C, n = 3



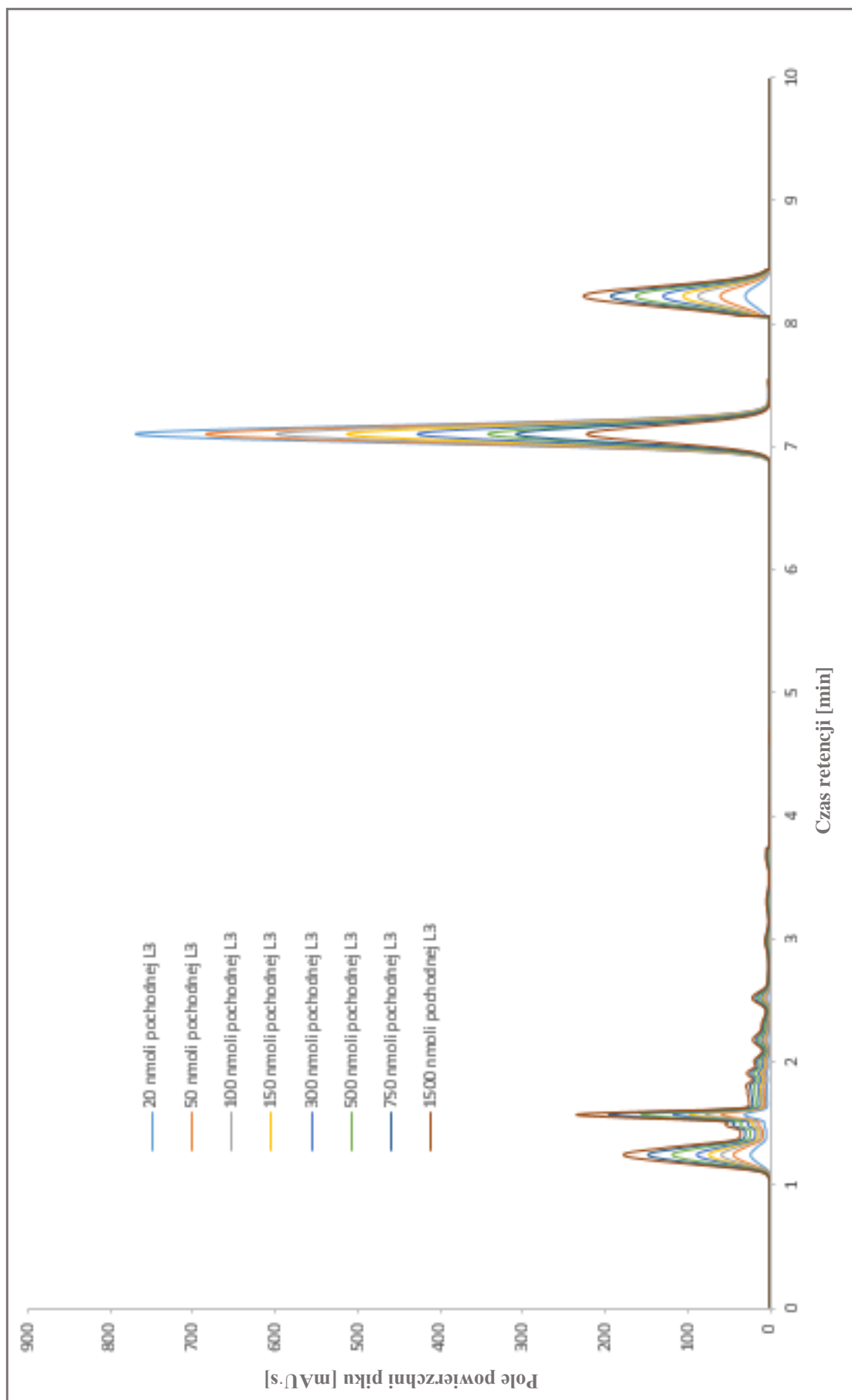
Wykres 19. Zależność pola powierzchni pików pochodnej LN3 w próbkach z ludzkim moczem od czasu w 4°C, -20°C oraz -80°C, n = 3

3.6.2.2. Wyznaczenie zakresu oznaczalności metod

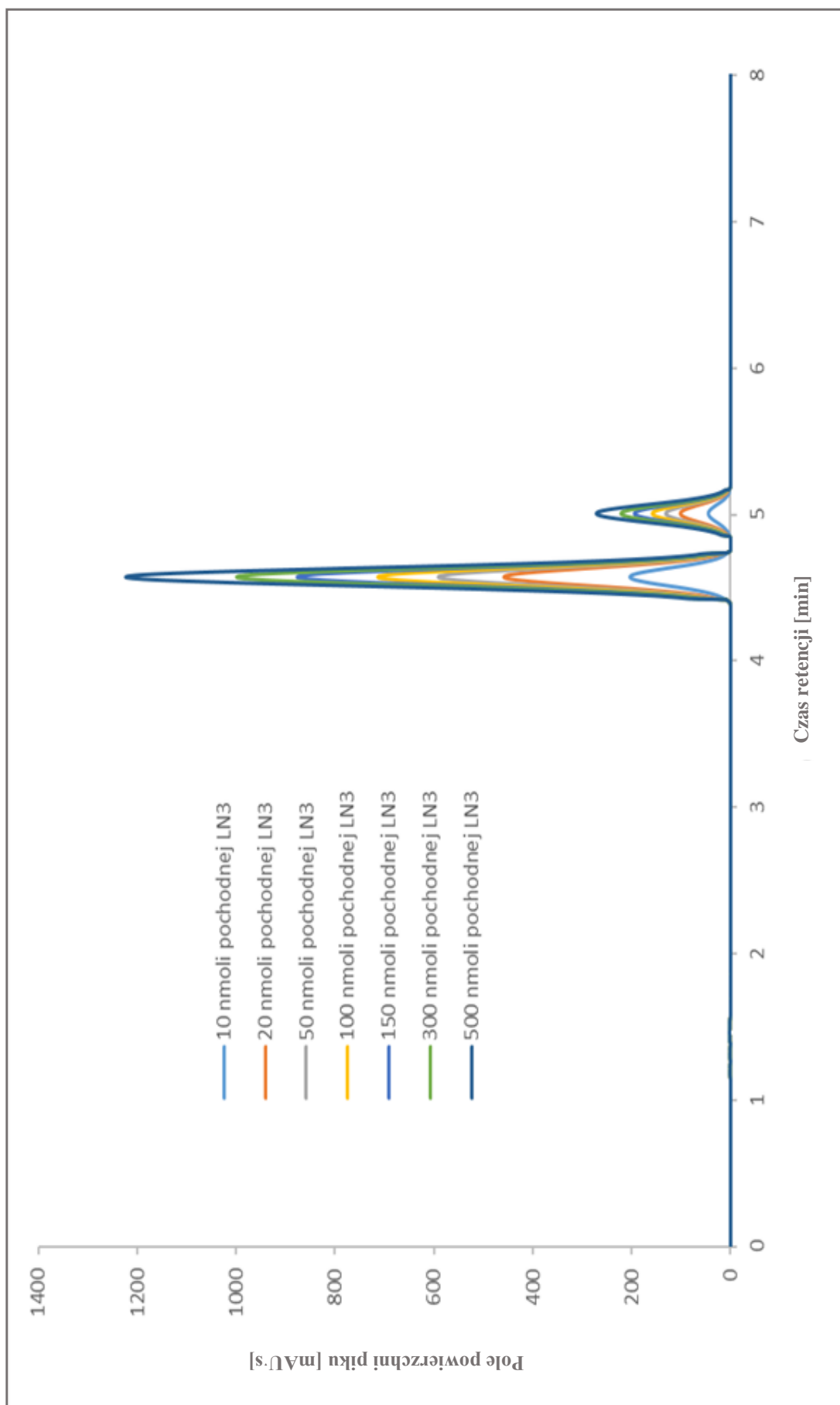
Kolejnym etapem badań była walidacja na mieszaninach reakcyjnych z dodatkiem ludzkiego moczu, w tym celu przygotowałam mieszaniny reakcyjne w 6 seriach pomiarowych. Poranny mocz od jednego ochotnika, którym była kobieta w wieku dwudziestu pięciu lat, badałam chromatograficznie pod kątem stężenia badanego analitu przez trzy kolejne dni. Każdego dnia przygotowywałam świeże roztwory. Po wprowadzeniu odpowiedniej objętości próbki moczu do serii mieszanin reakcyjnych, natychmiast umieszczałam ją w zamrażalce niskotemperaturowej laboratoryjnej chłodzącej do -80°C, a przed każdą analizą odmrażałam ją do temperatury pokojowej. Na Wykresach od 20. do 23. oraz w Tabelach od 11. do 14. przedstawiłam uzyskane wyniki. Sprawdziłam takie parametry walidacyjne jak:

- ◆ zakres liniowości metod,
- ◆ precyzję,
- ◆ dokładność,
- ◆ granicę wykrywalności (LOD),
- ◆ granicę oznaczalności (LOQ).

Ostatnie dwa wymienione parametry wyliczyłam na podstawie wzorów umieszczonych na stronie nr 70. Przyjęłam, że stężenie pochodnych L3 oraz LN3 jest równe stężeniu oznaczanego jonu siarczkowego. Otrzymane wyniki wyżej wymienionych parametrów walidacyjnych były zgodne z wymogami normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 [135] oraz wytycznymi organizacji ICH [136].



Wykres 20. Przykładowy chromatogram otrzymany podczas wyznaczania zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w próbce z ludzkim moczem za pomocą techniki HPLC/DAD (pik L1: 7,3 min, pik L3: 8,4 min). Układ chromatograficzny opisany w Tabeli 5.

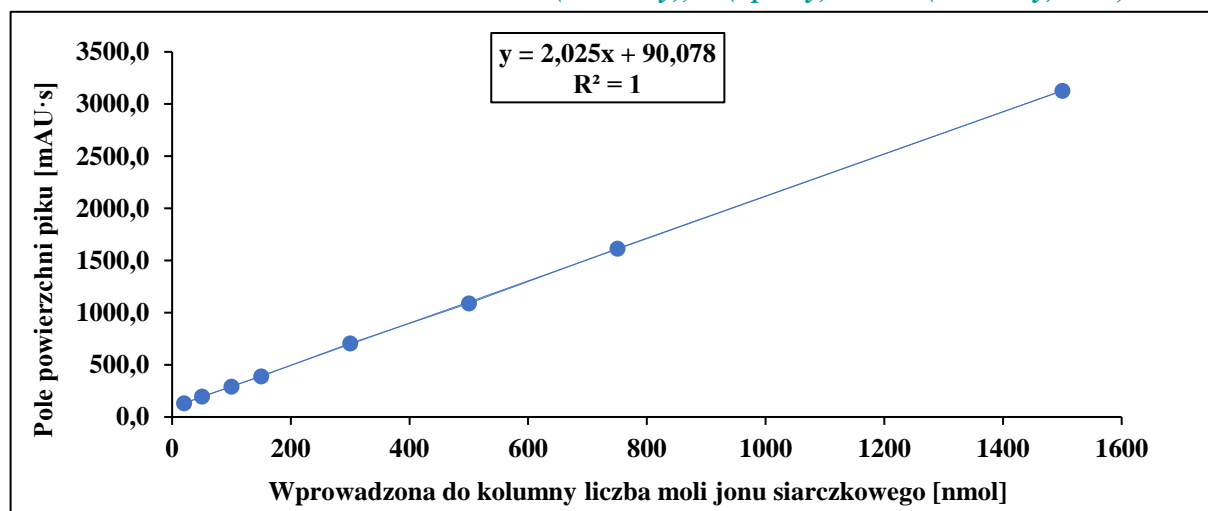


Wykres 21. Przykładowy chromatogram otrzymany podczas wyznaczania zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w próbce z ludzkim moczem za pomocą techniki HPLC/DAD (pik LNI: 4,6 min, pik LN3: 5,0 min). Układ chromatograficzny opisany w Tabeli 5.

Walidacja metody oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z wykorzystaniem techniki HPLC/DAD na próbkach z ludzkim moczem - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia

Wprowadzona do kolumny liczba moli jonu siarczkowego [nmol]	Znaleziona liczba moli jonu siarczkowego [nmol]			Średnia [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Odzysk [%]
	Dzień 1 intre-day	Dzień 2 up-day	Dzień 3 intra-day				
20	20,3	20,3	20,2	20,3 ± 0,1	0,06	0,29	101
50	52,0	52,0	52,2	52,1 ± 0,3	0,12	0,22	104
100	99,1	99,1	99,0	99,1 ± 0,1	0,06	0,06	99
150	148,0	147,9	148,0	148,0 ± 0,1	0,06	0,04	99
300	303,9	303,9	303,8	303,9 ± 0,1	0,06	0,02	101
500	493,6	493,6	493,4	493,5 ± 0,3	0,12	0,02	99
750	753,2	753,2	753,1	753,2 ± 0,1	0,06	0,01	100
1500	1500,0	1499,9	1500,0	1500,0 ± 0,1	0,06	0	100

Tabela 11. Statystyczna ocena odtwarzalność metody oznaczania jonów siarczkowych w próbkach z ludzkim moczem za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3



Wykres 22. Wykres zależności pola powierzchni pików pochodnej L3 od wprowadzonej do kolumny liczby moli jonu siarczkowego (próbki z ludzkim moczem) - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

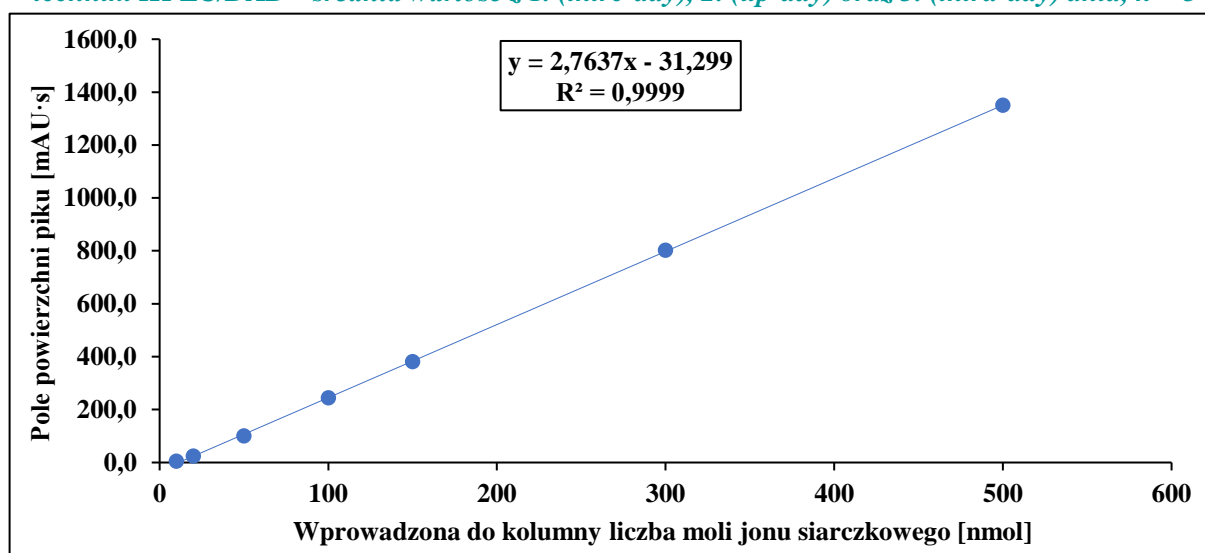
Parametr prostej wzorcowej	Wyznaczona wartość [L3]
Zakres liniowości [nmol]	20-1500
Współczynnik nachylenia prostej	2,025
Wyraz wolny równania prostej	90,078
Współczynnik korelacji R ²	1
Granica wykrywalności [nmol]	5,5
Granica oznaczalności [nmol]	16,8

Tabela 12. Parametry wyznaczonych zależności prostoliniowych w metodzie oznaczania jonów siarczkowych w próbkach z ludzkim moczem za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

Walidacja metody oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyizującego LNI z wykorzystaniem techniki HPLC/DAD na próbkach z ludzkim moczem - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia

Wprowadzona do kolumny liczba moli jonu siarczkowego [nmol]	Znaleziona liczba moli jonu siarczkowego [nmol]			Średnia [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Odzysk [%]
	Dzień 1 intre-day	Dzień 2 up-day	Dzień 3 intra-day				
10	12,8	12,8	12,7	12,8 ± 0,1	0,06	0,45	128
20	20,0	20,0	19,9	20,0 ± 0,1	0,06	0,29	100
50	47,5	47,5	47,4	47,5 ± 0,1	0,06	0,12	95
100	99,6	99,6	99,5	99,6 ± 0,1	0,06	0,06	100
150	148,9	148,8	148,8	148,8 ± 0,1	0,06	0,04	99
300	301,5	301,5	301,4	301,5 ± 0,1	0,06	0,02	100
500	499,7	499,7	499,6	499,7 ± 0,1	0,06	0,01	100

Tabela 13. Statystyczna ocena odtwarzalności metody oznaczania jonów siarczkowych w próbkach z ludzkim moczem za pomocą odczynnika derywatyizującego LNI z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3



Wykres 23. Wykres zależności pola powierzchni pików pochodnej LN3 od wprowadzonej do kolumny liczby moli jonu siarczkowego (próbki z ludzkim moczem) - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

Parametr prostej wzorcowej	Wyznaczona wartość [LN3]
Zakres liniowości [nmol]	10-500
Współczynnik nachylenia prostej	2,7637
Wyraz wolny równania prostej	- 31,299
Współczynnik korelacji R ²	0,9999
Granica wykrywalności [nmol]	3,3
Granica oznaczalności [nmol]	10,0

Tabela 14. Parametry wyznaczonych zależności prostoliniowych w metodzie oznaczania jonów siarczkowych w próbkach z ludzkim moczem za pomocą odczynnika derywatyizującego LNI z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

Wartość współczynnika kierunkowego (a) z równania prostej wzorcowej dla obu metod uzyskana na podstawie walidacji zarówno mieszanin reakcyjnych z ludzkim moczem jak i dla próbek standardów jest zbliżona do siebie. Zatem można stwierdzić, że w obu metodach nie obserwujemy efektu matrycowego. Dlatego przy ilościowym oznaczaniu jonów siarczkowych w ludzkim moczu zastosowałam metodę prostej wzorcowej.

3.6.2.3. Oznaczanie jonów siarczkowych w ludzkim moczu

W ostatnim etapie eksperymentu oznaczyłam jony siarczkowe oraz kreatyninę w ludzkim moczu. Analizowałam materiał biologiczny od 20. zdrowych ochotników, od 13. kobiet w wieku od 23. do 67. lat oraz od 7. mężczyzn w wieku od 25. do 70. lat. Stężenie badanego analitu w ludzkim moczu wyliczałam z równań prostych wzorcowych (metoda 1.: $y = 2,0247x + 90,175$ oraz metoda 2.: $y = 2,7643x - 31,349$) uzyskanych na podstawie wyznaczonych zakresów oznaczalności dla obu pochodnych w próbkach standardów. Otrzymane wyniki zaprezentowałam na Wykresach od 24. do 26. oraz w Tabelach od 15. do 22.

Wyznaczona wartość [L3]					
Numer próbki	Średnia wartość pola powierzchni piku [mAU·s]	Znaleziona liczba moli jonów siarczkowych (metoda prostej wzorcowej) [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Stężenie jonów siarczkowych (metoda prostej wzorcowej) [$\mu\text{mol}/\text{ml}_{\text{mocz}}$]
1	155,6	32,3 ± 0,1	0,06	0,18	3,21·10 ⁻⁴
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	205,2	56,8 ± 0,2	0,10	0,18	5,68·10 ⁻⁴
5	-	-	-	-	-
6	137,6	23,4 ± 0,6	0,23	0,99	2,34·10 ⁻⁴
7	-	-	-	-	-
8	226,8	67,5 ± 1,1	0,46	0,68	6,75·10 ⁻⁴
9	146,7	27,9 ± 0,6	0,25	0,90	2,79·10 ⁻⁴
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	236,2	72,1 ± 0,1	0,06	0,08	7,21·10 ⁻⁴
13	-	-	-	-	-
14	196,1	52,3 ± 1,3	0,53	1,01	5,23·10 ⁻⁴
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	220,8	64,5 ± 0,1	0,06	0,09	6,45·10 ⁻⁴
18	141,6	25,4 ± 0,9	0,36	1,42	2,54·10 ⁻⁴
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-

Tabela 15. Wyniki oraz statystyczna ocena oznaczania stężenia jonów siarczkowych w próbkach z ludzkim moczem za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD (metoda prostej wzorcowej), n = 6

Wyznaczona wartość [LN3]					
Numer próbki	Średnia wartość pola powierzchni piku [mAU·s]	Znaleziona liczba moli jonów siarczkowych (metoda prostej wzorcowej) [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Stężenie jonów siarczkowych (metoda prostej wzorcowej) [$\mu\text{mol/ml}_{\text{mocz}}$]
1	57,4	32,1 ± 0,7	0,30	0,93	3,21·10 ⁻⁴
2	3,2	12,5 ± 0,9	0,35	2,82	1,25·10 ⁻⁴
3	5,1	13,2 ± 0,5	0,21	2,05	1,32·10 ⁻⁴
4	124,6	56,4 ± 0,5	0,20	0,35	5,64·10 ⁻⁴
5	-	-	-	-	-
6	34,2	23,7 ± 0,1	0,06	0,24	2,37·10 ⁻⁴
7	-	-	-	-	-
8	156,3	67,9 ± 1,5	0,60	0,88	6,79·10 ⁻⁴
9	44,7	27,5 ± 0,2	0,10	0,36	2,75·10 ⁻⁴
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	168,5	72,3 ± 0,1	0,06	0,08	7,23·10 ⁻⁴
13	14,8	16,7 ± 0,7	0,30	1,80	1,67·10 ⁻⁴
14	114,9	52,9 ± 0,1	0,06	0,11	5,29·10 ⁻⁴
15	2,9	12,4 ± 0,6	0,23	2,07	1,24·10 ⁻⁴
16	-	-	-	-	-
17	144,7	63,7 ± 0,1	0,06	0,09	6,37·10 ⁻⁴
18	40,5	26,0 ± 1,7	0,70	2,70	2,60·10 ⁻⁴
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-

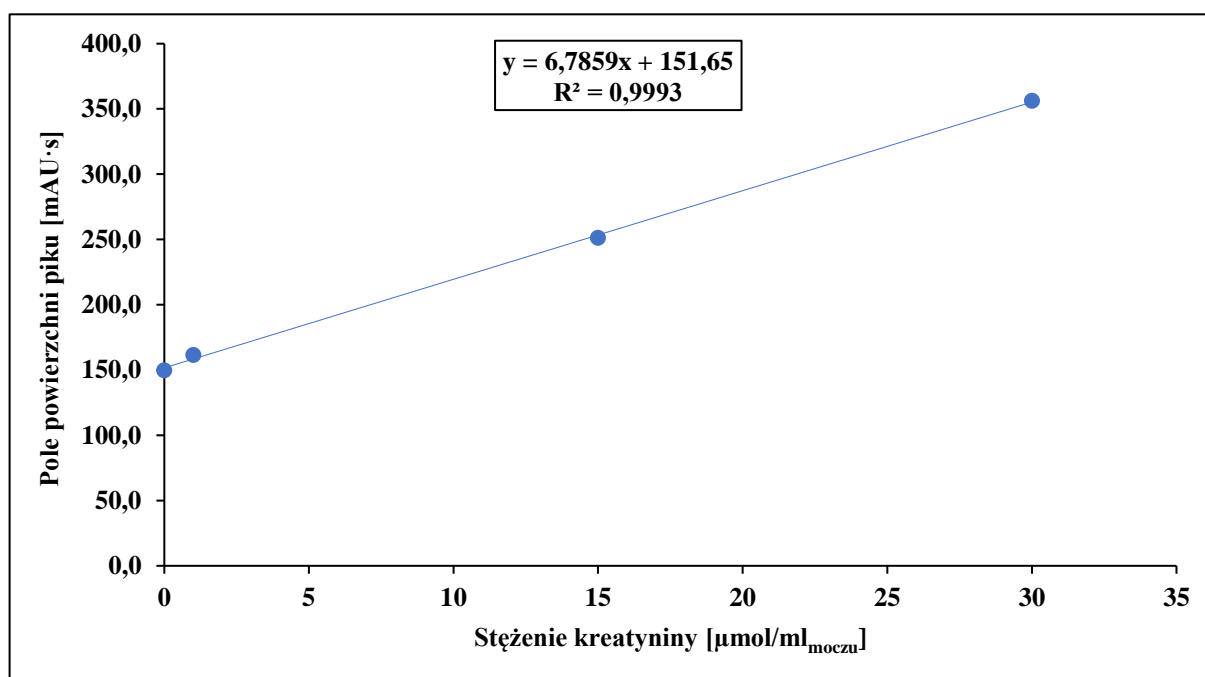
Tabela 16. Wyniki oraz statystyczna ocena oznaczania stężenia jonów siarczkowych w próbkach z ludzkim moczu za pomocą odczynnika derywatyzującego LNI z zastosowaniem techniki HPLC/DAD (metoda prostej wzorcowej), n = 6

Z powyższych tabel wynika fakt, że stężenie jonów siarczkowych w ludzkim moczu jest cechą osobniczą i może zależeć od wielu czynników. Najprawdopodobniej będzie to uzależnione w dużym stopniu od:

- ◆ rodzaju stosowanej diety,
- ◆ leków,
- ◆ suplementów,
- ◆ aktywności fizycznej,
- ◆ jakości wdychanego powietrza,
- ◆ stanu zdrowia,
- ◆ charakteru wykonywanej pracy,
- ◆ poziomu stresu,
- ◆ predyspozycji genetycznych itp.

W niektórych próbkach nie udało mi się oznaczyć jonów siarczkowych. Zapewne było to spowodowane brakiem oznaczanego analitu w moczu lub granicą wykrywalności opracowanych metod. Mogę stwierdzić, że opracowałam dwie metody za pomocą których można z dużym powodzeniem oznaczać jony siarczkowe w moczu, a inne składniki matrycy nie wpływają na otrzymywany sygnał analityczny. Metodę 2. można zastosować do wyznaczania niskich stężeń tego jonu w ludzkim moczu. Oprócz tego obie metody są bardzo proste, ponieważ opierają się głównie z trzech procesów takich jak: derywatyzacja przed kolumnowa, wirowanie i analiza chromatograficzna.

W tych samych analizowanych próbkach moczu oznaczyłam stężenie kreatyniny, według metody opracowanej w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego [131]. W Tabeli 17. przedstawiłam optymalne warunki chromatograficzne stosowane podczas oznaczania tego związku w moczu. W pierwszej kolejności wykonałam prostą wzorcową na próbkach z materiałem biologicznym (mocz) pochodzącym od zdrowej 25. letniej kobiety, które dodatkowo wzbogacałam roztworem kreatyniny. Później przeprowadziłam analizę ilościową kreatyniny w ludzkim moczu, a jej stężenie wyliczyłam z otrzymanego równania prostej wzorcowej ($y = 6,7859x + 151,65$). Następnie w celu wykluczenia rozbieżności będących skutkiem wydalania różnej objętości moczu podczas całej doby, otrzymane wyniki stężeń jonów siarczkowych normalizowałam na kreatyninę. Oznaczone stężenia badanego analitu w moczu dla pierwszej metody mieściły się w przedziale $2,41 - 16,77 \cdot 10^{-5}$ mol/mol_{kreatyniny}, natomiast dla drugiej metody przedział ten wyniósł $1,74 - 16,81 \cdot 10^{-5}$ mol/mol_{kreatyniny}.



Wykres 26. Wykres zależności pola powierzchni pików od wprowadzonego do kolumny stężenia kreatyniny, $n = 6$

Parametr	Kreatynina
Kolumna chromatograficzna	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4,6 × 150 mm; 4 μm)
Skład fazy ruchomej	woda dejonizowana(odgazowana za pomocą myjki ultradźwiękowej) : metanol 95:5 v/v
Prędkość przepływu fazy ruchomej	0,50 ml/min
Objętość roztworu wprowadzanego do kolumny chromatograficznej	1 μl
Temperatura automatycznego podajnika próbek	4°C
Temperatura termostatu kolumn	25°C
Czas analizy	4 min
Analityczna długość fali	λ = 234 nm

Tabela 17. Optymalne warunki chromatograficzne do oznaczania kreatyniny za pomocą techniki HPLC/DAD według [131]

Wyznaczona wartość [kreatynina]				
Numer próbki	Średnia wartość pola powierzchni piku [mAU·s] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [mAU·s]	RSD [%]	Stężenie kreatyniny [μmol/ml _{mocz}]
1	191,7 ± 0,4	0,15	0,38	5,9
2	200,5 ± 0,3	0,12	0,24	7,2
3	190,3 ± 0,4	0,15	0,40	5,7
4	231,7 ± 0,5	0,20	0,25	11,8
5	243,9 ± 0,1	0,06	0,06	13,6
6	186,3 ± 0,1	0,06	0,17	5,1
7	201,9 ± 1,1	0,45	0,89	7,4
8	216,1 ± 0,4	0,15	0,24	9,5
9	230,4 ± 0,1	0,06	0,07	11,6
10	189,0 ± 0,9	0,35	0,94	5,5
11	196,4 ± 0,1	0,06	0,13	6,6
12	180,8 ± 0,1	0,06	0,20	4,3
13	181,5 ± 0,9	0,35	1,17	4,4
14	201,9 ± 0,6	0,25	0,50	7,4
15	188,3 ± 0,1	0,06	0,16	5,4
16	201,9 ± 0,9	0,35	0,70	7,4
17	200,5 ± 0,7	0,30	0,62	7,2
18	207,3 ± 0,6	0,25	0,45	8,2
19	216,1 ± 0,5	0,20	0,31	9,5
20	194,4 ± 0,1	0,06	0,13	6,3

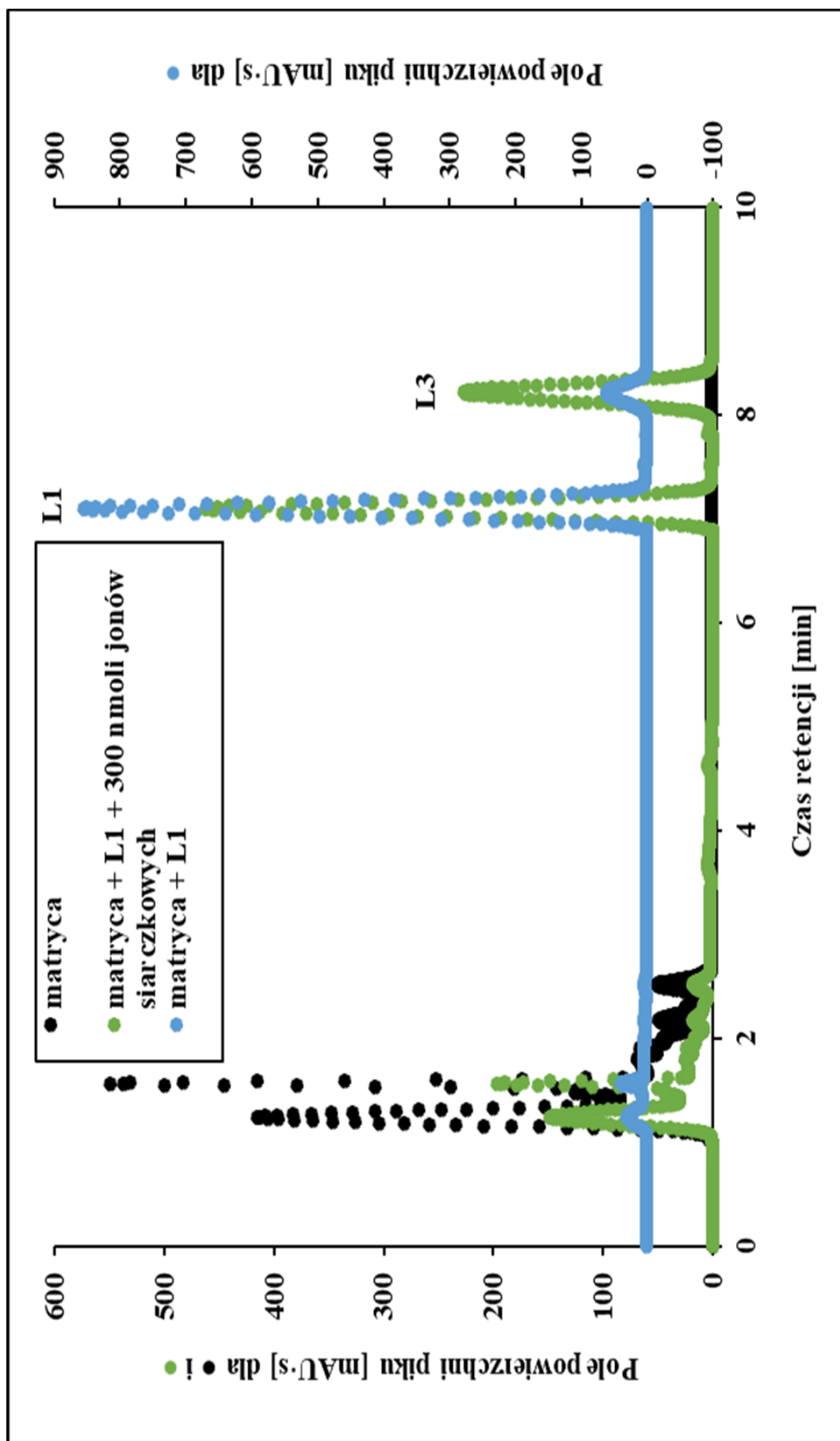
Tabela 18. Wyniki oraz statystyczna ocena oznaczania stężenia kreatyniny w próbkach z ludzkim moczem metodą prostej wzorcowej, n = 6

Wyznaczona wartość [L3]			
Numer próbki	Stężenie jonów siarczkowych [$\mu\text{mol/ml}_{\text{mocz}}$]	Stężenie kreatyniny [$\mu\text{mol/ml}_{\text{mocz}}$]	Stężenie jonów siarczkowych znormalizowane na kreatyninę [$\text{mol/mol}_{\text{kreatyniny}}$]
1	$3,21 \cdot 10^{-4}$	5,9	$5,44 \cdot 10^{-5}$
2	-	-	-
3	-	-	-
4	$5,68 \cdot 10^{-4}$	11,8	$4,81 \cdot 10^{-5}$
5	-	-	-
6	$2,34 \cdot 10^{-4}$	5,1	$4,59 \cdot 10^{-5}$
7	-	-	-
8	$6,75 \cdot 10^{-4}$	9,5	$7,11 \cdot 10^{-5}$
9	$2,79 \cdot 10^{-4}$	11,6	$2,41 \cdot 10^{-5}$
10	-	-	-
11	-	-	-
12	$7,21 \cdot 10^{-4}$	4,3	$16,77 \cdot 10^{-5}$
13	-	-	-
14	$5,23 \cdot 10^{-4}$	7,4	$7,07 \cdot 10^{-5}$
15	-	-	-
16	-	-	-
17	$6,45 \cdot 10^{-4}$	7,2	$8,96 \cdot 10^{-5}$
18	$2,54 \cdot 10^{-4}$	8,2	$3,10 \cdot 10^{-5}$
19	-	-	-
20	-	-	-

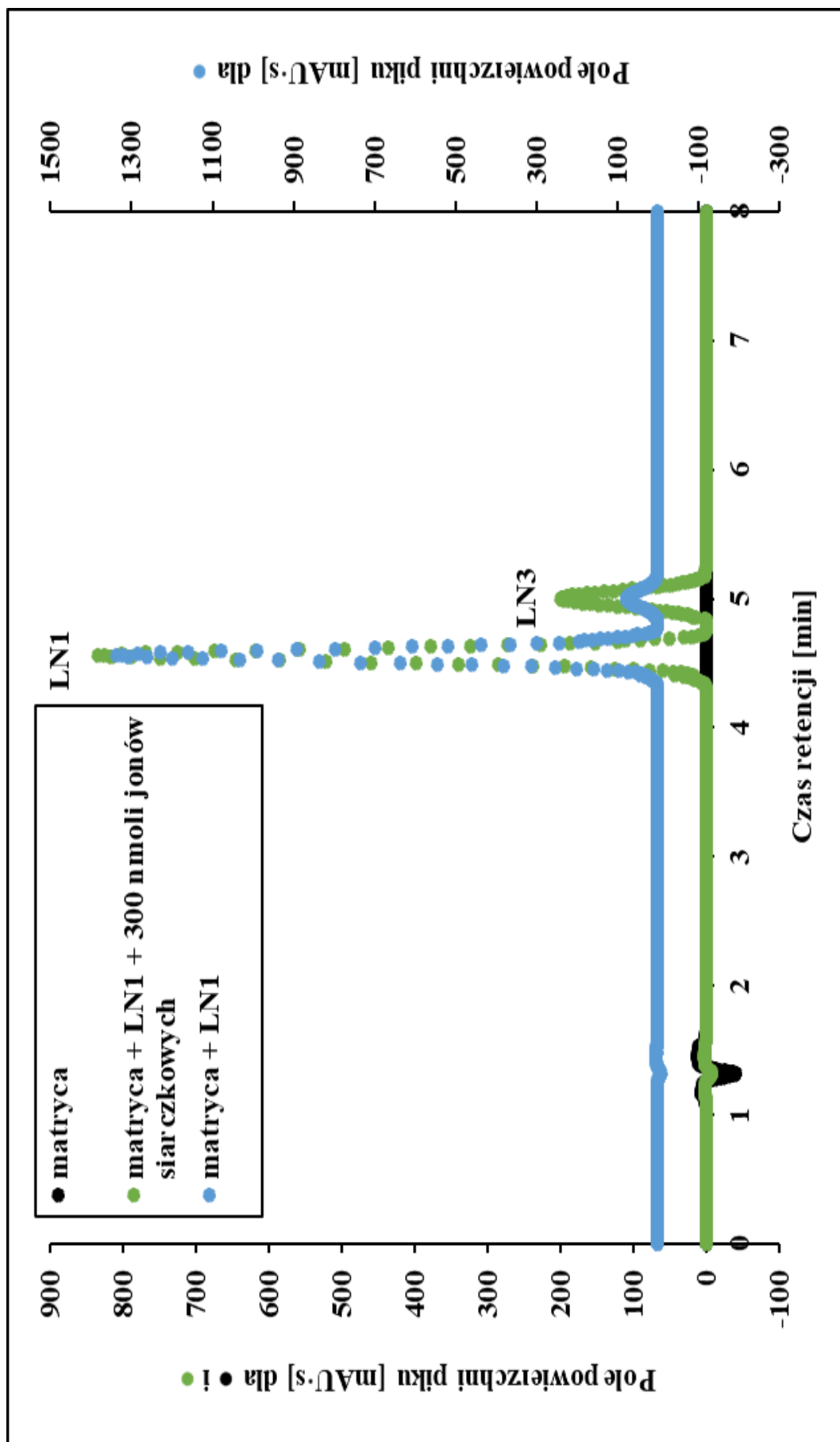
Tabela 19. Oznaczone oraz znormalizowane stężenie jonów siarczkowych na kreatyninę (metoda z odczynnikiem derywatyżującym L1), n = 6

Wyznaczona wartość [LN3]			
Numer próbki	Stężenie jonów siarczkowych [$\mu\text{mol/ml}_{\text{mocz}}$]	Stężenie kreatyniny [$\mu\text{mol/ml}_{\text{mocz}}$]	Stężenie jonów siarczkowych znormalizowane na kreatyninę [$\text{mol/mol}_{\text{kreatyniny}}$]
1	$3,21 \cdot 10^{-4}$	5,9	$5,44 \cdot 10^{-5}$
2	$1,25 \cdot 10^{-4}$	7,2	$1,74 \cdot 10^{-5}$
3	$1,32 \cdot 10^{-4}$	5,7	$2,31 \cdot 10^{-5}$
4	$5,64 \cdot 10^{-4}$	11,8	$4,78 \cdot 10^{-5}$
5	-	-	-
6	$2,37 \cdot 10^{-4}$	5,1	$4,65 \cdot 10^{-5}$
7	-	-	-
8	$6,79 \cdot 10^{-4}$	9,5	$7,15 \cdot 10^{-5}$
9	$2,75 \cdot 10^{-4}$	11,6	$2,37 \cdot 10^{-5}$
10	-	-	-
11	-	-	-
12	$7,23 \cdot 10^{-4}$	4,3	$16,81 \cdot 10^{-5}$
13	$1,67 \cdot 10^{-4}$	4,4	$3,80 \cdot 10^{-5}$
14	$5,29 \cdot 10^{-4}$	7,4	$7,15 \cdot 10^{-5}$
15	$1,24 \cdot 10^{-4}$	5,4	$2,30 \cdot 10^{-5}$
16	-	-	-
17	$6,37 \cdot 10^{-4}$	7,2	$8,85 \cdot 10^{-5}$
18	$2,60 \cdot 10^{-4}$	8,2	$3,17 \cdot 10^{-5}$
19	-	-	-
20	-	-	-

Tabela 20. Oznaczone oraz znormalizowane stężenie jonów siarczkowych na kreatyninę (metoda z odczynnikiem derywatyżującym LNI), n = 6



Wykres 24. Przykładowy zbiorczy chromatogram, metoda 1. Układ chromatograficzny opisalam w Tabeli 5.



Wykres 25. Przykładowy zbiorczy chromatogram, metoda 2. Układ chromatograficzny opisalam w Tabeli 5.

Poniżej w Tabeli 21. zestawiałam wartości parametrów statystyki opisowej, które zostały obliczone na podstawie wyników oznaczania stężenia jonów siarczkowych normalizowanego na kreatyninę za pomocą dwóch proponowanych metod analitycznych.

Wyniki statystyki opisowej		
Metoda z odczynnikiem derywatyżującym	L1	LN1
Liczba próbek	9	13
Średnia	$6,70 \cdot 10^{-5}$	$5,42 \cdot 10^{-5}$
Mediana	$5,44 \cdot 10^{-5}$	$4,65 \cdot 10^{-5}$
Minimum	$2,41 \cdot 10^{-5}$	$1,74 \cdot 10^{-5}$
Maksimum	$16,77 \cdot 10^{-5}$	$16,81 \cdot 10^{-5}$
Odchylenie standardowe	$4,30 \cdot 10^{-5}$	$4,07 \cdot 10^{-5}$
Skośność	1,80	2,01
Kurtoza	3,96	4,87

Tabela 21. Wyniki statystyki opisowej dla metody analitycznej z odczynnikiem derywatyżującym L1 oraz LN1

Za pomocą jednostronnego testu F (test Fishera-Snedecora) zweryfikowałam hipotezę o równości wariancji w dwóch populacjach (wyniki oznaczania stężenia jonów siarczkowych normalizowanego na kreatyninę za pomocą odczynnika derywatyżującego L1 oraz LN1). Przyjmując poziom istotności $\alpha = 0,05$ - postawiłam hipotezę zerową H_0 (wariancje w obu populacjach są sobie równe) oraz hipotezę alternatywną H_1 (wariancje w obu populacjach nie są sobie równe). Wyniki testu F przedstawiłam w Tabeli 22.

Wyniki testu F		
Metoda z odczynnikiem derywatyżującym	L1	LN1
Średnia	$6,70 \cdot 10^{-5}$	$5,42 \cdot 10^{-5}$
Wariancja	$1,85 \cdot 10^{-9}$	$1,65 \cdot 10^{-9}$
Obserwacje	9	13
df	8	12
F	1,12	
P(F<=f) jednostronny	0,42	
Test F jednostronny	2,85	

Tabela 22. Wyniki testu F dla metody analitycznej z odczynnikiem derywatyżującym L1 oraz LN1

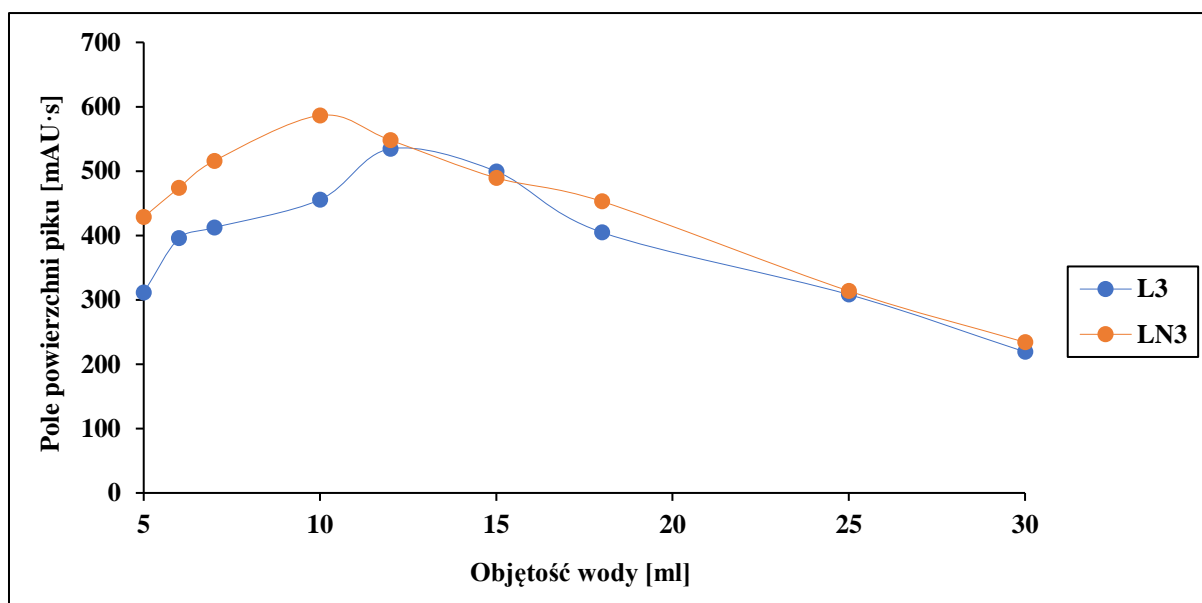
Wyznaczona wartość empiryczna statystyki F z Tabeli 22. wynosi 1,12. Natomiast z tablic rozkładu F dla $\alpha = 0,05$ oraz stopni swobody (df) 8 i 12, wartość krytyczna jednostronna F wynosi 2,85. Więc wartość statystyki F jest mniejsza niż wartość krytyczna jednostronna F. Dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej o równości wariancji w obu populacjach. Zatem jest spełnione założenie jednorodności wariancji w jednej i drugiej

populacji. Wyniki oznaczeń jonów siarczkowych za pomocą dwóch proponowanych metod badawczych nie różnią się statystycznie istotnie.

3.6.3. Badania wykonane na próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej

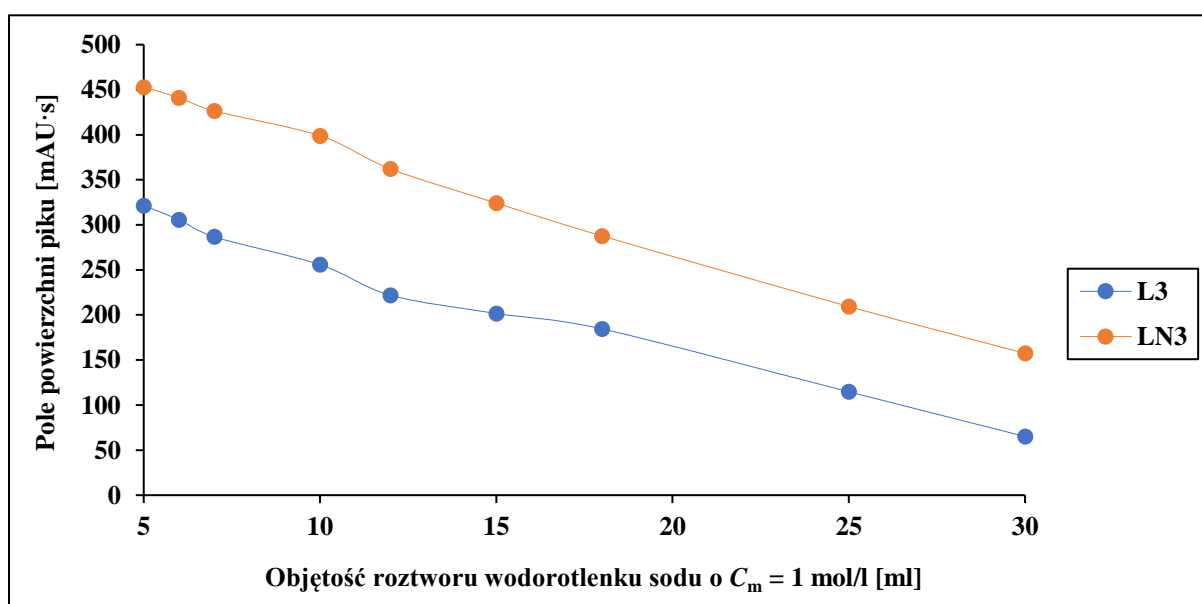
3.6.3.1. Optymalizacja procesu homogenizacji

Opracowane przez ze mnie dwie metody analityczne polegające na oznaczaniu jonów siarczkowych za pomocą soli piryliowych L1 oraz LN1, również wykorzystałam do oznaczenia stężenia badanego analitu w homogenacie tkanki wątroby kurzej. Najpopularniejszą i najbardziej praktyczną techniką rozdrabniania próbek biologicznych jest homogenizacja, do swoich badań użyłam homogenizatora Pottera-Elvehjema [138]. Przed oznaczaniem jonów siarczkowych w materiale biologicznym dobrałam jednocześnie odpowiednią substancję chemiczną oraz jej objętość w której był on homogenizowany. W celu przebiegu reakcji derywatywacji z jak największą wydajnością. Optymalizację procesu homogenizacji wątroby kurzej rozpocząłam od wody. Na podstawie danych zebranych na Wykresie 27. dla opracowanej metody z odczynnikiem derywatyżującym L1, można wnioskować, że otrzymywałam największy sygnał analityczny wówczas, gdy materiał biologiczny homogenizowałam w 12 ml wody. Przeprowadzanie procesu homogenizacji w mniejszej i większej ilości użytej substancji skutkowało otrzymywaniem przez ze mnie mniejszego sygnału analitycznego. W przypadku drugiej metody na podstawie danych zebranych na Wykresie 27. wynika fakt, że homogenizacja wątróbki kurzej w 10 ml wody daje największy sygnał analityczny, zmniejszanie lub zwiększanie jej objętości powoduje, że reakcja derywatywacji jest mniej wydajna.



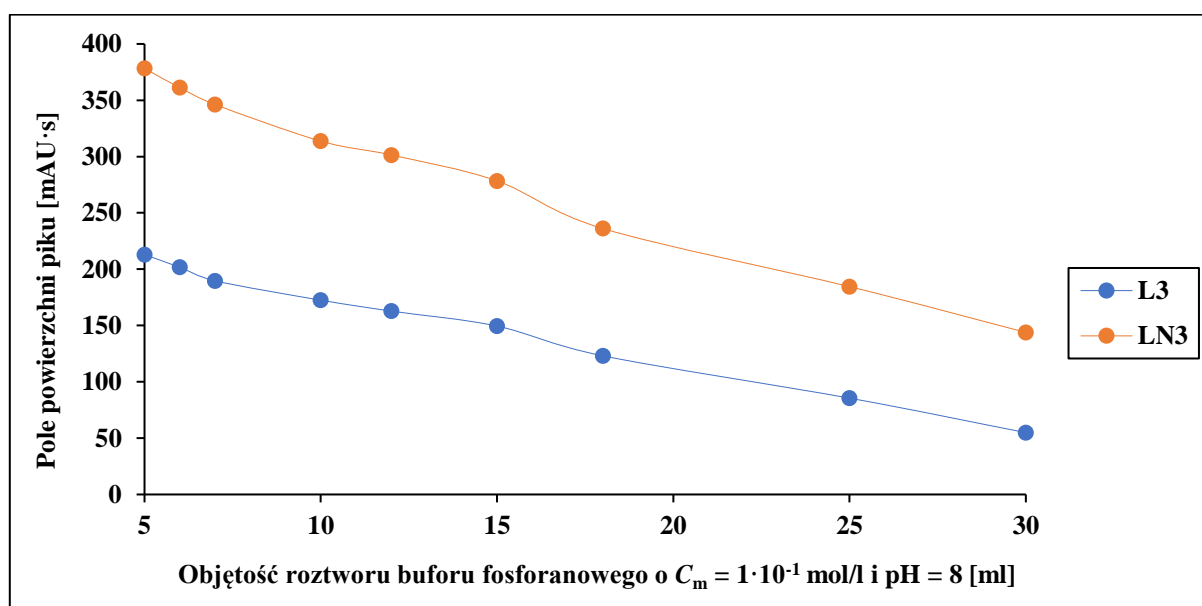
Wykres 27. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od objętości wody użytej w procesie homogenizacji tkanki wątroby kurzej, $n = 3$

Następnie sprawdziłam jak proces homogenizacji tkanki wątroby kurzej w roztworze wodorotlenku sodu o $C_m = 1 \text{ mol/l}$, będzie wpływał na wydajność reakcji derywatywacji oznaczanego analitu za pomocą dwóch użytych odczynników derywatywujących L1 oraz LN1. W przypadku obu metod widzimy, opierając się na danych zebranych na Wykresie 28., że największą wartość sygnału analitycznego otrzymujemy wtedy, gdy homogenizujemy materiał biologiczny w 5 ml roztworu wodorotlenku sodu o $C_m = 1 \text{ mol/l}$. W obu przypadkach wykonywanie procesu homogenizacji materiału biologicznego w objętości większej niż 5 ml analizowanego roztworu, powoduje sukcesywne obniżanie sygnału analitycznego wraz ze wzrostem jego objętości.



Wykres 28. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od objętości roztworu wodorotlenku sodu o $C_m = 1 \text{ mol/l}$ użytej w procesie homogenizacji tkanki wątroby kurzej, $n = 3$

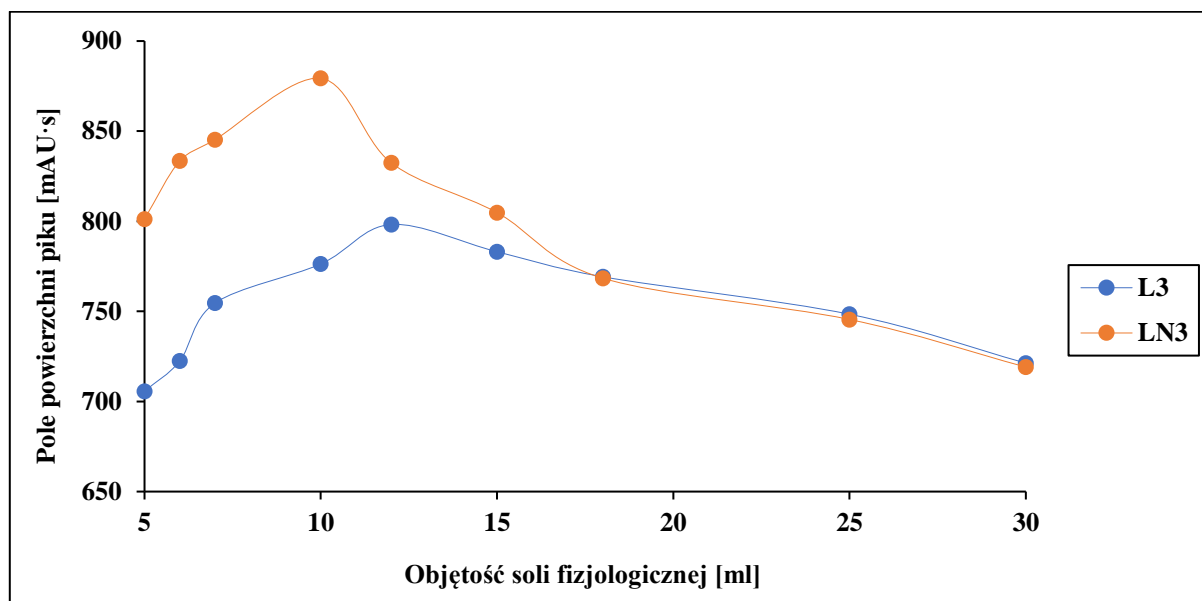
Wykonałam również proces homogenizacji badanego materiału biologicznego jakim była tkanka wątroby kurzej dla obu opracowywanych metod analitycznych w roztworze buforu fosforanowego o $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 8. Zarówno dla jednej jak i dla drugiej metody można na podstawie wyników umieszczonych na Wykresie numer 29. stwierdzić, że najlepiej homogenizować wątrobę kurzą w objętości 5 ml roztworu buforu fosforanowego o $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 8, co daje najwyższe uzyskiwane sygnały analityczne. Dalsze zwiększanie objętości użytego do doświadczenia roztworu skutkuje obniżeniem wydajności reakcji derywatywacji siarczaków za pomocą związku chemicznego L1 oraz LN1.



Wykres 29. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od objętości roztworu buforu fosforanowego o $C_m = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/l i pH = 8 użytej w procesie homogenizacji tkanki wątroby kurzej, $n = 3$

Postanowiłam jeszcze sprawdzić jak proces homogenizacji poddanemu analizie materiałowi biologicznemu w roztworze soli fizjologicznej (0,9% roztwór chlorku sodu) wpłynie na wydajność reakcji derywatywacji. Na podstawie tego eksperymentu można stwierdzić, że dodatek roztworu soli fizjologicznej w zakresie od 5 ml do 12 ml dla metody 1. oraz od 5 ml do 10 ml dla metody 2., wpływa na uzyskiwany sygnał analityczny dla obu pochodnych, w takim sposób, iż rośnie on sukcesywnie wraz z zwiększaniem jego objętości. Zaobserwowałam, że dla metody 1., wykorzystanie 12 ml roztworu soli fizjologicznej do procesu homogenizacji materiału biologicznego powoduje uzyskiwanie największego sygnału analitycznego, natomiast dalsze zwiększanie jej objętości powoduje stopniowe zmniejszanie się uzyskiwanego sygnału analitycznego. Dla metody 2. wykorzystanie 10 ml roztworu soli fizjologicznej do procesu homogenizacji tkanki wątroby kurzej daje sygnały analityczne o największej wartości. Większe objętości soli fizjologicznej skutkowały spadkiem wydajności

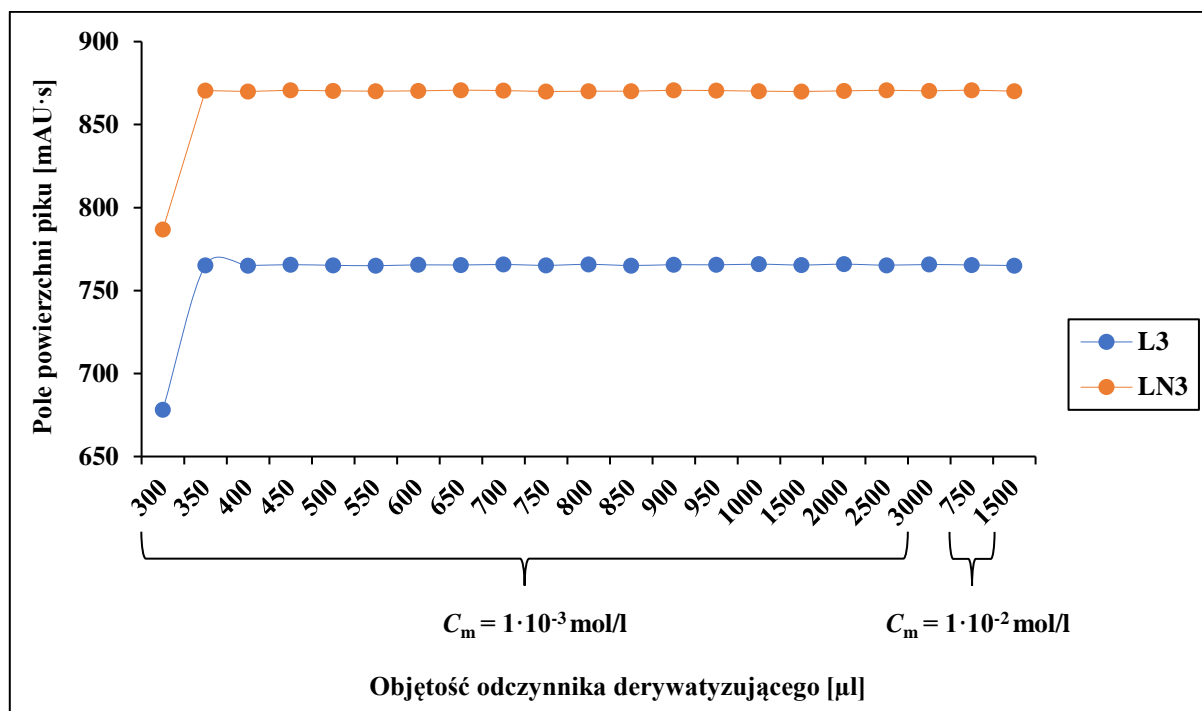
reakcji derywatywacji. Porównując ze sobą wyniki wszystkich eksperymentów dotyczących optymalizacji procesu homogenizacji tkanki wątroby kurzej. Wsuwa się wniosek, że najlepiej homogenizację przeprowadzać w 0,9% roztworze chlorku sodu. Dlatego w dalszym etapie badań tkankę wątroby kurzej homogenizowałam w soli fizjologicznej (12 ml dla metody z L1 oraz 10 ml dla metody z LN1), a następnie uzyskany homogenat w objętości 1 ml wprowadzałam do badanej mieszaniny reakcyjnej. Wyniki wyżej opisanego eksperymentu zostały zaprezentowane na Wykresie nr 30.



Wykres 30. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od objętości roztworu soli fizjologicznej użytej w procesie homogenizacji tkanki wątroby kurzej, $n = 3$

3.6.3.2. Optymalizacja warunków reakcji derywatywacji

Przystępując do ilościowego oznaczenia jonów siarczkowych w homogenacie kurzej wątroby, w pierwszym etapie dobrałam odpowiednią objętość odczynnika derywatyzującego L1 oraz LN1 dodawaną do mieszaniny reakcyjnej. Eksperyment przeprowadzałam na świeżej tkance kurzej wątroby, pochodzącej z lokalnego sklepu. Próbkę przygotowywałam w 3 seriach pomiarowych. Otrzymane wyniki zaprezentowałam na Wykresie 31.

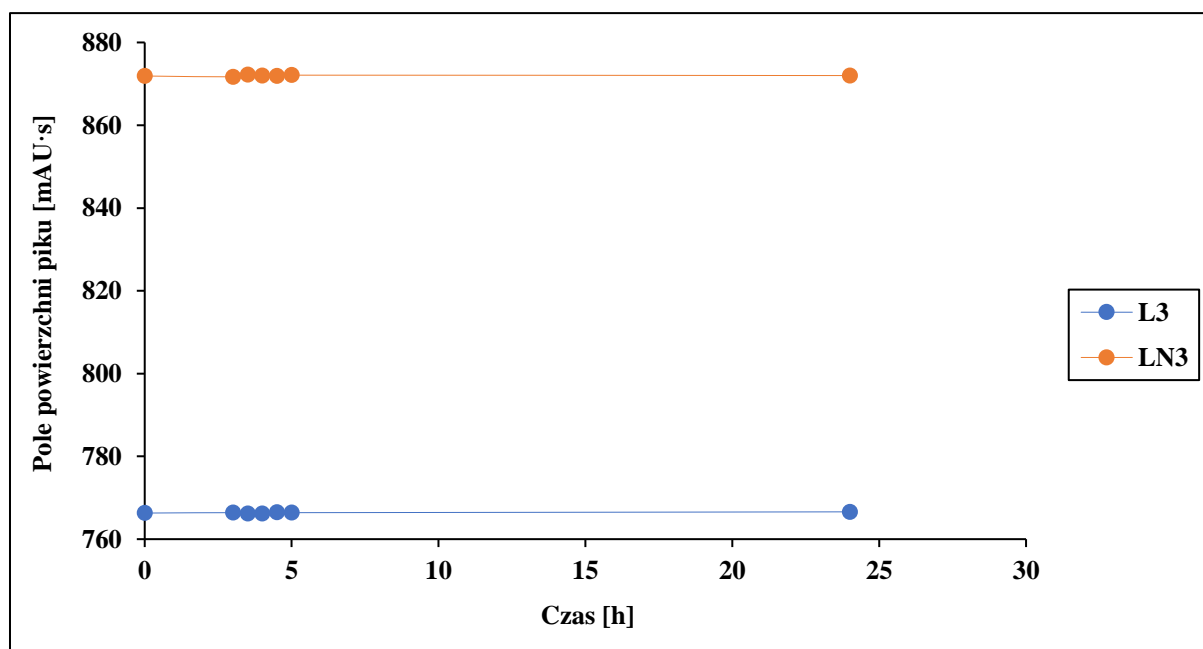


Wykres 31. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 od objętości odczynnika derywatyzującego dodawanej do próbek z homogenatem tkanki wątroby kurzej, $n = 3$

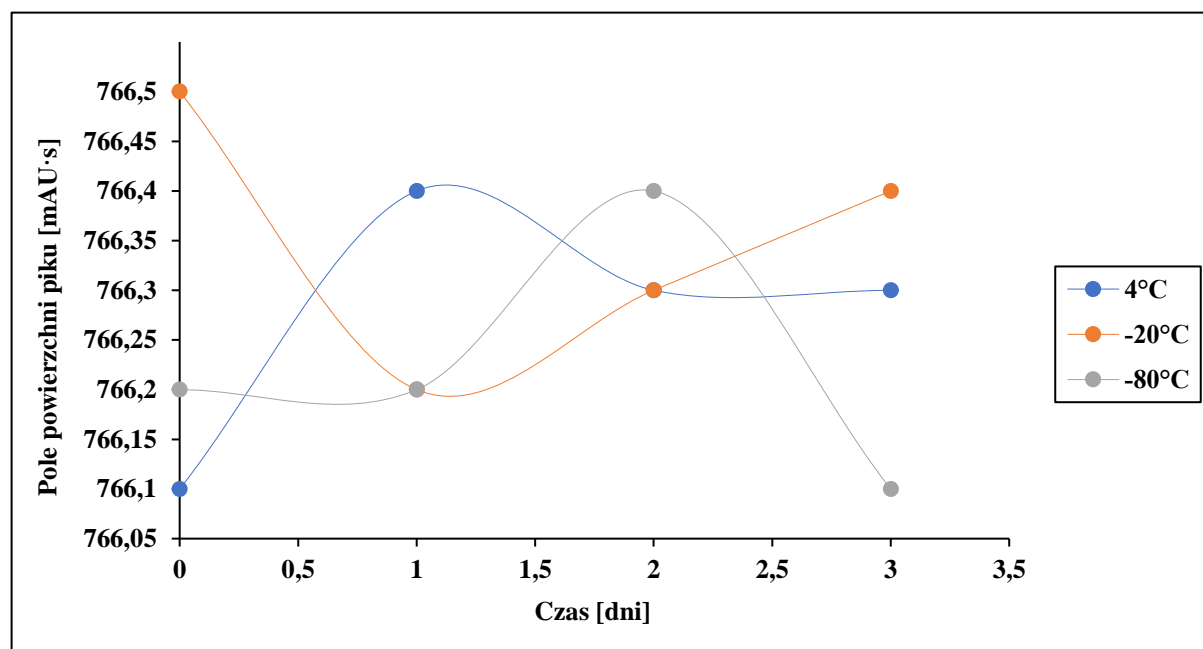
W zakresie od 350 μl o $C_m = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ do 1500 μl o $C_m = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$ dodawanego odczynnika derywatyzującego L1 do próbek, zaobserwowałam sygnały analityczne o stałych wartościach. Poniżej tego zakresu odnotowałam zdecydowanie mniejsze wartości sygnałów analitycznych, pochodzących od pochodnej L3. W kolejnych etapach doświadczenia do mieszaniny reakcyjnej dodawałam 3000 μl roztworu odczynnika derywatyzującego L1 o $C_m = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. Natomiast dla drugiej opracowywanej metody analitycznej zaobserwowałam te same zależności. Zatem zdecydowałam, że w następnych krokach eksperymentu również będę wprowadzać do roztworów 3000 μl LN1 o $C_m = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$.

Zbadałam trwałość związków L3 oraz LN3 w mieszaninach reakcyjnych z homogenatem wątroby kurzej. Trwałość pochodnych badałam w czterech temperaturach, takich jak: 25°C, 4°C, -20°C oraz -80°C. Badania w temperaturze pokojowej prowadziłam w przedziale czasowym od 0 do 24 godzin, natomiast w pozostałych temperaturach w zakresie czasowym od 0 do 3 dni. Tuż przed każdą analizą chromatograficzną doprowadzałam zamrożone roztwory do temperatury pokojowej. Od momentu zmieszania roztworu siarczku sodu z roztworem odczynnika derywatyzującego zaczęłam mierzyć czas eksperymentu. Na Wykresie od 32. do 34. zaprezentowałam uzyskane wyniki badań. Na podstawie, których można wysunąć wniosek, że zarówno jedna jak i druga pochodna w próbce z dodatkiem homogenatu jest trwała we wszystkich analizowanych temperaturach i przedziałach czasowych. Kolejnym wnioskiem jest fakt, że pozostałe składniki matrycy nie wpływają na ich trwałość. Dzięki czemu obie

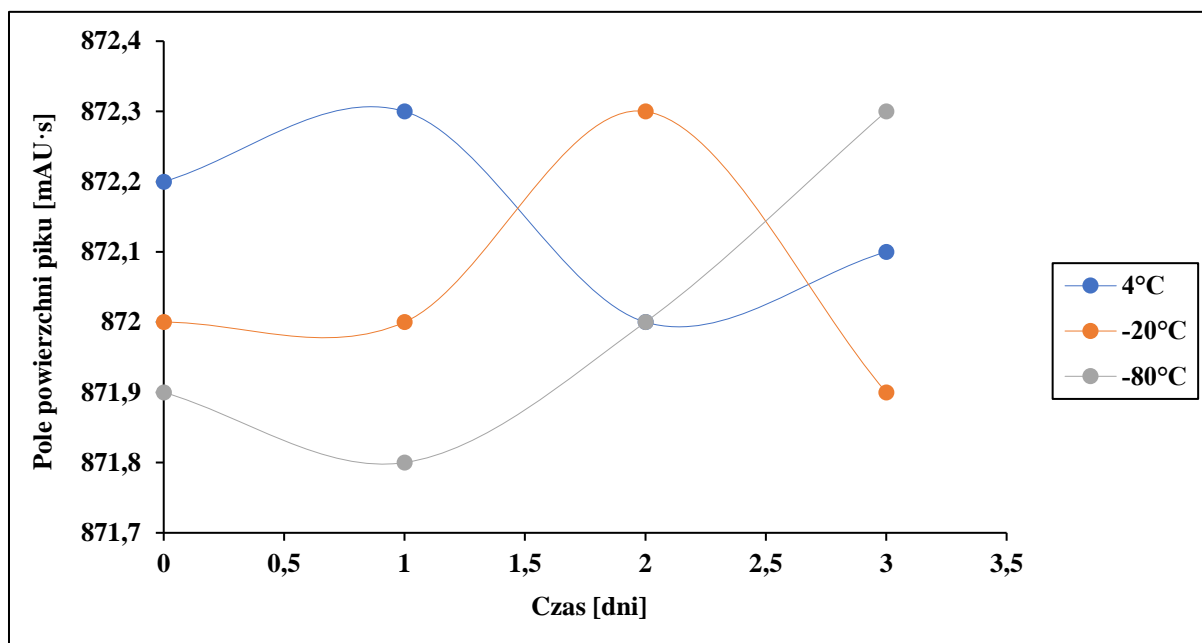
mieszaniny reakcyjne mogą być przechowywane nawet przez kilka godzin w temperaturze pokojowej zanim zostaną poddane analizie chromatograficznej, bez konieczności ich wcześniejszego zamrażania.



Wykres 32. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 oraz LN3 w próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej od czasu w 25°C, n = 3



Wykres 33. Zależność pola powierzchni pików pochodnej L3 w próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej od czasu w 4°C, -20°C oraz -80°C, n = 3

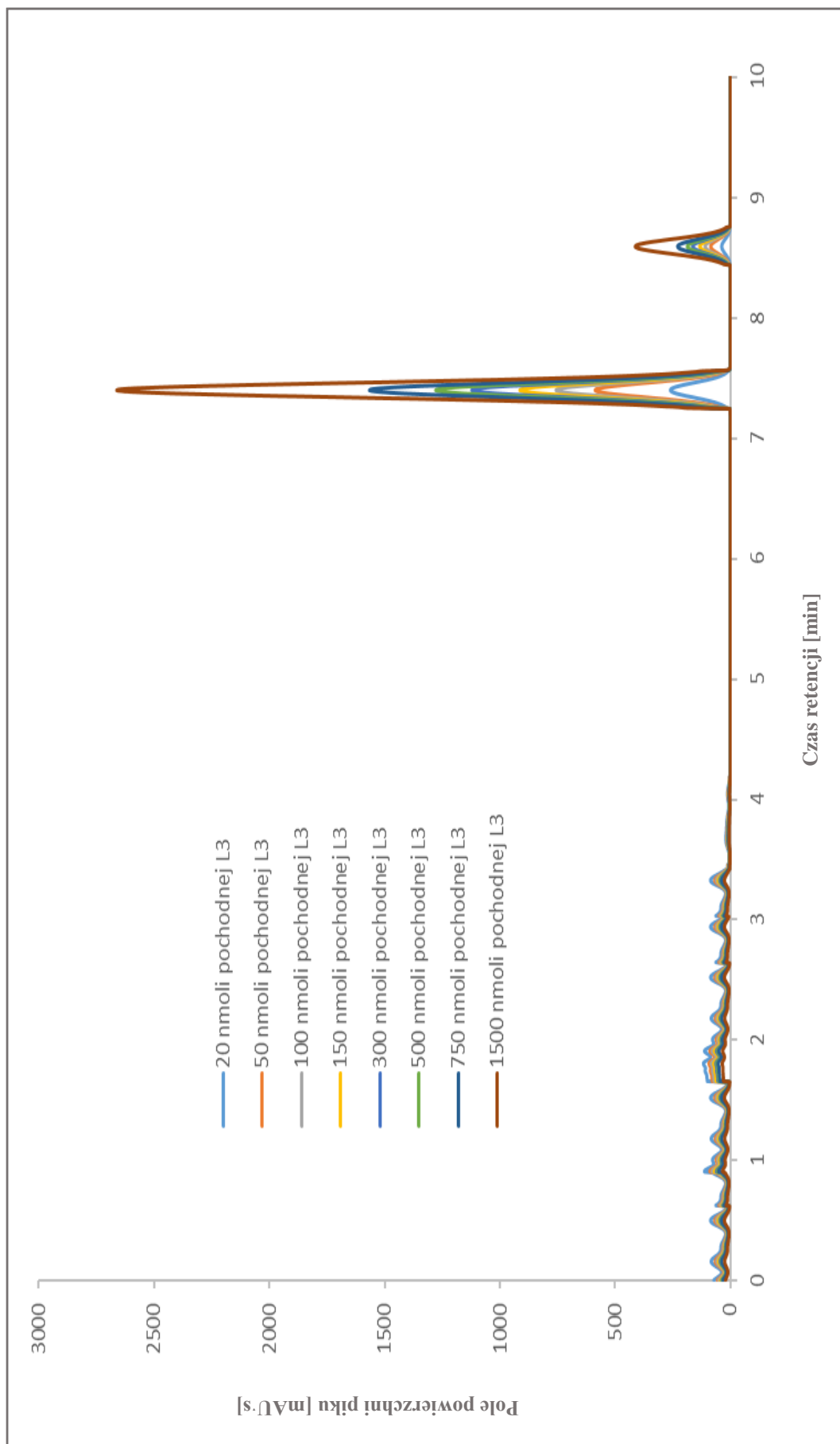


Wykres 34. Zależność pola powierzchni pików pochodnej LN3 w próbkach z homogenatem tkanki wątroby od czasu w 4°C, -20°C oraz -80°C, n = 3

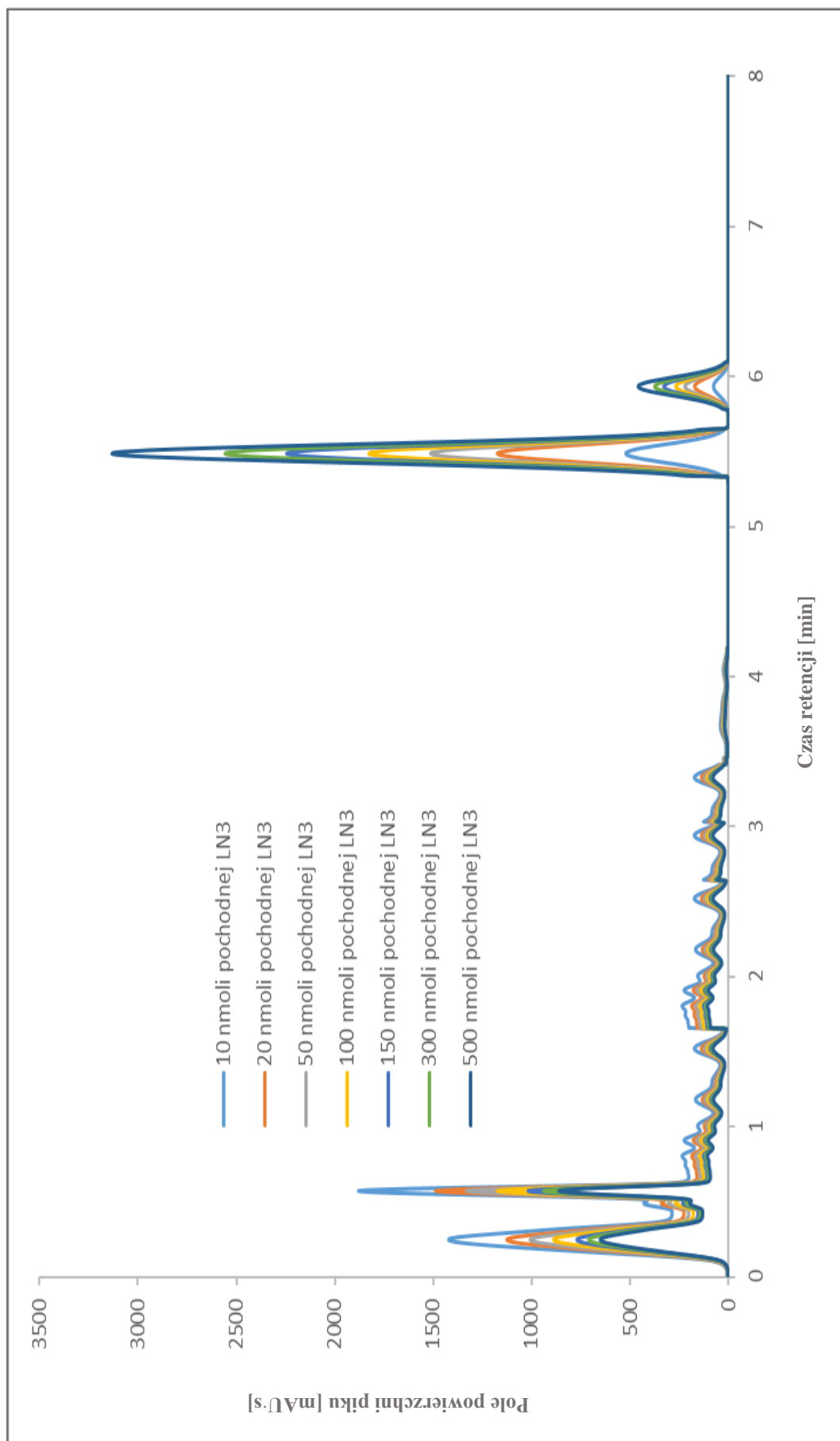
3.6.3.3. Wyznaczenie zakresu oznaczalności metod

Celem wyznaczenia zakresu oznaczalności anionów siarczkowych za pomocą soli piryliowych i techniki HPLC/DAD, przez trzy następane dni sporządzałam po 6 serii pomiarowych, które następnie poddałam analizie instrumentalnej wykorzystującą technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączoną z detektorem UV/VIS z matrycą fotodiową. Badania wykonywałam każdego dnia na nowych seriach roztworów i wykorzystywałam do nich jedną i tą samą wątrobę kurzą. Poniżej przedstawiłam przykładowe chromatogramy (Wykres 35. i 36.) oraz uzyskane wyniki kalibracji metod (Wykres 37. i 38. oraz Tabela od 23. do 26.). Dzięki metodzie najmniejszych kwadratów wyznaczyłam zależność pola powierzchni pików L3 oraz LN3 od liczby moli anionu siarczkowego, która charakteryzuje się prostoliniowością. W zakresie odpowiednio 20-1500 nmol oraz 10-500 nmol (Wykres 37. oraz 38.). Założyłam, że stężenie związku chemicznego L3 i LN3 jest identyczne wyjściowemu stężeniu oznaczanego analitu. W Tabeli 23. i 25. umieściłam odchylenie standardowe (SD), precyzję metody określoną względem odchylenia standardowego (RSD) oraz odzysk. Uzyskałam jednocześnie niskie wartości RSD oraz wysokie wartości odzysku dla jednej i drugiej metody analitycznej, co wskazuje na fakt, iż opracowane procedury analityczne są adekwatne do ilościowego oznaczania jonów siarczkowych. Ponadto w Tabeli 24. i 26. zaprezentowałam parametry wyznaczonych zależności prostoliniowych: zakres liniowości, współczynnik nachylenia prostej, wyraz wolny równania prostej, współczynnik korelacji R^2 ,

wartość granicy wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ). LOD i LOQ wyznaczyłam eksperymentalnie jako stosunek sygnału do szumu (S/N). Założyłam, że granica wykrywalności (LOD) jest najniższym stężeniem jonów siarczkowych, które generuje powstanie na chromatogramie piku 3-krotnie wyższego od szumów linii podstawowej (S/N = 3). Z kolei za wartość granicy oznaczalności (LOQ) przyjąłm stężenie analizowanego analitu, które generuje otrzymanie piku 9-krotnie razy większego niż szumy linii podstawowej (S/N = 9). Wyniki otrzymane wyżej opisanych parametrów walidacyjnych były kompatybilne z wymogami normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 [135] oraz dyrektywą organizacji ICH [136].



Wykres 35. Przykładowy chromatogram otrzymany podczas wyznaczania zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w próbce z homogenatem tkanki wątroby kurzej za pomocą techniki HPLC/DAD (pik L1: 7,4 min, pik L3: 8,6 min). Układ chromatograficzny opisany w Tabeli 5.

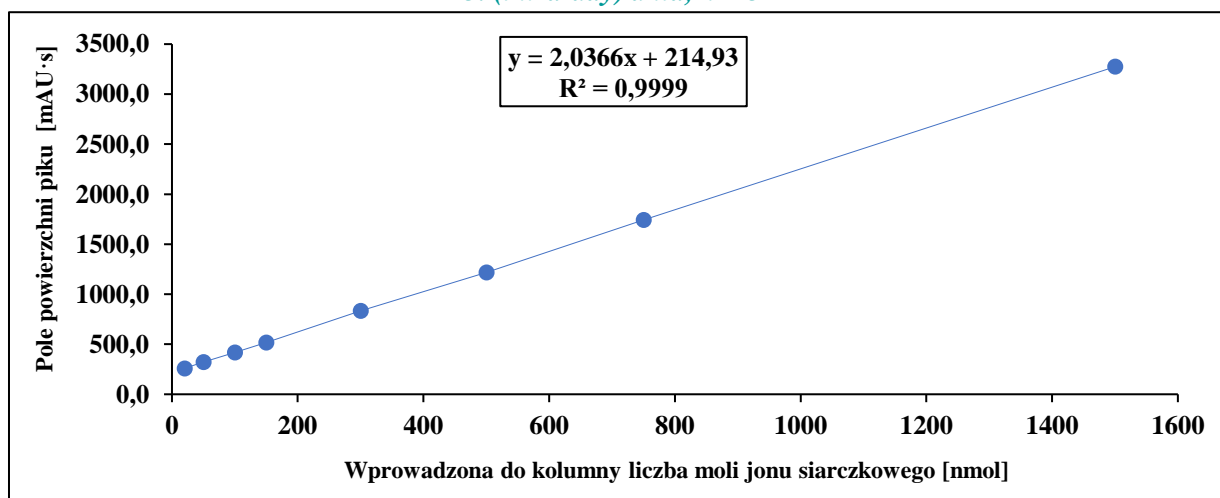


Wykres 36. Przykładowy chromatogram otrzymany podczas wyznaczania zakresu oznaczalności jonów siarczkowych w próbce z homogenatem tkanki wątroby kurzej za pomocą techniki HPLC/DAD (pik LN1: 5,5 min, pik LN3: 5,9 min). Układ chromatograficzny opisany w Tabeli 5.

Walidacja metody oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z wykorzystaniem techniki HPLC/DAD na próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia

Wprowadzona do kolumny liczba moli jonu siarczkowego [nmol]	Znaleziona liczba moli jonu siarczkowego [nmol]			Średnia [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Odzysk [%]
	Dzień 1 intre-day	Dzień 2 up-day	Dzień 3 intra-day				
20	21,8	21,9	21,9	21,9 ± 0,1	0,03	0,15	109
50	52,9	52,8	52,8	52,9 ± 0,1	0,05	0,09	106
100	99,7	99,7	99,7	99,7 ± 0	0,01	0,01	100
150	148,2	148,2	148,2	148,2 ± 0,1	0,03	0,02	99
300	303,3	303,3	303,3	303,3 ± 0	0,01	0	101
500	492,0	492,0	492,0	492,0 ± 0	0,01	0	98
750	750,0	750,1	750,1	750,0 ± 0,1	0,04	0,01	100
1500	1502,1	1502,1	1502,1	1502,1 ± 0,1	0,02	0	100

Tabela 23. Statystyczna ocena odtwarzalność metody oznaczania jonów siarczkowych w próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3



Wykres 37. Wykres zależności pola powierzchni pików pochodnej L3 od wprowadzonej do kolumny liczby moli jonu siarczkowego (próbki z homogenatem tkanki wątroby kurzej) - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

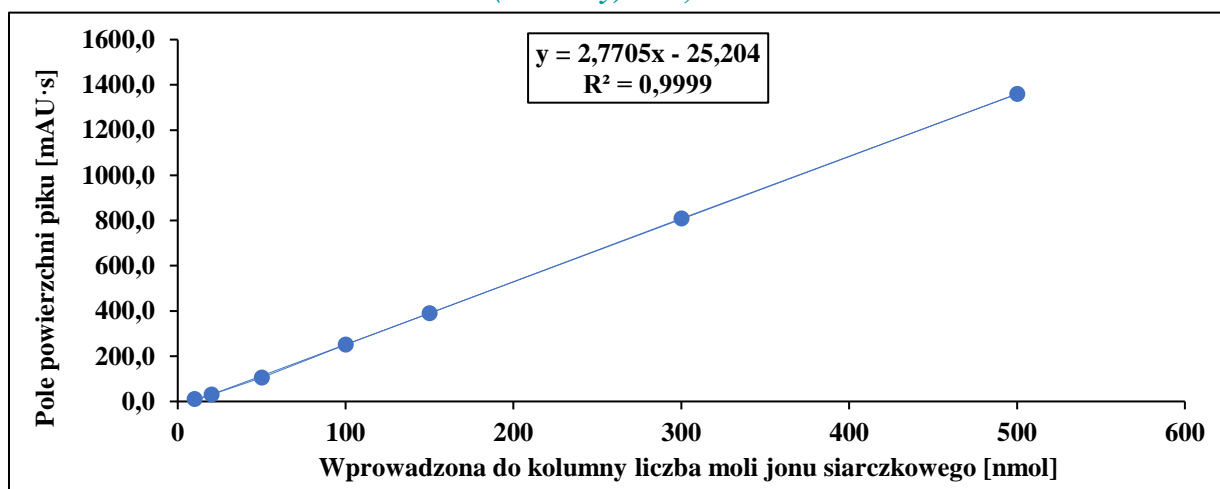
Parametr prostej wzorcowej	Wyznaczona wartość [L3]
Zakres liniowości [nmol]	20-1500
Współczynnik nachylenia prostej	2,0366
Wyraz wolny równania prostej	214,93
Współczynnik korelacji R ²	0,9999
Granica wykrywalności [nmol]	6,2
Granica oznaczalności [nmol]	18,8

Tabela 24. Parametry wyznaczonych zależności prostoliniowych w metodzie oznaczania jonów siarczkowych w próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

Walidacja metody oznaczania jonów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzującego LNI z wykorzystaniem techniki HPLC/DAD na próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia

Wprowadzona do kolumny liczba moli jonu siarczkowego [nmol]	Znaleziona liczba moli jonu siarczkowego [nmol]			Średnia [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Odzysk [%]
	Dzień 1 (intre-day)	Dzień 2 (up-day)	Dzień 3 (intra-day)				
10	12,8	12,8	12,8	12,8 ± 0	0,01	0,04	128
20	19,9	19,9	19,9	19,9 ± 0	0,01	0,05	99
50	47,1	47,1	47,1	47,1 ± 0,1	0,02	0,05	94
100	99,7	99,8	99,8	99,8 ± 0,1	0,02	0,02	100
150	149,6	149,6	149,6	149,6 ± 0,1	0,03	0,02	100
300	301,2	301,2	301,2	301,2 ± 0	0,02	0,01	100
500	499,7	499,7	499,7	499,7 ± 0	0	0	100

Tabela 25. Statystyczna ocena odtwarzalność metody oznaczania jonów siarczkowych w próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej za pomocą odczynnika derywatyzującego LNI z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3



Wykres 38. Wykres zależności pola powierzchni pików pochodnej LN3 od wprowadzonej do kolumny liczby moli jonu siarczkowego (próbki z homogenatem tkanki wątroby kurzej) - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

Parametr prostej wzorcowej	Wyznaczona wartość [LN3]
Zakres liniowości [nmol]	10-500
Współczynnik nachylenia prostej	2,7705
Wyraz wolny równania prostej	-25,204
Współczynnik korelacji R ²	0,9999
Granica wykrywalności [nmol]	3,3
Granica oznaczalności [nmol]	9,9

Tabela 25. Parametry wyznaczonych zależności prostoliniowych w metodzie oznaczania jonów siarczkowych w próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej za pomocą odczynnika derywatyzującego LI z zastosowaniem techniki HPLC/DAD - średnia wartość z 1. (intre-day), 2. (up-day) oraz 3. (intra-day) dnia, n = 3

Wartość współczynnika kierunkowego (a) z równania prostej wzorcowej dla obu metod, uzyskana na podstawie walidacji zarówno próbek z homogenatem materiału biologicznego, jak i dla próbek standardów jest zbliżona do siebie. Z tego względu można stwierdzić, że w obu procedurach nie obserwujemy interferencji matrycowej innych składników mieszaniny reakcyjnej. Zatem przy ilościowym oznaczaniu analitu w tkance wątroby kurzej zastosowałam metodę prostej wzorcowej.

3.6.3.4. Oznaczanie jonów siarczkowych w homogenacie tkanki wątroby kurzej

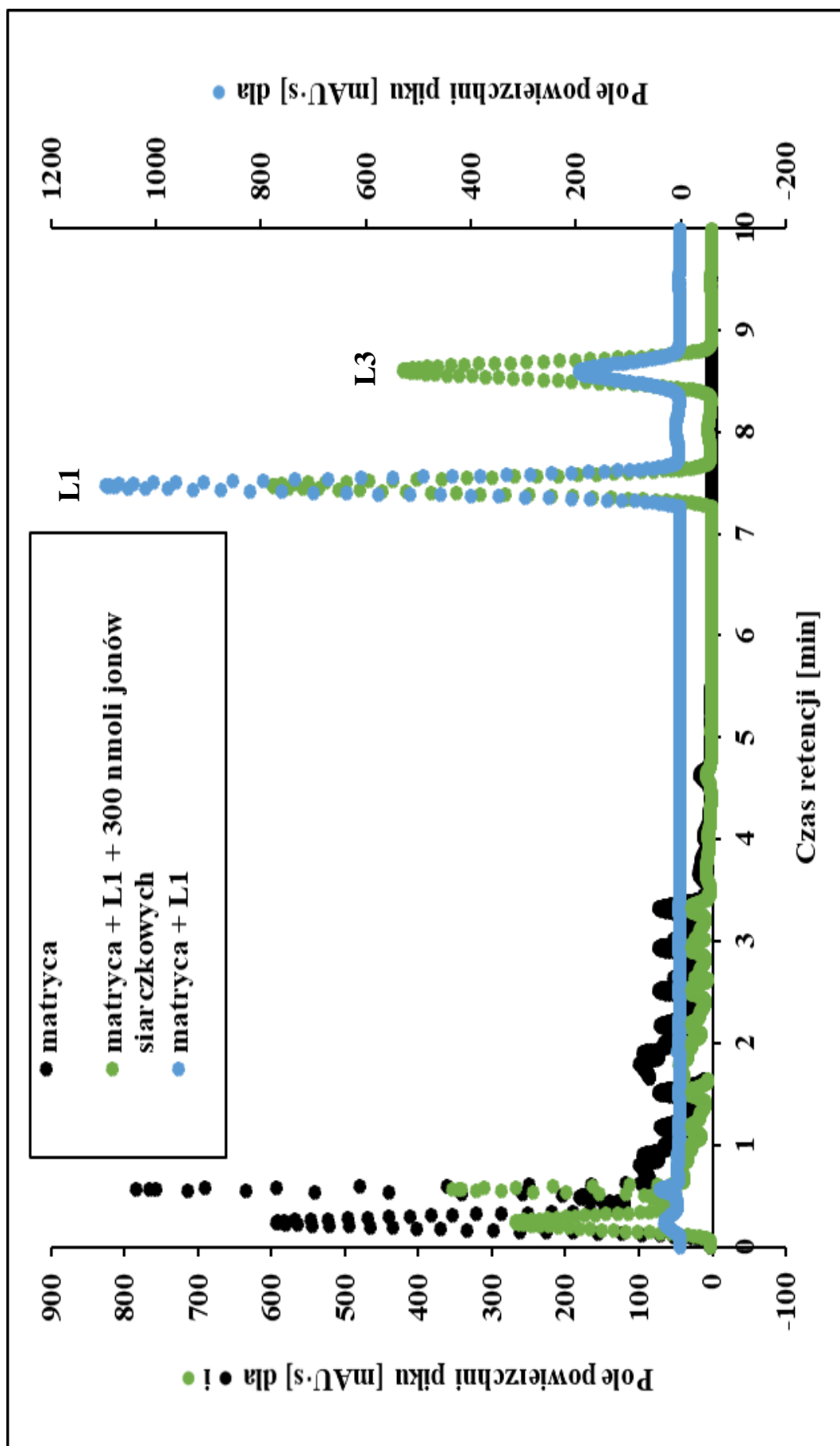
W końcowym etapie całego eksperymentu oznaczyłam ilościowo badany analit w homogenacie tkanki wątroby kurzej. Do badań wykorzystywałam za każdym razem świeży materiał biologiczny, który pochodził od różnych źródeł. Przez pięć kolejnych dni kupowałam w sześciu różnych sklepach wątrobę kurzą. Stężenie oznaczanego analitu w analizowanych próbkach wyliczałam z równań prostych wzorcowych uzyskanych na podstawie próbek standardów dla pochodnej L3 ($y = 2,0247x + 90,175$) oraz LN3 ($y = 2,7643x - 31,349$). Otrzymane wyniki zaprezentowałam na Wykresie 39. i 40. oraz w Tabeli 27. i 28.

Wyznaczona wartość [L3]					
Numer próbki	Średnia wartość pola powierzchni piku [mAU·s]	Znaleziona liczba moli jonów siarczkowych (metoda prostej wzorcowej) [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Stężenie jonów siarczkowych (metoda prostej wzorcowej) [$\mu\text{mol/ml}_{\text{homogenatu}}$]
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	275,0	91,3 ± 0,9	0,35	0,38	9,13·10 ⁻⁴
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	143,6	26,4 ± 1,0	0,40	0,28	2,64·10 ⁻⁴
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	176,2	42,5 ± 0,5	0,20	0,11	4,25·10 ⁻⁴
14	135,1	22,2 ± 0,9	0,35	0,26	2,22·10 ⁻⁴
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	184,5	46,6 ± 0,9	0,35	0,19	4,66·10 ⁻⁴
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	128,2	18,8 ± 1,0	0,40	0,31	1,88·10 ⁻⁴
26	-	-	-	-	-
27	189,6	49,1 ± 0,9	0,35	0,19	4,91·10 ⁻⁴
28	201,5	55,0 ± 0,6	0,25	0,12	5,50·10 ⁻⁴
29	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-

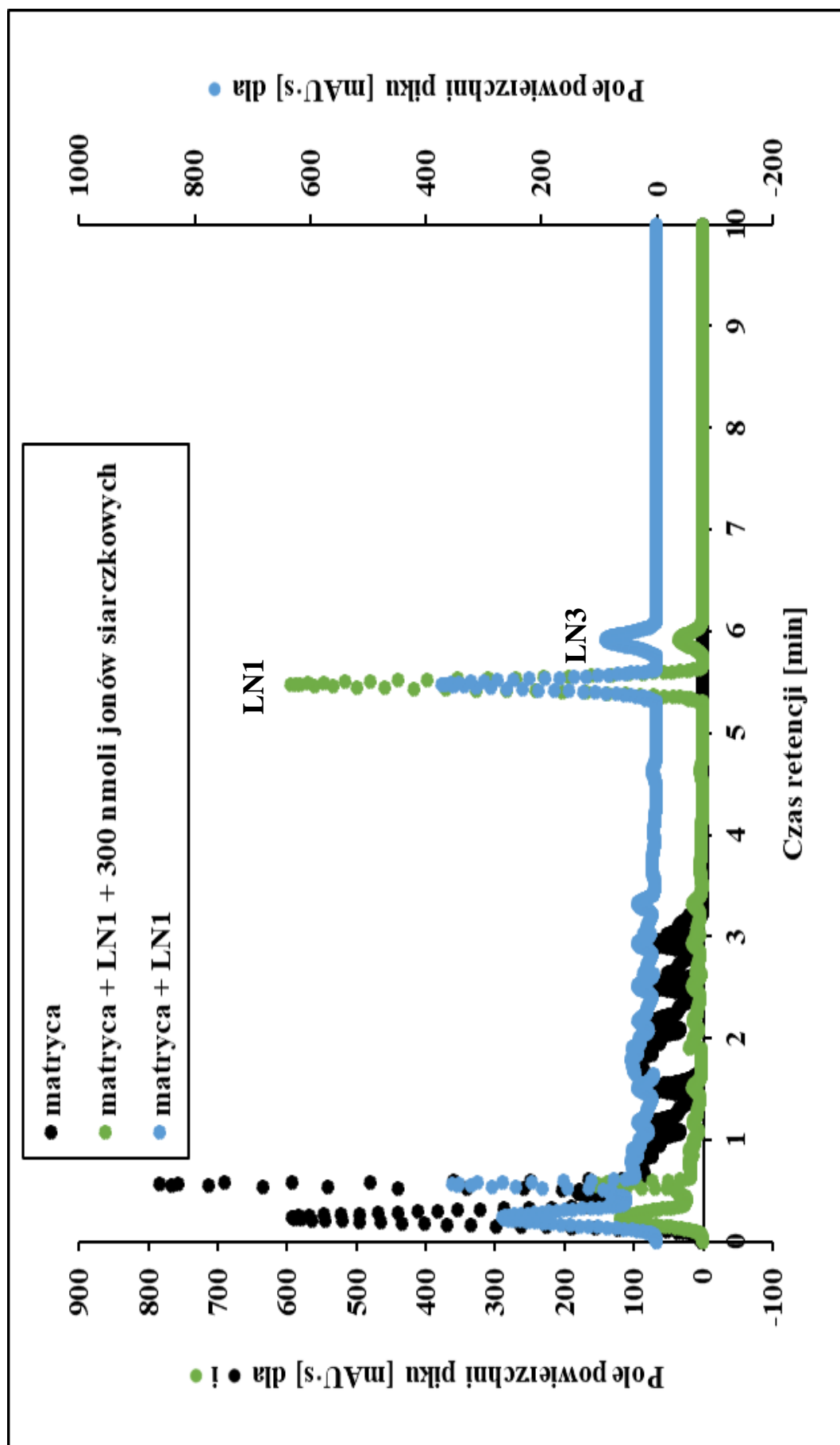
Tabela 27. Wyniki oraz statystyczna ocena oznaczania stężenia jonów siarczkowych w próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD (metoda prostej wzorcowej), n = 3

Wyznaczona wartość [LN3]					
Numer próbki	Średnia wartość pola powierzchni piku [mAU·s]	Znaleziona liczba moli jonów siarczkowych (metoda prostej wzorcowej) [nmol] $\bar{x} \pm t_{0,95} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	SD [nmol]	RSD [%]	Stężenie jonów siarczkowych (metoda prostej wzorcowej) [$\mu\text{mol/ml}_{\text{homogenatu}}$]
1	-	-	-	-	-
2	14,8	16,7 ± 0,7	0,32	0,18	1,67·10 ⁻⁴
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	221,6	91,5 ± 1,2			9,15·10 ⁻⁴
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	41,1	26,2 ± 0,4	0,25	0,12	2,62·10 ⁻⁴
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	87,2	42,9 ± 0,5	0,35	0,19	4,29·10 ⁻⁴
14	29,2	21,9 ± 1,3	0,40	0,22	2,19·10 ⁻⁴
15	3,2	12,5 ± 0,7	0,24	0,11	1,25·10 ⁻⁴
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	97,5	46,6 ± 0,2	0,41	0,32	4,66·10 ⁻⁴
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	4,9	13,1 ± 0,8	0,12	0,27	1,31·10 ⁻⁴
23	2,7	12,3 ± 1,5	0,32	0,19	1,23·10 ⁻⁴
24	-	-	-	-	-
25	19,5	18,4 ± 0,6	0,09	0,43	1,84·10 ⁻⁴
26	-	-	-	-	-
27	105,2	49,4 ± 0,7	0,45	0,67	4,94·10 ⁻⁴
28	122,1	55,5 ± 0,7	0,31	0,45	5,55·10 ⁻⁴
29	-	-	-	-	-
30	8,5	14,4 ± 0,3	0,06	0,12	1,44·10 ⁻⁴

Tabela 28. Wyniki oraz statystyczna ocena oznaczania stężenia jonów siarczkowych w próbkach z homogenatem tkanki wątroby kurzej pomocą odczynnika derywatyzującego LNI z zastosowaniem techniki HPLC/DAD (metoda prostej wzorcowej), n = 3



Wykres 39. Przykładowy zbiorczy chromatogram, metoda 1. Układ chromatograficzny opisany w Tabeli 5.



Wykres 40. Przykładowy zbiorczy chromatogram, metoda 2. Układ chromatograficzny opisalam w Tabeli 5.

Z powyższych wyników wynika fakt, że stężenie anionu siarczkowego w tkance wątroby kurzej jest cechą indywidualną dla każdego organizmu, i może na nią wpływać wiele czynników. Przepuszczalnie będzie to korelatywne w dużym stopniu od:

- ◆ rodzaju spożywanej paszy, leków i suplementów,
- ◆ wieku,
- ◆ sposobu i miejsca prowadzenia hodowli,
- ◆ stanu zdrowia,
- ◆ indywidualnych osobniczych predyspozycji zwierzęcia,
- ◆ poziomu stresu itp.

Dla co niektórych próbek, nie udało mi się w nich oznaczyć pożądanego analitu. Najwyraźniej wynika to z braku oznaczanych jonów siarczkowych w badanym materiale biologicznym, bądź granicą wykrywalności opracowanych procedur analitycznych. Obie metody można bez problemu wykorzystać do ilościowego oznaczania anionów siarczkowych w wątrobie kurzej, a pozostałe składniki tej matrycy nie wywołują efektów interferencyjnych. Ponadto procedura, w której wykorzystywałam odczynnik derywatyzujący LN1 i technikę chromatograficzną HPLC/DAD może posłużyć do wyznaczania niskich stężeń tego anionu w badanym materiale biologicznym. Jedna i druga metoda jest bardzo prosta ze względu na to, że obie składają się z czterech głównych procesów, są nimi: homogenizacja, derywatyzacja przed kolumnowa, wirowanie i analiza chromatograficzna. Najmniejsze i największe stężenie analitu, które oznaczyłam w badanym materiale biologicznym wynosiło $1,88 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}_{\text{homogenatu}}$ oraz $9,13 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}_{\text{homogenatu}}$, dzięki metodzie 1. W przypadku metody 2., najmniejsze stężenie anionów siarczkowych wyniosło $1,23 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}_{\text{homogenatu}}$, a największe ich stężenie było równe $9,15 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/ml}_{\text{homogenatu}}$.

Poniżej w Tabeli 29. zestawiałam wartości parametrów statystyki opisowej, które zostały obliczone na podstawie wyników oznaczania stężenia jonów siarczkowych w homogenacie tkanki wątroby kurzej za pomocą dwóch proponowanych procedur badawczych.

Wyniki statystyki opisowej			
Metoda z odczynnikiem derywatyzującym		L1	LN1
Liczba próbek		8	13
Średnia	} $\mu\text{mol/ml}_{\text{homogenatu}}$	$4,40 \cdot 10^{-4}$	$3,24 \cdot 10^{-4}$
Mediana		$4,46 \cdot 10^{-4}$	$2,19 \cdot 10^{-4}$
Minimum		$1,88 \cdot 10^{-4}$	$1,23 \cdot 10^{-4}$
Maksimum		$9,13 \cdot 10^{-4}$	$9,15 \cdot 10^{-4}$
Odchylenie standardowe		$2,33 \cdot 10^{-4}$	$2,37 \cdot 10^{-4}$
Skośność		1,13	1,42
Kurtoza		1,74	1,92

Tabela 29. Wyniki statystyki opisowej dla metody analitycznej z odczynnikiem derywatyzującym L1 oraz LN1

Za pomocą jednostronnego testu F (test Fishera-Snedecora) zweryfikowałam hipotezę o równości wariancji w dwóch populacjach (wyniki ilościowego oznaczania stężenia jonów siarczkowych w wątrobie kurzej za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 oraz LN1). Przyjmując poziom istotności $\alpha = 0,05$ - postawiłam hipotezę zerową H_0 (wariancje w obu populacjach są sobie równe) oraz hipotezę alternatywną H_1 (wariancje w obu populacjach nie są sobie równe). Wyniki testu F przedstawiłam w Tabeli 30.

Wyniki testu F			
Metoda z odczynnikiem derywatyzującym		L1	LN1
Średnia	} $\mu\text{mol/ml}_{\text{homogenatu}}$	$4,40 \cdot 10^{-4}$	$3,24 \cdot 10^{-4}$
Wariancja		$5,45 \cdot 10^{-8}$	$5,60 \cdot 10^{-8}$
Obserwacje		8	13
df		7	12
F		0,97	
P(F<=f) jednostronny		0,51	
Test F jednostronny		0,28	

Tabela 30. Wyniki testu F dla metody analitycznej z odczynnikiem derywatyzującym L1 oraz LN1

Wyznaczona wartość empiryczna statystyki F z Tabeli 30. wynosi 0,97. Natomiast z tablic rozkładu F dla $\alpha = 0,05$ oraz stopni swobody (df) 7 i 12, wartość krytyczna jednostronna F wynosi 2,91. Więc wartość statystyki F jest mniejsza niż wartość krytyczna jednostronna F. Dlatego nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej o równości wariancji w obu populacjach. Zatem jest spełnione założenie jednorodności wariancji w jednej i drugiej populacji. Wyniki oznaczeń jonów siarczkowych za pomocą dwóch proponowanych metod badawczych nie różnią się statystycznie istotnie.

3.7. Podsumowanie oraz wnioski

Przeprowadzone przeze mnie prace eksperymentalne skoncentrowane były na wykorzystaniu soli piryliowych do oznaczania jonów siarczkowych w wybranych matrycach biologicznych z zastosowaniem techniki HPLC/DAD. W ramach realizowanego tematu oraz postawionego celu przeprowadziłam szereg badań, których wynikiem było zoptymalizowanie warunków chromatograficznych oraz warunków przebiegu reakcji derywatywacji dla odczynników derywatyzujących L1 oraz LN1. Opracowałam również analityczne metody oznaczania badanych związków oraz przeprowadziłam walidacje opracowanych procedur, które zastosowałam do oznaczania tych związków w różnych materiałach biologicznych, takich jak: próbki ludzki mocz oraz homogenat wątroby kurzej.

Do głównych etapów zrealizowanych w części doświadczalnej w niniejszej rozprawie doktorskiej należą:

- ◆ Optymalizacja warunków chromatograficznych dla obu metod analitycznych.
- ◆ Optymalizacja warunków reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą soli piryliowych: wodorosiarczanu(VI) 2,4,6-trifenylopirylu (L1) oraz chloranu(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu (LN1).
- ◆ Walidacja metod oznaczania anionów siarczkowych za pomocą odczynnika derywatyzującego L1 i LN1 na próbkach standardów oraz próbkach z dodatkiem ludzkiego moczu i homogenatu tkanki wątroby kurzej.
- ◆ Oznaczanie stężenia jonów siarczkowych w badanym materiale biologicznym za pomocą techniki HPLC/DAD z zastosowaniem dwóch odczynników derywatyzujących L1 oraz LN1.
- ◆ Optymalizacja warunków procesu homogenizacji tkanki wątroby kurzej, w celu intensyfikacji wydajności reakcji derywatywacji badanego analitu przy pomocy związku L1 oraz LN3.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz uzyskanych wyników można stwierdzić, że:

- ◆ Sole piryliowe L1 oraz LN1 są specyficznymi odczynnikami derywatyzującymi, które z powodzeniem wykorzystałam do oznaczania jonów siarczkowych z zastosowaniem techniki HPLC/DAD.
- ◆ Pod wpływem powstania pochodnej L3 mieszanina reakcyjna zabarwia się na kolor ciemnożółty, natomiast powstaniu pochodnej LN3 towarzyszy pojawienie się ciemnoniebieskiego zabarwienia analizowanego roztworu.

- ◆ Odczynniki derywatywizujące L1 oraz LN1 reagują z badanym analitem w środowisku zasadowym buforu TRIS.
- ◆ Duży wpływ na przebieg reakcji L1 oraz LN1 z jonami siarczkowymi ma obecność acetonitrylu oraz 70% kwasu chlorowego(VII), a optymalna objętość tych związków chemicznych zapewnia wysoką wydajność reakcji derywatywizacji.
- ◆ Optymalne warunki chromatograficzne dla rozdzielania pochodnych L3 oraz LN3 od nadmiaru odczynników derywatywizujących L1 oraz LN1 z zastosowaniem techniki HPLC/DAD osiągnęłam stosując odwrócony układ faz.
- ◆ Na proces chromatograficznego rozdzielania pochodnych L3 oraz LN3 od nadmiaru odczynników derywatywizujących L1 oraz LN1 wpływa stężenie oraz pH buforu fosforanowego w fazie ruchomej.
- ◆ Niewątpliwie jedną z wielu cech dobrej analizy jest jej czas, który nie może przekroczyć 10 min. Uzyskane czasy retencji dla badanych związków nie przekraczają wymaganego czasu, i wynoszą odpowiednio: L1 - 7,3 min, L3 - 8,4 min, LN1 - 4,6 min, LN3 - 5,0 min (próbki standardów).
- ◆ Występujące zjawisko przesunięcia batochromowego (maksimum absorpcji pochodnej przesunięte w stosunku do maksimum odczynnika w kierunku fal dłuższych), umożliwia stosowanie dużych nadmiarów odczynnika derywatywizującego w stosunku do analitu, dla obu metod analitycznych.
- ◆ Prowadziłam proces homogenizacji tkanki wątroby kurzej w roztworze soli fizjologicznej oraz w niskiej temperaturze, poprzez umieszczenie falkonu z całą jego zawartością w łaźni lodowej. W wyniku czego otrzymywałam największą wydajność reakcji derywatywizacji.
- ◆ Obie pochodne we wszystkich analizowanych temperaturach, przedziałach czasowych oraz rodzajach próbek są trwałe. W związku tym mieszaniny reakcyjne mogą być przechowywane nawet przez kilka godzin w temperaturze pokojowej zanim zostaną poddane analizie chromatograficznej, bez konieczności ich wcześniejszego zamrażania.
- ◆ Opracowane metody chromatograficznego oznaczania jonów siarczkowych poddałam walidacji, a następnie z powodzeniem zastosowałam do określenia stężenia tych jonów w moczu człowieka oraz homogenacie wątroby kurzej.
- ◆ Opracowałam czułą metodę oznaczania jonów siarczkowych z wykorzystaniem odczynnika derywatywizującego LN1 oraz techniki HPLC/DAD, którą wykorzystywałam do

oznaczania niskiego stężenia tego analitu w próbkach ludzkiego moczu oraz homogenacie wątroby kurzej.

- ◆ Wyniki oznaczeń jonów siarczkowych za pomocą dwóch proponowanych metod nie różnią się statystycznie istotnie.
- ◆ Zaobserwowałam, że pozostałe składniki badanych matryc nie powodują efektów interferencyjnych.
- ◆ Stężenie jonów siarczkowych w ludzkim moczu oraz wątrobie kurzej jest cechą osobniczą, która najprawdopodobniej może zależeć od wielu czynników, u człowieka od takich jak: stosowana dieta, aktywność fizyczna, zażywane leki czy suplementy, płci, wieku, miejsca i rodzaju pracy, trybu życia, jakości wdychanego powietrza, poziomu stresu, indywidualnych predyspozycji organizmu itp. Natomiast u kury czynniki takie jak: rodzaj spożywanej paszy, wiek, sposób oraz miejsce hodowli, indywidualne predyspozycje organizmu itp., być może wpływają na zawartość tych jonów w jej wątrobie.
- ◆ Opracowane metody analityczne posiadają charakter rutynowy ze względu na sposób przygotowania mieszaniny reakcyjnej do analizy chromatograficznej oraz ilościowe oznaczenie badanego analitu.
- ◆ Analizę statystyczną przeprowadziłam za pomocą testu *t*-Studenta, testu F (przy poziomie istotności $\alpha < 0,05$) oraz statystyki opisowej. Za pomocą programu Excel uzyskałam wyniki walidacji obu metod oraz pozostałych wartości analitycznych.
- ◆ Na podstawie przeprowadzonej walidacji dla metody 1. i metody 2., można stwierdzić, że obie wykazują liniowość w zakresie stężeń odpowiednio dla każdej z nich 20-1500 nmol/l i 10-500 nmol/l.
- ◆ Opracowane metody analityczne mogą posłużyć do pomiaru stężenia siarkowodoru lub niebezpiecznych siarczków (postać jonów siarczkowych) w materiale biologicznym. W celu oceny przewlekłego narażenia, potwierdzenia szybkiej diagnozy ostrego zatrucia oraz stwierdzenia przyczyny śmierci tymi związkami chemicznymi. Stwierdzenie zgonu spowodowanego siarkowodorem wyklucza ewentualną hipoksemię (niedobór tlenu we krwi w stosunku do zapotrzebowania). Więc obie metody z powodzeniem mogą posłużyć do rutynowych ekspertyz, opiniodawstwa toksykologicznego, sądowego oraz lekarskiego, co nadaje im praktycznego charakteru.

Streszczenie

Anion siarczkowy występuje pod wieloma formami powszechnie w środowisku naturalnym, m.in. odnajdziemy go w powietrzu, wodzie, glebie, materii organicznej i skałach. Znalazł zastosowanie w wielu dziedzinach życia człowieka, na przykład produkcja kosmetyków, barwników, środków czystości, synteza kwasu siarkowego(VI) oraz wyprawianie skór. Jon ten oprócz swoich zalet posiada istotną wadę, jaką jest toksyczność (zależna od stężenia) niebezpieczna dla życia i zdrowia wszystkich organizmów żywych. Stężenie powyżej 100 mg/m³ prowadzi do porażenia nerwu węchowego, natomiast stężenie powyżej 1000 mg/m³ powoduje śmierć, dlatego jon siarczkowy jest tak ważną tematyką w chemii analitycznej. W związku z tym na przestrzeni lat opracowano i ulepszono wiele procedur opierających się na spektrofotometrii, elektrochemii, chromatografii oraz ich pokrewnych odmian pozwalających na wykrywanie i oznaczanie tego anionu.

Oznaczany analit ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne takie jak: duża tendencja do utleniania, bezbarwność oraz niska trwałość został poddany reakcji derywatywacji. Reaguje z odczynnikami derywatyżującymi: wodorosiarczanem(VI) 2,4,6-trifenylopirylu (L1) oraz chloranem(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu (LN1), są to sole piryliowe. W wyniku tego powstają pochodne L3 i LN3 o znacznie korzystniejszych właściwościach fizykochemicznych. Zmiana zabarwienia mieszanin reakcyjnych świadczy o powstaniu pożądanego pochodnego, na ciemnożółte i ciemnoniebieskie - odpowiednio dla L3 i LN3. Wyżej wspomniane sole piryliowe w zoptymalizowanych warunkach reakcji derywatywacji są selektywne względem anionu siarczkowego. Opisywana reakcja derywatywacji przebiega dwuetapowo, w pierwszym etapie powstaje produkt pośredni. W celu jego cyklizacji i aromatyzacji należało dobrać odpowiedni kwas oraz jego objętość.

Na podstawie tych informacji opracowano dwie metody analityczne pozwalające na oznaczenie badanego analitu w wybranych matrycach biologicznych (ludzki mocz i wątroba kurza) za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z detektorem UV/VIS z matrycą fotodiodową. W tym celu dobrano odpowiednie długości fal dla związku chemicznego L1, L3, LN1 i LN3, zoptymalizowano warunki chromatograficzne, warunki reakcji derywatywacji, warunki procesu homogenizacji w przypadku badań nad tkanką wątroby kurzej, przeprowadzono walidację na próbkach standardów i próbkach z materiałem biologicznym oraz oznaczono analizowany analit w ludzkim moczu oraz wątrobie kurzej. Opracowane metody są czułe, na co dowodem są otrzymane wartości granicy wykrywalności (metoda 2. odznacza się niższą czułością niż metoda 1). Ponadto metody charakteryzuje także, powtarzalność oraz precyzja, co potwierdzają statystycznie opracowane wyniki. Wartości analizowanych parametrów walidacyjnych były analogiczne z wymogami normy PN-EN

ISO/IEC 17025:2018-02 oraz wytycznymi organizacji ICH. Stworzone procedury analityczne charakteryzują się również rutynowością, ze względu na sposób przygotowania mieszaniny reakcyjnej do badań chromatograficznych oraz ilościowe oznaczenie badanego analitu. Ze względu na ich czułość, można z powodzeniem wykorzystywać je do określenia niskiego stężenia oznaczanego analitu w badanych matrycach biologicznych, a ich pozostałe składniki nie powodują interferencji matrycowych. Potencjałem obu metod jest ich aspekt praktyczny, z powodzeniem znajdują praktyczne zastosowanie w rutynowych ekspertyzach, opiniodawstwie sądowym, toksykologicznym oraz lekarskim.

Stężenie anionów siarczkowych w ludzkim moczu oraz wątrobie kurzej jest zdecydowanie cechą indywidualną, która najprawdopodobniej zależy od wielu czynników, u człowieka od stosowanej diety, aktywności fizycznej, zażywanych leków czy suplementów, płci, wieku, miejsca i rodzaju pracy, trybu życia, jakości wdychanego powietrza, stanu zdrowia organizmu indywidualnych predyspozycji organizmu itp. Natomiast u kury od rodzaju spożywanej paszy, wieku, sposobu oraz miejsca hodowli, indywidualnych predyspozycje organizmu oraz od jego stanu zdrowia itp.

Abstract

Sulfide anion occurs in many forms commonly in the natural environment. We find it in air, water, soil, organic matter and rocks. It is used in many areas of human life, for example, the production of cosmetics, dyes, cleaning agents, synthesis of sulfuric(VI) acid and leather dressing. This ion, apart from its advantages, has a significant disadvantage, which is toxicity (depending on concentration) dangerous to the life and health of all living organisms. The concentration above 100 mg/m³ leads to paralysis of the olfactory nerve, while the concentration above 1000 g/m³ causes death, which is why the sulfide ion is such an important topic in analytical chemistry. Therefore, over the years, many procedures have been developed and improved based on spectrophotometry, electrochemistry, chromatography and their related variations allowing the detection and determination of this anion.

The analyzed analyte, due to its physicochemical properties, such as: high tendency to oxidation, colorlessness and low stability, was subjected to a derivatization reaction. It reacts with derivatizing reagents: 2,4,6-triphenylpyrylium hydrogensulfate(VI) (L1) and 4-[*p*-(*N,N*-dimethylamino)phenyl]-2,6-diphenylpyrylium chlorate(VII) (LN1). As a result, L3 and LN3 derivatives with more favorable physicochemical properties were formed. The color change of the reaction mixtures indicated the formation of the desired derivatives to dark yellow and dark blue for L3 and LN3, respectively. The aforementioned pyrylium salts are selective for the sulfide anion under the optimized derivatization reaction conditions discussed above. The described derivatization reaction takes place in two stages, in the first stage an intermediate product is formed. In order to cyclize and aromatize it, the appropriate acid and its volume had to be selected.

Based on this information, two methods of analysis and analysis were developed for the determination of the analyte under study in selected male matrices (human urine and chicken liver) using the technique of high-performance liquid chromatography when switched on with a UV/VIS detector with a photodiode array. For this purpose, the appropriate wavelengths were selected for the chemical compound L1, L3, LN1 and LN3, the chromatographic conditions, the conditions of the derivatization reaction, the conditions of the homogenization process in the case of studies on chicken liver tissue were optimized, validation was carried out on standard samples and samples with biological material, and the analyzed analyte in human urine and chicken liver. The developed methods are sensitive, as evidenced by the values of the limit of detection obtained (method 2. is less sensitive than method 1.). In addition, the methods are also characterized by repeatability and precision, which is confirmed by statistically developed results. The values of the analyzed validation parameters were analogous to the requirements

of the PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 standard and the guidelines of the ICH organization. The analytical procedures developed are also routine, due to the method of preparing the reaction mixture for chromatographic tests and the quantitative determination of the analyte being tested. Due to their sensitivity, they can be successfully used to determine the low concentration of the analyte in the tested biological matrices, and their other components do not cause matrix interference. The potential of both methods lies in their practical aspect, they will successfully find practical application in routine expert opinions, forensic, toxicological and medical opinions.

The concentration of sulfide anions in human urine and chicken liver is definitely an individual feature, which most likely depends on many factors, in humans on the diet, physical activity, medications or supplements taken, sex, age, place and type of work, lifestyle, quality of inhaled air, the state of health of the organism, individual predispositions of the organism. In a liver, however, on the type of feed, age, method and place of breeding, individual predispositions of the organism and its health condition.

Wykaz skrótów

- ◆ C_m - stężenie molowe
- ◆ HPLC/DAD - wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem UV/VIS z matrycą fotodiodową
- ◆ L1 - wodorosiarczan(VI) 2,4,6-trifenylopirylu
- ◆ L2 - produkt pośredni reakcji związku chemicznego L1 z anionem siarczkowym
- ◆ L3 - wodorosiarczan(VI) 2,4,6-trifenylopirylu
- ◆ LN1 - chloran(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu
- ◆ LN2 - produkt pośredni reakcji związku chemicznego LN1 z anionem siarczkowym
- ◆ LN3 - chloran(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu
- ◆ TLC - chromatografia cienkowarstwowa
- ◆ TRIS - tris(hydroksymetylo)aminometan
- ◆ MALDI/MS - laserowa desorpcja i jonizacja próbki wspomaganą matrycą połączoną ze spektrometrią masową
- ◆ FLD - detektor fluorescencyjny
- ◆ CD - detektor konduktometryczny z supresją jonów
- ◆ LC-MS - detektor tandemowy spektrometrii mas
- ◆ RID - detektor refraktometryczny
- ◆ FTIR - detektor radiometryczny
- ◆ NMR - detektor polarymetryczny
- ◆ H_2S - kwas siarkowodorowy
- ◆ HS^- - anion wodorosiarczkowy
- ◆ S^{2-} - anion siarczkowy
- ◆ ASA - aspiryna
- ◆ ACS-14 - pochodna aspiryny czyli ester kwasu 2-acetyloksybenzenowego 4-(3-tioakso-3*H*-1,2-ditiol-5-yl)fenylu
- ◆ ATB-346 - pochodna naproksenu czyli ester kwasu 2-(6-metoksynaftaleno-2-yl)propanowego 4-tiokarbamoylfenylu
- ◆ ACS-48 - pochodna lewodopaminy czyli kwas 4-(3-tioakso-3*H*-1,2-ditiol-4-yl)benzenowy
- ◆ ACS-50 - pochodna lewodopaminy czyli kwas [2-metoksy-4-(3-tioakso-3*H*-1,2-ditiol-5-yl)-fenoksy]octowy
- ◆ ACS-5 - pochodna lewodopaminy czyli kwas 1,3-ditiole-2-tioakso-4-karboksyłowy
- ◆ ACS-81 - pochodna lewodopaminy czyli kwas 3-(prop-2-en-1-yl)disulfanylpropanowy
- ◆ ATB-429 - pochodna mesalazyny czyli ester kwasu 5-amino-2-hydroksybenzoesowego 4-(5-tioakso-5*H*-[1,2]ditiol-3yl)-fenylu
- ◆ GYY4137 - pochodna morfoliny czyli fosforoditionian morfolino-4-ium-4-metoksyfenylu(morfolina).
- ◆ CBS - β -syntaza cystationinowa
- ◆ CSE - γ -liaza cystationinowa
- ◆ 3MST - transferaza siarkowa 3-merkaptopirogranianu
- ◆ CAT - aminotransferaza cysteinowa
- ◆ GSH - zredukowany glutation
- ◆ TST - siarkotransferaza tiosiarczanowa (rodanaza)

- ◆ ppb - specjalna jednostka w analizie śladowej do wyrażania stężeń składników danej substancji w roztworze, liczba cząstek na miliard (10^{-9})
- ◆ ^a - związek chemiczny zsyntezowany i zidentyfikowany w Katedrze Chemii Organicznej i Stosowanej Uniwersytetu Łódzkiego
- ◆ ^b - świeża woda dejonizowana i odgazowana za pomocą myjki ultradźwiękowej

Skróty używane w ocenie statystycznej wyników:

- ◆ \bar{x} - średnia arytmetyczna
- ◆ n - liczba pomiarów
- ◆ s - odchylenie standardowe
- ◆ t - rozkład *t*-Studenta dla $\alpha = 95\%$
- ◆ SD - odchylenie standardowe
- ◆ RSD - precyzja metody określona względem odchylenia standardowego
- ◆ LOD - granica wykrywalności
- ◆ LOQ - granica oznaczalności
- ◆ df - stopień swobody
- ◆ α - poziom istotności

Bibliografia

- [1] M.A. Miranda, H. García, *2,4,6-Triphenylpyrylium Tetrafluoroborate as an Electron-Transfer Photosensitizer*, Chemical Reviews 94 (1994) 1063-1089.
- [2] C. Arcoumanis, J.J. McGuirk, J.M.L.M. Palma, *On the use of fluorescent dyes for concentration measurements in water flows*, Experiments in Fluids 10 (1990) 177-180.
- [3] F.J. Duarte, L.W. Hillman, *Dye Laser Principles With Applications*, Academic, New York (1990).
- [4] A. Beltrán, M.I. Burguete, D.R. Abánades, D. Pérez-Sala, S.V. Luis, F. Galindo, *Turn-on fluorescent probes for nitric oxide sensing based on the ortho-hydroxyamino structure showing no interference with dehydroascorbic acid*, Chemical Communications 50 (2014) 3579-3581.
- [5] B.A. Rao, J.Y. Lee, Y. Son, *Synthesis of a novel pyrylium salt with chemoselectivity to a cyanide anion*, Supramolecular Chemistry 27 (2015) 191-200.
- [6] M. Shariatgorji, A. Nilsson, P. Källback, O. Karlsson, X. Zhang, P. Svenningsson, P.E. Andren, *Pyrylium Salts as Reactive Matrices for MALDI-MS Imaging of Biologically Active Primary Amines*, Journal of the American Society for Mass Spectrometry 26 (2015) 934-939.
- [7] T. Fossen, L. Cabrita, O.M. Andersen, *Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region*, Food Chemistry 63 (1998) 435-440.
- [8] G.A. Sawada, T.J. Raub, J.W. Higgins, N.K. Brennan, T.M. Moore, G. Tomblin, M.R. Detty, *Chalcogenopyrylium dyes as inhibitors/modulators of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells*, Bioorganic and Medicinal Chemistry 16 (2008) 9745-9756.
- [9] T. Okamoto, N. Yamamoto, M. Kawaguchi, *Pharmaceutical compositions containing pyrylium compounds, pyrylium salts and process for manufacturing a medicament containing the aforesaid compounds*, (2000) 1-29.
- [10] J.A. Soroka, Praca doktorska, Politechnika Szczecińska (1981).
- [11] A.T. Balaban, *Aromaticity of Six-Membered Rings with One Heteroatom*, Topics in Heterocyclic Chemistry 19 (2009) 213-218.
- [12] A. Mouradzadegan, F. Abadast, *An Innovative and Atom-Efficient Synthesis of Bioactive 2-Aroylfuran Derivatives Using Macroporous Polymer-Supported Cyanide*, Synlett 25 (2014) 448-452.
- [13] A.R. Katritzky, C.A. Ramsden, J. Joule, V. Zhdankin, *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, Wyd. 3., Elsevier, Amsterdam (2010).
- [14] A.T. Balaban, W. Schroth, G. Fischer, *Pyrylium Salts Part I. Syntheses*, Advances in Heterocyclic Chemistry 10 (1969) 241-326.
- [15] A. Dinculescu, T. S. Balaban, Cristina Popescu, D. Toader, A. T. Balaban, *Synthesis of Pyrylium Salts with Various Anions*, Bulletin des Sociétés Chimiques Belges 100 (1991) 665-672.
- [16] Q. Michaudel, T. Chauvire, V. Kottisch, M.J. Supej, K.J. Stawiasz, L.X. Shen, W.R. Zipfel, H.D. Abruna, J.H. Freed, B.P. Fors, *Mechanistic Insight into the Photocontrolled Cationic Polymerization of Vinyl Ethers*, Journal of the American Chemical Society 139 (2017) 15530-15538.

- [17] L.M.M. Pascual, D.G. Dunford, A.E. Goetz, K.A. Ogawa, A.J. Boydston, *Comparison of Pyrylium and Thiopyrylium Photooxidants in Metal-Free Ring-Opening Metathesis Polymerization*, Synlett 27 (2016) 759–762.
- [18] Y. Li, H. Wang, X. Li, *Over one century after discovery: pyrylium salt chemistry emerging as a powerful approach for the construction of complex macrocycles and metallo-supramolecules*, Chemical Science 11 (2020) 12249-12268.
- [19] A. Günther, J.A. Soroka, *The main synthesis of pyrylium salts*, Wiadomości chemiczne 71 (2017) 1-2.
- [20] V. Calabrese, C. Cornelius, A.T. Dinkova-Kostova, E.J. Calabrese, M.P. Mattson, *Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders*, Antioxidants and Redox Signaling 13 (2010) 1763-1811.
- [21] E. Łowicka, J. Bełtowski, *Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists*, Pharmacological Reports 59 (2007) 4-24.
- [22] J. Stetkiewicz, *Siarkowodór. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego*, Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 4 (2011) 97-117.
- [23] O. Kabil, R. Baneryce, *Redox biochemistry of hydrogen sulfide*, Journal of Biological Chemistry 285 (2010) 21903-21907.
- [24] T. Lipiec, *Półmikroanaliza jakościowa bez użycia gazowego H₂S i jego soli*, PZWL, Warszawa (1954).
- [25] E. Gomółka, A. Szaynok, *Chemia wody i powietrza*, Oficyna Wydawnictwa Politechniki Wrocławskiej, Wrocław (1997).
- [26] P. O'Neill, *Chemia środowiska*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (1997).
- [27] L. Ferrer, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, *Analytical methodologies for reliable sulfide determinations in aqueous matrices exploiting flow-based approaches*, Trends in Analytical Chemistry 26 (2007) 413-422.
- [28] Z. Małecki, *Koncepcja rekultywacji zbiornika retencyjnego pokrzywnica k. Kalisza*, Inżynieria Ekologiczna 19 (2007) 113-122.
- [29] N.S. Lawrence, J. Davis, R.G. Compton, *Analytical strategies for the detection of sulfide: a review.*, Talanta 52 (2000) 771-784.
- [30] A.C. Aplin, M.L. Coleman, *Sour gas and water chemistry of the Bridport Sands reservoir, Wytch Farm, UK*, Geological Society 86 (1995) 303-314.
- [31] W.L. Orr, J.S. Sinninghe Damsté, *Geochemistry of Sulfur in Petroleum Systems*, American Chemical Society 429 (1990) 2-29.
- [32] A. Albitser, *Sulfide Stress Cracking Assessment of Carbon Steel Welding with High Content of H₂S and CO₂ at High Temperature: A Case Study*, Scientific Research Publishing 12 (2020) 863-885.

- [33] M. Whiteman, P.K. Moore, *Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability?*, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13 (2009) 2684-2692.
- [34] W. Sand, *Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates. A general mechanistic overview*, *International Biodeterioration and Biodegradation* 40 (1997) 183-190.
- [35] J. Rodríguez-Fernández, J.M. Costa, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Simple detector for oral malodour based on spectrofluorimetric measurements of hydrogen sulphide in mouth air*, *Analytica Chimica Acta* 398 (1999) 23-31.
- [36] J. Bełtowski, *Siarkowodór jako biologicznie aktywny mediator w układzie krążenia*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 58 (2004) 285–291.
- [37] H. Savolainen, *Dihydrogensulfid*, Nordiska expertgruppen för gränsvärdes dokumentation. *Arbete och Hälsa* 31 (1982) 1-27.
- [38] J. Stetkiewicz, *Siarkowodór*, *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 4 (2011) 97-117.
- [39] B. Frydrych, *Wybrane związki nieorganiczne*, [W:] *Podstawy toksykologii*. J. Piotrkowski (red.). Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa (2008).
- [40] J.L. Wallace, *Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs*, *Trends in Pharmacological Sciences* 28 (2007) 501-505.
- [41] A. Sparatore, E. Perrino, V. Tazzari, D. Giustarini, R. Rossi, G. Rossoni, K. Erdman, H. Schröder, P. Soldato, *Pharmacological profile of a novel H₂S-releasing aspiryn*, *Free Radical Biology and Medicine* 46 (2009) 586-592.
- [42] J.L. Wallace, G. Caliendo, V. Santagada, G. Cirino, *Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346)*, *British Journal of Pharmacology* 159 (2010) 1236-1246.
- [43] M. Lee, V. Tazzari, D. Giustarini, R. Rossi, A. Sparatore, P. Soldato, E. Mcgeer, P.L. Mcgeer, *Effects of hydrogen sulfide-releasing L-DOPA derivatives on glial activation*, *Journal of Biological Chemistry* 23 (2010) 17318-17328.
- [44] E. Distrutti, L. Sediari, A. Mencarelli, B. Renga, S. Orlandi, G. Russo, G. Caliendo, V. Santagada, G. Cirino, J.L. Wallace, S. Fiorucci, *5-Amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-[1,2]dithiol-3yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319 (2006) 447-458.
- [45] S. Fiorucci, S. Orlandi, A. Mencarelli, G. Caliendo, V. Santagada, E. Distrutti, L. Santucci, G. Cirino, J.L. Wallace, *Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis*, *British Journal of Pharmacology* 150 (2007) 996-1002.

- [46] L. Li, M. Salto-Tellez, C.H. Tan, M. Whiteman, P.K. Moore, *GY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat*, Free Radical Biology and Medicine 47 (2009) 103-113.
- [47] B. Olas, *Hydrogen sulfide in hemostasis: friend or foe?*, Chemico-Biological Interactions 217 (2014) 49-56.
- [48] J. Tadeusiewicz, A. Krysztofiak, B. Olas, *Czosnek - panaceum na choroby układu krążenia?*, Kosmos 63 (2014) 37-44.
- [49] N. Shibuya, S. Koike, M. Tanaka, M. Ishigam-Yuasa, Y. Kimura, Y. Ogasawara, K. Funkui, N. Nagahara, H. Kimura, *A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells*, Nature Communications 4 (2013) 1366.
- [50] J. Bełtowski, *Siarkowodor jako biologicznie aktywny mediator w układzie krążenia*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 58 (2004) 285-291.
- [51] M. Ufnal, T. Żera, *Rola tlenu azotu, siarkowodoru oraz tlenu węgla w regulacji układu krążenia i ich potencjał farmakoterapeutyczny*, Kardiologia Polska 5 (2010) 436-440.
- [52] K. Tanizawa, *Production of H₂S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase*, Journal of Biochemistry 149 (2011) 357-359.
- [53] J. Tadeusiewicz, B. Olas, *Siarkowodor - gaz nie tylko o właściwościach toksycznych*, Kosmos 63 (2014) 125-135.
- [54] J. Tadeusiewicz, B. Olas, *Tlenek azotu i tlenek węgla – dwa ważne gazotransmitery*, Kosmos 63 (2014) 543-554.
- [55] E. Edry, D. Melamed, *Class switch recombination: a friend and a foe*, Clinical Immunology 123 (2007) 244-251.
- [56] Z. Jin, H. Chan, J. Ning, K. Lu, D. Ma, *The role of hydrogen sulfide in pathologies of the vital organs and its clinical application*, Journal of Physiology and Pharmacology 66 (2015) 169-179.
- [57] Y. Zhang, Z.H. Tang, Z. Ren, S.L. Qu, M.H. Liu, L.S. Liu, Z.S. Jiang, *Hydrogen sulfide, the next potent preventive and therapeutic agent in aging and age-associated diseases*, Molecular and Cellular Biology 33 (2013) 1104-1113.
- [58] B.W. Perridon, H.G.D. Leuvenink, J.L. Hillebrands, H. van Goor, E.M. Bos, *The role of hydrogen sulfide in aging and age-related pathologies*, Aging 8 (2016) 264-289.
- [59] L. Rajchel, *The occurrences of sulphurous waters in the polish carpathians*, Geologica Carpathica 53 (2002) 1-6.
- [60] https://www.malinowehotele.pl/malinowyzdroj/pl/page,medical_spa_swietokrzyskie_balneologia_sanatorium,48,.html (dostępność z dnia 25.10.2022 rok).
- [61] M. Korczak, J. Owczarek, *Właściwości lecznicze wód siarczkowych*, Acta Balneologica 56 (2014) 106-108.
- [62] <https://wprawiamywruch.mdh.pl/kategoria-zdrowie/kapiele-siarczkowe-dlaczego-warto> (dostępność z dnia 24.10.2022 rok).

- [63] J. Malinowska, K. Babicz, B. Olas, *Biologiczna aktywność siarkowodoru*, Wiadomości chemiczne 65 (2011) 289-299.
- [64] G. Yang, *Hydrogen sulfide in cell survival: a double-edged sword*, Expert Review of Clinical Pharmacology 4 (2011) 33-47.
- [65] B.L. Predmore, D.J. Lefer, G. Gojon, *Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine, Antioxidants and Redox Signaling* 17 (2012) 119-140.
- [66] European Union. Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL), *Hydrogen Sulphide - Occupational Exposure Limits and Biological Limit Values* (2007).
- [67] *Emergency and Continuous Exposure Guidance Levels for Selected Submarine Contaminants*, Committee on Emergency and Continuous Exposure Guidance Levels for Selected Submarine Contaminants, Committee on Toxicology, National Research Council, tom III (2009).
- [68] ATSDR, *Toxicological Profile for Hydrogen Sulfide and Carbonyl Sulfide* (2016).
- [69] M.G. Costigan, *Hydrogen sulfide: UK occupational exposure limits*, Occupational and Environmental Medicine 60 (2003) 308-312.
- [70] K.A. Brenneman, D.F. Meleason, M. Sar, M.W. Marshall, R.A. James, E.A. Gross, J.T. Martin, D.C. Dorman, *Olfactory mucosal necrosis in male CD rats following acute inhalation exposure to hydrogen sulfide: reversibility and the possible role of regional metabolism*, Toxicologic Pathology 30 (2002) 200-208.
- [71] *EH40/2005 Workplace Exposure Limits*, Health and Safety Executive (2005).
- [72] D.C. Dorman, K.A. Brenneman, M.F. Struve, K.L. Miller, R.A. James, M.W. Marshall, P.M. Foster, *Fertility and developmental neurotoxicity effects of inhaled hydrogen sulfide in Sprague-Dawley rats*, Neurotoxicology and Teratology 22 (2000) 71-84.
- [73] R.S. Hannah, S.H. Roth, *Chronic exposure to low concentrations of hydrogen sulfide produces abnormal growth in developing cerebellar Purkinje cells*, Neuroscience Letters 122 (1991) 225-228.
- [74] B. Skrajny, R.S. Hannah, S.H. Roth, *Low concentrations of hydrogen sulphide alter monoamine levels in the developing rat central nervous system*, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 70 (1992) 1515-1518.
- [75] R.S. Hannah, L.J. Hayden, S.H. Roth, *Hydrogen sulfide exposure alters the amino acid content in developing rat CNS*, Neuroscience Letters 99 (1989) 323-327.
- [76] <https://pl.lamscience.com/uses-hydrogen-sulfide> (dostępność z dnia 27.10.2022 rok).
- [77] W. Wardencki, *Problems with the determination of environmental sulphur compounds by gas chromatography*, Journal of Chromatography A 793 (1998) 1-19.
- [78] D.E. Williams, *Semiconducting oxides as gas-sensitive resistors*, Sensors and Actuators B: Chemical 57 (1999) 1-3.
- [79] N. Batina, I. Ciglencečki, B. Ćosović, *Determination of elemental sulphur, sulphide and their mixtures in electrolyte solutions by a.c. voltammetry*, Analytica Chimica Acta 267 (1992) 157-164.

- [80] A. Lopez-Moliner, R. Batlle, A. Villareal, J.R. Castillo, *Sulphate determination after its reduction to hydrogen sulphide and volatile separation by molecular absorption spectrometry*, *Talanta* 43 (1996) 1565-1572.
- [81] J. Wall, B. Chiswell, B. Hamilton, C. Dieckmann, K. O'Halloran, *Analysis for sulfur as hydrogen sulfide incorporating zirconia pretreatment and preconcentration*, *Talanta* 45 (1997) 85-90.
- [82] M. García-Calzada, G. Marbán, A.B. Fuertes, *Potentiometric determination of sulphur in solid samples with a sulphide selective electrode*, *Analytica Chimica Acta* 380 (1999) 39-45.
- [83] W. Puacz, W. Szahun, K. Linke, *Determination of sulphide in blood*, *Analyst* 120 (1995) 939-943.
- [84] Y. Ogasawara, K. Ishii, T. Togawa, S. Tanabe, *Determination of trace amounts of sulphide in human red blood cells by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection after derivatization with p-phenylenediamine and iron(III)*, *Analyst* 116 (1991) 1359-1363.
- [85] T. Ramstad, A.H. Bates, T.J. Yellig, S.J. Borchert, K.A. Mills, *Analysis of hydrogen sulfide gas from a pharmaceutical drug formulation by cryofocused headspace gas chromatography*, *Analyst* 120 (1995) 2775-2780.
- [86] M. Okumura, N. Yano, K. Fujinaga, Y. Seike, S. Matsuo, *In situ preconcentration method for trace dissolved sulfide in environmental water samples using solid-phase extraction followed by spectrophotometric determination*, *Analytical Sciences* 15 (1999) 427-431.
- [87] B. Divjak, W. Goessler, *Ion chromatographic separation of sulfur-containing inorganic anions with an ICP-MS as element-specific detector*, *Journal of Chromatography A* 844 (1999) 161-169.
- [88] F. Hissner, J. Mattusch, K. Heinig, *Quantitative determination of sulfur-containing anions in complex matrices with capillary electrophoresis and conductivity detection*, *Journal of Chromatography A* 848 (1999) 503-513.
- [89] G. Schiavon, G. Zotti, R. Toniolo, G. Bontempelli, *Electrochemical Detection of Trace Hydrogen Sulfide in Gaseous Samples by Porous Silver Electrodes Supported on Ion-Exchange Membranes (Solid Polymer Electrolytes)*, *Analytical Chemistry* 67 (1995) 318-323.
- [90] N.S. Lawrence, J. Davis, R.G. Compton, *Analytical strategies for the detection of sulfide: a review*, *Talanta* 52 (2000) 771-784.
- [91] N.S. Lawrence, J. Davis, L. Jiang, T.G.J. Jones, S.N. Davies, R.G. Compton, *The electrochemical analog of the methylene blue reaction: A novel amperometric approach to the detection of hydrogen sulfide*, *Electroanalysis* 12 (2000) 1453-1460.
- [92] PN-C-04566-03:1974, Woda i ścieki - Badania zawartości siarki i jej związków - Oznaczanie siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych - Metoda jodometryczna.
- [93] PN-C-04566-05:1981, Woda i ścieki - Badania zawartości siarki i jej związków - Oznaczanie sumy siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych z użyciem elektrody jonoselektywnej.
- [94] PN-C-04566-03:1982, Woda i ścieki - Badania zawartości siarki i jej związków - Oznaczanie siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych metodą tiomerkurymetryczną.

- [95] PN-C-04566-02:1982, Woda i ścieki - Badania zawartości siarki i jej związków - Oznaczanie siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych metodą kolorymetryczną z tiofluoresceiną i kwasem o-hydroksyrtęciobenzoesowym.
- [96] PN-C-04566-02:1974, Woda i ścieki - Badania zawartości siarki i jej związków - Oznaczanie siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych - Metoda kolorymetryczna.
- [97] PN-C-04566-13:1985, Woda i ścieki - Badanie zawartości siarki i jej związków - Oznaczanie siarkowodoru i siarczków rozpuszczalnych metodą merkurymetryczną ze wstępnym zagęszczaniem w postaci siarczku tributyllocynowego.
- [98] E. Fischer, *Bildung von Methylenblau als Reaktion auf Schwefelwasserstoff*, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 16 (1883) 2234-2236.
- [99] M.F. Mousavi, N. Sarlack, *Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Sulfide Ion Based on Its Catalytic Reduction Reaction with Methylene Blue in the Presence of Te(IV)*, Analytical Letters, 30 (1997) 1567-1578.
- [100] R.D. Kane, R.J. Horvath, M.S. Cayard, *Wet H₂S Cracking of Carbon Steels and Weldments*, NACE International, Houston (1996).
- [101] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements 2nd Edition*, Butterworth-Heinemann, Wielka Brytania (1997).
- [102] C. Gru, H. Legoff, S. Narcon, P.M. Sarradin, J.C. Caprais, F.H. Lallier, *Determination of reduced sulfur compounds by high-performance liquid chromatography in hydrothermal seawater and body fluids from Riftia pachyptila*, Analyst 123 (1998) 1289-1293.
- [103] T. Togawa, M. Ogawa, M. Nawata, Y. Ogasawara, K. Kawanabe, S. Tanabe, *High Performance Liquid Chromatographic Determination of Bound Sulfide and Sulfite and Thiosulfate at Their Low Levels in Human Serum by Pre-column Fluorescence Derivatization with Monobromobimane*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin 40 (1992) 3000-3004.
- [104] J. Raba, M.A. Mallea, S. Quintar, V.A. Cortinez, *Determination of sulfide with chloranilic acid by biamperometric and automatic potentiometric end-point detection with a lead chloranilate selective electrode*, Talanta 39 (1992) 1007-1011.
- [105] L. Chen, S. Ingrid, Y.G. Ding, Y. Liu, J.G. Qi, C.S. Tang, J.B. Du, *Imbalance of endogenous homocysteine and hydrogen sulfide metabolic pathway in essential hypertensive children*, Chinese Medical Journal 120 (2007) 389-393.
- [106] L. Chang, B. Geng, F. Yu, J. Zhao, H. Jiang, J. Du, C. Tang, *Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats*, Amino Acids 34 (2008) 573-585.
- [107] J.E. Doeller, T.S. Isbell, G. Benavides, J. Koenitzer, H. Patel, R.P. Patel, J.R. Lancaster, V.M. Darley-Usmar, D.W. Kraus, *Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues*, Analytical Biochemistry 341 (2005) 40-51.
- [108] N.L. Whitfield, E.L. Kreimier, F.C. Verdial, N. Skovgaard, K.R. Olson, *Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling*, American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 294 (2008) 1930-1937.
- [109] T. Ubuka, *Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissue*, Journal of Chromatography B 781 (2002) 227-249.

- [110] Ź. Rembisz, D. Bzdurska, J. Obiedzińska, R. Martínez-Máñez, R. Zakrzewski, *A derivatization approach using pyrylium salts for the sensitive and simple determination of sulfide in spring water by high performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 1407 (2015) 184-192.
- [111] J. Font, J. Gutiérrez, J. Lalueza, X. Pérez, *Determination of sulfide in the leather industry by capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A 740 (1996) 125-132.
- [112] C. J. Richardson, E.A. Magee, J.H. Cummings, *A new method for the determination of sulphide in gastrointestinal contents and whole blood by microdistillation and ion chromatography*, Clinica Chimica Acta 293 (2000) 115-125.
- [113] T. Ubuka, T. Abe, R. Kajikawa, K. Morino, *Determination of hydrogen sulfide and acid-labile sulfur in animal tissues by gas chromatography and ion chromatography*, Journal of Chromatography B 757 (2001) 31-37.
- [114] T. Mitsui, L.M. Edmond, E.A. Magee, J.H. Cummings, *The effects of bismuth, iron, zinc and nitrate on free sulfide in batch cultures seeded with fecal flora*, Clinica Chimica Acta 335 (2003) 131-135.
- [115] M.D. Levitt, J. Furne, J. Springfield, F. Suarez, E. Demaster, *Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa*, Journal of Clinical Investigation 104 (1999) 1107-1114.
- [116] J. Furne, A. Saeed, M.D. Levitt, *Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values*, American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 295 (2008) 1479-1485.
- [117] Y. Hoshika, Y. Iida, *Gas chromatographic determination of sulphur compounds in town gas*, Journal of Chromatography A 134 (1977) 423-432.
- [118] K. Eto, T. Asada, K. Arima, T. Makifuchi, H. Kimura, *Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease*, Biochemical and Biophysical Research Communications 293 (2002) 1485-1488.
- [119] D.R. Salomon, J. Romano, *Applications of capillary ion electrophoresis in the pulp and paper industry*, Journal of Chromatography A 602 (1992) 219-225.
- [120] M. H. Hashmi, N. A. Chughtai, I. Ahmad, A. U. Afzal, *Semiquantitative determination of thiourea, thiocyanate, and sulfide by circular thin layer chromatography*, Microchimica Acta 58 (1970) 254-257.
- [121] R. Zakrzewski, W. Ciesielski, A. Ulanowska, R. Martínez-Máñez, *2,4,6-Triphenylpyrylium cations as derivatization reagents for sulfide ions detection in TLC, Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 184 (2009) 1139-1148.
- [122] D. Jiménez, R. Martínez- Máñez, F. Sancenón, J.V. Ros-Lis, A. Benito, J. Soto, *A new chromo-chemodosimeter selective for sulfide anion*, Journal of the American Chemical Society 125 (2003) 9000-9001.
- [123] Ź. Rembisz, R. Zakrzewski, W. Ciesielski, M. Skowron, R. Martínez-Máñez, *Thin-layer chromatographic image analysis for the determination of sulfide ions using pyrylium cations*, Journal of Planar Chromatography - Modern TLC 27 (2014) 240-244.

- [124] W. Ciesielski, K. Dyńska-Kukulka, R. Zakrzewski, A. Hekner, *Analysis of sulfide ions by densitometric thin-layer chromatography and use of TLSee software*, Journal of Planar Chromatography - Modern TLC 23 (2010) 343-347.
- [125] Ź. Rembisz, D. Bzdurska, J. Obiedzińska, R. Martínez-Mánez, R. Zakrzewski, *A derivatization approach using pyrylium salts for the sensitive and simple determination of sulfide in spring water by high performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 1407 (2015) 184-192.
- [126] G. Chwatko, *Oznaczanie siarkowodoru w próbkach biologicznych*, Wiadomości chemiczne 64 (2010) 243-262.
- [127] D. Jiménez, R. Martínez-Mánez, F. Sancenón, J.V. Ros-Lis, A. Benito, J. Soto, *A new chromo-chemodosimeter selective for sulfide anion*, Journal of the American Chemical Society 125 (2003) 9000-9001.
- [128] A. Mouradzadegun, F. Abadast, *Expeditious Synthesis of Aromatic Cyanodienones Using Neutral Alumina as a Versatile Heterogeneous Catalyst*, An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry 44 (2014) 640-647.
- [129] J. Minczewski, Z. Marczenko, *Chemia analityczna. T.2. Chemiczne metody analizy ilościowej*. Wyd. 10., PWN, Warszawa (2011).
- [130] Z.S. Szmal, T. Lipiec, *Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej*, Wyd. 7. poprawione i unowocześnione, PZWL, Warszawa (1996).
- [131] K. Kuśmierk, R. Głowacki, E. Bald, *Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 385 (2006) 855-860.
- [132] L.R. Snyder, J.W. Dolan, D.C. Lommen, *Drylab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development: I. Isocratic elution*, Journal of Chromatography A 485 (1989) 65-89.
- [133] J.W. Dolan, D.C. Lommen, L.R. Snyder, *Drylab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development: II. Gradient Elution*, Journal of Chromatography A 485 (1989) 91-112.
- [134] R. Zakrzewski, W. Ciesielski, A. Ulanowska, R. Martínez Mánez, *2,4,6-Triphenylpyrylium cations as derivatization reagents for sulfide ions detection in TLC, Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 184 (2009) 1139-1148.
- [135] PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02, *Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących*.
- [136] ICH Q2(R1) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*.
- [137] K. Tsuge, M. Kataoka, Y. Seto, *Stability of Sulfide and Thiosulfate in Blood and Urine during 4°C Storage*, Japanese Journal of Science and Technology for Identification 4 (2000) 83-90.
- [138] M.J. Krawczyk, A. Kamińska, G. Chwatko, *Homogenizacja tkanek nieodzowny etap przygotowania próbki stałej do analizy*, Analityka: Nauka i Praktyka 2 (2017) 42-27.