



Szymon Dziomba

**Mechanizmy łączonych metod wzbogacania analitów w
kapilarze przy użyciu wysokosprawnych
technik elektromigracyjnych**

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny

Gdański Uniwersytet Medyczny

Promotor rozprawy:

dr hab. Piotr Kowalski

Gdańsk 2014

Spis treści

Streszczenie.....	5
Summary	7
Spis użytych akronimów	9
I. Wstęp	11
1. Spiętrzanie.....	12
1.1. Spiętrzanie próbki we wzmocnionym polu elektrycznym (FASS).....	12
1.2. Spiętrzanie dużych objętości próbki (LVSS).....	13
1.3. Dozowanie elektrokinetyczne próbki we wzmocnionym polu elektrycznym (FASI) .	15
1.4. Techniki oparte na destabilizacji miceli.....	17
1.5. pH-spiętrzanie	20
1.6. Dynamiczne krzyżowanie pH	23
2. Zmiatanie	25
2.1. Podstawy teoretyczne.....	25
2.2. Elektrokinetyczne dozowanie próbki połączone ze zmiataniem.....	29
2.3. Inne mechanizmy wzbogacania z użyciem fazy pseudostacjonarnej.....	32
3. Izotachforeza (ITP)	36
3.1. Mechanizm ITP.....	36
3.2. Przejściowa izotachforeza (tITP)	37
3.3. Przejściowa pseudo-izotachforeza (p-ITP)	40
3.4. Procesy izotachforetyczne w technikach elektromigracyjnych.....	42
4. Podsumowanie	43
II. Cel pracy.....	48
III. Część doświadczalna.....	50
1. Aparatura, odczynniki, materiały.....	51
1.1. Aparatura naukowa	51
1.2. Odczynniki i rozpuszczalniki.....	52
1.3. Oprogramowanie.....	54
2. Spiętrzanie analitów na drodze przeniesienia z miceli do rozpuszczalnika organicznego	55
2.1. Wstęp	55
2.2. Część eksperymentalna	57
2.2.1. Przygotowanie roztworów	57
2.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne	58
2.2.3. Procedura przygotowania próbki do analizy	58
2.3. Wyniki i dyskusja.....	58

2.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody	62
3. Spiętrzanie analitów we wzmocnionym polu elektrycznym z zastosowaniem wielokrotnego dozowania próbki	65
3.1. Wstęp	65
3.2. Część eksperymentalna	66
3.2.1. Przygotowanie roztworów	66
3.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne	66
3.2.3. Procedura przygotowania próbki do analizy	67
3.3. Wyniki i dyskusja.....	67
3.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody	73
4. Dozowanie elektrokinetyczne próbki we wzmocnionym polu elektrycznym w kontekście zjawiska pseudo-izotachoforezy	76
4.1. Wstęp	76
4.2. Część eksperymentalna	77
4.2.1. Przygotowanie roztworów	77
4.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne	77
4.2.3. Procedura przygotowania próbki do analizy	78
4.3. Wyniki i dyskusja.....	78
4.3.1. Spiętrzanie.....	78
4.3.2. Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz	85
4.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody	87
5. Spiętrzanie analitów we wzmocnionym polu elektrycznym, a efekt zmiatania próbki w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii.....	91
5.1. Wstęp	91
5.2. Część eksperymentalna	92
5.2.1. Przygotowanie roztworów	92
5.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne	92
5.2.3. Procedura przygotowania próbki do analizy	93
5.3. Wyniki i dyskusja.....	93
5.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody	99
6. Indukowane kwasem pH-spiętrzanie próbki poddanej reakcji upochadniania w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii.....	104
6.1. Wstęp	104
6.2. Część eksperymentalna	105
6.2.1. Przygotowanie roztworów	105
6.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne	105
6.2.3. Oznaczanie zawartości ACN przy użyciu chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC – FID).....	105

6.2.4. Procedura przygotowania próbek do analizy	106
6.2.5. Procedura upochadniania próbek	106
6.3. Wyniki i dyskusja.....	106
6.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody.....	110
7. Podsumowanie	116
Wnioski	120
Piśmiennictwo	121

Streszczenie

Techniki rozdzielania mieszanin stanowią bez wątpienia jedną z najprężniej rozwijanych dziedzin chemii analitycznej. Przełomowe odkrycia dokonane przez Michaiła Cwieta i Arne Tiseliusa w pierwszej połowie ubiegłego wieku rozpoczęły erę technik chromatograficznych i elektroforetycznych, będących obecnie podstawowymi narzędziami stosowanymi w pracy laboratoryjnej w różnych gałęziach przemysłu, medycyny i nauki na całym świecie. Analiza pojedynczych komórek, zminiaturyzowane samodzielne systemy analityczne czy badania kosmosu – to tylko niektóre z aktualnych problemów naukowych z sukcesem rozwiązywanych przy pomocy technik rozdzielania mieszanin.

Techniki elektromigracyjne doskonale wpisują się we współczesne trendy z uwagi na szereg zalet obejmujących krótki czas analiz, niskie zużycie odczynników, technologię przyjazną środowisku i niezwykle wysoką sprawność rozdzielania. Stosunkowo niską czułość oznaczeń z użyciem detekcji spektrofotometrycznej zalicza się do najczęściej wymienianych wad elektroforezy kapilarnej (CE). Przyczyną tej niedogodności jest stosunkowo krótka droga optyczna używanego promieniowania (zazwyczaj 25 – 100 μm), a także objętość dozowanej próbki, standardowo nieprzekraczająca kilku nanolitów. Znaczący wzrost siły sygnału można jednak uzyskać stosując techniki wzbogacania analitu w kapilarze, będących przedmiotem przeprowadzonych badań.

W poniższej pracy przedstawiono wybrane zagadnienia dotyczące wzmacniania siły sygnału w CE poprzez właściwe wykorzystanie zjawisk fizykochemicznych zachodzących w kapilarze pod wpływem przykładanego napięcia. Za główny cel badań obrano dokładny opis mechanizmów stosowanych technik, wyznaczenie parametrów krytycznych prowadzenia procesu wzbogacania, a także poruszanie nowych aspektów tej dziedziny nauki.

W pierwszym etapie badań oszacowano efekt wzmocnienia siły sygnału uzyskiwany przy pomocy techniki spiętrzania analitów na drodze przeniesienia z miceli do rozpuszczalnika organicznego (ang. micelle to solvent stacking, MSS). Opracowana metoda umożliwiła około pięćdziesięciokrotną poprawę czułości detekcji wybranych substancji farmakologicznie czynnych w stosunku do standardowego dozowania hydrodynamicznego.

Mniejszy efekt wzbogacenia analitów o zbliżonej strukturze chemicznej uzyskano za sprawą techniki spiętrzania próbki we wzmacnionym polu elektrycznym (ang. field-amplified sample stacking, FASS) z wielokrotnym dozowaniem próbki. Zaproponowany układ dozowania próbki stanowi pierwsze doniesienie naukowe z użyciem techniki FASS.

Najniższe wartości granic wykrywalności (ang. limit of detection, LOD) i oznaczalności (ang. limit of quantification, LOQ) dla wybranych substancji aminowych uzyskano z użyciem techniki dozowania elektrokinetycznego próbki we wzmacnionym polu elektrycznym (ang. field-amplified sample injection, FASI). Dodatkowe zastosowanie dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz – ciecz (ang. dispersive liquid – liquid microextraction, DLLME) umożliwiło oznaczanie tych związków w próbkach moczu ludzkiego w stężeniu kilku ng/ml. Przeprowadzone badania wykazały udział przejściowej pseudo-izotachoforezy (ang. transient pseudo-isotachopheresis, p-ITP) w procesie spiętrzania próbki.

Odrębnym zagadnieniem poruszonym w dalszym etapie pracy było jednoczesne wzbogacenie analitów o różnym charakterze chemicznym (słabe kwasy i zasady organiczne). W tym celu zastosowano technikę zmiatania próbki w warunkach niehomogennej pola elektrycznego (technika FASS). Przeprowadzona optymalizacja wykazała zróżnicowany wpływ poszczególnych parametrów na oznaczane witaminy z grupy B, a ich znaczenie dla efektywności zachodzących procesów zostało dokładnie omówione.

Ostatni aspekt pracy dotyczył wzbogacania próbek poddanych przed analizą procesowi upochadniania. W badaniu wykorzystano mieszaninę 20 aminokwasów biogennych, które sprzęgano z 2,4-dinitrofluorobenzenem (DNFB) w obecności tetraboranu disodowego. Z uwagi na obecność boraksu w próbce, w omawianym przypadku użyto technikę pH-spiętrzania indukowanego kwasem. Wzbogacania analitów anionowych za pomocą tej techniki nie zostało do tej pory opublikowane w literaturze naukowej. W eksperymentach wykazano także poprawę skuteczności zmiatania w stosunku do kwasu asparaginowego, glutaminowego i cystyna w obecności jonów boranowych.

Opracowane metody poddano wstępnej ocenie walidacyjnej, na podstawie której potwierdzono potencjał aplikacyjny.

Summary

Undoubtedly, separation technology is one of the most intensively developed issues of analytical chemistry. Breakthroughs made by Michail Cwiet and Arne Tiselius in the first half of twentieth century have begun the era of chromatographic and electrophoretic techniques, which are currently considered as basic tools used in laboratories in various branches of industry, medicine and science, all over the world. Single cell analysis, micro total analysis systems or space exploration – these are only a few of actual scientific problems which are successfully solved with a use of separation techniques.

Electromigration techniques are often utilized in aforementioned cases according to their advantages like short analysis time, low solvents consumption, environmental friendliness and extremely high separation efficiency. Relatively low sensitivity with spectrophotometric detection is one of the main disadvantages of capillary electrophoresis (CE). The main reason of this inconvenience is a result of a relatively short optical path length (usually 25 – 100 μm) as well as a small injection volume (typically a few nanoliters). However, considerable sensitivity enhancement can be obtained when on-line preconcentration techniques are applied, which was the issue of conducted researches.

In the work, selected aspects of signal amplification in CE have been included. The main goals of presented researches concerned the investigation and description of preconcentration mechanisms, determination of parameters critical for sensitivity enhancement and development of applied techniques.

The first step involved the assessment of preconcentration potential of micelle to solvent stacking technique (MSS). Elaborated method improved the detection sensitivity of selected pharmacologically active substances for about 50-fold in comparison to standard hydrodynamic injection mode.

Lower preconcentration effect of similar compounds was obtained when field-amplified sample stacking (FASS) technique with repetitive sample injection was utilized. To the best of authors knowledge the proposed injection method with FASS technique have never been published before.

The lowest values of limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for selected model amines were obtained with field-amplified sample injection (FASI) technique. Additional implementation of dispersive liquid – liquid microextraction

(DLLME) into the analytical procedure resulted in quantification of the analytes on the level of few ng/ml in human urine samples. The researches have also revealed a contribution of transient pseudo-isotachophoresis (p-ITP) in stacking mechanism.

Simultaneous preconcentration of weak acids and basis can be considered as a separate issue of the work. For this purpose sweeping under inhomogeneous electric field (FASS technique) conditions was proposed. The conducted optimization showed varied impact of tested parameters on determined vitamins B, which was insightfully discussed in a view of applied technique.

The last aspect concerned the preconcentration of derivatized samples. In experiments twenty biogenic amino acids were coupled with 2,4-dinitrofluorobenzene reagent (DNFB) in a presence of sodium tetraborate salt. According to the relatively high concentration of borate in a sample zone, acid-induced pH-stacking technique was proposed for sensitivity enhancement. It was the first report on the use of this technique for anionic compounds preconcentration in CE. The research has also shown high sweeping efficiency of cystine as well as aspartic and glutamic acids in the presence of borate ions.

Elaborated methods were preliminary validated which confirmed the application potential.

Spis użytych akronimów

ACN – acetonitryl

AFMC – ogniskowanie analitów przez rozpad miceli

BGE – elektrolit rozdzielający

CE – elektroforeza kapilarna

C_{inj} – stężenie analitu w strefie próbki [mol/L]

CMC – krytyczne stężenie micelarne

C_{stack} – stężenie analitu w strefie spiętrzenia [mol/L]

DLLME – dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz

DNFB – 2,4-dinitrofluorobenzen

E – siła pola elektrycznego [V/cm]

EF – współczynnik wzmocnienia

EOF – przepływ elektroosmotyczny

FASI – dozowanie elektrokinetyczne próbki we wzmocnionym polu elektrycznym

FASS – spiętrzanie próbki we wzmocnionym polu elektrycznym

HCB – bufor o wysokiej przewodności

iPrOH – propan-2-ol

I.S. – wzorzec wewnętrzny

ITP – izotachoforeza

k_{BGE} – współczynnik retencji analitu w strefie buforu rozdzielającego

K_D – współczynnik podziału analitu między fazą pseudostacjonarną i roztwór buforu

k_S – współczynnik retencji analitu w strefie próbki

l_{focus} – ostateczna długość strefy próbki po procesie wzbogacania [cm]

l_{grad} – długość strefy próbki po procesie wzbogacania z uwzględnieniem zjawiska RFGE
[cm]

l_{inj} – długość wprowadzonej strefy próbki [cm]

l_{stack} – długość strefy próbki po procesie spiętrzenia [cm]

l_{sweep} – długość strefy próbki po procesie zmiatania [cm]

LE – elektrolit wiodący

LLE – ekstrakcja ciecz-ciecz

LOD – granica wykrywalności

LOQ – granica oznaczalności

LVSS – spiętrzanie dużych objętości próbki

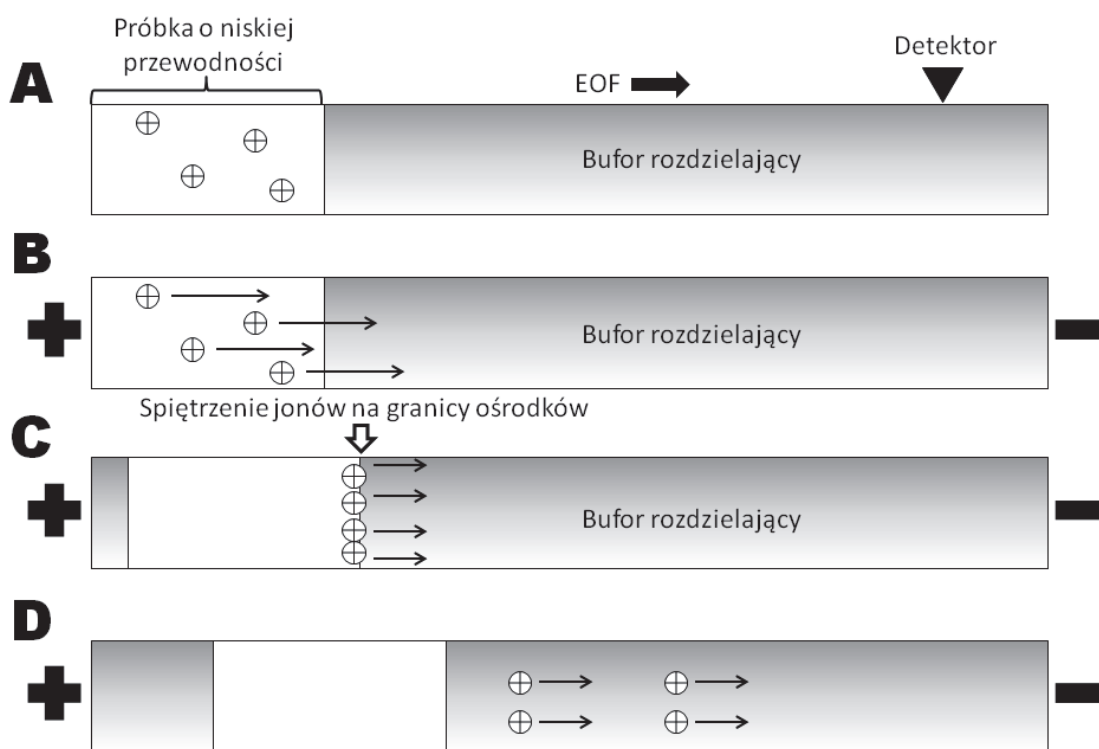
MCRB – migrująca granica reakcji chemicznej
 MEKC – micelarna elektrokinetyczna chromatografia
 MeOH - metanol
 MSS – spiętrzanie analitów na drodze przeniesienia z miceli do rozpuszczalnika organicznego
 mtITP – micelarna przejściowa izotachoforeza
 p-ITP – przejściowa pseudo-izotachoforeza
 RFGE – efekt różnicy współczynnika retencji
 SEI – selektywne zubożające dozowanie elektrokinetyczne
 S/N – stosunek sygnału do szumu
 TE – elektrolit terminujący (ograniczający, kończący)
 Tris – 2-amino-2-hidroksymetylopropano-1,3-diol
 tITP – przejściowa izotachoforeza
 V_{EOF} – prędkość przepływu elektroosmotycznego [m/s]
 V_{eff} – prędkość migracji elektroforetycznej jonu w polu elektrycznym [m/s]
 V_{anal} – wypadkowa prędkość poruszania się cząsteczki w kapilarze [m/s]
 μ – ruchliwość elektroforetyczna [cm^2/Vs]
 κ – przewodnictwo elektryczne ośrodka [S/m]
 γ – stosunek przewodności bufor rozdzielający/próbka
 ϕ_s – stosunek objętości fazy pseudostacjonarnej do wodnej w strefie próbki
 ϕ_{BGE} – stosunek objętości fazy pseudostacjonarnej do wodnej w strefie buforu rozdzielającego

I. Wstęp

1. Spiętrzanie

1.1. Spiętrzanie próbki we wzmacnionym polu elektrycznym (FASS)

Spiętrzanie (ang. stacking) jest najstarszą techniką wzbogacania analitu w kapilarze. Pierwsze doniesienia na temat tego zjawiska pochodzą z roku 1950 [1]. W swojej pracy Haglund i Tiselius zwrócili uwagę na zawężenie pasm rozdzielanych substancji przy zastosowaniu próbki o niższej przewodności w stosunku do buforu rozdzielającego. Podobne spostrzeżenia poczynione przez ten sam zespół naukowy dotyczyły planarnej elektroforezy żelowej [2]. Jakkolwiek, podstawy teoretyczne tego zjawiska, w kontekście elektroforezy kapilarnej, zostały przedstawione dopiero pod koniec lat osiemdziesiątych przez Mikkers i współpracowników [3].



Rys. 1. Schemat spiętrzania związków kationowych we wzmacnionym polu elektrycznym. (A) Próbkę zawierającą zjonizowane anality zostaje hydrodynamicznie wprowadzona do kapilary uprzednio wypełnionej buforem rozdzielającym. (B) Po przyłożeniu napięcia następuje migracja kationów w kierunku katody. (C) W wyniku różnicy w przewodności próbki i buforu rozdzielającego, anality ulegają spiętrzeniu na granicy ośrodków o różnej przewodności. (D) W ostatnim etapie anality ulegają rozdzielaniu i detekcji.

Istotą zjawiska spiętrzania jest gwałtowna zmiana szybkości migracji elektroforetycznej cząsteczek na granicy dwóch ośrodków. W przypadku dozowania do kapilary próbki o niskiej przewodności w stosunku do buforu rozdzielającego (FASS), różnica w szybkości migracji jonu pomiędzy tymi dwoma ośrodkami wynika z różnych wartości przewodności próbki i buforu (Rysunek 1).

Wzbogacenie analitów jest wprost proporcjonalna do stosunku przewodności elektrycznej buforu rozdzielającego i próbki:

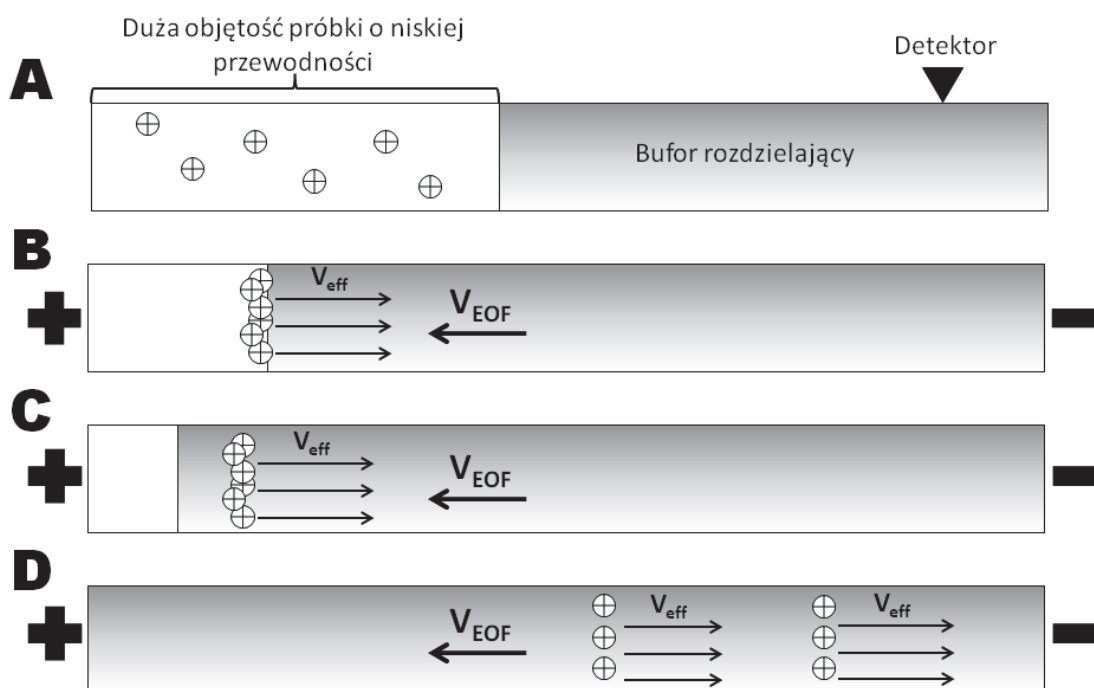
$$C_{\text{stack}} = C_{\text{inj}} \gamma \quad (1)$$

, gdzie: C_{stack} – stężenie analitu w strefie spiętrzenia [mol/L]; C_{inj} – stężenie analitu w strefie próbki [mol/L]; γ – stosunek przewodności bufor rozdzielający/próbka [-].

W praktyce zależność ta zostaje spełniona jedynie dla małych objętości dozowanej próbki [4]. Większym objętościom dozowania towarzyszy szereg zjawisk określanych wspólnym mianem „dyspersji elektroforetycznej”, w wyniku której uzyskiwany sygnał ulega poszerzeniu [3 - 5]. Co więcej, niska przewodność elektryczna próbki może prowadzić do zaburzeń w przewodzeniu prądu elektrycznego w kapilarze. Z tego względu technika FASS, mimo prostoty wykonania, posiada znaczne ograniczenia pod względem objętości dozowanej próbki, co z kolei przekłada się na stosunkowo niewielki współczynnik wzmocnienia dla tej techniki (zwykle < 100) [6].

1.2. Spiętrzanie dużych objętości próbki (LVSS)

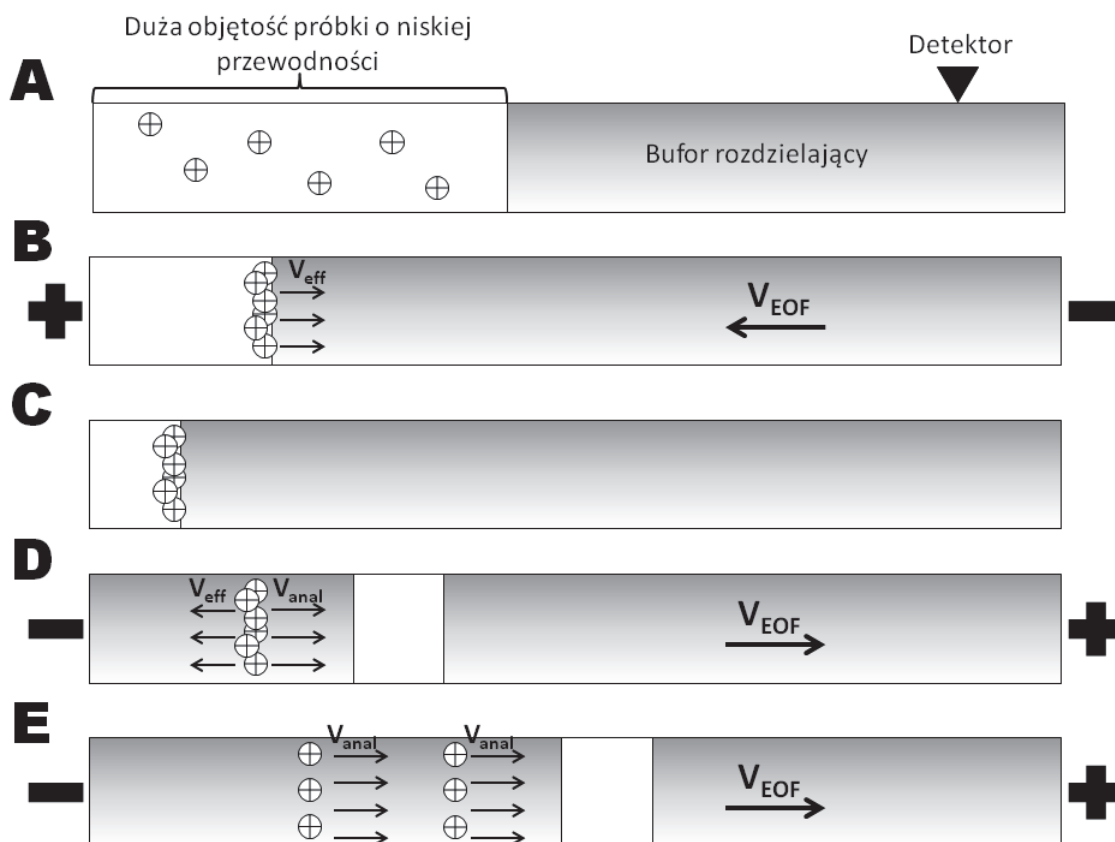
Spiętrzanie dużych objętości próbki (ang. large volume sample stacking) wymaga wydłużenia okresu ogniskowania analitu na granicy ośrodków próbka/bufor rozdzielający przed właściwym etapem rozdzielania elektroforetycznego. W technice tej etap spiętrzenia prowadzi się przy jednoczesnym usuwaniu matrycy próbki w celu ujednolicenia rozkładu pola elektrycznego wewnątrz kapilary. Usuwanie matrycy próbki z kapilary odbywa się najczęściej przy użyciu tzw. „pompy elektroosmotycznej” [7; 8]. Istotą procesu jest taki dobór warunków elektroforetycznych, aby wektor migracji analitu był skierowany do detektora, przeciwnie do przepływu elektroosmotycznego (ang. electroosmotic flow, EOF).



Rys. 2. Schemat mechanizmu LVSS bez zmiany polaryzacji elektrod ($|V_{anal}| > |V_{EOF}|$). (A) Do kapilary wypełnionej buforem rozdzielającym wprowadza się dużą objętość próbki zawierającej anality kationowe. (B) Po przyłożeniu napięcia następuje spiętrzanie jonów na granicy ośrodków o różnej przewodności. (C, D) Ze względu na wyższą wartość szybkości migracji elektroforetycznej oznaczanych związków od szybkości przepływu elektroosmotycznego, po etapie spiętrzania następuje dalsza migracja analitów w kierunku katody, ich rozdzielenie i detekcja.

W przypadku, gdy bezwzględna wartość szybkości migracji analitu jest większa niż bezwzględna wartość szybkości przepływu elektroosmotycznego ($|V_{anal}| > |V_{EOF}|$), analizę prowadzi się przy stałej polaryzacji elektrod (Rysunek 2) [6]. W przeciwnym razie ($|V_{anal}| < |V_{EOF}|$), po etapie spiętrzania z jednoczesnym usuwaniem matrycy, polaryzacja elektrod ulega odwróceniu (Rysunek 3) [6]. W tym przypadku etap spiętrzania prowadzi się do momentu uzyskania wartości natężenia prądu bliskiej jego wartości maksymalnej (kapilara w całości wypełniona buforem rozdzielającym). Technika LVSS wymaga precyzyjnej kontroli wartości i kierunku EOF. W tym celu stosuje się czwartorzędowe sole amoniowe [9], polimery organiczne [10], zewnętrzne ciśnienie przykładane do wlotu [11] lub wylotu kapilary [12], roztwory o wysokiej lepkości w naczynkach z buforem rozdzielającym [13], a także powlekanie kapilar gotowymi preparatami dostępnymi komercyjnie [12; 14]. Biorąc pod uwagę fakt, iż efekt wzmocnienia w technikach opartych o dozowanie hydrodynamiczne jest w przybliżeniu wprost proporcjonalny do objętości dozowanej próbki, obniżenie granicy wykrywalności w technice LVSS jest limitowane objętością stosowanej kapilary [8]. Jakkolwiek, wykorzystanie dodatkowych mechanizmów wzbogacania

analitu w kapilarze (takich, jak zmiatanie), pozwala na wielokrotne dozowanie dużych objętości próbki do kapilary podczas jednej analizy [15; 16]. Zastosowaniu techniki LVSS pozwala zwykle na poprawę czułości o dwa rzędy wielkości [6].

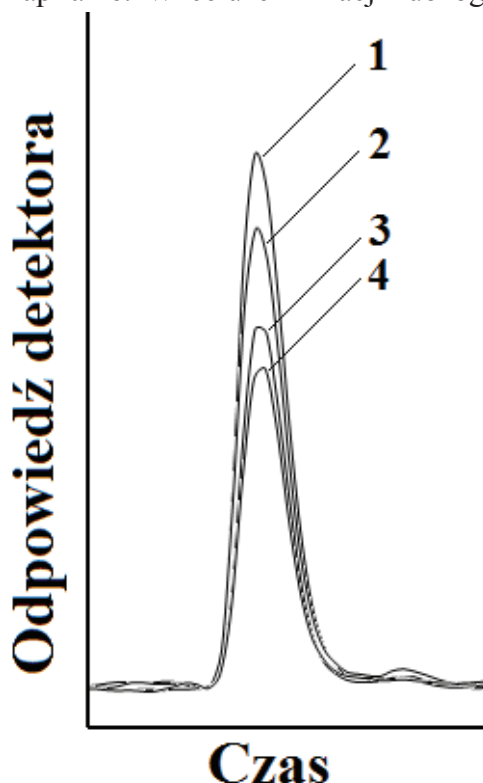


Rys. 3. Schemat mechanizmu LVSS z zastosowaniem zmiennej polaryzacji elektrod na przykładzie analitów kationowych ($|V_{anal}| < |V_{EOF}|$). (A) Duża objętość próbki zawierającej zjonizowane anality zostaje hydrodynamicznie wprowadzona do kapilary uprzednio wypełnionej buforem rozdzielającym. (B) Pod wpływem przyłożonego napięcia anality migrują w kierunku katody i ulegają spiętrzeniu na granicy ośrodków o różnej przewodności. (B, C) Odwrócony EOF powoduje usunięcie matrycy próbki z kapilary. (C) Proces spiętrzenia z jednoczesnym usuwaniem matrycy prowadzi się do momentu uzyskaniu $> 90\%$ wartości natężenia prądu w stosunku do kapilary wypełnionej jedynie buforem rozdzielającym. (D) Następnie, polaryzacja elektrod ulega odwróceniu. (E) Ponieważ $V_{eof} > V_{eff}$, następuje przepływ anality w kierunku detektora, ich rozdzielenie i detekcja.

1.3. Dozowanie elektrokinetyczne próbki we wzmocnionym polu elektrycznym (FAEI)

Spiętrzenie analitów we wzmocnionym polu elektrycznym z zastosowaniem dozowania elektrokinetycznego pozwala na przezwycięzenie problemu związanego z ograniczoną objętością kapilary. Dozowanie analitów w tej technice odbywa się na drodze jednocześnie zachodzących zjawisk elektroosmozy i elektroforezy. To właśnie efekt elektroforetyczny jest odpowiedzialny za nieproporcjonalne w stosunku do objętości wprowadzanie analitów do kapilary [17; 18]. Umożliwia to dozowanie znacznych ilości analitu bez widocznego efektu poszerzenia sygnału,

będącego wynikiem przeładowania objętościowego kapilary [18]. Przepływ cieczy w kapilarze podczas dozowania elektrokinetycznego na skutek elektroosmozy znacząco wpływa zarówno na poszerzenie uzyskiwanych sygnałów, jak i spadek ich intensywności [18; 19]. Efekt ten jest pomijalnie mały w przypadku stosunkowo krótkiego czasu dozowania próbki [18]. Zastosowanie dłuższego czasu dozowania próbki, w celu uzyskania większego efektu wzmocnienia sygnału, wymaga wdrożenia różnych modyfikacji, mających ograniczyć niekorzystne zjawisko przepływu cieczy w kapilarze. W celu eliminacji lub ograniczenia EOF stosuje się bufor rozdzielający o



Rys. 4. Wpływ wielokrotnego dozowania tej samej próbki przy pomocy techniki FASI na uzyskiwany sygnał. Cyfry na rysunku wskazują na krotność dozowania.

niskiej wartości pH (< 3.0) [20], powlekanie wewnętrznych ścian kapilary [21], a także przykładanie zewnętrznego ciśnienia w celu zbalansowania przepływu [22]. Ponieważ efekt wzmocnienia w technice FASI jest wprost proporcjonalny do różnicy w przewodności próbki i buforu rozdzielającego, dodatkowy efekt wzmocnienia sygnału można uzyskać poprzez dodatek rozpuszczalników organicznych do roztworu próbki [23]. Także dodatek niewielkiej ilości kwasu lub zasady do próbki w celu zapewnienia właściwej jonizacji analitów może znacząco poprawić czułość metody [23]. Bardzo często wykorzystuje się

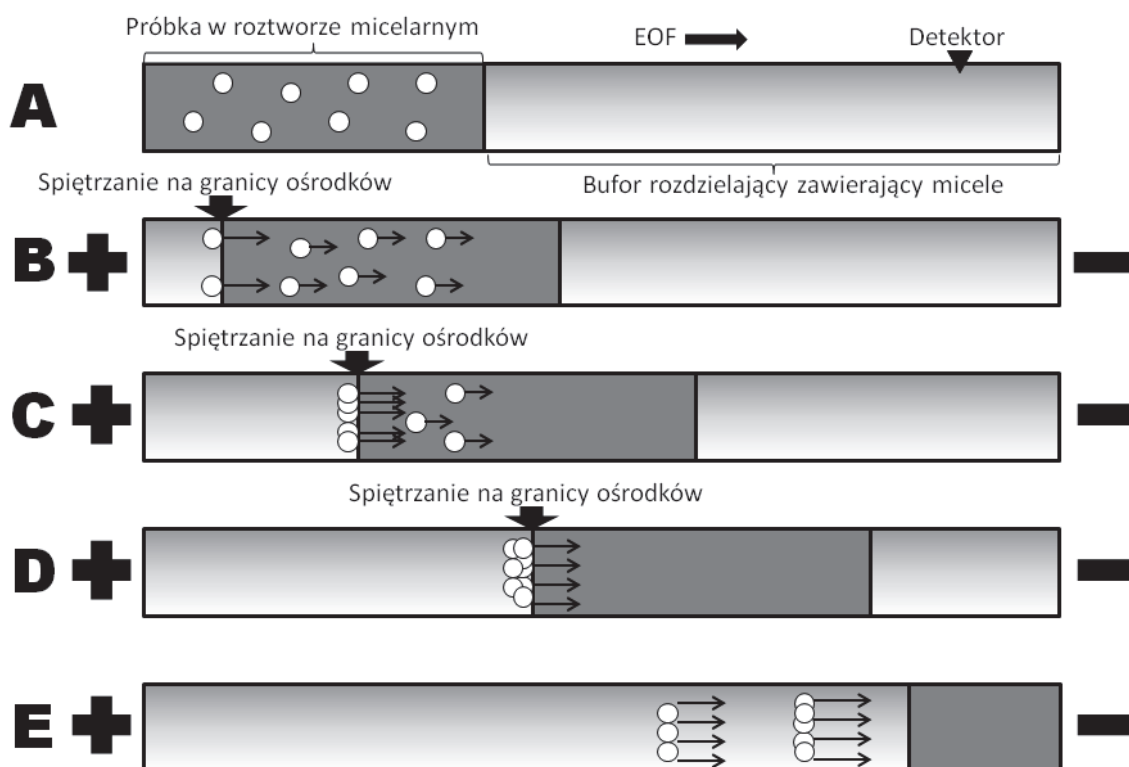
także dozowanie do kapilary, bezpośrednio przed próbką, krótkiej strefy o niskiej przewodności (zazwyczaj wody lub bardzo rozcieńczonego roztworu rozdzielającego, ang. head-column injection) [23]. Uzyskiwany efekt wzmocnienia w technice FASI wynosi zwykle od dwóch do czterech rzędów wielkości [6]. Ze względu na nieproporcjonalny ubytek analitu z próbki w stosunku do jej objętości oraz efekty elektrolityczne towarzyszące dozowaniu elektrokinetycznemu zaleca się, aby każdorazowe dozowanie prowadzić przy użyciu świeżego roztworu próbki [23; 24]. Na Rysunku 4 przedstawiono sygnały uzyskiwany dla danej substancji podczas wielokrotnego dozowania elektrokinetycznego tego samego roztworu próbki. Zaznacza się zarówno mniejsza wysokość jak i pole powierzchni uzyskiwanych pików, co obrazuje zmiany zachodzące w roztworze próbki

po każdorazowym jej dozowaniu. Także kształt i położenie elektrody względem wlotu kapilary ma znaczący wpływ na ilość dozowanej substancji [25].

Technika FASI pozwala na poprawę czułości metody analitycznej poprzez wydłużanie czasu dozowania próbki. Może to skutkować poszerzeniem uzyskiwanego pasma substancji w kapilarze. Jakkolwiek, ilość wprowadzanego analitu w dalszym ciągu będzie wzrastać w miarę wydłużania czasu dozowania próbki. Stosowanie bardzo długiego czasu dozowania próbki (powyżej 60 - 80 s) z jednoczesnym stosowaniem stosunkowo wysokiego napięcia (> 10 kV) wymaga zastosowania dodatkowego mechanizmu wzbogacania analitu w kapilarze takiego, jak zmiatanie [24] lub przejściowa izotachoforeza [26]. Szczegółowy opis tych technik został przedstawiony w dalszych rozdziałach pracy (Rozdziały I.2.2. i I.3.2.).

1.4. Techniki oparte na destabilizacji miceli

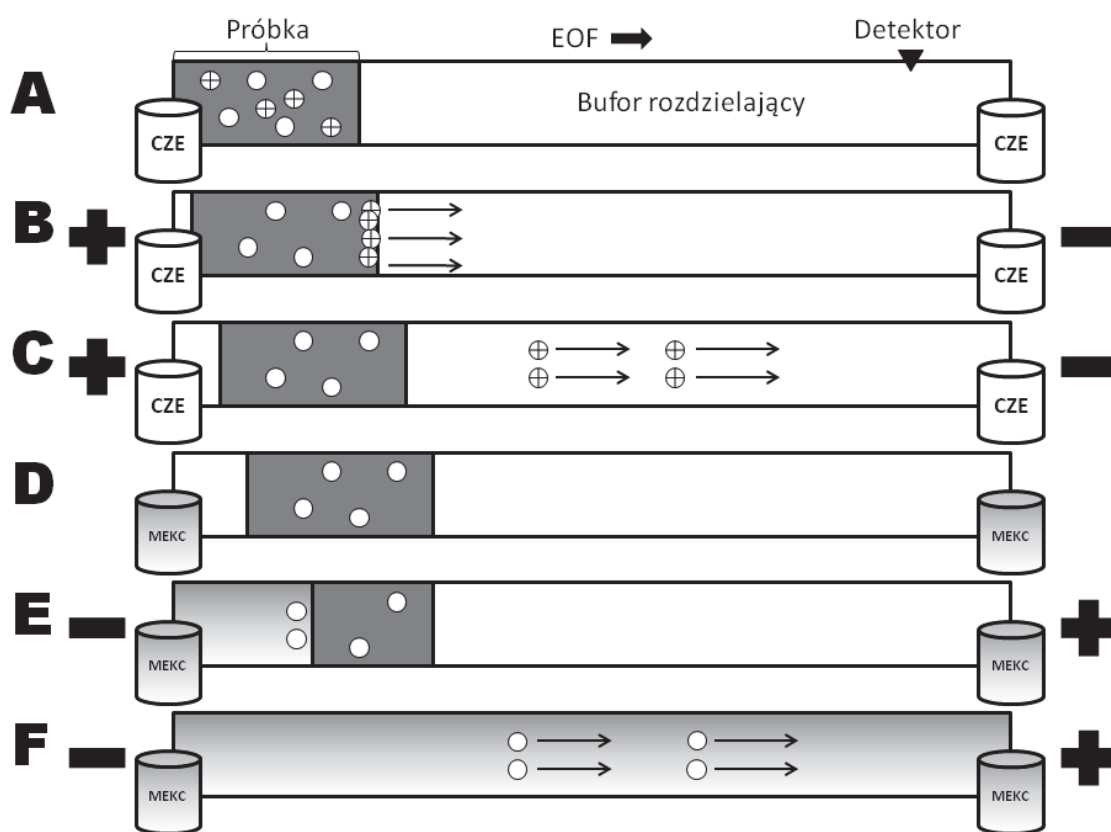
Ogniskowanie analitów poprzez rozpad miceli (ang. analyte focusing by micelle collapse, AFMC) jest jedną z najmłodszych technik wzbogacania analitu w kapilarze [27]. W technice tej anality dozowane do kapilary w roztworze surfaktantu (Rys. 5A) ulegają spiętrzeniu na granicy stref próbka/bufor rozdzielający na skutek destabilizacji miceli (Rys. 5B – D). Efekt ten uzyskuje się poprzez: (i) dobór surfaktantu w strefie próbki w stężeniu nieznacznie przekraczającym krytyczne stężenie micelarne (ang. critical micellar concentration, CMC) danego surfaktantu; (ii) dodatek rozpuszczalnika organicznego do roztworu rozdzielającego. Po etapie ogniskowania anality ulegają rozdzieleniu przy pomocy MEKC (Rys. 5E). Początkowo technika AFMC w połączeniu z MEKC była dedykowana jedynie dla cząsteczek neutralnych elektrycznie [27 - 30]. W późniejszych latach wprowadzano kolejne modyfikacje techniki AFMC (technika MSS) umożliwiające wzbogacanie i rozdzielanie analitów kationowych i/lub anionowych za pomocą CZE [31; 32], elektroforezy kapilarnej w środowisku niewodnym [33] lub EKC [34]. Hydrodynamiczne dozowanie próbki w omawianych technikach pozwala na wzmocnienie sygnału od kilkudziesięciu do kilkuset razy [31 - 34], podczas gdy najwyższe współczynniki wzmocnienia (ang. enhancement factor, EF) dla tej techniki odnotowano przy jednoczesnym stosowaniu techniki FASI i MSS (ponad tysiąckrotne wzmocnienie sygnału) [35; 36].



Rys. 5. Schemat mechanizmu techniki AFMC. (A) Do kapilary wypełnionej micelnym buforem rozdzielającym, zawierającym dodatek rozpuszczalnika organicznego, wprowadza się dużą objętość próbki. Matryca analityczną próbki również zawiera surfaktant, jednakże w stężeniu znacznie niższym niż bufor rozdzielający, nieznacznie przekraczającym krytyczne stężenie micelarne tenzydu w tych warunkach. (B) Anality ulegające sorpcji przez micelle, pod wpływem przyłożonego napięcia migrują w strefie próbki w kierunku katody. (B - D) Większa prędkość przepływu elektroosmotycznego w stosunku do prędkości migracji analitów w strefie próbki skutkuje spiętrzaniem analitów po stronie anodowej próbki. Spiętrzanie jest efektem destabilizacji miceli próbki w zetknięciu z buforem rozdzielającym o niższej sile jonowej i zawierającym rozpuszczalnik organiczny. (E) Ostatecznie anality ulegają sorpcji przez micelle znajdujące się w buforze rozdzielającym i rozdzieleniu przy pomocy MEKC. Należy zaznaczyć, iż technika AFMC jest dedykowana związkom elektrycznie obojętnym.

Liczbowe wartości współczynników wzmocnienia uzyskiwane przy pomocy technik FASS i AFMC/MSS nie różnią się w znaczący sposób. Jakkolwiek, istnieje kilka różnic pomiędzy tymi dwoma podejściami do omawianego zagadnienia. (i) Po pierwsze, w technikach MSS i AFMC przewodność próbki jest równa lub wyższa od przewodności stosowanego buforu rozdzielającego, co pozwala na dozowanie większych objętości próbki bez destabilizacji natężenia prądu podczas analiz. W efekcie uzyskuje się nieznaczłą poprawę czułości na korzyść MSS i AFMC. (ii) Po wtóre, w celu destabilizacji miceli obecnych w próbce (MSS i AFMC), bufor rozdzielający zawiera stosunkowo dużą zawartość rozpuszczalnika organicznego (np. 60% metanolu lub 30% acetonitrylu) [31; 32]. Co więcej, w technikach tych warunki rozdzielania dobiera się tak, aby efektywny kierunek migracji stosowanego surfaktantu był

skierowany do wlotu kapilary. Dzięki temu techniki MSS i AFMC są kompatybilne z detekcją MS [30; 32]. Ponieważ w technice FASS efekt wzmocnienia jest wprost proporcjonalnie do różnicy w przewodności graniczących ze sobą ośrodków, dodatek rozpuszczalników organicznych do buforu rozdzielającego wpływa niekorzystnie na uzyskiwaną poprawę czułości. W praktyce brak jest jednoznacznych danych literaturowych na temat różnicy w uzyskiwanych efektach pomiędzy omawianymi technikami. (iii) Po trzecie, zastosowanie micelarnej matrycy próbki pozwala na znaczną poprawę rozpuszczalności substancji silnie hydrofobowych [27; 28; 37]. Należy zaznaczyć, iż wyższy efekt wzmocnienia w technikach AFMC i MSS można uzyskać przez łączenie ich z innymi mechanizmami akumulacji analitów takimi, jak FASI [35] lub zmiatanie [38; 39].



Rys. 6. Przykładowy schemat mechanizmu dwuwymiarowego rozdzielania substancji kationowych i obojętnych w jednej kapilarze przy użyciu technik CZE i MEKC. (A) Do kapilary wypełnionej buforem CZE o niskiej wartości pH próbka wprowadzana jest hydrodynamicznie. (B) Pod wpływem przyłożonego napięcia kationy ulegają spiętrzeniu na granicy ośrodków próbki/bufor rozdzielający, (C) a następnie ulegają rozdzielaniu przy pomocy CZE. (B, C) W tym czasie substancje elektrycznie obojętne, wobec małej wartości EOF (niskie pH buforu), poruszają się z niewielką prędkością w kierunku detektora. (D) Po zakończonym etapie rozdzielania z użyciem CZE następuje zmiana naczyniek z buforem rozdzielającym na końcach kapilary na MEKC. (E, F) Odwrócona polaryzacja elektrod skutkuje penetracją fazy pseudostacjonarną przez próbkę i sorpcją (zmiataniem) pozostających tam analitów, a następnie ich rozdzielaniem przy pomocy MEKC.

Interesującym wykorzystaniem technik AFMC i MSS jest wzbogacanie próbki w dwuwymiarowej analizie elektroforetycznej przy użyciu MEKC i CZE, prowadzonej w tej samej kapilarze (ang. 2D heart-cutting capillary electrophoresis) [37; 40]. Przykładowy schemat rozdzielania substancji obojętnych elektrycznie i kationowych ilustruje Rysunek 6. Próbkę wprowadza się hydrodynamicznie do kapilary wypełnionej buforem o niskiej wartości pH (Rysunek 6A). Przyłożenie napięcia skutkuje migracją kationów w kierunku katody, podczas gdy anality obojętne poruszają się znacznie wolniej na skutek niewielkiej wartości EOF (Rysunek 6B i C). Po detekcji analitów kationowych następuje zmiana polaryzacji elektrod i rozdzielanie analitów neutralnych na drodze MEKC (Rysunek 6D - F). W prezentowanym przykładzie anality kationowe ulegają wzbogaceniu na drodze spiętrzania pod wpływem przyłożonego napięcia, natomiast ogniskowanie analitów elektrycznie obojętnych uzyskuje się poprzez zmiatanie przy pomocy fazy pseudostacjonarnej [37]. Zastosowanie technik AFMC i MSS pozwala na odwrócenie układu rozdzielającego (przejście MEKC do CZE) [37; 40]. Po umieszczeniu analitów w buforze zawierającym micelle i rozdzieleniu ich przy pomocy MEKC następuje przejście do CZE z jednoczesnym ogniskowaniem analitów poprzez rozpad miceli. Może to nastąpić „płynnie” (bez konieczności zmiany fiolek z buforami na końcach kapilary [37]) lub przy zastosowaniu zewnętrznego ciśnienia wraz ze zmianą zawartości rezerwuarów buforowych [40]. Koncepcja dwuwymiarowego rozdzielania analitów w jednej kapilarze nie jest nowa w technikach elektromigracyjnych [41], jednakże wykorzystanie technik AFMC i MSS w tej dziedzinie najlepiej świadczy o zapotrzebowaniu na tego typu rozwiązania. Pomimo niewielu doniesień na temat dwuwymiarowej CE, wstępne wyniki są bardzo obiecujące i z pewnością będą intensywnie rozwijane w najbliższych latach.

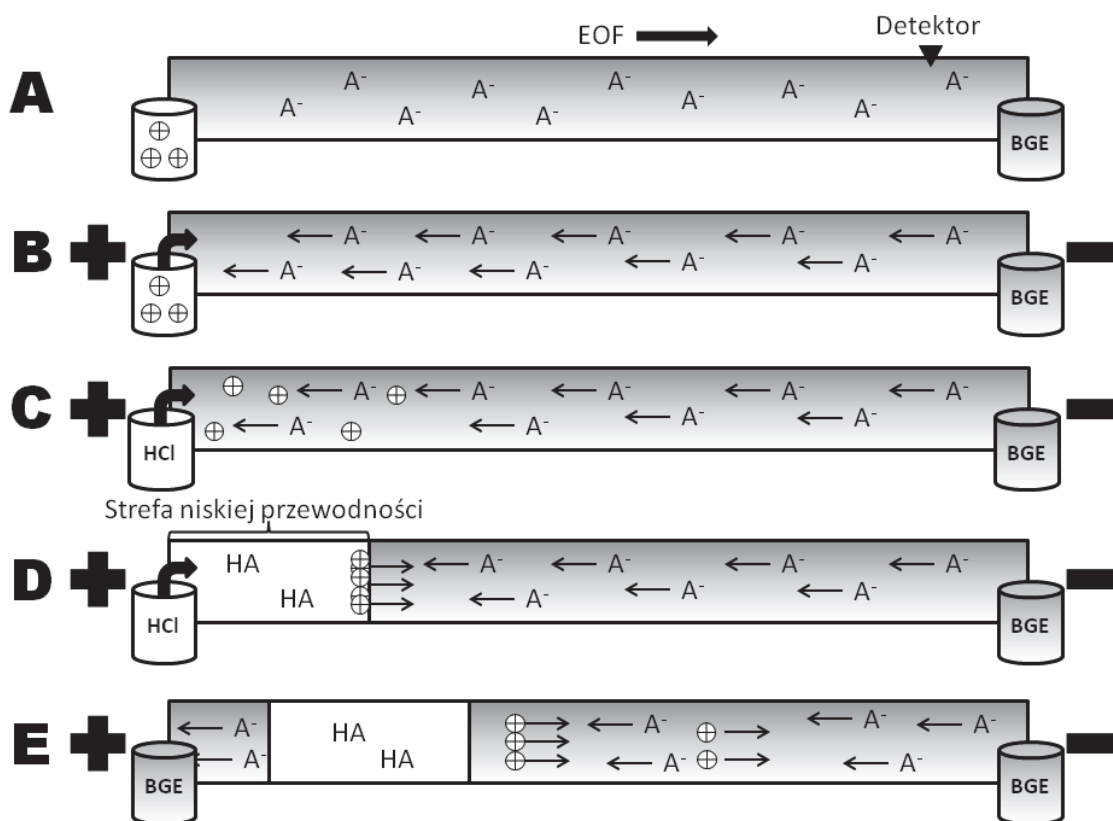
1.5. pH-spiętrzanie

Jak już wspomniano, głównym ograniczeniem techniki FASS jest objętość próbki, jaką można wprowadzić do kapilary bez utraty sprawności układu rozdzielającego. Z tego powodu wprowadzono szereg modyfikacji i alternatywnych rozwiązań jak techniki LVSS, AFMC i MSS. Kolejną możliwością jest „wytworzenie” strefy wzmocnionego pola elektrycznego wewnątrz kapilary podczas analizy pod wpływem różnicy wartości pH stosowanych roztworów. Efekt ten można uzyskać poprzez wprowadzenie próbki do kapilary pomiędzy roztwór zasady (przed próbką) i kwasu (za próbka) stosując normalną polaryzację elektrod [42]. Po przyłożeniu

napięcia jony hydroniowe migrują w kierunku katody, podczas gdy jony hydroksylowe w kierunku przeciwnym, w wyniku czego (w strefie próbki) zachodzi reakcja zobojętniania i wytworzenie strefy niskiej przewodności.

Schwer i Lottspeich wykazali skuteczność hydrodynamicznego dozowania próbki do kapilary pomiędzy roztwór kwasu i zasady we wzbogacaniu peptydów w CE [42]. Podobne rozwiązanie znalazło zastosowanie w wielu badaniach biomedycznych [43 - 50], szczególnie w analizie substancji amfifilowych [44; 46; 48 - 50], ale także cząsteczek o ładunku jednoimiennym [43 - 45]. Dużą zaletą tej techniki jest jej kompatybilność z detektorem MS [44 - 50], a także możliwość analizy próbek biologicznych po uprzednim ich rozcieńczeniu w odpowiedniej matrycy analitycznej [45 - 47], co znacząco skraca czas całej procedury, a także pozwala na uniknięcie błędów i strat w trakcie procesu ekstrakcji. Interesujący wydaje się być udział przejściowej izotachoforezy (ang. transient isotachopheresis, tITP) w mechanizmie wzbogacania analitów [42; 44; 51; 52]. Jakkolwiek, efektywność tITP w omawianym procesie nie została jak dotąd oszacowana.

Podobna strategia, jednakże oparta na dozowaniu elektrokinetycznym próbki, została opracowana przez zespół profesora Craig'a Lunte [53; 54]. Wzbogacanie analitu przy pomocy techniki pH-spiętrzania indukowanego kwasem zostało schematycznie przedstawione na Rysunku 7. Istotą tego procesu jest elektrokinetyczne dozowanie próbki (anality kationowe) do kapilary uprzednio wypełnionej buforem rozdzielającym, zawierającym anion słabego kwasu (A^- , Rys. 7A i B). W trakcie dozowania analit ulega rozproszeniu w buforze rozdzielającym (Rys. 7C). Spiętrzanie oznaczanych jonów następuje na skutek elektrokinetycznego dozowania mocnego kwasu (najczęściej 0.1 M HCl). Skutkuje to odwróceniem dysocjacji słabego kwasu, będącego składnikiem buforu rozdzielającego, a tym samym utworzeniem strefy o niskiej przewodności, w której anality ulegają przyśpieszeniu, a następnie spiętrzeniu na granicy utworzonych ośrodków (Rys. 7C i D). Rozdzielanie i detekcja oznaczanych związków następuje poprzez umieszczenie obu końców kapilary w buforze rozdzielającym, a następnie przyłożenie wysokiego napięcia (Rys. 7E). Analogiczny schemat stosuje się w przypadku oznaczania anionów, jednakże w tym przypadku bufor rozdzielający zawiera w swoim składzie kation słabej zasady, a spiętrzanie indukuje elektrokinetyczne dozowanie mocnej zasady (najczęściej 0.1 M NaOH) [55; 56]. Oznaczanie anionów wymaga także ograniczenia, eliminacji lub odwrócenia przepływu elektroosmotycznego [55; 56].



Rys. 7. Schemat mechanizmu wzbogacania analitów kationowych przy pomocy techniki pH-spiętrzania indukowanego kwasem. (A, B) Do kapilary wypełnionej buforem rozdzielającym, zawierającym anion słabego kwasu, elektrokinetycznie dozuję się próbkę. (C) Prowadzi to do rozproszenia oznaczanych kationów w buforze rozdzielającym. (C, D) Elektrokinetyczne dozowanie mocnego kwasu prowadzi do protonowania anionów obecnych w buforze rozdzielającym z utworzeniem słabo zdysocjowanego kwasu HA. (D) W efekcie powstaje strefa o niższej przewodności w stosunku do buforu rozdzielającego, w której analyty ulegają przyspieszeniu, a następnie spiętrzeniu na granicy ośrodków o różnej przewodności. (E) Ostatecznie kationowe składniki próbki ulegają rozdzieleniu, a następnie oznaczeniu przy pomocy detektora. Oznaczenia: A^- - anion słabego kwasu HA, składnik buforu rozdzielającego; zacienione pole symbolizuje bufor rozdzielający.

Eksperymentalnie wyznaczono, iż najbardziej optymalnym stosunek czasu dozowania próbki (przy danym napięciu) do czasu dozowania kwasu (lub zasady) wynosi 1,6 [54; 57]. Jakkolwiek, późniejsze badania wykazały, iż nie jest on stały i zależy od ruchliwości analitu i składu stosowanego buforu rozdzielającego [58]. Czulość w tej technice można dodatkowo zwiększyć poprzez: (i) zastosowanie ciśnienia bezpośrednio po etapie spiętrzania, w celu usunięcia strefy o niskiej przewodności [58]; (ii) obniżenie przewodności próbki, co zwiększa ilość dozowanej substancji w czasie [59]. Niezwykle wysoką sprawność rozdzielania ($> 10^6$ N/m) można uzyskać poprzez łączenie technik pH-spiętrzania i dynamicznego krzyżowania pH [60]. Jakkolwiek, eksperymetalnie wykazano skuteczność tego połączenia jedynie w wąskim zakresie pH stosowanego buforu w stosunku do wartości pK_a oznaczanych substancji [60].

Ogromną zaletą techniki pH-spiętrzania jest możliwość jej stosowania dla próbek o wysokiej sile jonowej [54 - 57], co pozwala na bezpośrednie używanie pH-spiętrzania w analizie próbek biologicznych [59; 61 - 63].

1.6. Dynamiczne krzyżowanie pH

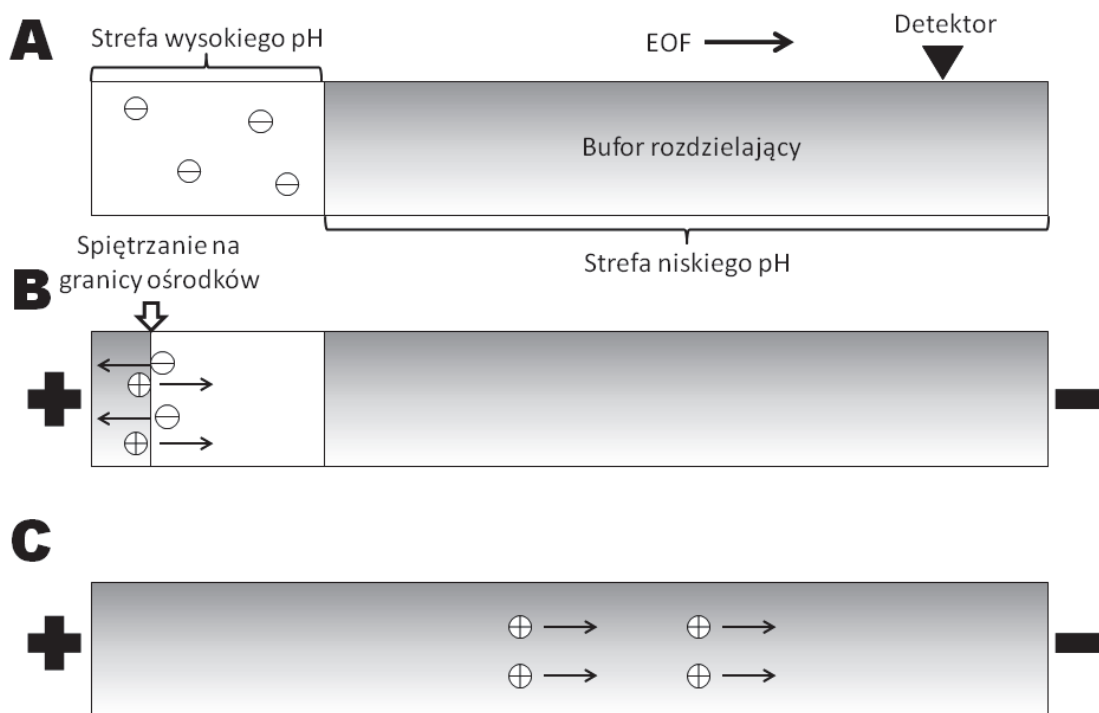
Już na początku lat dziewięćdziesiątych Aebersold i Morrison zaobserwowali wpływ pH matrycy próbki na efekt wzmocnienia sygnału [64]. Dla syntetycznych peptydów rozdzielanych przy pomocy buforu cytrynianowego (pH 2,5), istotną poprawę czułości obserwowano przy zastosowaniu roztworu amoniaku jako matrycy analitycznej próbki, podczas gdy rozpuszczenie analitów w buforze rozdzielającym nie dawało takiego efektu. Co więcej, sprawność układu była stała pomimo zwiększania objętości dozowania amoniakalnego roztworu próbki [64]. Autorzy pracy efekt wzmocnienia sygnału tłumaczyli zmianą zwrotu wektora migracji elektroforetycznej oznaczanych peptydów przebiegającego wraz ze zmianą wartości pH ośrodka (pH matrycy analitycznej próbki $>$ pI analitów, podczas gdy pH buforu rozdzielającego $<$ pI analitów). McKibbin i współ. zaobserwowali efekt wzmocnienia sygnału dla epinefryny podczas analizy preparatów stomatologicznych [65]. Zastosowanie buforu boranowego (pH 10,1) w przypadku badanych próbek (pH 3,0 – 3,5) pozwoliło na poprawę parametrów rozdzielania (wysokość i szerokość sygnału) w obecności stosunkowo dużego stężenia soli w próbce (155 mM NaCl) [65], co wskazywało na spiętrzanie analitu na skutek różnicy w jego jonizacji na granicy dwóch ośrodków, a nie wzmocnienia pola elektrycznego w strefie próbki na skutek reakcji zobojętniania. Duży wkład w wyjaśnienie samego zjawiska miały prace Cao [66 - 68]. Wnikliwa analiza matematyczna zjawiska krzyżowania pH na skutek przyłożonego napięcia została poparta serią eksperymentów z użyciem żelu agarozowego i wskaźników lokalnej zmiany pH. Eksperymenty wykazały występowanie dwóch ośrodków o różnych wartościach pH z wyraźnie zaznaczoną granicą między nimi, na której następowało wzbogacanie analitu.

Termin „dynamiczne (przejściowe) krzyżowanie pH” został zaproponowany przez McKibbina i współ. [69] i obejmuje wszystkie techniki wzmacniania sygnału w elektroforezie kapilarnej polegające na zmianie stopnia jonizacji analitu i (w przypadku amfolitów) zmiany ładunku na skutek różnicy w wartości pH ośrodków. Należy zaznaczyć, iż równolegle stosowany w literaturze termin migrującej granicy

reakcji chemicznej (ang. moving chemical reaction boundary, MCRB) jest pojęciem szerszym, aczkolwiek wykorzystuje się go w odniesieniu do tego samego zjawiska.

Na efektywność procesu mają wpływ zarówno rodzaj i stężenie użytego elektrolitu, jak i pH stosowanych buforów [66 - 68; 70]. Zaznacza się także udział mechanizmu izotachforetycznego [71]. Przykładowy schemat mechanizmu dynamicznego krzyżowania pH dla substancji amfolytycznych został przedstawiony na Rysunku 8.

Technika dynamicznego krzyżowania pH pozwala na wzbogacanie związków o charakterze słabych kwasów i zasad, a także substancji amfolytycznych [65; 69; 70; 72]. Krotność wzmocnienia uzyskiwana przy pomocy tej techniki mieści się w granicach od kilkudziesięciu do kilkuset razy [73], podczas gdy modyfikacje dynamicznego krzyżowania pH oraz łączenie z innymi technikami wzbogacania analitu w kapilarze pozwalają na obniżenie granic wykrywalności nawet o cztery rzędy wielkości [74 - 77].



Rys. 8. Schemat mechanizmu wzbogacania analitów amfolytycznych na drodze dynamicznego krzyżowania pH. (A) Do kapilary wypełnionej buforem rozdzielającym o niskiej wartości pH ciśnieniowo dozowana jest próbka o wysokim pH. Wartość pH próbki jest wyższa od pI analitów, co skutkuje ujemną jonizacją oznaczanych cząsteczek w strefie próbki. (B) Pod wpływem przyłożonego napięcia ujemnie naładowane anality migrują w kierunku anody. W zetknięciu z buforem rozdzielającym ich jonizacja ulega zmianie ($\text{pH buforu} < \text{pI analitów}$). Prowadzi to do spiętrzania analitów na granicy tych dwu ośrodków. (C) Po neutralizacji strefy wysokiego pH na skutek migracji jonów buforu następuje rozdzielanie i detekcja analitów.

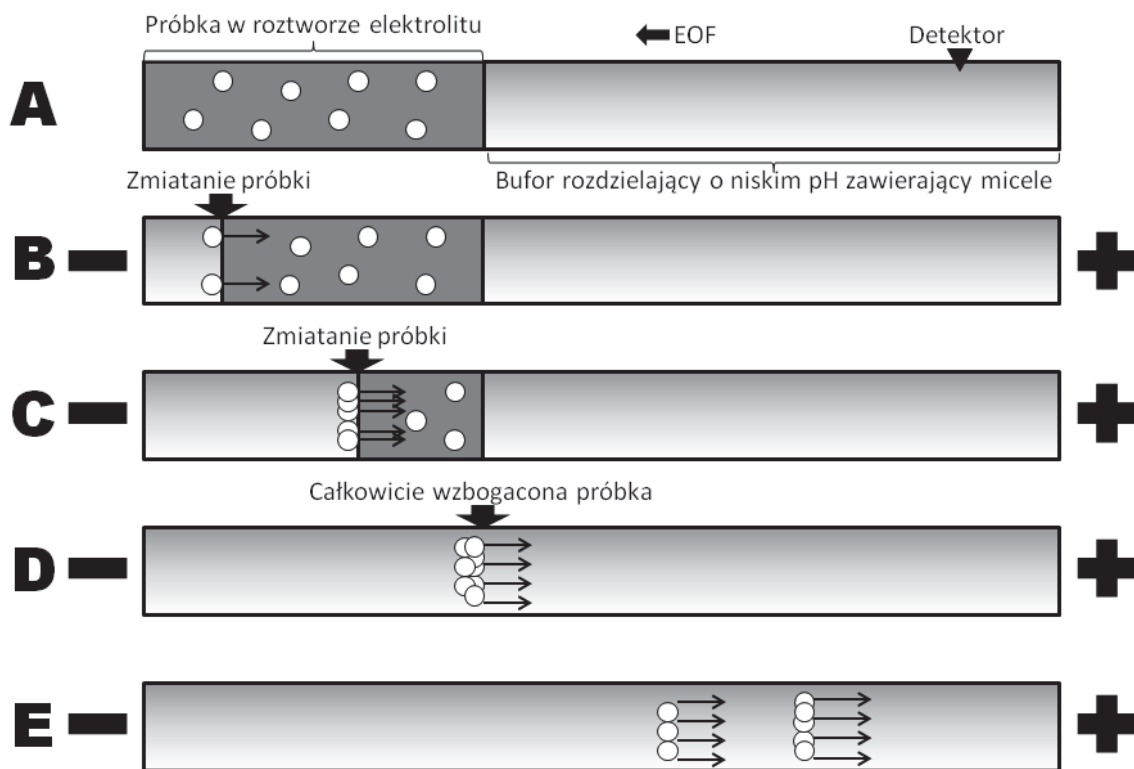
2. Zmiatanie

2.1. Podstawy teoretyczne

W roku 1984 Terabe i współ. opublikowali przełomową pracę dotyczącą zastosowania miceli jako dodatku do buforu rozdzielającego w CE [78]. Umożliwiło to elektrokinetyczne rozdzielanie substancji elektrycznie obojętnych, a tym samym zapoczątkowało nowy rozdział w dziedzinie technik elektromigracyjnych – micelną elektrokinetyczną chromatografię. Fenomen rozdzielania substancji przy pomocy MEKC polega na współistnieniu dwóch faz wewnątrz kapilary: pseudostacjonarnej (micele) i bufora rozdzielającego. Współczynnik podziału (K_D) pomiędzy te dwie fazy, obok zjawisk elektroforetycznych typowych dla konwencjonalnej CZE, odgrywa kluczową rolę w mechanizmie rozdzielania substancji w MEKC. Stopień powinowactwa analitu do fazy pseudostacjonarnej zależy przede wszystkim od właściwości hydrofilowych/hydrofobowych oraz ładunku zarówno analitu, jak i rodzaju użytego surfaktantu. MEKC stanowi obecnie najczęściej stosowany tryb EKC. Duże znaczenie ma także zastosowanie cyklodekstryn, mikroemulsji, a także roztworów polimerów jako fazy pseudostacjonarnej [79].

Oddziaływanie fazy pseudostacjonarnej z analitem może zostać wykorzystane w celu akumulacji (wzbogacenia) oznaczanych związków do postaci wąskiego pasma. Opis tego procesu i teoretyczne jego podstawy zostały przedstawione przez Quirino i Terabe na łamach prestiżowego czasopisma *Science* [80]. Autorzy w swojej pracy, w celu zobrazowania samego procesu, posłużyli się porównaniem do „zmiatania ziarenek ryżu przy pomocy szczotki”. Stąd też pochodzi nazwa omawianej techniki – zmiatanie (ang. sweeping). Schematycznie mechanizm techniki zmiatania został przedstawiony na Rysunku 9. Podstawą zjawiska jest brak fazy pseudostacjonarnej w próbce (Rys. 9 A). Pod wpływem przyłożonego napięcia następuje penetracja fazy pseudostacjonarnej przez strefę próbki (Rys. 9 B - D). Składniki próbki ulegają retencji na micelach, co prowadzi do ich akumulacji i wzbogacenia. Końcowy etap polega na rozdzieleniu analitów na drodze MEKC (Rys. 9 E). W omawianym przykładzie przedstawiono sytuację, w której bufor rozdzielający składa się z surfaktantu anionowego i roztworu elektrolitu o niskiej wartości pH. W efekcie prowadzi to do znikomej jonizacji grup silanolowych na powierzchni kapilary i małej wartości przepływu elektroosmotycznego. W tych warunkach efektywna migracja miceli obecnych w buforze rozdzielającym odbywa się w kierunku anody. W celu detekcji

analitów w tych warunkach stosuje się odwróconą polaryzację elektrod. Z tego względu niektórzy autorzy dodatkowo wyróżniają zmiatanie (lub spiętrzanie) przy pomocy fazy pseudostacjonarnej o odwróconym kierunku migracji miceli (ang. reverse migrating micelles) [79]. Jakkolwiek, idea samego mechanizmu jest taka sama. W niniejszej pracy dla uproszczenia stosowany będzie ujednolicony termin ‘zmiatanie’.



Rys. 9. Schemat przedstawiający proces zmiatania analitów obojętnych elektrycznie przy użyciu buforu rozdzielającego o niskim pH, zawierającego micelle anionowe. (A) Do kapilary wypełnionej buforem rozdzielającym dozowana jest duża objętość próbki niezawierającej miceli. (B - D) Odwrócona polaryzacja elektrod i kwaśne pH buforu skutkuje niewielkim przepływem elektroosmotycznym w kierunku katody, podczas gdy wypadkowa prędkość migracji miceli anionowych w tych warunkach skierowana jest do anody. Przyłożenie wysokiego napięcia powoduje penetrację próbki przez fazę pseudostacjonarną i akumulację analitów po stronie katodowej próbki. (D, E) Po etapie wzbogacania następuje rozdzielanie analitów przy pomocy MEKC i ich detekcja.

Skuteczność efektu zmiatania zależy przede wszystkim od powinowactwa analitu do fazy pseudostacjonarnej. Zależność tą obrazuje poniższe równanie:

$$l_{\text{sweep}} = l_{\text{inj}} \frac{1}{1+k_s} \quad (2)$$

, gdzie: l_{sweep} – długość strefy próbki po procesie zmiatania [cm]; l_{inj} – długość strefy próbki wprowadzonej do kapilary [cm]; k_s – współczynnik retencji analitu w strefie próbki [-].

W efekcie współczynnik EF w technice zmiatania, wyrażony stosunkiem długości strefy dozowanej do długości strefy po procesie wzbogacania (dla dużych wartości k_S), w przybliżeniu równy jest współczynnikowi retencji analitu.

$$EF = \frac{l_{inj}}{l_{sweep}} = 1 + k_S \approx k_S \quad (3)$$

W praktyce zależność ta jest spełniona jedynie dla analitów obojętnych elektrycznie i w przypadkach, gdy przewodność próbki i buforu rozdzielającego są równe ($\gamma = 1$) [81; 82]. Niezgodności eksperymentalne dla zależności (3) dla $\gamma \neq 1$ wynikają ze złożoności i wieloetapowego charakteru procesu zmiatania. W ramach całego procesu można wyróżnić trzy etapy: (i) spiętrzanie lub rozmycie (ang. destacking) miceli na granicy ośrodków bufor rozdzielający/próbka; (ii) właściwy etap zmiatania analitów przez spiętrzoną lub rozmytą fazę pseudostacjonarną; (iii) a także spiętrzanie lub rozmycie zakumulowanej strefy analitów na granicy próbka/bufor rozdzielający [81 - 84].

Zmiany zachodzące w poszczególnych roztworach w kapilarze w procesie wzbogacania przy pomocy techniki zmiatania charakteryzuje współczynnik zmiany stosunku faz θ (ang. phase ratio shift factor):

$$\theta = \frac{\varphi_S}{\varphi_{BGE}} = \frac{k_S}{k_{BGE}} \quad (4)$$

, gdzie: φ_S – stosunek objętości fazy pseudostacjonarnej do wodnej w strefie próbki [-]; φ_{BGE} – stosunek objętości fazy pseudostacjonarnej do wodnej w strefie buforu rozdzielającego [-]; k_{BGE} – współczynnik retencji analitu w strefie buforu [-].

Wpływ współczynnika θ na efekt zmiatania analitów przedstawia poniższe równanie:

$$l_{focus} = \frac{1}{\gamma\theta(1+k_{BGE})} l_{inj} \quad (5)$$

, gdzie: l_{focus} – ostateczna długość strefy próbki po procesie wzbogacania [cm].

Istnieje kilka zagadnień będących konsekwencją Równania (5):

1. Efekt przewodności próbki w procesie zmiatania zaznacza się w mniejszym stopniu dla substancji o dużych wartościach k_{BGE} [82].
2. W przypadku, gdy $\theta = \frac{1}{\gamma}$, efektywność procesu zmiatania jest niezależna od stosunku przewodności próbki i buforu rozdzielającego. Doświadczalnie wykazano, iż dla małych i średnich wartości k_{BGE} (< 5) zależność ta jest

spełniona, pod warunkiem nie występowania dodatkowych efektów takich, jak na przykład różnica w wartościach pH pomiędzy próbką i buforem rozdzielającym (dynamiczne krzyżowanie pH) [81 - 83].

3. Występowanie dodatkowych efektów, związanych z nieproporcjonalną zmianą współczynnika θ w stosunku do różnicy w przewodności faz (γ) tak, iż $\theta \neq \frac{1}{\gamma}$ może prowadzić do poprawy lub pogorszenia efektywności wzbogacania analitu [82]. Wykazano, że dla analitów o niskiej wartości k_{BGE} zastosowanie matrycy analitycznej próbki o wyższej przewodności w stosunku do buforu rozdzielającego pozwala uzyskać większe współczynniki wzmocnienia sygnału niż przy zastosowaniu homogennego pola elektrycznego w całej kapilarze [82; 83]. Zmiana objętości faz w tych przypadkach wynika z różnicy w stabilności miceli w strefie próbki i buforu rozdzielającego, np. wyższe stężenie soli w strefie próbki w stosunku do BGE obniży wartość CMC surfaktantu i przesunie równowagę procesu tworzenia miceli na korzyść micelizacji. Zwiększy to objętość fazy pseudostacjonarnej w strefie próbki, w wyniku czego nastąpi przyrost współczynnika θ [82]. Jakkolwiek, zabieg zwiększania przewodności próbki wykazuje skuteczność jedynie w ograniczonym zakresie ($0.3 < \gamma < 1$) [83]. Dalsze zmiany prowadzą do lokalnych różnic w wartościach przyływu elektroosmotycznego, co wpływa na poszerzenie sygnału.

Jakkolwiek, Równanie (5) nie uwzględnia sytuacji, w których $k_S \neq k_{BGE}$ w wyniku różnic w wartości współczynnika podziału (K_D) analitu w próbce i buforze rozdzielającym. W przypadku większego powinowactwa analitu do fazy pseudostacjonarnej w strefie próbki w stosunku do buforu rozdzielającego ($k_S > k_{BGE}$) obserwuje się wyższe współczynniki wzmocnienia niż w przypadku, gdy $k_S = k_{BGE}$. Z kolei $k_S < k_{BGE}$ skutkuje poszerzeniem pasm analitu w kapilarze. Tłumaczy się to dodatkowym efektem występującym bezpośrednio po procesie penetracji (zmiatania) strefy próbki przez fazę pseudostacjonarną. Efekt ten zachodzi na granicy próbki i roztworu rozdzielającego i wynika z różnicy w prędkości migracji analitów (V_{anal}) w tych dwóch ośrodkach (spiętrzanie). Zjawisko to nosi nazwę ‘efektu różnicy współczynnika retencji’ (ang. retention factor gradient effect, RFGE) [85].

$$\frac{l_{grad}}{l_{sweep}} = \frac{V_{anal,BGE}}{V_{anal,S}} \quad (6)$$

l_{grad} - długość strefy próbki po procesie wzbogacania z uwzględnieniem zjawiska RFGE [cm].

Po przekształceniu Równania (6) otrzymujemy:

$$l_{grad} = \frac{k_S k_{BGE} + k_{BGE}}{k_S k_{BGE} + k_S} \frac{1}{1 + k_S} l_{inj} \quad (7)$$

Równanie (7) uwzględnia modyfikacje w składzie matrycy analitycznej próbki i buforu rozdzielającego takie, jak dodatek rozpuszczalnika organicznego [86; 87] oraz różnice w jonizacji analitu pomiędzy ośrodkami na skutek różnic pH [76; 88]. Zwraca również uwagę fakt, iż efektywność zmiatania zależy nie tylko od współczynnika retencji analitu w strefie próbki, ale także w strefie buforu. W rezultacie, wyższe wartości k_S i niższe wartości k_{BGE} będą predysponować układ do uzyskiwania wyższych liczbowo wartości EF. Z tego względu optymalizacja metody rozdzielania substancji przy użyciu MEKC powinna uwzględniać zarówno skład buforu rozdzielającego jak i (jeśli to możliwe) skład matrycy analitycznej próbki.

Proces zmiatania (podobnie jak spiętrzanie) jest wykorzystywany przede wszystkim do wzbogacania analitów (ogniskowania dużych objętości próbki) w celu poprawy czułości metody analitycznej. Jednakże należy zaznaczyć, iż zjawisko to ma również przełożenie na wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu standardowego dozowania próbki (kilka nL). Maksymalizacja efektywności zmiatania w tym przypadku pozwala na poprawę sprawności i rozdzielczości układu [89].

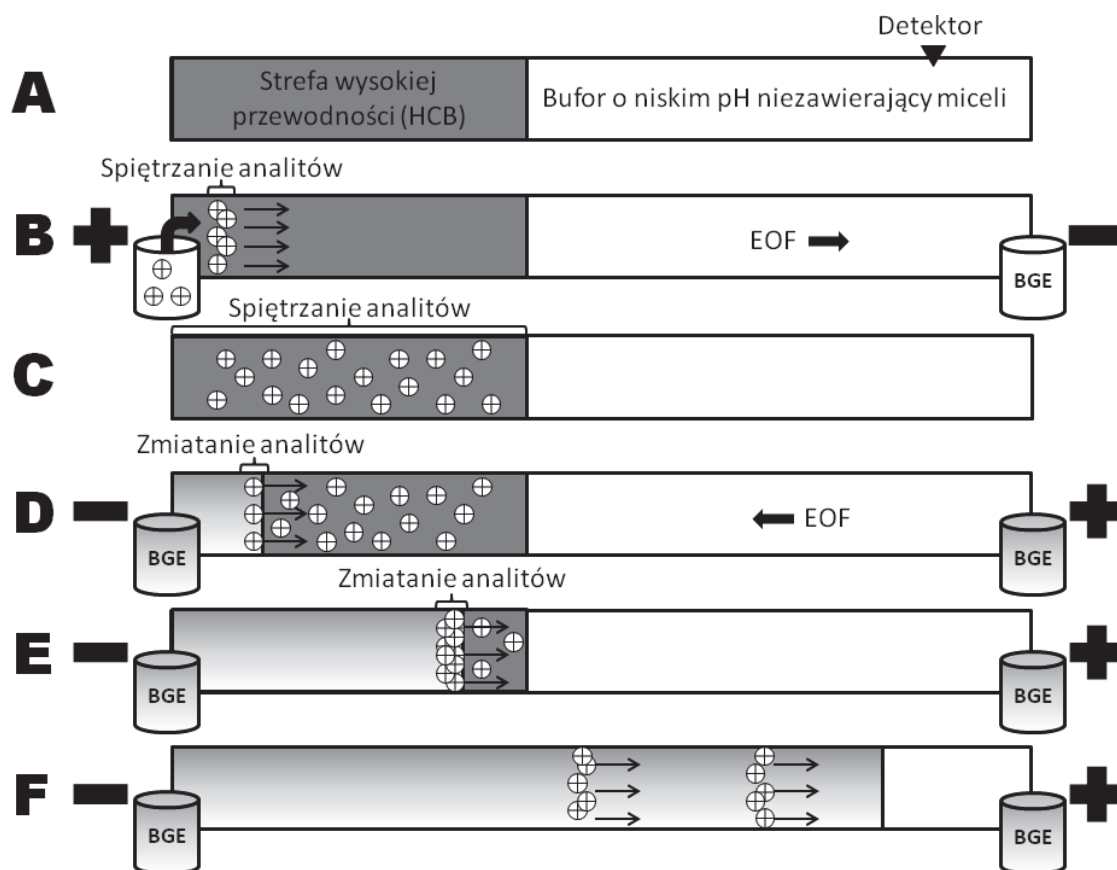
2.2. Elektrokinetyczne dozowanie próbki połączone ze zmiataniem

Właściwy dobór parametrów kluczowych dla procesu zmiatania pozwala na poprawę czułości metody zazwyczaj w zakresie od dwóch do trzech rzędów wielkości [90]. Podobnie jak w przypadku pozostałych technik, tak i tu objętość próbki poddanej procesowi wzbogacania ogranicza końcowy efekt wzmocnienia sygnału. Doniesienia literaturowe w tym względzie obejmują nie tylko dozowanie dużych objętości próbek (od kilkunastu do kilkadziesiąt procent całkowitej długości kapilary) [90], ale także wypełnianie całej objętości kapilary próbka, a następnie zmiatanie i rozdzielanie składników [91]. Ograniczenie związane z pojemnością kapilary o małej średnicy wewnętrznej może zostać przezwyciężone poprzez zastosowanie wielokrotnego

dozowania próbki [15; 16]. Może to jednakże prowadzić do stopniowej utraty sprawności rozdzielania układu wraz z kolejnymi etapami ogniskowania [15; 16].

Jak już wspomniano w Rozdziale I.1.3., dozowanie elektrokinetyczne próbki pozwala na nieproporcjonalne w stosunku do objętości wprowadzanie analitów do kapilary. W praktyce pozwala to na dozowanie znacznie większej ilości substancji niż w przypadku dozowania ciśnieniowego. Jakkolwiek, zachowanie wysokiej sprawności rozdzielania w połączeniu z dozowaniem elektrokinetycznym próbki wymaga wykorzystania dodatkowych efektów takich, jak na przykład spiętrzanie. Wydłużenie czasu dozowania próbki prowadzi jednak do stopniowego spadku intensywności sygnału i poszerzania się uzyskiwanego pasma oznaczanej substancji [23]. Z kolei zastosowanie dodatkowego mechanizmu wzbogacania analitu w kapilarze takiego, jak zmiatanie, pozwala na rozwiązanie tego problemu.

Zastosowanie dozowania elektrokinetycznego próbki w połączeniu ze zmiataniem zostało po raz pierwszy opisane przez Quirino i Terabe [24]. Schemat tej techniki na przykładzie oznaczania analitów kationowych został przedstawiony na Rysunku 10. Do kapilary wypełnionej roztworem elektrolitu o niskiej wartości pH (niezawierającym fazy pseudostacjonarnej) wprowadza się roztwór elektrolitu o wysokiej przewodności (Rysunek 10A). Następnie elektrokinetycznie dozuje się próbkę, która ulega spiętrzeniu w strefie o wysokiej przewodności (Rysunek 10B). Na skutek długiego czasu dozowania próbki anality ulegają rozproszeniu w strefie o wysokiej przewodności (Rysunek 10C). Kolejny etap polega na umieszczeniu końców kapilary w micelarnym buforze rozdzielającym i zmianie polaryzacji elektrod (Rysunek 10D). Prowadzi to do penetracji strefy wysokiej przewodności przez fazę pseudostacjonarną i zmiatanie zawartych w niej analitów (Rysunek 10D i E). Po etapie zmiatania następuje rozdzielenie oznaczanych związków przy pomocy MEKC (Rysunek 10F).



Rys. 10. Schemat mechanizmu techniki SEI w połączeniu ze zmiataniem w MEKC. (A) Do kapilary wypełnionej buforem o niskim pH niezawierającym surfaktantu wprowadza się elektrolit o wysokiej przewodności. (B) Próbkę o niskiej przewodności, zawierającą zjonizowane anality, elektrokinetycznie dozuje się do kapilary. (B, C) Skutkuje to spiętrzeniem się analitów w strefie HCB. (D, E) Zmiana polaryzacji elektrod, a także rezerwuarów na końcach kapilary na micelarny bufor rozdzielający, prowadzi do penetracji strefy HCB przez anionowe micelle i akumulacji analitów. (F) Po procesie zmiatania następuje rozdzielanie analitów przy pomocy MEKC. Ciemna strefa na rysunku reprezentuje roztwór HCB. Biała strefa symbolizuje kwaśny bufor elektrolitu w wodzie. Szara strefa to micelarny bufor rozdzielający.

Bardzo wysokie współczynniki wzmocnienia (do sześciu rzędów wielkości) uzyskiwane przy pomocy tej techniki wynikają przede wszystkim z dużej ilości analitów wprowadzonej do kapilary poprzez zastosowanie długiego (od kilku do kilkunastu minut) dozowania elektrokinetycznego przy stosunkowo wysokim napięciu (zwykle > 10 kV) [24; 92]. Prowadzi to do znacznego zubożenia próbki używanej podczas analizy (ang. selective exhaustive injection, SEI). Kluczowe czynniki wpływające na efekt wzmocnienia sygnału w tej technice to parametry dozowania próbki, długość i przewodność w strefie buforu o wysokiej przewodności (ang. high conductivity buffer, HCB), przewodność próbki, a także stężenie surfaktantu. Jakkolwiek, analiza chemometryczna wykazała, iż stężenie elektrolitu w strefie HCB nie wpływa na poprawę czułości metody pod warunkiem, że stosunek

κ_{HCB} do $\kappa_{\text{Próbki}} > 30$ [93]. Długość strefy HCB z kolei bezpośrednio zależy od parametrów dozowania (czas, napięcie/natężenie) i powinna być dostatecznie duża, aby zapewnić spiętrzenie wszystkich analitów w jej obrębie [93]. Wykazano także, że zastosowanie krótkiej strefy o niskiej przewodności bezpośrednio przed dozowaniem próbki nie poprawia uzyskiwanych wyników w przypadku długiego dozowania elektrokinetycznego [23; 24; 92; 93]. Tłumaczy się to stopniowym wzrostem przewodności strefy na skutek migracji jonów w czasie dozowania próbki [93; 94]. Dalsze badania wykazały wzrost powtarzalności metody przy zastosowaniu stałego natężenia prądu zamiast stałego napięcia podczas dozowania próbki [95]. Zaobserwowano również poprawę czułości techniki w przypadku użycia fosforanu monosodowego zamiast kwasu fosforowego w roli HCB, co tłumaczy się występowaniem dodatkowego efektu izotachforetycznego [95].

Obecnie SEI w połączeniu z techniką zmiatania jest jednym z najskuteczniejszych sposobów poprawy czułości w CE. Jej wadą jest brak możliwości wzbogacania analitów neutralnych oraz jednoczesnego dozowania jonów różnoimiennych. Niemniej jednak, omawianą technikę z powodzeniem wykorzystuje się do oznaczania zarówno związków organicznych [24; 92], jak i nieorganicznych [96] oraz przy zastosowaniu MEKC [24; 92], MEEKC [97], a także zmiatania próbki przez kompleksowanie [96]. Wykazano także aplikacyjność tej techniki w analizie dwuwymiarowej w CE [40; 98].

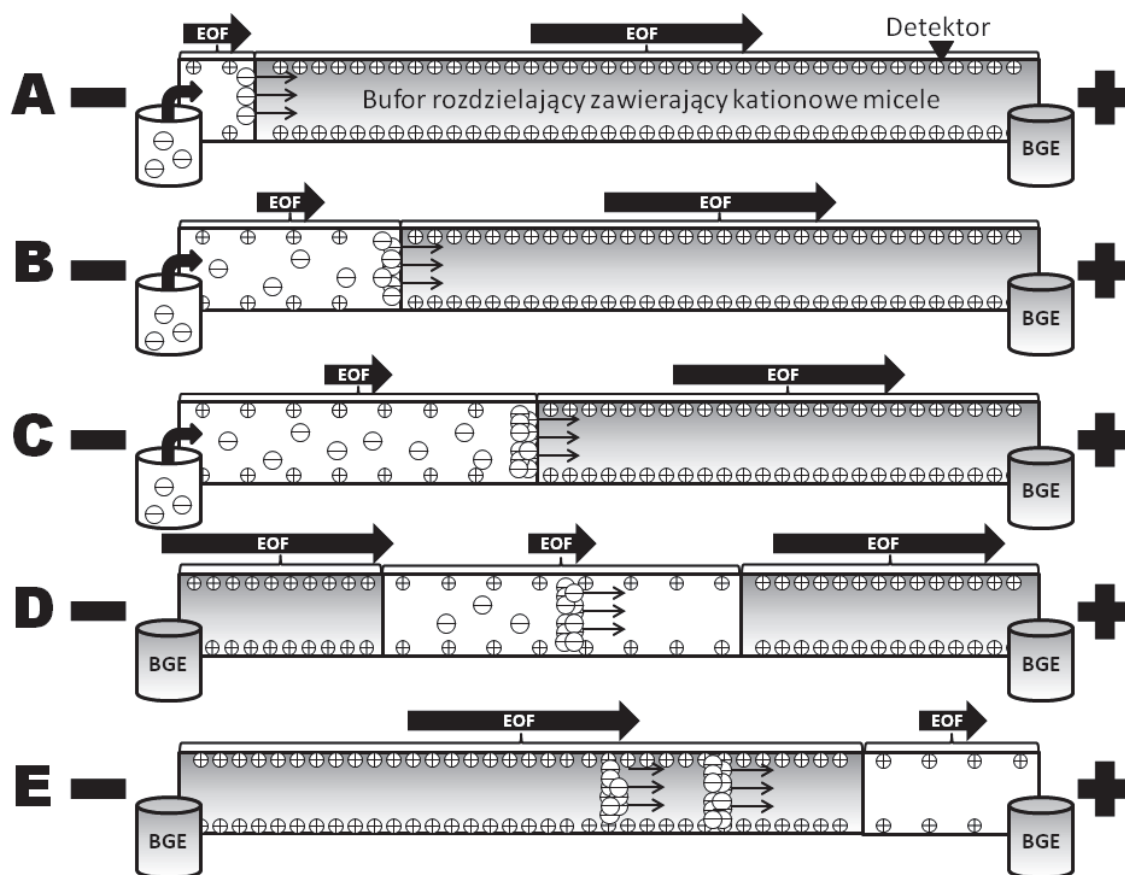
2.3. Inne mechanizmy wzbogacania z użyciem fazy pseudostacjonarnej

Pierwsze doniesienia na temat procesu zmiatania dotyczyły zastosowania miceli anionowych jako fazy pseudostacjonarnej [80]. Późniejsze prace wykazały skuteczność zmiatania przy pomocy miceli kationowych [99], mikroemulsji [100], cyklodekstryn [100], a także niejonowych polimerów organicznych [101]. Zastosowanie tych ostatnich ogranicza się jedynie do analitów jonowych. Interesujący jest również fakt, iż w przypadku standardowego procesu zmiatania, faza pseudostacjonarna penetruje strefę próbki akumulując zawarte w niej substancje, podczas gdy użycie niejonowego surfaktantu prowadzi do akumulacji analitów w roztworze polimeru podczas migracji elektroforetycznej [90]. Zjawisko to przypomina raczej technikę spiętrzania, jednakże nagła zmiana w ruchliwości elektroforetycznej analitu na skutek oddziaływań analit – polimer zależy od powinowactwa jonu do fazy pseudostacjonarnej, a proces wzbogacenia opisuje Równanie (2).

Podobny mechanizm wzmacniania siły sygnału został wykorzystany w technice przejściowego pułapkowania (ang. transient trapping) analitów [102]. Dozowanie elektrokinetyczne analitów poprzedzone jest wprowadzeniem do kapilary krótkiej strefy zawierającej fazę pseudostacjonarną (micelle). Anality dozowane do kapilary ulegają przejściowemu pułapkowaniu w strefie micelarnej, co prowadzi do zawężenia pasm oznaczanych substancji. Po opuszczeniu strefy jonu migrują w kierunku detektora ulegając rozdzieleniu. Omawiana technika pozwala na kilkusetkrotną poprawę czułości metody. Wykazano także możliwość jej stosowania w układach mikroczipowych [102; 103].

Bardzo wysokie współczynniki wzmocnienia (3 - 4 rzędy wielkości) można uzyskać przy jednoczesnym stosowaniu dozowania elektrokinetycznego i MEKC z dynamiczną immobilizacją fazy pseudostacjonarnej (wypadkowa prędkość poruszania się miceli w kapilarze równa 0). Efekt ten można uzyskać poprzez: (i) lokalną różnicę w wartościach EOF w kapilarze [104; 105] lub (ii) dobór odpowiedniego pH buforu [106].

(i) Wzbogacanie analitów anionowych przy użyciu pierwszej metody polega na zastosowanie odwróconego przepływu elektroosmotycznego (dodatek surfaktantu kationowego do buforu rozdzielającego) i ujemnej polaryzacji elektrod. Elektrokinetyczne dozowanie próbki w buforze bez dodatku surfaktantu kationowego prowadzi do destabilizacji dynamicznej powłoki kationowej na powierzchni części kapilary (Rysunek 11A - C). W efekcie obserwuje się niejednorodny rozkład wartości EOF w kapilarze, niższy w stosunku do sytuacji wyjściowej. W tej sytuacji prędkość migracji elektroforetycznej miceli jest kompensowana ograniczonym EOF. Akumulacja analitów w fazie pseudostacjonarnej następuje na granicy stref próbka/bufor rozdzielający (Rysunek 11A - C). Po zakończeniu dozowania następuje końcowa akumulacja analitów (Rysunek 11D), a następnie rozdzielenie przy pomocy MEKC (Rysunek 11E) [104]. Podobny mechanizm został opracowany dla wzbogacania analitów kationowych. W tym wypadku kapilarę wypełnia się roztworem surfaktantu anionowego, a dozowanie próbki i rozdzielanie substancji odbywa się przy dodatniej polaryzacji elektrod. Istotą procesu jest niska wartość pH próbki. Elektroosmotyczne wprowadzenie matrycy powoduje miejscowe hamowanie przepływu wewnątrz kapilary, co także prowadzi do obniżenia wypadkowej wartości EOF w całej kapilarze i dynamiczną immobilizację miceli [105].



Rys. 11. Schemat techniki wzbogacania analitów na drodze dynamicznej immobilizacji miceli na przykładzie oznaczania analitów anionowych. (A) Do kapilary wypełnionej micelarnym buforem rozdzielającym elektrokinetycznie dozujemy się próbkę pozbawioną dodatku surfaktantu, podczas gdy stosowany bufor zawiera micelle. Obecność surfaktantu kationowego skutkuje odwróconym przepływem elektroosmotycznym. Z tego względu analizę prowadzi się przy odwróconej polaryzacji elektrod. (A – C) Wprowadzanie do kapilary próbki pozbawionej surfaktantu destabilizuje powłokę surfaktantu na ścianie kapilary, co znacznie zmniejsza wartość EOF w tym regionie. Prowadzi to do zmniejszenia wypadkowej wartości EOF w całej kapilarze i niwelowania elektroforetycznej migracji miceli w kierunku przeciwnym do kierunku EOF. (D) Po dozowaniu próbki następuje zmiana rezerwuaru katodowego na bufor rozdzielający i dalsze ogniskowanie analitów. (E) Końcowy etap polega na wyrównaniu wartości EOF w kapilarze i rozdzieleniu substancji przy pomocy MEKC. Rysunek został sporządzony na podstawie [104]. Zacieniowane pola symbolizują bufor z dodatkiem kationowej fazy micelarnej, podczas gdy biała strefa oznacza bufor bez tenzydu. ⊕ - kationowy surfaktant na wewnętrznej powierzchni kapilary. Gęstość rozmieszczenia symbolizuje intensywność powlekania wewnętrznej ścian kapilary. ⊖ - anionowy składnik próbki (analit).

(ii) Drugi przypadek dotyczy dozowania elektrokinetycznego substancji elektrycznie obojętnych. U podstaw tej techniki leży zerowa wypadkowa prędkość migracji miceli w obecności pola elektrycznego [106]. Stan stacjonarny uzyskuje się poprzez właściwy dobór pH buforu, przy którym migracja elektroforetyczna fazy pseudostacjonarnej jest redukowana przez przepływ elektroosmotyczny [107]. W omawianym przykładzie dozowanie elektrokinetyczne analitów neutralnych (18 kV przez 70 minut) do kapilary wypełnionej buforem o pH = 5, zawierającym 50 mM SDS,

pozwoili na wprowadzenie próbki o objętości równoważnej pięćdziesięciu jeden objętościom stosowanej kapilary (średnica: 50 μm , całkowita długość: 30 cm). Po etapie dozowania rezerwuary na końcach kapilary zostały wymienione na roztwory o podobnym składzie, jednakże innym pH (8.0), co zaowocowało mobilizacją miceli, zmiataniem analitów i obniżeniem granicy wykrywalności o ponad 20 000 razy dla oznaczanych flawonoidów. Ten imponujący wynik jest jednym z najwyższych współczynników wzmocnienia uzyskanych dla analitów obojętnych elektrycznie [106]. Jakkolwiek, pomimo bardzo wysokich współczynników wzmocnienia, stosunkowo długi czas dozowania we wszystkich omawianych przypadkach znacznie ogranicza praktyczne wykorzystanie tych technik [104 - 106].

Obok faz pseudostacjonarnych typowych dla ECK, zmiatanie może również zachodzić w technice CZE za sprawą kompleksowania analitów przez składnik buforu rozdzielającego, który w tym przypadku pełni funkcję czynnika zmiatającego. Najczęściej zjawisko to wykorzystywane jest do wzbogacania i oznaczania cząsteczek, zawierających w swojej strukturze ugrupowanie cis – diolowe, a przeprowadzane jest z użyciem buforu boranowego [108]. Aplikacyjność tego podejścia wykazano w przypadku analiz zawartości cukrów [108], metabolitów kwasów nukleinowych [109] i niektórych alkaloidów [110]. Ostatnie prace zwracają uwagę na wieloetapowych charakter zmiatania przy użyciu jonów boranowych [111].

Kompleksowanie jonów metali przez związki organiczne jest również szeroko rozwiniętym zagadnieniem w kontekście techniki zmiatania. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się jony wersenianowe [96; 112]. Jakkolwiek, proces kompleksowania znalazł także wykorzystanie w oznaczaniu związków organicznych takich, jak na przykład aminokwasy, w obecności jonów metali jako dodatku do buforu rozdzielającego [113].

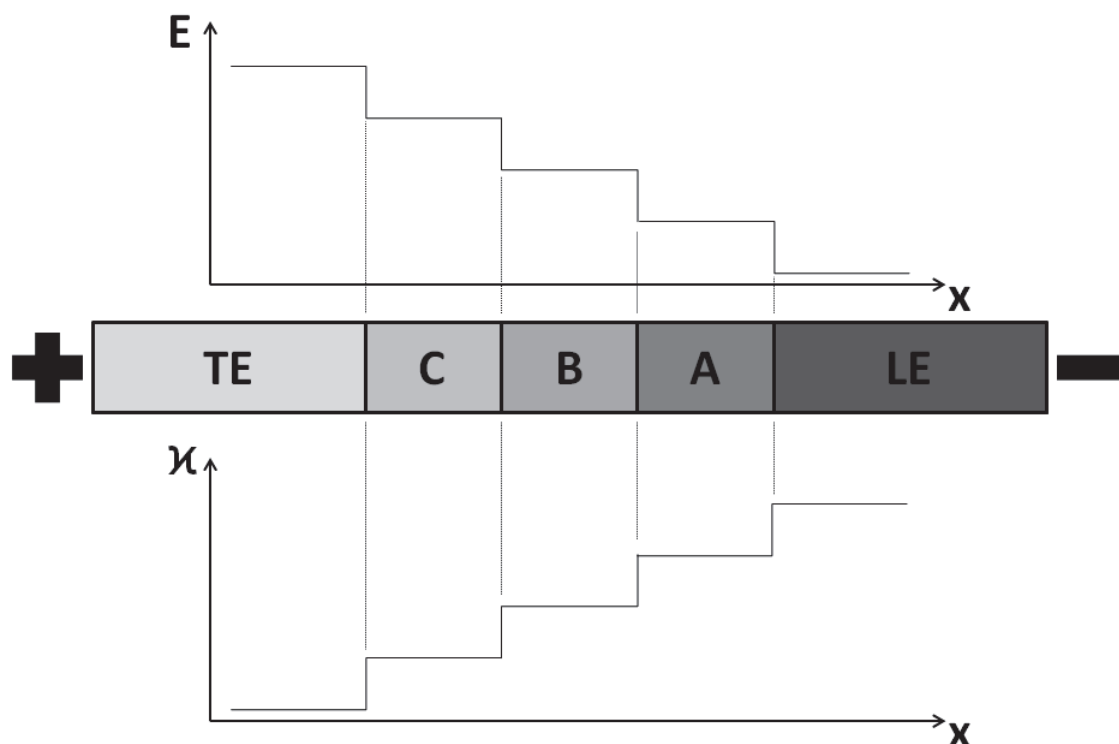
Kompleksowanie analitów umożliwia rozdzielanie substancji obojętnych elektrycznie [108], a także detekcję UV substancji nie posiadających ugrupowań chromoforowych w swojej strukturze [108; 113]. Dodatkowo, zmiatanie jonów metali przy pomocy organicznych związków kompleksujących jest kompatybilne z detekcją MS [112].

3. Izotachoforeza (ITP)

3.1. Mechanizm ITP

Termin „izotachoforeza” pochodzi z greki i oznacza „migrację ze stałą prędkością”. Podczas gdy rozdzielanie substancji w CZE polega na różnicach w efektywnej prędkości poruszania się jonów, tak w przypadku ITP prędkość migracji cząsteczek jest równa, a rozdzielanie substancji następuje na skutek różnicy w ruchliwości elektroforetycznej indywiduów chemicznych. Układ rozdzielający w typowej ITP składa się z dwóch roztworów buforowych, z których jeden zawiera jony o ruchliwości większej od oznaczanych składników, a drugi jony o ruchliwości niższej od analitu. Roztwory te noszą nazwy odpowiednio elektrolitu wiodącego (LE) i elektrolitu ograniczającego (kończącego, terminującego, TE). Proces izotachoforezy, w odróżnieniu od innych omawianych technik, prowadzony jest w warunkach stałego natężenia prądu elektrycznego, którego przepływ warunkowany jest stałą szybkością poruszania się jonów na całej długości kapilary. Z tego względu następuje uporządkowanie jonów według ich wzrastającej ruchliwości elektroforetycznej. Uporządkowanie stref względem ruchliwości jonów w polu elektrycznym (przewodności roztworów) prowadzi do niejednorodnego rozkładu (gradientu) pola elektrycznego wewnątrz kapilary ($E_{LE} < E_{anal} < E_{TE}$). W konsekwencji jon o danej ruchliwości elektroforetycznej będzie przyspieszany w kontakcie ze strefą o wyższym polu elektrycznym, podczas gdy jego prędkość poruszania się będzie maleć w niższym polu elektrycznym (samoorganizacja stref w ITP). Omówiony rozkład sił pola elektrycznego i przewodności w kapilarze został przedstawiony na Rysunku 12.

Ze względu na mechanizm rozdzielania ITP znalazła zastosowanie w oznaczaniu nieorganicznych i organicznych jonów przede wszystkim w analizie wód różnego pochodzenia (głównie przemysł spożywczy i analizy środowiskowe). Proces rozdzielania w ITP prowadzi się przy użyciu jednej lub dwóch połączonych ze sobą kapilar. Na szczególną uwagę zasługuje drugi z wymienionych układów. Umożliwia on nie tylko prowadzenie analiz dwuwymiarowych, co zwiększa potencjał aplikacyjny techniki, ale również pozwala na wykorzystanie ITP do wzbogacania próbki w pierwszej kapilarze, a następnie rozdzielanie i oznaczenie składników w drugim etapie analizy. Możliwość jednoczesnej detekcji analitów w obu kapilarach, a także szeroka oferta komercyjnych urządzeń do ITP czyni z niej bardzo atrakcyjne narzędzie analityczne [114].



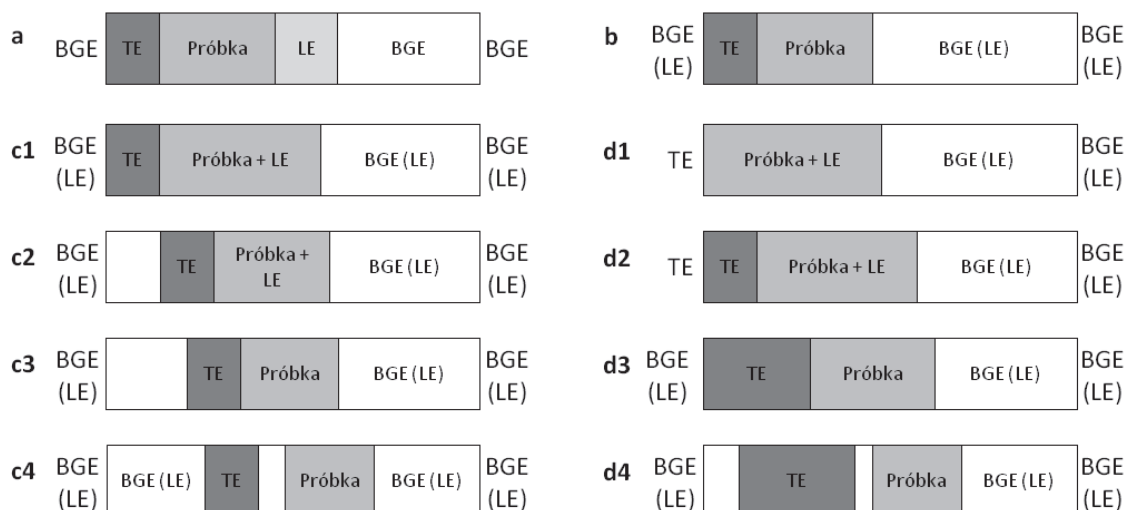
Rys. 12. Schemat przedstawiający rozkład wartości pola elektrycznego i przewodność poszczególnych stref roztworów w kapilarze podczas izotachforetycznego rozdzielania kationowych substancji A, B i C. Warunki: $I = \text{const.}$ i $\mu_{LE} > \mu_A > \mu_B > \mu_C > \mu_{TE}$.

3.2. Przejściowa izotachforeza (tITP)

Dwuwymiarowa analiza ITP – CZE umożliwia znaczącą poprawę czułości oznaczeń w stosunku do standardowej CZE. W pionierskiej pracy na ten temat Foret i współ. uzyskali tysiąckrotnie niższe granice wykrywalności dla użytych białek testowych [115]. W cytowanym artykule autorzy zwrócili również uwagę na możliwość efektywnego dozowania dużych objętości próbki (do 50% całkowitej objętości kapilary) w zależności od składu matrycy analitycznej, co zaowocowało około pięćdziesięciokrotnym wzmocnieniem siły sygnału. Obserwowane zjawisko polegało na występowaniu przejściowego (chwilowego) etapu izotachforetycznego (ang. transient isotachopheresis, tITP), w którym składnik próbki pełnił funkcję LE, a składnik buforu rozdzielającego rolę TE. Był to więc proces analogiczny do obserwowanego w przypadku dwuwymiarowej analizy ITP – CZE z tą różnicą, że tITP zachodziła w jednej kapilarze (co stanowi niewątpliwą zaletę proponowanego rozwiązania), a uzyskiwana poprawa siły sygnału była zdecydowanie wyższa dla techniki dwukolumnowej. Jakkolwiek, różnice w wartościach wzbogacenia w tym przypadku wynikały z geometrii stosowanych kapilar (znacznie większa średnica

wewnętrzna pierwszej kapilary w stosunku do drugiej w układzie dwuwymiarowym) [115].

Późniejsze badania wykazały, iż tITP nie ogranicza się jedynie do przypadków, gdy jeden ze składników próbki pełni rolę LE, podczas gdy TE jest składnikiem buforu rozdzielającego. Rysunek 13 przedstawia niektóre z możliwych układów LE – TE – BGE – próbka. Na podanej rycinie na uwagę zasługuje duża dowolność konfiguracji stosowanych elektrolitów. Funkcję LE i TE mogą pełnić jony dozowane bezpośrednio przed i za próbką w postaci krótkich pasm (Rysunek 13a). W innych układach makrokomponent buforu rozdzielającego może przejąć funkcję jednego ze składników układu (LE lub TE), podczas gdy drugi umieszczany jest przed lub za strefą próbki (Rysunek 13b). Dodatkowo, matryca próbki może zawierać jony LE lub TE (Rysunek 13c, d). Omawiana różnorodność układu tITP ma przełożenie na częste obserwowanie efektów izotachforetycznych w innych technikach elektroforetycznych. Zagadnienie to zostało omówiony w dalszej części niniejszego rozdziału [116; 117].



Rys. 13. Różne konfiguracje układu LE – TE – BGE – próbka, dla których zachodzi zjawisko tITP: (a) Standardowa tITP; (b) tITP z buforem rozdzielającym pełniącym funkcję LE; (c) tITP indukowana składem próbki z regularnym przejściem z ITP do CE; (d) tITP indukowana składem próbki z początkowym etapem ITP. Nieoznakowane białe strefy symbolizują bufor rozdzielający (BGE) pełniący funkcję LE. Rysunek i komentarz na podstawie [116].

Istnieją dwa warunki konieczne do zajścia izotachforetycznego spiętrzenia składników próbki. Pierwszy obejmuje różnicę w ruchliwości elektroforetycznej komponentów układu izotachforetycznego tak, iż $\mu_{LE} > \mu_{próbki} > \mu_{TE}$. Drugi natomiast, dotyczy znacznie wyższego stężenia elektrolitów LE i TE w stosunku do składników próbki. W rezultacie stężenie analitu w strefie po procesie tITP przedstawia poniższe wyrażenie:

$$C_{\text{stack}} = K C_{\text{LE}} = \frac{\mu_{\text{anal}} (\mu_{\text{LE}} + \mu_{\text{Q}})}{\mu_{\text{LE}} (\mu_{\text{anal}} + \mu_{\text{Q}})} C_{\text{LE}} \quad (8)$$

, gdzie Q oznacza przeciwjon. Z równania wynika, iż większy efekt wzmocnienia będzie obserwowany w obecności wyższego stężenia jonu wiodącego. Zależność ta nie uwzględnia wpływu jonu terminującego na proces wzbogacania próbki. Wykazano, że w przypadku, gdy TE jest składnikiem próbki, jego niższe stężenie poprawia uzyskiwany efekt wzmocnienia sygnału na skutek wyższego pola elektrycznego w rezerwuarze próbki podczas dozowania [118]. Z drugiej jednak strony, większa ilość użytego TE przedłuża czas izotachforetycznego ogniskowania analitów, przez co krócej ulegają one dyspersji elektroforetycznej w czasie rozdzielania elektroforetycznego [116]. Zbytnie wydłużenie procesu tITP w trakcie całego procesu analitycznego prowadzi do pogorszenia rozdzielczości [116; 117]. Z tego względu etap izotachforetyczny należy indywidualnie optymalizować w toku opracowywania metody analitycznej, a czas jego trwania można kontrolować poprzez stężenie jonu terminującego, objętość dozowanej strefy TE (Rysunek 13c) lub czas przykładanego napięcia do naczynka wypełnionego TE (Rysunek 13d) [116; 117].

Jednoczesne stosowanie roztworów o różnym składzie jakościowym, sile jonowej i wartości pH (BGE, TE, LE) skutkuje różnicą w lokalnych wartościach EOF. Co więcej, obecność hydrodynamicznego przepływu w kapilarze powoduje poszerzenie uzyskiwanych sygnałów. Z tego względu wyższe wartości współczynników wzmocnienia obserwowane są w układach, w których EOF = 0 [118]. W tym celu stosuje się powlekanie wewnętrznej powierzchni kapilar (lub kanałów mikroczipu) substancjami eliminującymi EOF [118] lub stosuje się zewnętrzne ciśnienie w celu neutralizacji przepływu [119 - 121].

Zastosowanie tITP umożliwia efektywne wzbogacanie nawet dużych objętości próbki [115]. Jakkolwiek, dozowanie elektrokinetyczne próbki pozwala na wprowadzenie znacznie większej ilości substancji w stosunku do dozowania ciśnieniowego. Zagadnienie to było już omawiane w Rozdziałach (I.1.3. i I.2.2.). Wykazano, iż połączenie tITP z techniką FASI (ang. electrokinetic supercharging, EKS) pozwala na uzyskanie bardzo wysokich liczbowo współczynników wzmocnienia w stosunku do standardowego dozowania ciśnieniowego [21; 26; 118 - 121]. Dla porównania, zastosowanie techniki FASI pozwoliło na około dwustukrotną poprawę czułości detekcji wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych, podczas gdy rozwinięcie opracowanej metodologii o proces tITP zaowocowało dalszym

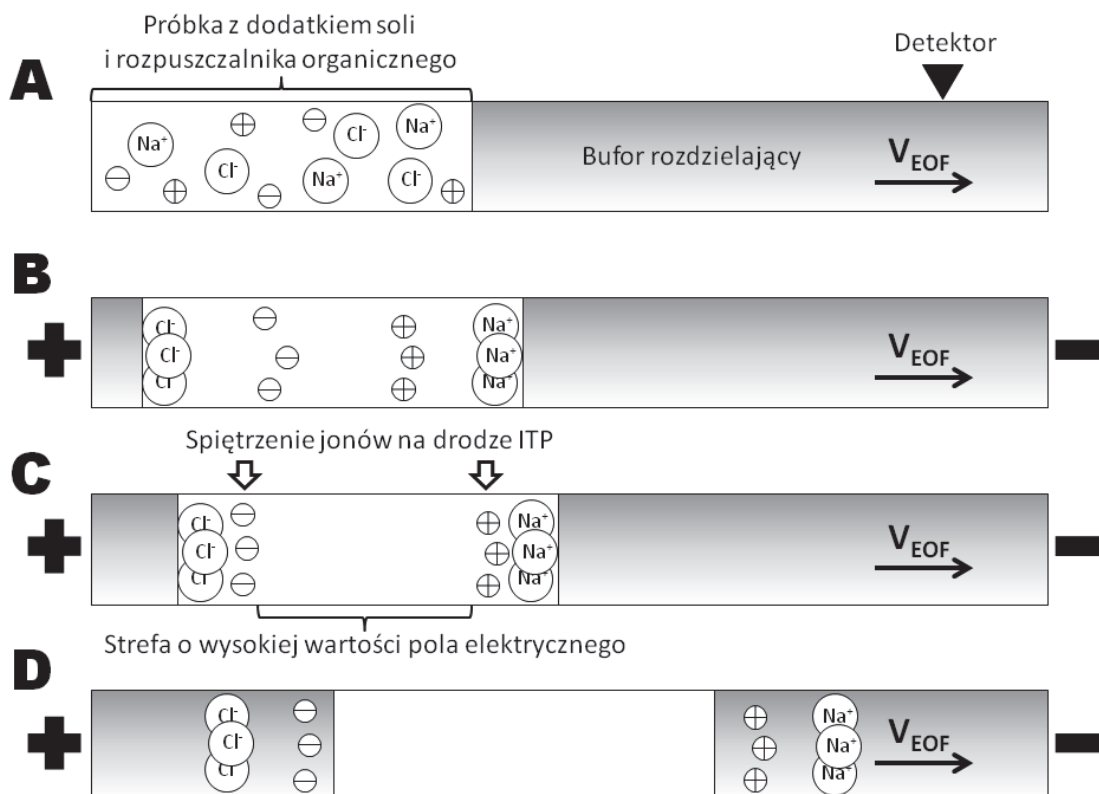
dwunastokrotnym wzmocnieniem siły sygnału [21]. Obecnie, obok omawianej już techniki SEI w połączeniu ze zjawiskiem zmiatania (Rozdział I.2.2.), EKS stanowi najefektywniejszą znaną metodę wzmacniania siły sygnału w CE.

3.3. Przejściowa pseudo-izotachoforeza (p-ITP)

Najbardziej kluczowym elementem optymalizacji procesu ITP jest właściwy dobór LE i TE. W większości przypadków jony sodowe (lub potasowe, w analizie kationów) i chlorkowe (w analizie anionów) doskonale spełniają rolę LE, jako że ich ruchliwość elektroforetyczna jest wyższa od większości jonów organicznych i nieorganicznych. Z kolei dobór właściwego TE nie zawsze jest tak oczywisty i często nastręcza pewnych trudności. Zazwyczaj funkcję tę pełnią duże jony organiczne jak cytrynianowy czy tetrabutylamonowy [114].

Alternatywą dla klasycznego podejścia wykorzystującego typowe roztwory buforowe LE i TE jest zastosowanie rozpuszczalnika organicznego w funkcji TE [122 - 124]. Jak już wspomniano powyżej, mechanizm ITP polega przede wszystkim na różnicy w wartościach lokalnego pola elektrycznego w kapilarze (Rysunek 12). Najwyższą wartość pola elektrycznego obserwuje się dla strefy TE, w której ruchliwość jonów ograniczających jest najniższa i w której pozostałe jony układu będą przyspieszane (samoorganizacja ITP). W swoich pracach dotyczących analizy CE próbek biologicznych, poddanych deproteinizacji z użyciem acetonitrylu (ACN), Shihabi zaobserwował wyższą sprawność układu w stosunku do próbek niezawierających rozpuszczalnika organicznego [122]. Omawiany proces został nazwany przejściową pseudo-izotachoforezą (ang. transient pseudo-isotachopheresis, p-ITP) [124], a jej mechanizm został przedstawiony na Rysunku 14. Próbką zawierającą zarówno anality kationowe, jak i anionowe, rozpuszczalnik organiczny oraz stosunkowo dużą zawartość jonów o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej (jony sodowe i chlorkowe), dozowana jest do kapilary wypełnionej buforem rozdzielającym (Rysunek 14A). Po przyłożeniu napięcia następuje migracja jonów dodatnich w kierunku katody i anionów w kierunku anody (Rysunek 14B). Migracja jonów w kierunku elektrod skutkuje zubożeniem w nośniki ładunku centralnej strefy próbki, w której obserwuje się znacznie wyższe pole elektryczne na skutek obecności rozpuszczalnika organicznego. W efekcie obserwuje się proces tITP, w którym jony Na^+ i Cl^- pełnią funkcję LE dla (odpowiednio) kationów i anionów, a ACN służy jako

TE (pseudo-TE, Rysunek 14C). Po etapie izotachforetycznego spiętrzenia jonów następuje rozdzielanie i detekcja składników na drodze CZE (Rysunek 14D) [123].



Rys. 14. Schemat mechanizmu p-ITP. (A) Próbkę zawierającą znaczną ilość NaCl i rozpuszczalnik organiczny (np. ACN) dozowana jest do kapilary wypełnionej buforem rozdzielającym do CZE. (B) Po przyłożeniu napięcia następuje migracja jonów w kierunku elektrod o przeciwnych znakach. (C) Migracja jonów skutkuje zubożeniem w nośniki ładunku elektrycznego centralnej strefy próbki, gdzie obserwowane jest wyższe pole elektryczne w stosunku do pozostałych części kapilary. Prowadzi to do tITP, w której rolę LE pełnią jony Na^+ (dla kationów) i Cl^- (dla anionów), a rozpuszczalnik organiczny funkcjonuje jako pseudo-TE. (D) Po etapie wzbogacania następuje rozdzielanie składników próbki przy pomocy CZE.

Optymalne warunki do zajścia omawianego procesu to zwykle 50 – 70% (v/v) rozpuszczalnika organicznego i 1% (w/w) zawartości chlorku sodu w próbce [123; 124]. Układ ten umożliwia spiętrzenie dużych objętości próbki (20 – 30% całkowitej objętości kapilary) i skutkuje zwiększeniem czułości metody zwykle do 100-razy [125]. Dużą zaletą p-ITP jest możliwość jednoczesnego wzbogacania analitów kationowych i anionowych, a także uniwersalny charakter pseudo-TE. Technika ta jest w szczególności przydatna w analizie próbek biologicznych, do przygotowania których stosuje się deproteinizację przy użyciu ACN. Dodatek tego rozpuszczalnika do próbki w stosunku objętościowym 2 do 1 zwykle zapewnia satysfakcjonujące oczyszczenie próbki z makroskładników i pozwala na bezpośrednią analizę z użyciem CE [122 - 124].

3.4. Procesy izotachforetyczne w technikach elektromigracyjnych

Wystąpienie zjawiska ITP warunkowane jest obecnością mediów pełniących rolę LE i TE. W przypadku analiz izotachforetycznych, skład LE i TE poddawany jest weryfikacji zarówno jakościowej, jak i ilościowej w toku optymalizacji metody analitycznej. Jakkolwiek, różnorodność stosowanych odczynników w technikach elektromigracyjnych i duża dowolność układu LE – TE – BGE – próbka (Rysunek 12) jest przyczyną stosunkowo częstego udziału procesów izotachforetycznych w technikach elektromigracyjnych.

Anres i współ. zwrócili uwagę na skład roztworu HCB w technice SEI łączonej ze zmiataniem w kontekście ITP. Obecność jonów sodowych w strefie HCB pozwoliła na półtora krotny wzrost efektu wzmocnienia sygnału w stosunku do użycia roztworu kwasu fosforowego [95].

W technice pH-spiętrzania Baidoo i współ. zaobserwowali dodatkowy efekt tITP, w którym rolę LE i TE pełniły odpowiednio jony amonowe i hydroniowe [44]. Późniejsze badania i symulacje komputerowe potwierdziły ich spostrzeżenia [51; 52].

Foteeva i współ. wykazali, że w przypadku analizy MEKC próbek o dużej zawartości jonów Cl^- może zachodzić zjawisko micelarnej przejściowej ITP. (ang. micellar transient isotachophoresis, mtITP) [126]. Duża siła jonowa próbki prowadzi do spiętrzania miceli na granicy ośrodków próbka/bufor rozdzielający [84]. Stosując bufor rozdzielający złożony z anionowego surfaktantu (SDS) i tetraboranu disodowego (boraks) w opisywanym przykładzie zachodzi zależność $\mu_{\text{Cl}} > \mu_{\text{SDS}} > \mu_{\text{borax}}$ [126]. Jakkolwiek, zgodnie z Równaniem (8) efekt ten jest widocznie jedynie w przypadku dostatecznie dużego zasolenia próbki. Niemniej jednak, może być przyczyną odchylenia od wyników obserwowanych w stosunku do wyliczeń teoretycznych [28; 82]. Matczuk i współ. wykazali około dziesięciokrotny efekt wzmocnienia siły sygnału dla analitów neutralnych w obecności 100 mM chlorku sodu w próbce w stosunku do próbki wodnej (brak zjawiska mtITP) [127].

4. Podsumowanie

Techniki wzbogacania analitu w kapilarze niewątpliwie pozwalają na przezwyciężenie największej niedogodności CE – stosunkowo niskiej czułości analiz przeprowadzanych przy użyciu najpopularniejszych detektorów spektrofotometrycznych. Ich zastosowanie umożliwia wykrycie organicznych związków drobnocząsteczkowych na poziomie kilku ppt przy użyciu podstawowego detektora UV bez konieczności rozbudowy lub modyfikacji standardowej aparatury do CE [24]. Techniki te oparte są na podstawowych zjawiskach fizycznych i w większości przypadków istnieje możliwość zastosowania opracowanej metodologii zarówno w klasycznej CE, jak i w układach mikroczipowych [128]. Różnorodność technik wzmacniania sygnału pozwala na dobór odpowiedniego rozwiązania i jego implementację do uprzednio opracowanej metody w przypadku, gdy tak wykazała zbyt niską czułość. Poznanie kluczowych parametrów i składowych uzyskiwanego efektu wzmocnienia sygnału umożliwia optymalizację procesu. Z kolei dokładne zrozumienie mechanizmów wzbogacania analitów w kapilarze pozwala na poprawę uzyskiwanych parametrów rozdzielania substancji przy użyciu standardowego dozowania próbki do kapilary [89]. Opracowanie nowych sposobów spiętrzania próbki nie pozostało bez znaczenia dla rozwoju dwuwymiarowych technik rozdzielania substancji [40]. Wszystkie te czynniki tłumaczą dużą intensywność prowadzonych badań w tej dziedzinie nauki na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat.

W Tabeli 1 zestawiono opisane techniki wzmacniania siły sygnału wraz z parametrami istotnymi z praktycznego punktu widzenia. Większość technik pozwala na wzbogacanie analitów zjonizowanych, podczas gdy anality obojętne elektrycznie (poza nielicznymi wyjątkami) można wzbogacać jedynie przy zastosowaniu fazy pseudostacjonarnej (technika zmiatania i AFMC). Zastosowanie np. technik spiętrzania do wzbogacania substancji niejonowych możliwe jest w przypadku stosowania dodatkowego mechanizmu akumulacji substancji [106] lub po nadaniu analitom ładunku. Dla przykładu, dodatek sulfonowanych cyklodekstryn do roztworu próbki umożliwił ponad tysiąckrotne obniżenie granicy wykrywalności wybranych związków steroidowych przy zastosowaniu techniki pH-spiętrzania z elektrokinetycznym dozowaniem próbki [129]. Najczęściej jednak efekt wzmocnienia sygnału dla substancji obojętnych uzyskuje się za pomocą zmiatania fazą pseudostacjonarną [90]. Jednoczesne wzbogacanie analitów kationowych i anionowych

z kolei możliwe jest jedynie w przypadku techniki FASS, p-ITP i zmiatania, podczas gdy jedynie zmiatanie pozwala na jednoczesne wzbogacanie każdego rodzaju substancji. Jest to jeden z głównych powodów łączenia techniki zmiatania z innymi technikami wzbogacania analitów w kapilarze.

Tab. 1. Porównanie najczęściej stosowanych technik wzbogacania analitu w kapilarze pod kątem wybranych aspektów praktycznych. * Zacięniowane tło wskazuje na możliwości jednoczesnego wzbogacania podanych indywiduów chemicznych. ** Brak danych literaturowych (komentarz w tekście).

Technika	Rodzaj analitu*	Odporność na zasolenie próbki	Kompatybilność z detektorem MS	Złożoność opracowania techniki	Efekt wzmocnienia siły sygnału [125]
FASS	⊕⊖	-	+	+	$10^1 - 10^2$
LVSS	⊕⊖	-	+	+++	$10^2 - 10^3$
FASI	⊕⊖	-	+	++	$10^2 - 10^3$
AFMC	○	+/-	+/- --	++	$10^1 - 10^2$
MSS	⊕⊖	+/-	+	++	$10^1 - 10^2$
pH-spiętrzanie	⊕⊖	+++	+	++	$10^1 - 10^3$
Dynamiczne krzyżowanie pH	⊕⊖	+++	+	++	$10^1 - 10^2$
Zmiatanie	⊕⊖⊖	+/-	+/- --	++	$10^1 - 10^5$
SEI-zmiatanie	⊕⊖	+/-	+/- --	++++	$10^3 - 10^6$
tITP	⊕⊖	++	+	+++	$10^1 - 10^3$
EKS	⊕⊖	-	+	++++	$10^3 - 10^6$
p-ITP	⊕⊖	+++	+/-**	+	$10^1 - 10^2$

Bardzo istotnym zagadnieniem w praktyce laboratoryjnej jest odporność techniki na obecność soli w analizowanych próbkach (Tabela 1). Jako że współczynnik wzmocnienia w technikach FASS, LVSS i FASI, a także w technikach łączonych opartych na FASI – SEI-zmiatanie i EKS, jest wprost proporcjonalny do różnicy w przewodności roztworu próbki i buforu rozdzielającego (Równanie (1)), w tych technikach obserwuje się drastyczne pogorszenie efektu spiętrzenia wraz ze wzrostem

stężenia soli w próbce. Jedynie w przypadku łączonej techniki SEI-zmiatanie, ze względu na drugi mechanizm wzbogacania próbki, możliwa jest poprawa siły sygnału, chociaż uzyskany efekt będzie daleki od spodziewanego. W przypadku zmiatania, wzrost siły jonowej próbki może mieć dwojaki wpływ na poprawę intensywności sygnału, co został szczegółowo przedyskutowane w Rozdziale I.2.1. Procesy MSS i AFMC prowadzi się w warunkach, w których $\gamma \approx 1$. Z tego względu możliwy jest dobór odpowiednich warunków prowadzenia procesu do stężenia soli w próbce. Niemniej jednak, zastosowanie procedury ekstrakcji przed analizą CE pozwala na przezwycięzenie tej niedogodności. Dynamiczne krzyżowanie pH, pH-spiętrzanie i p-ITP to techniki dedykowane próbkom o wysokim zasoleniu i powinny być brane pod uwagę w pierwszej kolejności w przypadku analizy płynów ustrojowych, próbek środowiskowych, produktów żywnościowych czy farmaceutycznych. Również tITP umożliwia skuteczne wzbogacanie próbek o znacznej sile jonowej, a w niektórych przypadkach zasolenie próbki jest czynnikiem indukującym ITP [126].

Zastosowanie spektrometru mas jako detektora w technikach rozdzielania substancji, uważa się obecnie za jedno z największych osiągnięć chemii analitycznej dwudziestego wieku. Intensywny rozwój technologiczny tego typu urządzeń pozwala na oznaczanie wyjątkowo niskich stężeń substancji (pg/ml). Dodatkowo, uzyskiwane widmo umożliwia jednoczesną identyfikację oznaczanych związków, przez co tandemowa spektrometria mas uważana jest obecnie za złoty standard analiz biomedycznych. Z tego względu kompatybilność opisywanych technik z detekcją MS jest aktualnym problemem, bardzo często poruszonym w literaturze naukowej. Zagadnienie to w dużej mierze sprowadza się do rodzaju techniki elektromigracyjnej używanej do rozdzielania substancji po właściwym procesie wzbogacenia. W przypadku CZE, którą można zastosować z większością opisywanych technik, problem kompatybilności z detektorem MS ogranicza się przede wszystkim do zastosowania dostatecznie lotnych składników buforu rozdzielającego (elektrolitu buforującego i/lub dodatku rozpuszczalników organicznych). Dużo większą trudność napotyka natomiast zastosowanie MEKC. W technice tej zazwyczaj stosuje się stosunkowo duże stężenie jonowych surfaktantów, co prowadzi do nieefektywnej jonizacji analitów i zapychania kapilar używanych w najczęściej stosowanej technice jonizacji przez elektrorozpylanie (ang. electrospray ionization, ESI). Dlatego też technika zmiatania i AFMC nie wykazują zgodności z detekcją MS

(Tabela 1). Jakkolwiek, istnieje możliwość stosowania tych technik z detektorem MS. Najczęściej wykorzystuje się częściowe wypełnienie kapilary buforem zawierającym fazę pseudostacjonarną tak, iż stosowany surfaktant nie ma kontaktu ze źródłem wzbudzania jonów (ang. partial filling technique) [30; 130; 131]. Alternatywą jest zmiatanie przez kompleksowanie analitów [96]. Ma to jednakże bardzo ograniczone zastosowanie praktyczne. Teoretycznie możliwe wydaje się również użycie p-ITP, jednakże brakuje danych literaturowych na ten temat.

Możliwy do uzyskania efekt wzmocnienia sygnału stanowi istotę omawianego zagadnienia i (w zależności od stosowanej techniki) waha się od jednego do sześciu rzędów wielkości (Tabela 1). Wartości prezentowane w Tabeli 1 nie są dokładnym odzwierciedleniem rezultatów poszczególnych prac, jednakże pozwalają na ogólną ocenę potencjału danej techniki, co z kolei umożliwia dobór techniki wzmacniania siły sygnału współmierny do oczekiwanej czułości metody. Istotnym jest również aspekt ilości parametrów wymagających optymalizacji. Przekłada się to na złożoność i czas potrzebny na opracowanie metody analitycznej.

Należy zaznaczyć, iż porównanie uzyskiwanych efektów wzmocnienia sygnału pomiędzy opublikowanymi pracami różnych (a nawet tych samych) zespołów badawczych wydaje się być skomplikowane, a nawet kontrowersyjne. Istnieje duża rozbieżność w sposobie szacowania otrzymanego efektu. Większość autorów stosuje porównanie wartości LOD badanych związków uzyskane opracowaną techniką wzbogacania analitu w kapilarze w stosunku do wartości LOD otrzymywanych przy zastosowaniu standardowego dozowania hydrodynamicznego (najczęściej najmniejsza możliwa objętość dozowania próbki). Ze względu na różnorodność stosowanych parametrów dozowania takich, jak czas, wielkość przykładanego ciśnienia, typ dozowania – hydrodynamiczny lub grawitacyjny, stosowane jednostki ciśnienia, ilość dozowanej próbki do kapilary może się znacząco różnić, wpływając na wielkość wyliczonego efektu wzmocnienia. Stosunkowo często stosuje się również porównanie wysokości lub (rzadziej) pola powierzchni pików dla techniki wzmacniania sygnału i techniki referencyjnej, uwzględniając przy tym różnicę stężeń analitów w badanych próbkach. Mylące może być także porównywanie efektów wzmocnienia pomiędzy różnymi rodzajami detekcji. Spośród wymienionych możliwości najbardziej wiarygodne wydaje się być porównanie wartości LOD pomiędzy różnymi metodami. Jednakże w tym przypadku problematyczne może okazać się porównanie uzyskanych wyników z pracami innych autorów, jako że wymaga to zastosowania tych samych

substancji wzorcowych. Z tego względu większość autorów posługuje się ogólnym pojęciem współczynnika wzmocnienia sygnału najczęściej wyrażanym w postaci:

$$EF = \frac{H_1}{H_2} \frac{C_2}{C_1} \quad (9)$$

, gdzie: H_1 i C_1 – wysokość sygnału i stężenie substancji dla techniki wzbogacania analitu; H_2 i C_2 – wysokość sygnału i stężenie substancji dla metody referencyjnej.

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, prace w dziedzinie techniki wzbogacania analitu powinny zawsze obejmować podanie uzyskanych wartości LOD, a także dokładny opis sposobu obliczenia efektu wzmocnienia siły sygnału.

II. Cel pracy

Wzbogacania analitów w kapilarze stanowi obecnie jedno z najbardziej rozwijanych zagadnień dotyczących technik elektromigracyjnych. Intensywne prace w tej tematyce pozwoliły na przełamanie dotychczasowych stereotypów dotyczących niskiej czułości CE w stosunku do technik chromatograficznych [132]. Dokładne poznanie zjawisk zachodzących podczas procesu wzbogacania próbki w kapilarze, w tym wyznaczenie parametrów krytycznych i odkrycie wzajemnych zależności między nimi, wydaje się być kluczowe dla właściwego wykorzystania opisywanych technik i maksymalizacji uzyskiwanego efektu.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metod oznaczania wybranych substancji testowych z wykorzystaniem technik wzbogacania analitu w kapilarze. Przeprowadzone badania miały na celu:

1. Poznanie i opis mechanizmu wzmocnienia siły sygnału poprzez modyfikację wybranych parametrów metody.
2. Opracowanie nowych technik spiętrzania analitów lub modyfikację już istniejących.
3. Zwrócenie uwagi na zjawiska towarzyszące technikom, których mechanizmy zostały już opisane w literaturze naukowej.
4. Konstruktywną dyskusję na temat praktycznego wykorzystania obecnego stanu wiedzy na temat wzbogacania próbki w kapilarze.

III. Część doświadczalna

1. Aparatura, odczynniki, materiały

1.1. Aparatura naukowa

Urządzenia do CE:

- Beckman P/ACE 2100 wyposażony w detektor UV (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).
- Beckman P/ACE 5000 wyposażony w detektor UV (Beckman Coulter).
- PA 800 Plus wyposażony w detektor fotodiodowy z detekcją UV (Beckman Coulter).

pH-metry:

- Beckman pH-meter (Beckman Coulter).
- Cerko Lab System (Gdańsk, Polska).
- Crison GLP-21 (Barcelona, Hiszpania).

Systemy uzdatniania wody:

- Basic 5 (Hydrolab, Wislina, Polska).
- Mili Q Direct (Merck Millipore, Billerica, MA, USA).
- Redestylator wody (GFL 2104, Burgwedel, Niemcy).

Pozostała aparatura i sprzęt laboratoryjny:

- Chromatograf gazowy Gas Chromatograph System wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny (Shimadzu, Kyoto, Japonia).
- Termostat: Eppendorf Termomixer (Eppendorf, Hamburg, Niemcy).
- Kapilary krzemionkowe niemodyfikowane różnej długości (średnica wewnętrzna: 50 μm ; średnica zewnętrzna: 375 μm ; Beckman Coulter).
- Krzemionkowa kolumna kapilarna do chromatografii gazowej o długości 30 m, średnicy 0,5 mm i grubością filmu fazy stacjonarnej (5%-fenylo-95%-dimetylopolysiloksan) wynoszącej 0,25 mm.
- Konduktometr Conductibility Meter Lab 970 (SCHOTT Instruments, Mainz, Germany).
- Spektrofotometr UV/VIS PU 8750 (Philips, UK).

1.2. Odczynniki i rozpuszczalniki

Substancje wzorcowe:

- Amitryptylina chlorowodorek (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Baklofen (Sigma-Aldrich).
- Chloropromazyny chlorowodorek (Sigma-Aldrich).
- Chlorprotiksenu chlorowodorek (Sigma-Aldrich).
- Fluoksetyny chlorowodorek (Sigma-Aldrich).
- Glicyna (Merck, Darmstadt, Niemcy).
- Hydroksyzyny dichlorowodorek (Sigma-Aldrich).
- Klomipraminy chlorowodorek (Sigma-Aldrich).
- Kwas foliowy (Sigma-Aldrich).
- Kwas L-asparaginowy (Merck).
- Kwas L-glutaminowy (Merck).
- L-alanina (Merck).
- L-asparagina bezwodna (Merck).
- L-argininy chlorowodorek (Merck).
- L-cysteina (Merck).
- L-cystyna (Merck).
- L-feniloalanina (Merck).
- L-glutamina (Merck).
- L-histydyny chlorowodorek jednowodny (Merck).
- L-izoleucyna (Merck).
- L-leucyna (Merck).
- L-lizyny chlorowodorek (Merck).
- L-metionina (Merck).
- L-prolina (Merck).
- L-seryna (Merck).
- L-treonina (Merck).
- L-tryptofan (Merck).
- L-tyrozyna (Merck).
- L-walina (Merck).
- Nikotynamid (Sigma-Aldrich).

- Oksazepam (Sigma-Aldrich).
- Olanzapina (Sigma-Aldrich).
- Opipramolu dichlorowodorek (Sigma-Aldrich).
- Perfenazyna (Sigma-Aldrich).
- Pirydoksyna (Sigma-Aldrich).
- Prochloroperazyny dimaleinian (Sigma-Aldrich).
- Promazyny chlorowodorek (Sigma-Aldrich).
- Ryboflawina (Sigma-Aldrich).
- Tiaminy chlorowodorek (Sigma-Aldrich).
- Tiorydazyny chlorowodorek (Sigma-Aldrich).
- Trifluperazyny di chlorowodorek (Sigma-Aldrich).

Elektrolity i składniki buforu rozdzielającego:

- 0.1 M roztwór wodorotlenku sodu (Beckman Coulter).
- 2-amino-2-hydroksymetylopropano-1,3-diol (Tris, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).
- 85% roztwór kwasu fosforowego (POCH, Gliwice, Polska).
- Chlorek sodu (POCH).
- Czteroboran disodowy dziesięciowodny (Merck).
- Diwodorofosforan sodu (Merck).
- Laurylosiarczan sodu (Merck).
- Wodorotlenek sodu (POCH).

Rozpuszczalniki organiczne:

- Aceton (HPLC grade, VWR, Radnor, PA, USA).
- Acetonitryl (ACN, HPLC grade, Merck Millipore).
- Dichlorometan (Sigma-Aldrich).
- Metanol (HPLC grade, Merck).
- Methanol (LC-MS grade, Baker, NJ, USA).
- Propan-2-ol (iPrOH, HPLC grade, VWR).
- Tetrachlorek węgla (Sigma-Aldrich).

Pozostale:

- 2,4-dinitrofluorobenzen (Sigma-Aldrich).
- Pożywka dla wzrostu bakterii BD Mueller Hinton II Broth.
- Roztwór Ringera (Baxter, Deerfield, IL, USA).
- Szczep *Staphylococcus aureus* (ATCC6538).
- Szczep *Escherichia coli* (ATCC8739).

1.3. Oprogramowanie

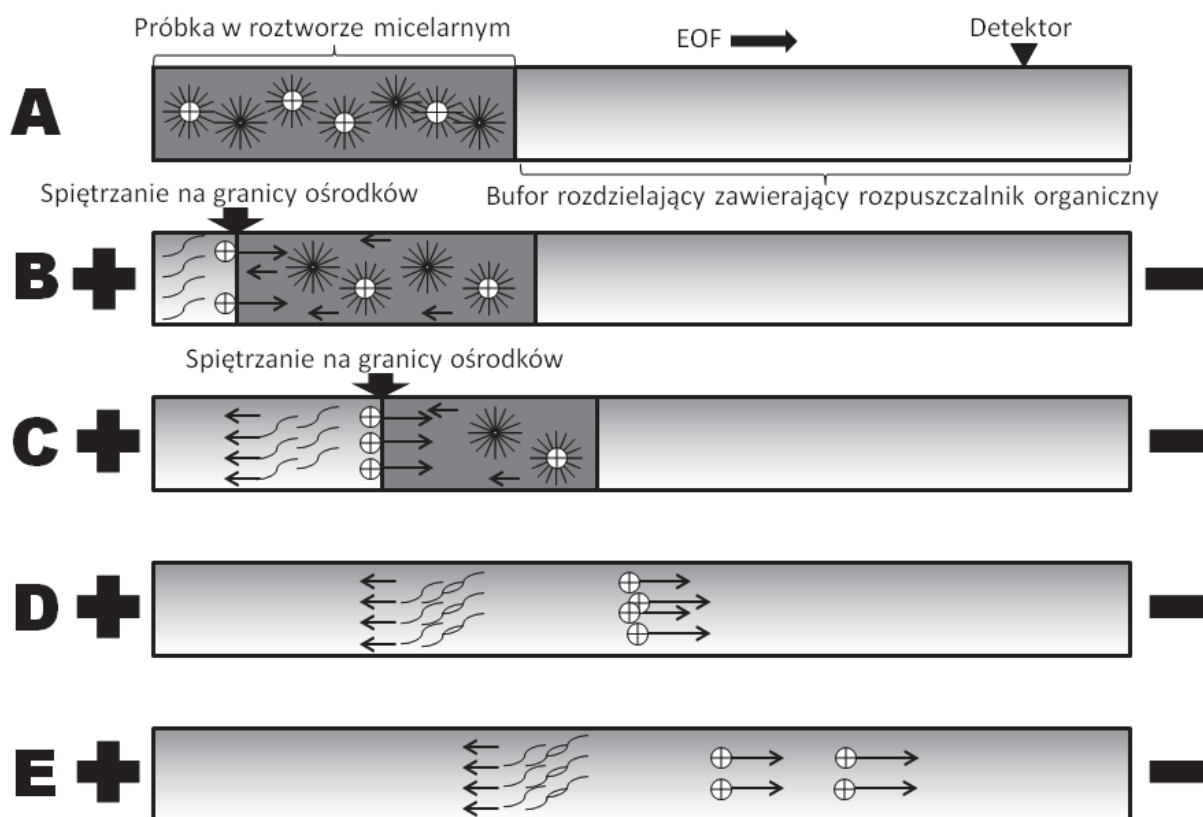
- 32 Karat (wersja 8.0; Beckman Coulter).
- ACS/ChemSketch (wersja 12.01; Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Kanada).
- Beckman Gold Software (Beckman Coulter).
- CE Expert (Beckman Coulter).
- Peak Master 5.3 Complex (www.natur.cuni.cz/gas).

2. Spiętrzanie analitów na drodze przeniesienia z miceli do rozpuszczalnika organicznego

2.1. Wstęp

Wzbogacanie analitu na skutek różnicy przewodności dwóch roztworów wprowadzonych do kapilary stanowi podstawę większości technik spiętrzania omówionych w Rozdziale I. O ile łatwość opracowania techniki FASS poczytuje się za jej wielką zaletę, o tyle uzyskiwany efekt wzmocnienia jest znacznie ograniczony [6]. Różnice w przewodności roztworu próbki i stosowanego BGE, wraz ze wzrostem objętości dozowania próbki, prowadzą do znacznego poszerzenia uzyskiwanych sygnałów na skutek zjawiska elektrodyspersji [18]. W celu przezwyciężenia tej niedogodności Chien i Burgi zaproponowali technikę spiętrzania analitów z jednoczesnym (lub kolejno następującym po sobie) procesem usuwania matrycy próbki (LVSS) [7; 8; 18]. Pomimo licznych strategii opracowanych dla techniki LVSS, optymalizacja metody analitycznej z jej wykorzystaniem wymaga uwzględnienia dużej liczby parametrów (Tabela 1). Co więcej, w przypadku starszych urządzeń do CE, użycie niektórych jej wariantów może być wręcz niemożliwe ze względu na ograniczenie technologiczne tych aparatów [6]. Alternatywę stanowią techniki, w których proces wzbogacania zachodzi z użyciem dwóch roztworów o takiej samej przewodności, co ogranicza elektrodyspersję analitów przy dużych objętości dozowania próbki.

Technika MSS jest stosunkowo nową techniką, w której gwałtowną zmianę prędkości analitu uzyskuje się na drodze destabilizacji micelarnej matrycy próbki [31; 32]. Schemat spiętrzania analitów kationowych z użyciem techniki MSS został przedstawiony na Rysunku 15. Duża objętość próbki, zawierającej surfaktant anionowy w stężeniu nieznacznie przekraczającym wartość CMC użytego tenzydu, dozowana jest do kapilary uprzednio wypełnionej BGE o stosunkowo dużej zawartości rozpuszczalnika organicznego (Rysunek 15A). Po przyłożeniu napięcia następuje elektroforetyczna migracja miceli wraz z inkorporowanymi analitami kationowymi w kierunku anody. Skutkuje to destabilizacją miceli na granicy stref próbka – BGE, co z kolei powoduje zmianę kierunku migracji elektroforetycznej oznaczanych substancji (Rysunek 15B i C). Po całkowitym spiętrzeniu próbki (Rysunek 15D) anality ulegają rozdzieleniu zgodnie z regułami techniki CZE (Rysunek 15E).



Rys. 15. Schemat mechanizmu techniki MSS na przykładzie oznaczania substancji kationowych. (A) Do kapilary wypełnionej buforem rozdzielającym, zawierającym stosunkowo dużą zawartość rozpuszczalnika organicznego, hydrodynamicznie wprowadza się próbkę. Matryca analityczna próbki składa się z elektrolitu i surfaktantu anionowego w stężeniu nieznacznie przekraczającym CMC. (B, C) Przyłożenie wysokiego napięcia skutkuje migracją oznaczanych związków inkorporowanych przez ujemnie naładowane micelle w kierunku anody. W kontakcie z ośrodkiem o dużej zawartości rozpuszczalnika organicznego następuje destabilizacja miceli próbki i spiętrzanie analitów na granicy stref próbka – BGE. (D, E) Po całkowitym spiętrzeniu próbki, anality ulegają rozdzieleniu przy pomocy CZE. Oznaczenia: - micelle anionowe; - monomeryczne cząsteczki surfaktantu. Wektory na rysunku symbolizują prędkość elektroforetyczną poszczególnych składników.

Zastosowanie techniki MSS pozwala na wzbogacania analitów kationowych lub anionowych w zależności od użytego rodzaju surfaktantu (odpowiednio anionowy lub kationowy) i polaryzacji elektrod (odpowiednio normalna lub odwrócona) [31; 32]. Wykazano także dodatkowy efekt wzbogacenia analitów poprzez łączenie z innymi technikami takimi, jak na przykład zmiatanie [38]. Efekt ten uzyskuje się poprzez dodatkowe dozowanie przed próbką roztworu o takim samym składzie jak matryca analityczna próbki, jednakże pozbawionego oznaczanych składników. Prowadzi to do wydłużenia czasu oddziaływania analitów z fazą pseudostacjonarną przed właściwym etapem rozdzielania elektroforetycznego i wyższych liczbowo współczynników wzbogacenia analitów [38]. Rozdzielanie w technice MSS prowadzi się najczęściej przy pomocy CZE [31; 32; 38]. Jakkolwiek, istnieje również możliwość

wykorzystania w tym celu elektroforezy w środowisku niewodnym [33], MEKC [34] i cieczy jonowych [133]. Najwyższe współczynniki wzmocnienia sygnału w omawianej technice uzyskano poprzez dodatkowe zastosowanie metody FASI [35; 36]. Uwagę zwraca również możliwość wykorzystania mikroemulsji jako matrycy analitycznej próbki [134].

Duża dowolność modyfikacji techniki MSS, kompatybilność z detekcją MS [32], możliwość łączenia tej techniki z innymi metodami wzmacniania siły sygnału oraz technikami rozdzielania elektroforetycznego, czyni z niej interesującą alternatywę dla spiętrzania na skutek różnicy przewodności ośrodków (FASS i LVSS). Z tego względu podjęto próbę opracowania metody elektroforetycznego oznaczania wybranych środków farmakologicznych stosowanych głównie w leczeniu psychiatrycznym z użyciem techniki MSS. Wybór substancji modelowych uzasadnia się przede wszystkim spodziewanymi niskimi stężeniami tych związków w płynach ustrojowych, będących konsekwencją stosunkowo małych dawek stosowanych preparatów (dawka jednorazowa rzędu kilku do kilkudziesięciu miligramów) [135]. Budowa pierścieniowa tych związków umożliwia zastosowanie detekcji UV, a charakter słabych zasad organicznych pozwala na nadanie tym cząsteczkom ładunku dodatniego poprzez dobór odpowiedniej wartości pH roztworu. Opracowana metoda została zastosowana do oznaczania wybranych substancji czynnych w moczu ludzkim po uprzedniej ekstrakcji ciecz-ciecz (ang. liquid-liquid extraction, LLE).

2.2. Część eksperymentalna

2.2.1. Przygotowanie roztworów

Roztwory wzorcowe analitów (olanzapina, promazyna, chloropromazyna, opipramol, prochlorperazyna) i wzorca wewnętrznego (ang. internal standard, I.S., tiorydazyna) zostały przygotowane poprzez odważenie odpowiedniej ilości substancji stałej i rozpuszczenie w MeOH (1 mg/ml). Roztwory pomocnicze diwodorofosforanu sodu i laurylosiarczanu sodu przygotowano w stężeniu 200 mM (fosforan) i 50 mM (SDS) przez rozpuszczenie odważonej ilości poszczególnych substancji w wodzie redestylowanej. Pożądane pH roztworów uzyskano przy pomocy 85% roztworu kwasu fosforowego lub 1 M roztworu NaOH.

Po procesie optymalizacji BGE zawierał: 40 mM NaH_2PO_4 , 60% (v/v) MeOH, pH 3,7, podczas gdy matryca analityczna próbki składała się z 10 mM NaH_2PO_4 i 8 mM SDS, pH 3,6.

2.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne

Podczas eksperymentów stosowano niemodyfikowane kapilary krzemionkowe o średnicy wewnętrznej 50 μm i całkowitej długości 57 cm (efektywna długość: 50 cm). Procedura kondycjonowania nowych kapilar obejmowała płukanie (przy ciśnieniu 20 psi $\approx$ 138 kPa) kolejno: MeOH (10 min), 0,1 M roztworem NaOH (10 min), wodą redestylowaną (10 min) i BGE (20 min). Na początku każdego dnia pracy kapilara była przemywana: MeOH (10 min), wodą redestylowaną (10 min), 0,1 M roztworem NaOH (20 min), wodą redestylowaną (10 min) i BGE (5 min).

Opracowana procedura elektroforetyczna obejmowała kondycjonowanie kapilary z użyciem BGE (1 min), dozowanie próbki przez 90 sekund przy ciśnieniu 0,5 psi (3.45 kPa), przyłożenie wysokiego napięcia przez 15 min (25 kV, 22 °C) oraz końcowe płukanie kapilary 0,1 M roztworem NaOH i wodą redestylowaną (po 2 min). Wszystkie procedury przemywania kapilary prowadzono przy ciśnieniu 138 kPa.

2.2.3. Procedura przygotowania próbki do analizy

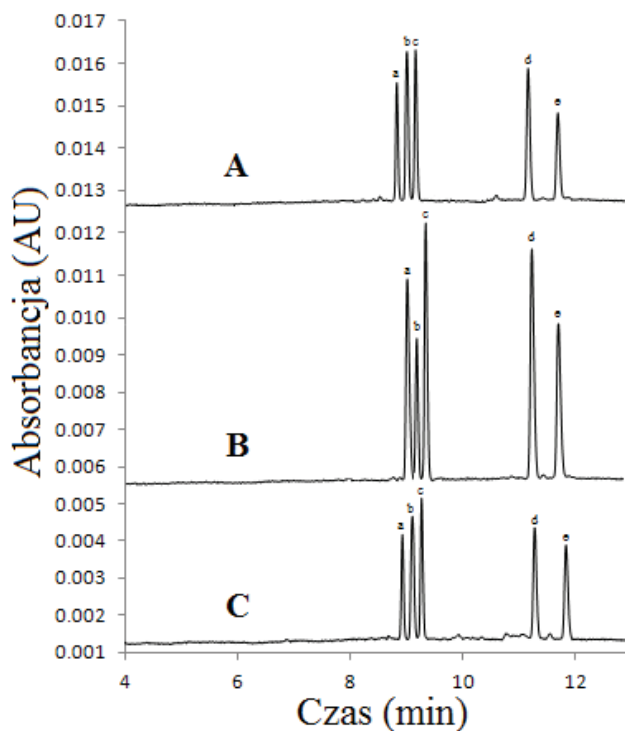
Aplikacyjność opracowanej metody analitycznej wykazano na przykładzie oznaczania wybranej grupy substancji biologicznie czynnych w moczu ludzkim. W tym celu próbki moczu pobrane od sześciu zdrowych ochotników i odwirowano stosując 4000 obr./min przez 10 min. Następnie, do 2 ml supernatantu dodawano 10 μl roztworu wzorców, 10 μl roztworu wzorca wewnętrznego w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ i 50 μl 1 M roztworu NaOH w celu alkalizacji próbki. Po wymieszaniu całości prowadzono ekstrakcję typu LLE z użyciem 2 ml dichlorometanu (10 min przy 300 obr./min). Końcowy etap procedury polegał na odwirowaniu próbki, zebraniu i odparowaniu fazy organicznej w temp. 45 °C pod strumieniem powietrza. Suchą pozostałość rozpuszczono w 100 μl zoptymalizowanej matrycy analitycznej próbki i poddano analizie z użyciem CE.

2.3. Wyniki i dyskusja

Optymalizacja procesu spiętrzania analitów z użyciem techniki MSS obejmowała następujące parametry: wartość pH próbki i BGE, stężenie surfaktantu w próbce, zawartość MeOH w BGE, a także czas dozowania próbki.

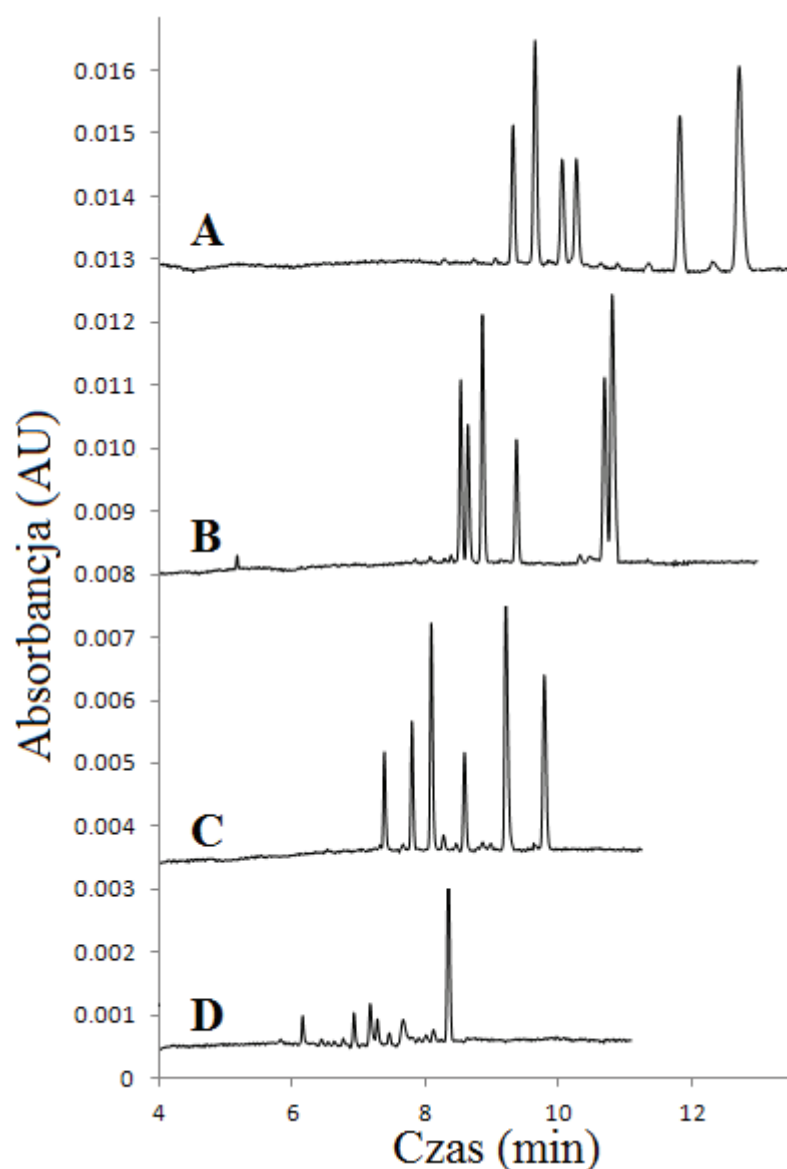
Biorąc pod uwagę mechanizm techniki, stężenie surfaktantu w strefie próbki to pierwszy z kluczowych parametrów mających bezpośredni wpływ na uzyskiwany

efekt wzmocnienia siły sygnału. Ponieważ podawana przez producenta wartość CMC wodnego roztworu SDS wynosi 8,1 mM, a teoretyczne optymalne stężenie tenzydu powinno nieznacznie przekraczać CMC, testowane stężenia wynosiły 6, 8 i 10 mM. Uzyskane wyniki przedstawia Rysunek 16. Sygnały o najwyższej intensywności uzyskano dla stężenia 8 mM, co z uwagi na niewielką siłę jonową próbki, wykazuje dobrą zgodność z wartością deklarowaną przez producenta dla roztworów wodnych. Obok różnej intensywności zaznacza się również większa powierzchnia uzyskanych sygnałów. W przypadku wyższego stężenia SDS (Rysunek 16A) efekt ten można tłumaczyć nieefektywnym procesem destabilizacji miceli w kontakcie z BGE i częściową stratą analitów na skutek sorpcji przez migrujące w kierunku anody micelle. Z kolei 6 mM roztwór SDS mógł skutkować nieefektywnym procesem transportu analitów w strefie próbki przez fazę micelną i niejednorodną migracją części oznaczanych substancji w kapilarze (Rysunek 16C). Założenie to tłumaczy również niestabilną linię bazową oraz obecność dodatkowych sygnałów o niskiej intensywności między dziesiątą a dwunastą minutą. Niemniej jednak, obecność 8 mM roztworu SDS w próbce wykazała najlepszy rezultat w badanym zakresie stężeń.



Rys. 16. Wpływ stężenia SDS w próbce na intensywność sygnałów [136]. (A) 10 mM SDS; (B) 8 mM SDS; (C) 6 mM SDS. Skład BGE: 40 mM NaH_2PO_4 , 60% (v/v) MeOH, pH 3,7; skład matrycy analitycznej próbki: 10 mM NaH_2PO_4 , pH 3,6, (A) 10 mM SDS, (B) 8 mM SDS, (C) 6 mM SDS; parametry dozowania próbki: 90 s (3,45 kPa); stosowane napięcie: 25 kV; temperatura: 22 °C; kapilara krzemionkowa niemodyfikowana: 50 μm x 57 cm (50 cm do detektora); detekcja UV (254 nm); wzorce w stężeniu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Oznaczenia: (a) olanzapina, (b) promazyna, (c) chlorpromazyna, (d) opipramol, (e) prochlorperazyna.

Drugim parametrem istotnie wpływającym na uzyskiwany efekt wzmocnienia w technice MSS jest dodatek rozpuszczalnika organicznego. W tym celu do BGE dodawano różną objętość MeOH, a uzyskane elektroferogramy przedstawiono na Rysunku 17. Wzrost zawartości MeOH w zakresie od 40 do 60% (v/v) skutkował znaczną poprawą efektu spiętrzania i wzrostem siły sygnału (Rysunek 17B – D). Dalsze zwiększanie stężenia MeOH (do 70% v/v) spowodowało spadek sprawności rozdzielania (Rysunek 17A). Z tego względu dodatek 60% MeOH do BGE uznano za optymalny.



Rys. 17. Wpływ dodatku MeOH do BGE na uzyskiwane wyniki [136]. Skład BGE: 40 mM NaH_2PO_4 , (A) 70%, (B) 60%, (C) 50%, (D) 40% MeOH, pH 3,6. W eksperymencie użyto dodatkowo tiurydazyny (I.S.). Pozostałe parametry takie same, jak na Rys. 16B.

Wartość pH roztworu rozdzielającego w przypadku niektórych technik elektroforetycznych może istotnie wpływać na efekt wzmocnienia siły sygnału [65]. Jakkolwiek, przeprowadzone doświadczenia w zakresie pH od 2,5 do 6,0 wykazały brak wpływu tego parametru na proces wzbogacania próbki. W badanym zakresie pH obserwowane różnice dotyczyły przede wszystkim rozdzielczości układu. Jedynie zastosowanie buforu o $\text{pH} > 5,0$ skutkowało detekcją pojedynczego sygnału o bardzo wysokiej intensywności w miejscu spodziewanych analitów. Sygnał ten pochodził od stosowanego surfaktantu, którego prędkość migracji elektroforetycznej w tych warunkach jest mniejsza od prędkości EOF [107]. Z tego względu podczas analizy substancji kationowych z użyciem SDS w roli tenzydu, proces rozdzielania należy prowadzić przy $\text{pH} < 5$. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, iż zastosowanie roztworu BGE o pH 3,7 pozwala na całkowite rozdzielanie stosowanych substancji w możliwie jak najkrótszym czasie.

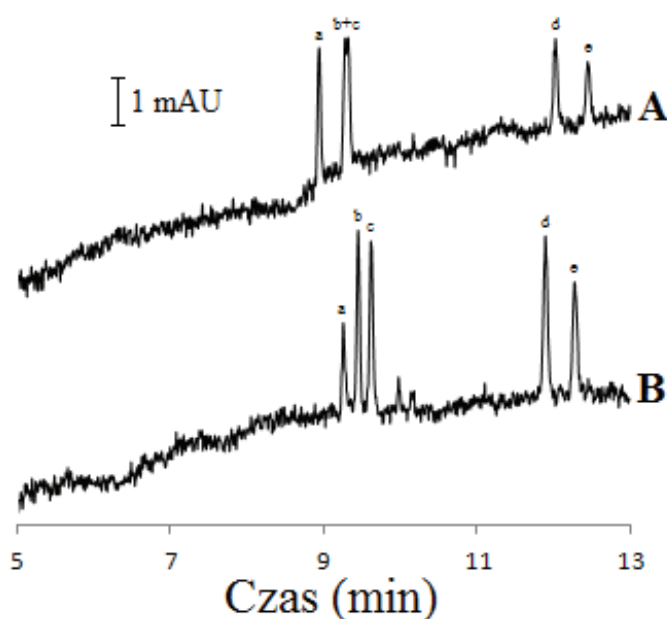
Ze względu na omawiany efekt zmiany kierunku efektywnej migracji miceli w polu elektrycznym, a także uwzględniając wahania siły jonowej roztworów, badane pH próbki znajdowało się w zakresie od 3 do 4,5. Nie zaobserwowano znaczącego wpływu testowanego zakresu pH na parametry rozdzielania. Z tego względu, w celu eliminacji różnicy w lokalnych wartościach prędkości EOF, stosowano pH próbki zbliżone do pH roztworu BGE.

Ostatnim parametrem uwzględnionym w ramach optymalizacji metody był czas dozowania próbki. Ponieważ objętość próbki poddanej procesowi wzbogacenia ma bezpośrednie przełożenie na intensywność uzyskiwanych sygnałów, czas dozowania ma kluczowe znaczenie dla czułości opracowanej metody. Zoptymalizowane parametry techniki MSS umożliwiły skuteczne spiętrzanie około 87 nl próbki (90 s przy ciśnieniu 3.45 kPa), co stanowiło 8.9% efektywnej objętości kapilary.

W celu oszacowania efektu wzmocnienia siły sygnału analizowano mieszaninę badanych związków w dwóch różnych stężeniach: dla techniki MSS użyto stężeń w zakresie od 20 (olanzapina) do 40 ng/ml (pozostałe anality), a dla metody wykorzystującej standardowe dozowanie hydrodynamiczne (5 s, 3.45 kPa) stężenie użytych analitów wynosiło 1 $\mu\text{g/ml}$ poza olanzapiną, której stężenie równe było 2 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku małej objętości dozowanej próbki, by wyeliminować dodatkowe efekty spiętrzania próbki, anality były rozpuszczone w BGE. Elektroferogramy uzyskane w wyniku przeprowadzonych eksperymentów zostały przedstawione na Rysunku 18. Porównując wysokości sygnałów i uwzględniając użyte

w doświadczeniu stężenia analitów (Równanie 9), stwierdzono około 50-krotną poprawę czułości metody. Na Rysunku 18A można także zaobserwować nakładające się sygnały promazyny i chloropromazyny, podczas gdy technika MSS umożliwiła całkowite rozdzielenie tych dwóch związków (Rysunek 18B). Wskazuje to na dodatkowy proces rozdzielania zachodzący w strefie próbki z użyciem miceli. Zagadnienie to zostało omówione w Rozdziale I.1.4.

Opracowana metoda została poddana częściowej walidacji, a jej aplikacyjność wykazana na przykładzie analizy moczu ludzkiego.



Rys. 18. Oszacowanie efektu wzmocnienia siły sygnału dla opracowanej techniki MSS [136]. (A) Anality rozpuszczone w BGE w stężeniu 2 $\mu\text{g/ml}$ (a) 1 $\mu\text{g/ml}$ (b – e); dozowanie próbki prowadzono przez 5 s przy ciśnieniu 3.45 kPa. (B) Anality rozpuszczone w zoptymalizowanej matrycy analitycznej próbki (8 mM SDS, 10 mM NaH_2PO_4 , pH 3,6) w stężeniu 0,02 $\mu\text{g/ml}$ (a) i 0,04 $\mu\text{g/ml}$ (b – e); dozowanie prowadzono przez okres 90 s przy ciśnieniu 3.45 kPa. Pozostałe parametry takie same, jak na Rys. 16B.

2.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody

Metoda została poddana częściowej walidacji obejmującej określenie selektywności, liniowości metody, wyznaczenia granic wykrywalności i oznaczalności, a także ocenę precyzji i dokładności metody. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 2.

Selektywność metody została potwierdzona na podstawie analizy próbek moczu pochodzących od sześciu zdrowych mężczyzn w wieku od 23 do 45 lat. Na elektroferogramach nie zaobserwowano interferencji o intensywności przekraczającej 10 % wartości pola powierzchni pików oznaczanych substancji (dla stężeń analitów wynoszących 20 ng/ml).

Liniowość metody badano w zakresie od 20 – 400 ng/ml poprzez analizę sześciu niezależnie przygotowanych próbek o sześciu różnych stężeniach wzorców (20, 50, 100, 200, 250 i 400 ng/ml). Krzywe kalibracyjne sporządzone w oparciu o zależność wartości skorygowanego pola powierzchni pików (iloraz pola powierzchni i czasu migracji analitu) i skorygowanego pola powierzchni wzorca wewnętrznego. Uzyskane wyniki wykazywały zgodność z wybranym modelem liniowym ($R^2 > 0.994$).

Tab. 2. Zestawienie wyznaczonych parametrów walidacyjnych dla metody oznaczania wybranych pięciu substancji czynnych w moczu ludzkim przy użyciu techniki MSS-CZE.

	Olanzapina	Promazyna	Chlorpromazyna	Opipramol	Prochlorperazyna
Zakres liniowości metody	20 – 400 ng/ml				
Współczynnik kierunkowy prostej (a)	0,0174	0,0150	0,0155	0,0126	0,0071
Współczynnik przesunięcia prostej (b)	0,1372	0,1349	0,0513	-0,0464	0,0827
Współczynnik korelacji (R ²)	0,9968	0,9941	0,9980	0,9993	0,9973
LOD (ng/mL)	6				
LOQ (ng/mL)	20				
Powtarzalność metody (n = 6)					
Precyzja (% RSD)					
50 ng/mL	8,4	9,0	5,0	7,5	11,0
200 ng/mL	5,2	6,0	4,3	5,0	5,2
400 ng/mL	3,3	2,9	3,2	3,2	4,7
Dokładność (%)					
50 ng/mL	82,6	81,2	86,1	93,0	81,5
200 ng/mL	106,8	99,5	100,7	97,6	102,3
400 ng/mL	99,4	97,4	100,4	100,4	97,7
Odtwarzalność metody (n = 9)					
Precyzja (% RSD)					
50 ng/mL	8,9	9,3	8,4	7,6	11,2
200 ng/mL	5,7	6,5	4,5	5,2	5,5
400 ng/mL	3,5	4,0	3,7	3,6	4,9
Dokładność (%)					
50 ng/mL	82,8	80,7	85,9	91,3	81,3
200 ng/mL	106,9	101,9	97,8	98,1	102,7
400 ng/mL	98,4	96,0	101,2	102,2	96,9

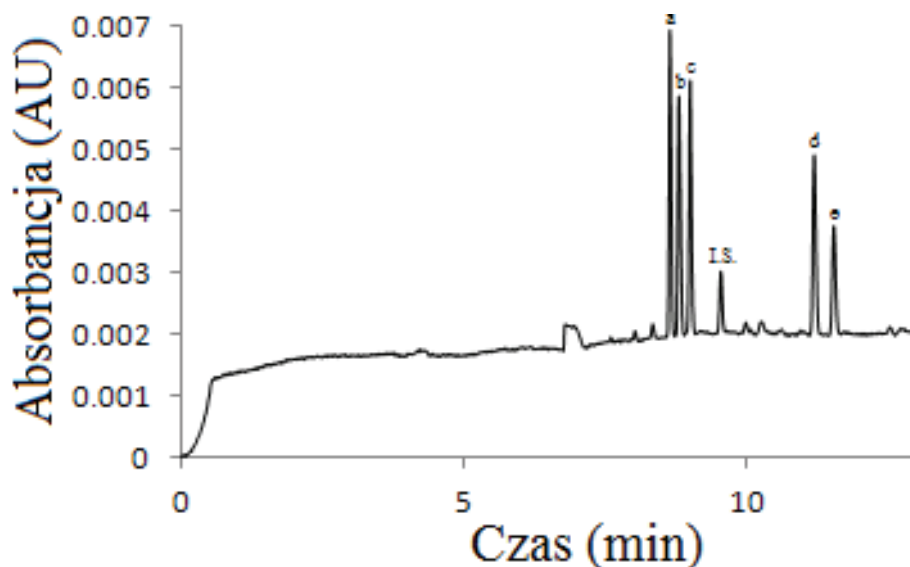
Wartości LOD i granic oznaczalności (ang. limit of quantification, LOQ) dla analitów wyznaczono na podstawie stosunku sygnału do szumu (ang. signal to noise

ratio, S/N). Stężenie substancji równe 6 ng/ml przyjęto za LOD ($S/N = 3$), podczas gdy LOQ ($S/N = 10$) wyznaczono na poziomie 20 ng/ml.

Precyzję i dokładność metody w jednym dniu (powtarzalność metody) weryfikowano poprzez analizę sześciu niezależnie przygotowanych próbek w trzech różnych stężeniach (50, 100 i 400 ng/ml). Uzyskane wartości precyzji, wyrażonej jako względne odchylenie standardowe (ang. relative standard deviation, RSD), mieściły się w zakresie od 2,9 do 11,0%, podczas gdy dokładność oznaczeń wynosiła od 81,2 do 106,8%.

Precyzję i dokładność metody pomiędzy dniami (odtwarzalność metody) badano poprzez analizę trzech niezależnie przygotowanych próbek w trzech różnych stężeniach (50, 100 i 400 ng/ml) przez trzy kolejne dni. W tym przypadku precyzję oznaczeń oszacowano na poziomie od 3,5 do 11,2%. Wyznaczona dokładność mieściła się w granicach od 80,7 do 106,9%.

Przykładowy elektroferogramy z oznaczenia próbki moczu wzbogaconej badanymi substancjami został przedstawiony na Rysunku 19.



Rys. 19. Przykładowy elektroferogramy próbki moczu wzbogaconej analitami w stężeniu 250 ng/ml [136]. Warunki analizy takie same, jak na Rys. 16B.

3. Spiętrzanie analitów we wzmocnionym polu elektrycznym z zastosowaniem wielokrotnego dozowania próbki

3.1. Wstęp

Standardowa długość dozowania próbki w CE zwykle nie przekracza 1% efektywnej długości kapilary. Wprowadzanie większych objętości próbki wymaga wykorzystania technik wzbogacania analitów w kapilarze w celu uzyskania pożądanej, wysokiej sprawności układu. Spiętrzanie dużej objętości próbki można w prosty sposób uzyskać poprzez zastosowanie matrycy próbki o niższej przewodności w stosunku do używanego BGE [137]. Jednakże w celu przeciwdziałania elektrodyspersji analitów na skutek istotnych różnic w składzie stosowanego BGE i matrycy analitycznej próbki, wymagane jest ujednolicenie rozkładu wielkości pola elektrycznego wewnątrz kapilary. Można to uzyskać poprzez usunięcie matrycy próbki w trakcie lub po procesie spiętrzania (LVSS). W tym celu często wykorzystuje się EOF [7; 10; 11], jednakże ze względu na konieczność ścisłej kontroli jego wartości, rozwiązanie to można zastąpić zewnętrznym ciśnieniem hydrodynamicznym [12].

Opisane metody pozwalają na efektywne spiętrzanie dużych objętości próbki. Jakkolwiek, ze względu na znacznie większą wartość EOF od prędkości migracji elektroforetycznej zdecydowanej większości jonów w polu elektrycznym, podczas procesu spiętrzania następuje utrata części analitów. Z jednej strony stosowanie mniejszych wartości przepływu przeciwdziała wypychaniu oznaczanych substancji z kapilary wraz z analityczną matrycą próbki. Z drugiej jednak strony wydłużenie czasu trwania etapu spiętrzania i usuwania matrycy prowadzi do poszerzenia pików w wyniku dyfuzji analitów. Z tego względu ograniczenia dotyczące objętości dozowania próbki obejmują także technikę LVSS, a celem jej optymalizacji jest znalezienie kompromisu pomiędzy prędkością użytego przepływu (EOF lub wywołanego zewnętrznym ciśnieniem), a prędkością poruszania się analitu w strefie próbki.

Zastosowanie łączonych technik takich, jak LVSS-zmianowanie, pozwala na zapobieganie utracie analitów w trakcie procesu usuwania matrycy. Urban i współ. wykazali możliwość wielokrotnego dozowania próbki do całej objętości kapilary [15]. Mieszanina anionowych i niemodyfikowanych cyklodekstryn jako fazy pseudostacjonarnej umożliwiła zmianowanie próbki po każdorazowym jej dozowaniu. Podczas stosowania dwukrotnego dozowania i spiętrzania próbki, uzyskany efekt wzmocnienia dla oznaczanych sterydów mieścił się w granicach od 138 do 185. Implementacja kolejnego dozowania próbki powodowała jednak znaczący spadek

sprawności układu [15]. Także Wang i współ. opracowali metodę wielokrotnego dozowania dużej objętości próbki i jej wzbogacenia z użyciem technik LVSS i zmiatania [16]. Użycie pompy elektroosmotycznej w celu usunięcia matrycy analitycznej próbki nie powodowało strat w ilości analitów ze względu na niskie pH próbki i odwrócony kierunek migracji analitów. Stosując pięciokrotne dozowanie próbki do kapilary wykazano 2500-krotną poprawę czułości metody w stosunku do MEKC z użyciem standardowego dozowania próbki (5 s, 3.45 kPa).

W celu poprawy czułości standardowej techniki LVSS opracowano metodę wielokrotnego dozowania próbki, poddawanej procedurze spiętrzania z jednoczesnym usuwaniem matrycy analitycznej próbki poprzez przykładanie zewnętrznego ciśnienia. W badaniu użyto sześciu związków farmakologicznie czynnych o budowie aminowej, jako substancji modelowych. Opracowaną metodę poddano częściowej walidacji, a jej wykorzystanie przedstawiono na przykładzie oznaczania wybranych substancji w moczu ludzkim.

3.2. Część eksperymentalna

3.2.1. Przygotowanie roztworów

Roztwory substancji wzorcowych (opipramol, hydroksyzyna, promazyna, amitryptylina, fluoksetyna, tiorydazyna) w stężeniu 1 mg/ml przygotowano przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości wzorca w czystym metanolu. 200 mM roztwór kwasu fosforowego przygotowano przez rozcieńczenie dokładnie odmierzonej objętości 85% roztworu kwasu fosforowego.

Optymalizacja wykazała najkorzystniejsze rezultaty przy zastosowaniu BGE złożonego z 80 mM roztworu kwasu fosforowego, podczas gdy matryca analityczna próbki zawierała 1 mM H_3PO_4 i 30% (v/v) MeOH.

3.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne

Podczas eksperymentów stosowana niemodyfikowane kapilary krzemionkowe o średnicy wewnętrznej 50 μm i całkowitej długości 60 cm (efektywna długość: 50 cm) termostatowane w temperaturze 25 °C.

Procedurę przygotowania nowych kapilar i wstępne kondycjonowanie przeprowadzane na początku każdego dnia zostało opisane w Rozdziale III.2.2.2.

Procedura analityczna obejmowała przemycie kapilary 0,1 M roztworem NaOH (0,5 min), wodą dejonizowaną (1 min) i BGE (1,5 min). Po etapie kondycjonowania

do kapilary dozowano kolejno próbkę (53 s) i BGE (12 s), stosując ciśnienie 3,45 kPa. Następnie prowadzono proces spiętrzania i usuwania matrycy (2 kV, - 6,9 kPa, 0,65 min). Dozowania i spiętrzanie próbki obejmowało łącznie cztery powtórzenia. Ostatni etap polegał na przyłożeniu napięcia 30 kV i rozdzielaniu stosowanych substancji. W doświadczeniach wszystkie procedury przemywania kapilary prowadzono z użyciem ciśnienia 138 kPa.

3.2.3. Procedura przygotowania próbki do analizy

Próbki moczu, pobrane od sześciu zdrowych mężczyzn w wieku od 24 do 46 lat, zostały zamrożone w temperaturze -20 °C. Przed przystąpieniem do analizy, próbki rozmrażano w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przy 10000 obr./min przez 10 min. 3 ml supernatantu wzbogacano przez dodanie 15 µl mieszaniny wzorców w odpowiednim stężeniu i 10 µl I.S. (roztwór oksazepamu) o stężeniu 200 µg/ml. Tak przygotowaną próbkę moczu alkalizowano doprowadzając do pH 12 przy użyciu 2 M NaOH. Ekstrakcję prowadzono przez trzykrotny dodatek 1 ml dichlorometanu, wytrząsanie przez 5 min na wytrząsarce laboratoryjnej (200 obr./min), wirowanie (3000 obr./min przez 15 min) i zbieranie 0,4 ml fazy organicznej. Połączony ekstrakt o objętości 1,2 ml odparowywano do sucha w obecności azotu w temp. 25 °C. Końcowy etap polegał na rozpuszczeniu suchej pozostałości w matrycy analitycznej próbki (1,2 ml), następnie wirowaniu i analizie elektroforetycznej.

3.3. Wyniki i dyskusja

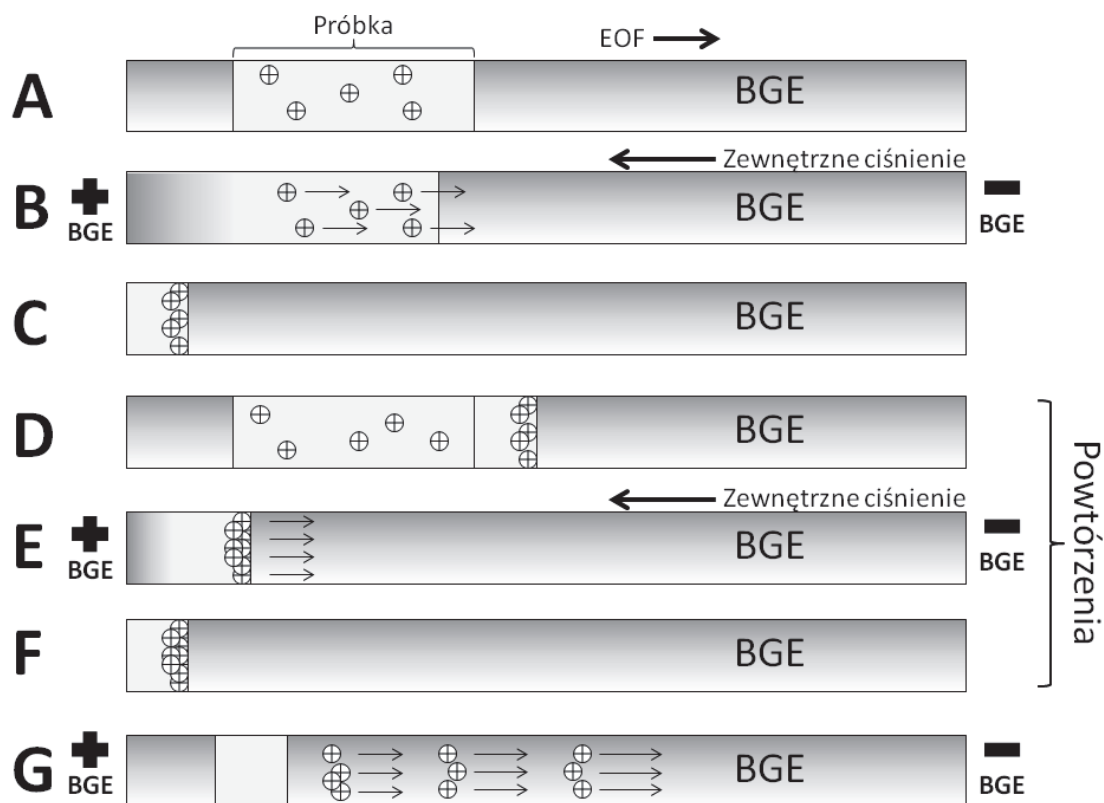
W celu maksymalizacji różnicy w przewodności roztworów, na granicy których prowadzono proces spiętrzania analitów, jako BGE użyto 80 mM H₃PO₄. Stosunkowo wysokie stężenie kwasu gwarantuje efektywny proces spiętrzania analitów. Co więcej, niskie pH hamuje EOF, co ogranicza zjawisko dyspersji substancji [20]. Wybrany BGE zapewnił także pożądaną jonizację oznaczanych związków i umożliwił ich całkowite rozdzielanie.

Zastosowana początkowo matryca o niskiej przewodności (anality w wodzie) pozwalała jedynie na efektywne spiętrzanie próbki dozowanej przez 30 s (3.45 kPa). Dłuższy czas dozowania, po przyłożeniu wysokiego napięcia, prowadził do zaburzeń w przewodzeniu prądu w kapilarze. Z tego względu konieczne było usunięcie matrycy o niskiej przewodności przed etapem rozdzielania, natomiast dodatkowy efekt wzmocnienia siły sygnału uzyskano poprzez opracowanie techniki wielokrotnego

dozowania próbki. Schemat mechanizmu wzbogacania próbki został przedstawiony na Rysunku 20. Do kapilary wypełnionej BGE wprowadzano hydrodynamicznie dużą objętość próbki, której matryca analityczna wykazywała znacznie niższą przewodność niż BGE (Rysunek 20A). Za próbką dozowana była mała objętość BGE w celu uniknięcia strat analitów podczas usuwania matrycy próbki. Spiętrzanie analitów z jednoczesnym usuwaniem próbki prowadzono przez jednoczesne przyłożenie zewnętrznego ciśnienia do naczynka od strony katodowej (wektor ciśnienia o zwrocie skierowanym do anody) i wysokiego napięcia. Stosowana wartość napięcia na tym etapie była znacznie niższa, niż potencjał używany do rozdzielania substancji. Pod wpływem pola elektrycznego anality ulegały spiętrzaniu na granicy ośrodków próbka – BGE, podczas gdy przeciwnie skierowane ciśnienie hydrodynamiczne usuwało matrycę analityczną próbki o niskiej przewodności (Rysunek 20B). Etap spiętrzania i usuwania matrycy prowadzono do momentu uzyskania około 95% wartości natężenia prądu dla kapilary w całości wypełnionej BGE (Rysunek 20C). Proces dozowania i spiętrzania próbki powtarzano w celu maksymalizacji efektu wzbogacania analitów (Rysunek 20D – F). Ostatni etap polegał na przyłożeniu wysokiego napięcia i rozdzieleniu oznaczanych jonów przy pomocy CZE (Rysunek 20G).

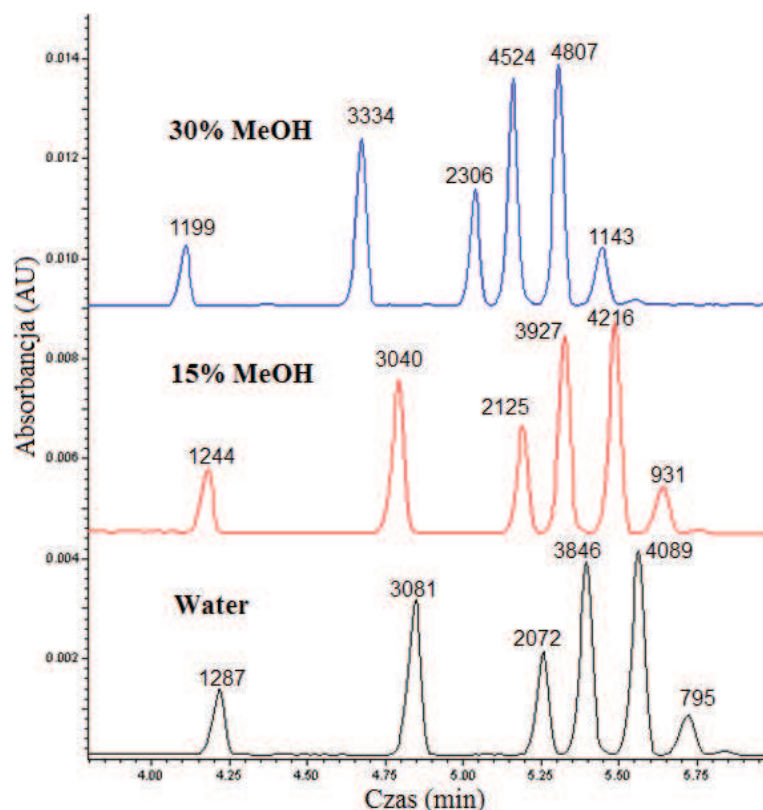
Optymalizacja techniki wzbogacania próbki obejmowała skład matrycy analitycznej próbki, stosowane napięcie podczas etapu spiętrzania, a także możliwą ilość efektywnego dozowania próbki.

Ponieważ wzmocnienie siły sygnału w technice FASS jest wprost proporcjonalne do różnicy przewodności ośrodków na granicy których zachodzi zjawisko spiętrzania, obecność rozpuszczalnika organicznego w strefie próbki promuje ten proces (Rysunek 21). Dodatkowo, w roztworze o niższej przewodności prędkość migracji jonów jest wyższa, co jest korzystne z uwagi na ryzyko utraty analitów pod wpływem przyłożonego ciśnienia. Założenie to jest zgodne z uzyskanymi wynikami (Rysunku 21). Intensywność większości sygnałów wzrasta wraz z zawartością MeOH w próbce. Dla 30% (v/v) MeOH można było zaobserwować jedynie nieznaczny spadek wysokości sygnału dla opipramolu w stosunku do sygnałów uzyskanych dla próbki w wodzie. Dalszy dodatek rozpuszczalnika skutkował niestabilnością natężenia prądu podczas analizy. Z tego względu trzydziestoprocentowe (v/v) stężenie MeOH przyjęto za optymalne.



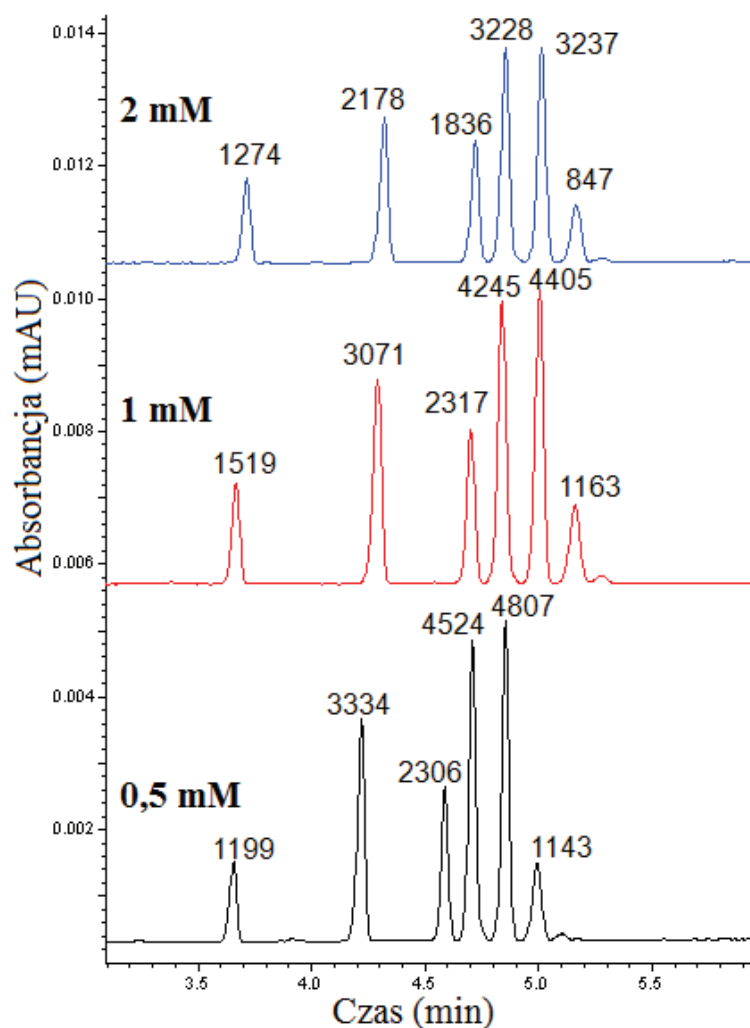
Rys. 20. Schemat mechanizmu opracowanej techniki FASS z zastosowaniem wielokrotnego dozowania próbki [138]. (A) Próbkę o niskiej przewodności dozowana jest do kapilary wypełnionej BGE. Za próbką wprowadzana jest niewielka objętość BGE. (B) Jednoczesne przyłożenie napięcia i zewnętrznego ciśnienia skutkuje spiętrzaniem oznaczanych jonów na granicy ośrodków próbka – BGE i usuwaniem matrycy analitycznej próbki. Wprowadzona mała objętość BGE na etapie (A) zabezpiecza układ przed usuwaniem analitów w początkowym etapie tego procesu. (C) Spiętrzanie prowadzi się do momentu uzyskania około 95% wartości natężenia prądu charakterystycznego dla kapilary wypełnionej jedynie BGE. (D – F) Dozowanie próbki i BGE, a następnie spiętrzanie analitów i usuwanie matrycy próbki powtarza się w celu uzyskania większego efektu wzbogacenia próbki. (G) W ostatnim etapie anality ulegają rozdzieleniu w wysokim polu elektrycznym.

Kolejnym parametrem poddanym weryfikacji był dodatek kwasu do dozowanej próbki (Rysunek 22). Obecność elektrolitu w próbce pozwala także na dozowanie do kapilary stosunkowo dużych objętości próbki o niskiej przewodności z uniknięciem zjawiska niestabilności natężenia prądu podczas etapu rozdzielania. Przeprowadzone badania wykazały dwójaki wpływ dodatku kwasu na parametry uzyskanych sygnałów. W przypadku opipramolu zaobserwowano istotny ($> 25\%$) wzrost siły sygnału dla $1 \text{ mM H}_3\text{PO}_4$ w stosunku do $0,5 \text{ mM H}_3\text{PO}_4$. Jednocześnie intensywność sygnałów pochodzących od hydroksyzyny, amitryptyliny i fluoksetyny zmalała o około 10% .



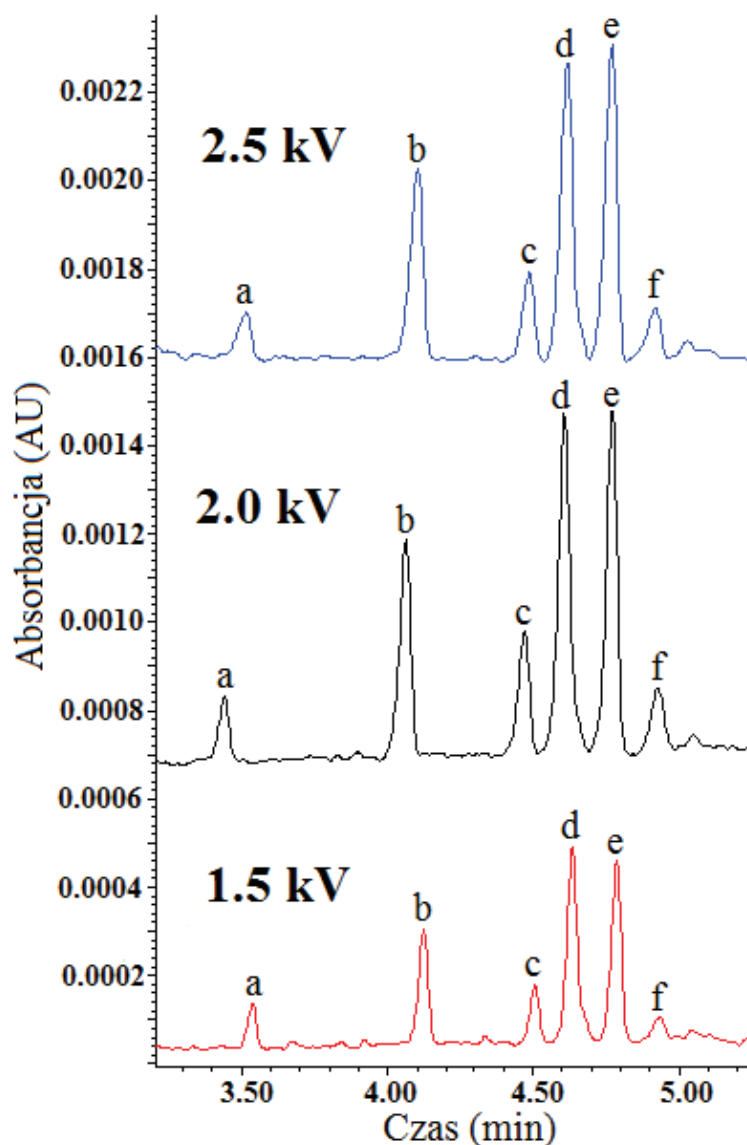
Rys. 21. Wpływ dodatku MeOH do matrycy analitycznej próbki na wysokość uzyskiwanych sygnałów [138]. Warunki: BGE, 80 mM H_3PO_4 ; próbka, 0.5 mM H_3PO_4 w wodzie (czarny), 15% (v/v) MeOH (czerwony) lub 30% (v/v) MeOH (niebieski); kapilara, średnica wewnętrzna 50 μm x całkowita długość 60 cm; napięcie, 30 kV; parametry dozowania, 3 razy 53 s (3,45 kPa) próbka i BGE (12 s, 3,45 kPa); etap spiętrzania, 2 kV, - 6,9 kPa, 0,65 min; detekcja UV (200 nm). Sygnały (od lewej): opipramol, hydroksyzyna, promazyna, amitryptylina, fluoksetyna i tiorydazyna. Wysokości poszczególnych sygnałów przedstawiono oznaczono na rysunku nad każdym pikiem.

Z jednej strony, ze względu na obecność grup aminowych w strukturze oznaczanych związków, dodatek kwasu umożliwił jonizację analitów i wydajniejsze spiętrzenie analitów. Z drugiej jednak strony wraz z ilością kwasu wzrastała siła jonowa próbki, a tym samym malała różnica w przewodności ośrodków. Efekt ten był szczególnie widoczny w obecności 2 mM kwasu, gdzie obserwowano znacznie niższe wysokości sygnałów niż w pozostałych przypadkach. Biorąc pod uwagę istotną poprawę czułości dla opipramolu i jedynie nieznaczny spadek wysokości pików dla hydroksyzyny, amitryptyliny i fluoksetyny, jako optymalny w omawianym przypadku wybrany został 1 mM kwas fosforowy.



Rys. 22. Wpływ stężenia H_3PO_4 w matrycy analitycznej próbki na wysokość uzyskiwanych sygnałów [138]. Skład dozowanej próbki: 30% (v/v) MeOH i 0,5, 1 lub 2 mM H_3PO_4 . Pozostałe warunki i oznaczenia jak na Rysunku 21.

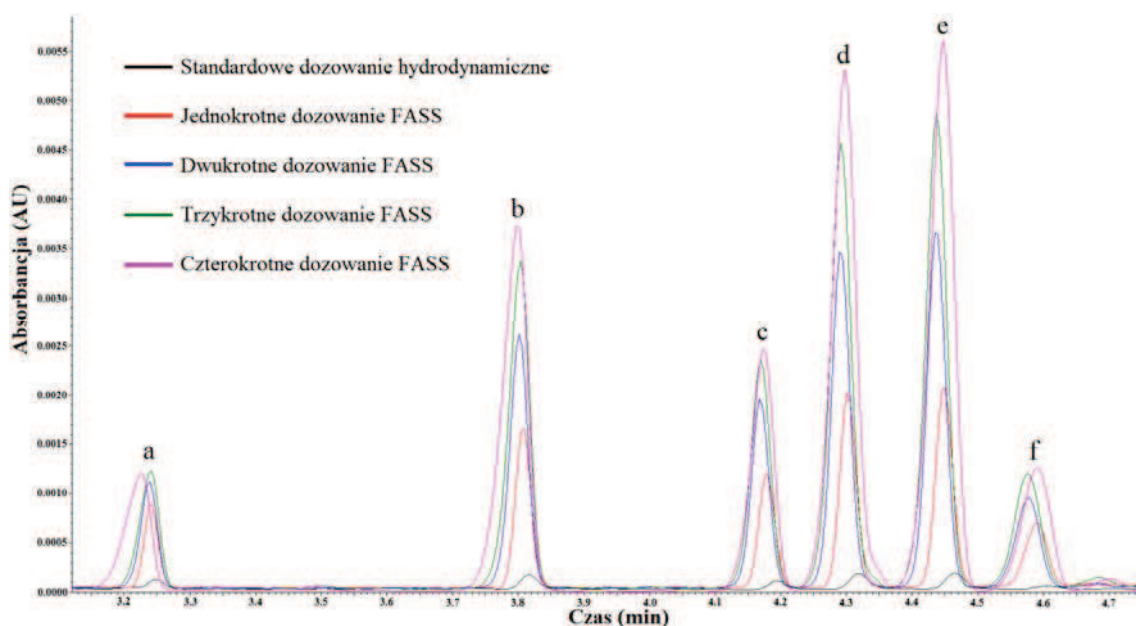
Wykazano, że przykładane napięcie podczas procesu spiętrzania miało również znaczący wpływ na uzyskane wyniki (Rysunek 23). Zastosowanie zbyt niskiego napięcia (1,5 kV) skutkowało niską prędkością migracji analitów w kierunku katody i stratami związanymi ze stosowanym ciśnieniem przeciwprowodowym. Podczas gdy najwyższe sygnały uzyskano dla 2 kV, spadek sprawności rozdzielania był widoczny już przy 2,5 kV. Co ciekawe, skrócenie czasu prowadzenia spiętrzania przy 2,5 kV dało podobny rezultat do obserwowanego na Rysunku 23. Poszerzenie sygnałów w obecności wyższego pola elektrycznego może tłumaczyć elektrostatyczne oddziaływanie analitów z anionami obecnymi w BGE, co ograniczyło dyfuzję oznaczanych amin [20; 22; 139]. Przekroczenie granicznego napięcia w tym przypadku skutkowało wzrostem udziału procesów dyfuzyjnych i poszerzeniem sygnałów. Z tego względu napięcie 2 kV zostało uznane za optymalne.



Rys. 23. Wpływ stosowanego napięcia podczas etapu spiętrzania na uzyskiwane wyniki [138]. Warunki: skład matrycy analitycznej próbki, 0,5 mM H_3PO_4 , 30% MeOH; etap spiętrzania, 1,5, 2 lub 2,5 kV, - 6,9 kPa, 0,65 min. Pozostałe warunki i oznaczenia jak na Rys. 21. Oznaczenia: a - opipramol, b - hydroksyzyna, c - promazyna, d - amitriptylina, e – fluoksetyna, f – tiorydazyna.

Usuwanie matrycy dozowanej próbki stanowiło jeden z kluczowych elementów optymalizowanej metody. W tym celu podczas etapu spiętrzania próbki, równocześnie przykładano zewnętrzne ciśnienie. Zarówno czas jak i jego wartość miały znaczący wpływ na uzyskiwane wyniki. Badania wykazały, że zbyt szybkie prowadzenie procesu przy wyższych wartościach ciśnienia niż zoptymalizowane prowadziło do usuwania części analitów wraz z matrycą, podczas gdy wydłużenie tego etapu z zastosowaniem niższego ciśnienia skutkowało poszerzaniem pików. Najkorzystniejsze parametry rozdzielania uzyskano przy zastosowaniu ciśnienia – 6,9 kPa przy czasie spiętrzania równym 0,65 min.

Współczynnik wzmocnienia siły sygnału z użyciem dozowania ciśnieniowego w CE wzrasta wraz z objętością dozowania próbki. Jakkolwiek, każda technika wykazuje pewną graniczną zdolność do efektywnego spiętrzania danej objętości próbki. Na Rysunku 24 przedstawiono elektroferogramy uzyskiwane przy użyciu różnych trybów dozowania próbki. Zastosowanie techniki FASS pozwala na znaczną poprawę czułości metody w stosunku do standardowego dozowania ciśnieniowego próbki (5 s, 3,45 kPa). Trzykrotne powtórzenie procedury dozowania i spiętrzania próbki zaowocowało dalszym wzrostem siły sygnału z zachowaniem wysokiej sprawności układu. Widoczne poszerzenie sygnałów zostało zaobserwowane dopiero przy czterokrotnym dozowaniu próbki. Niemniej jednak, i w tym przypadku odnotowano wysoką sprawność układu (137,4 - 274,4 tysięcy pólk teoretycznych na metr) i całkowite rozdzielenie oznaczanych związków. Ze względu na istotną poprawę czułości dla hydroksyzyny, amitryptyliny i fluoksetyny, czterokrotne dozowanie próbki zostało wykorzystane w dalszych etapach pracy.



Rys. 24. Wpływ trybu dozowania próbki na parametry uzyskiwanych sygnałów [138]. Skład dozowanej próbki: 30% (v/v) MeOH, 1 mM H₃PO₄. Pozostałe warunki i oznaczenia jak na Rysunku 21.

3.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody

Opracowana technika FASS z wielokrotnym dozowaniem próbki została zastosowana do oznaczania wybranych leków psychiatrycznych w próbkach moczu ludzkiego. W tym celu przeprowadzono częściową walidację metody obejmującą selektywność, zakres liniowości metody, wyznaczenie granic wykrywalności

i oznaczalności, a także oszacowanie precyzji i dokładności oznaczeń. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 3.

Tab. 3. Wyznaczone parametry walidacyjne dla opracowanej metody oznaczania wybranych leków psychiatrycznych w próbkach moczu ludzkiego po ekstrakcji ciecz-ciecz z użyciem techniki FASS z wielokrotnym dozowaniem próbki. * Sprawność rozdzielania wyliczono dla trzech analiz próbki o stężeniu 80 ng/ml ze wzoru: $N = 5,54 (t_m/w_{1/2})^2$, gdzie t_m – czas migracji analitu [s]; $w_{1/2}$ – szerokość pików w połowie wysokości [s].

	Opipramol	Hydroksyzyna	Promazyna	Amitryptylina	Fluoksetyna	Tiorydazyna
Zakres liniowości metody	30–1000 ng/ml					
Współczynnik kierunkowy prostej (a)	1.7656	3.6891	2.597	5.3255	5.6061	1.0937
Współczynnik przesunięcia prostej (b)	0.0045	0.0003	0.0173	0.0154	0.0109	0.0032
Współczynnik korelacji (R^2)	0.9992	0.9996	0.9988	0.9995	0.9996	0.9989
LOD (ng/mL)	3.92	2.23	5.04	2.77	2.74	6.21
LOQ (ng/mL)	11.76	6.69	15.12	8.31	8.22	18.63
EF	12	27	29	36	35	32
N/m (x1000)*	144.7	222.3	274.7	256.4	247.4	137.4
Powtarzalność metody (n = 6)						
Precyzja (% RSD)						
30 ng/mL	4.36	2.48	5.60	3.08	3.05	6.90
900 ng/mL	0.82	0.86	1.35	0.98	0.75	1.37
Dokładność (%)						
30 ng/mL	101.5	99.3	98.7	99.7	99.7	102.7
900 ng/mL	99.9	99.9	100.0	100.1	100.1	100.4
Odtwarzalność metody (n = 9)						
Precyzja (% RSD)						
30 ng/mL	5.11	2.54	5.74	3.22	3.49	6.73
900 ng/mL	1.05	1.14	1.39	1.13	0.88	1.51
Dokładność (%)						
30 ng/mL	102.1	100.1	99.2	99.8	99.7	101.5
900 ng/mL	99.9	99.8	100.6	100.3	100.2	100.3

Selektywność metody badano na podstawie analizy próbek moczu pochodzących od sześciu różnych osób. Na elektroferogramach nie stwierdzono interferencji pochodzących od matrycy próbek.

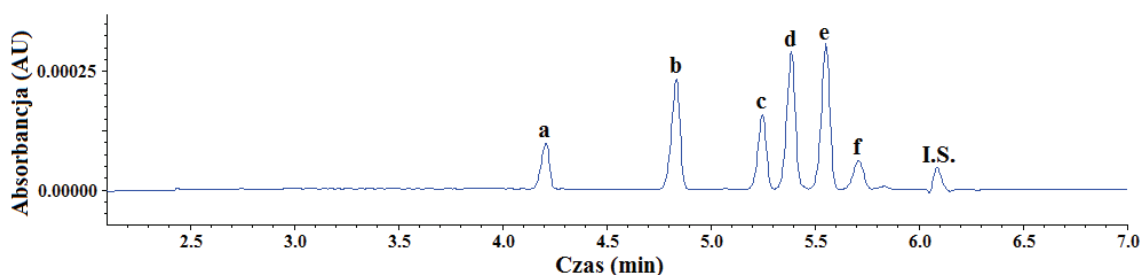
Krzywe kalibracyjne sporządzono przez analizę sześciu niezależnie przygotowanych próbek w dziesięciu różnych stężeniach (30, 40, 50, 80, 100, 300, 500, 700, 900 and 1000 ng/ml). W badanym zakresie stężeń obserwowano dobrą zgodność z przyjętym modelem liniowym ($R^2 > 0,9988$).

Granice wykrywalności i oznaczalności wyznaczono w zakresie od 2,23 do 6,21 ng/ml (LOD) oraz od 6,69 do 18,63 ng/ml (LOQ).

Precyzję metody dla dwóch różnych stężeń (30 i 900 ng/ml) wyznaczono poniżej 6,90% (dla 6 analiz w obrębie jednego dnia) i 6,73% (pomiędzy dniami, po 3 oznaczenia na dzień). Dokładność metody wahała się w granicach od 98,7 do 102,7% (dla analiz wykonanych podczas jednego dnia) i w zakresie od 99,2 do 102,1% (pomiędzy dniami).

Ocenę efektu wzmocnienia sygnału przeprowadzono przez porównanie wysokości pików uzyskiwanych z użyciem opracowanej metody (dla stężenia analitów równego 1 µg/ml) i metody opartej o standardowe dozowanie hydrodynamiczne próbki (5 s, 3,45 kPa), dla którego anality oznaczano na poziomie 10 µg/ml. Należy zaznaczyć, iż w celu eliminacji efektów spiętrzania próbki, w metodzie z wykorzystaniem małej objętości dozowania próbki, matrycę analityczną stanowił BGE. Uzyskane wartości EF mieściły się w granicy od 12 do 36 (Tabela 4).

Przykładowy elektroferogramy uzyskany w wyniku analizy próbki moczu ludzkiego wzbogaconej oznaczanymi substancjami został przedstawiony na Rysunku 25.



Rys. 25. Przykładowy elektroferogramy uzyskany w wyniku analizy próbki moczu ludzkiego wzbogaconej wybranymi substancjami o aktywności farmakologicznej [138]. Warunki analizy jak na Rysunku 21. Oznaczenia: a - opipramol, b - hydroksyzyna, c - promazyna, d - amitryptylina, e – fluoksetyna, f – tiorydazyna, I.S. – oksazepam.

4. Dozowanie elektrokinetyczne próbki we wzmocnionym polu elektrycznym w kontekście zjawiska pseudo-izotachforezy

4.1. Wstęp

Zastosowanie dozowania elektrokinetycznego próbki pozwala na wprowadzenie znacznie większej ilości analitów niż użycie dozowania ciśnieniowego, w przypadku którego ilość dozowanej substancji jest bezpośrednio zależna od objętości wprowadzonej próbki [17; 18]. Z tego względu dozowanie elektrokinetyczne umożliwia obniżenie granic wykrywalności substancji nawet o sześć rzędów wielkości [24; 118].

Jakkolwiek, wprowadzanie dużej liczby jonów do kapilary na drodze elektrokinetycznej wiąże się ze stosunkowo długim czasem prowadzenia tego procesu (od kilku do nawet kilkudziesięciu minut), podczas którego pojawia się konieczność ogniskowania wprowadzonych do kapilary jonów.

Zhang i Thormann jako pierwsi wykazali, iż dodatek do próbki rozpuszczalnika organicznego takiego, jak propan-1-ol umożliwia uzyskanie znacznie wyższych współczynników wzbogacenia analitu w stosunku do roztworów wodnych [23]. Również Shihabi uzyskał podobny efekt poprzez dodatek acetonu i acetonitrylu do matrycy analitycznej próbki [140]. Zwrócił on także uwagę na wyższość dodatku rozpuszczalnika w stosunku do próbek wodnych podczas analizy substancji, wykazujących zróżnicowaną rozpuszczalność w wodzie [140]. Ten sam autor w innej swojej pracy podkreśla znaczenie stosowanego BGE wraz z dozowaniem elektrokinetycznym próbki [124]. Wprowadzenie analitów pomiędzy roztwór boraksu (po stronie katodowej próbki) i trietanolaminy (po stronie anodowej) pozwoliło na efektywne spiętrzenie analitów na drodze tITP [124]. Technika ta została później szczegółowo opisana przez Hirokawę i współ. [26]. Niemniej jednak, Shihabi w swojej pracy wykazał skuteczność techniki FASI w obecności elektrolitu wiodącego i terminującego [124].

Ze względu na uzyskiwaną wysoką czułość metod opartych o dozowanie elektrokinetyczne próbki, podjęto próbę opracowania procedury oznaczania wybranych substancji farmakologicznie czynnych. Celem doświadczeń było wyznaczenie parametrów krytycznych dla procesu spiętrzania analitów, które poddano optymalizacji i ewaluacji. Dodatkowy efekt wzbogacenia analitów uzyskano poprzez zastosowanie techniki DLLME, jako metody przygotowania próbki do analizy elektroforetycznej. Opracowaną metodę poddano częściowej walidacji, a jej aplikacyjność wykazano

na przykładzie oznaczania wybranych substancji modelowych w próbkach moczu ludzkiego.

4.2. Część eksperymentalna

4.2.1. Przygotowanie roztworów

Roztwory wzorcowe analitów (olanzapina, prochlorperazyna, trifluoperazyna, perfenazyna, chlorprotiksen, klomipramina) przygotowano w MeOH w stężeniu 1 mg/ml. 0,2 M roztwory Tris i chlorku sodu przygotowano w kolbkach miarowych rozpuszczając odważone substancje w wodzie dejonizowanej. Pożądane pH roztworów uzyskano poprzez doprowadzanie za pomocą 1 M roztworu kwasu solnego. Mieszaninę ekstrakcyjną przygotowano przez umieszczenie 2,5 ml CCl₄ w kolbie miarowej o pojemności 25 ml i rozcieńczenie ACN do kreski.

4.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne

Wszystkie eksperymenty w ramach opracowania metody były prowadzone przy użyciu niemodyfikowanej kapilary krzemionkowej o średnicy wewnętrznej 50 µm i całkowitej długości 57 cm (efektywna długość: 50 cm) termostатовanej w temperaturze 22 °C.

Każdą nową kapilarę kondycjonowano kolejno: MeOH (20 min), 1 M NaOH (60 min), 0,1 M NaOH (30 min), wodą (30 min) i roztworem BGE (20 min).

Na początku każdego dnia używana kapilara przepłukiwana była: MeOH (10 min), 0,1 M NaOH (20 min), wodą dejonizowaną (10 min) i roztworem BGE (15 min). Końcowy etap polegał na zanurzeniu obrotów kapilary w roztworze BGE i przyłożeniu wysokiego napięcia (22 kV) przez 15 min.

Zoptymalizowana procedura stosowana podczas analiz elektroforetycznych obejmowała: (i) przemycie kapilary roztworem BGE (2 min) złożonym z 45 mM Tris (pH 2,20); (ii) dozowanie 0,25 mM roztworu HCOOH (3 s, 3,45 kPa); (iii) elektrokinetyczne dozowanie próbki (70 s, 5 kV), której matryca analityczna składała się z 90% MeOH i 0,25 mM HCOOH; (iv) dozowanie BGE (3 s, 3,45 kPa); (v) elektroforetyczne rozdzielanie składników próbki (22 kV przez 10 min); (vi) płukanie końcowe kapilary (MeOH – 1 min, 0,1 M NaOH – 3 min, BGE – 1 min). Podczas etapu optymalizacji metody elektroforetycznej stosowano detekcję analitów przy $\lambda = 200$ nm, podczas gdy detekcję w czasie optymalizacji ekstrakcji i częściowej

walidację metody prowadzono przy $\lambda = 254$ nm. Wszystkie procedury przemywania kapilary w eksperymentach prowadzono przy ciśnieniu 138 kPa.

4.2.3. Procedura przygotowania próbki do analizy

Zebrane próbki moczu ludzkiego pobrane od zdrowych ochotników przechowywano w temperaturze -20°C przez okres przynajmniej 24 godzin przed użyciem, jednak nie dłużej niż siedem dni. Po rozmrożeniu w temperaturze pokojowej, próbki moczu wirowano przez 5 min przy 3000 obr./min. Do 995 μl supernatantu dodawano 5 μl mieszaniny wzorców i 10 μl I.S. (wodny roztwór promazyny o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$). Po dokładnym wymieszaniu zawartości fiolki całość alkalizowano przez dodanie 100 μl 1 M NaOH, po czym zawartość naczynka mieszano i wirowano przez 2 min przy 8000 obr./min. Następnie, 1 ml tak przygotowanego supernatantu umieszczano w probówce typu eppendorf o pojemności 1,5 ml i poddawano procedurze DLLME.

300 μl mieszaniny ekstrakcyjnej „błyskawicznie” wprowadzano do uprzednio przygotowanej próbki moczu przy pomocy mikrostrzykawki o pojemności 500 μl (Hamilton, Reno, NA, USA). Probówkę zamykano na czas 14 min, po czym wirowano przez 2 min przy 8000 obr./min. 20 μl dolnej fazy organicznej zbierano przy pomocy mikrostrzykawki o pojemności 100 μl (Hamilton) i przenoszono do kolejnej próbki typu eppendorf o pojemności 0,5 ml. Rozpuszczalnik organiczny odparowywano w temp. 50°C pod zmniejszonym ciśnieniem przez 25 min, a suchą pozostałość rozpuszczano w 30 μl matrycy analitycznej próbki (0,25 mM HCOOH w 90% MeOH), którą następnie analizowaną z użyciem CE.

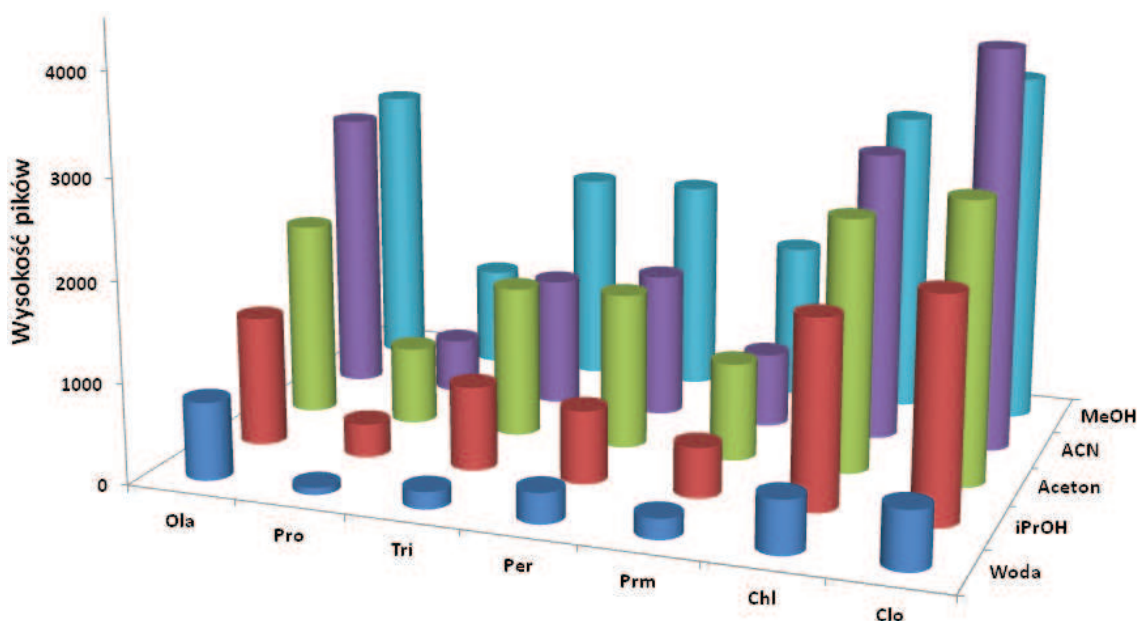
4.3. Wyniki i dyskusja

4.3.1. Spiętrzanie

Optymalizacja metody obejmowała zbadanie wpływu takich czynników, jak skład matrycy analitycznej próbki, skład stosowanego BGE, czas i napięcie dozowania próbki, a także skład i parametry dozowania roztworu wprowadzanego do kapilary bezpośrednio przed próbką.

Skład matrycy analitycznej próbki ma istotne znaczenie dla procesu spiętrzania [23; 124; 140]. Ponieważ większa różnica przewodności pomiędzy próbką i BGE pozwala na uzyskanie wyższych liczbowo współczynników wzmocnienia sygnału, badano wpływ rodzaju rozpuszczalnika organicznego w matrycy analitycznej próbki

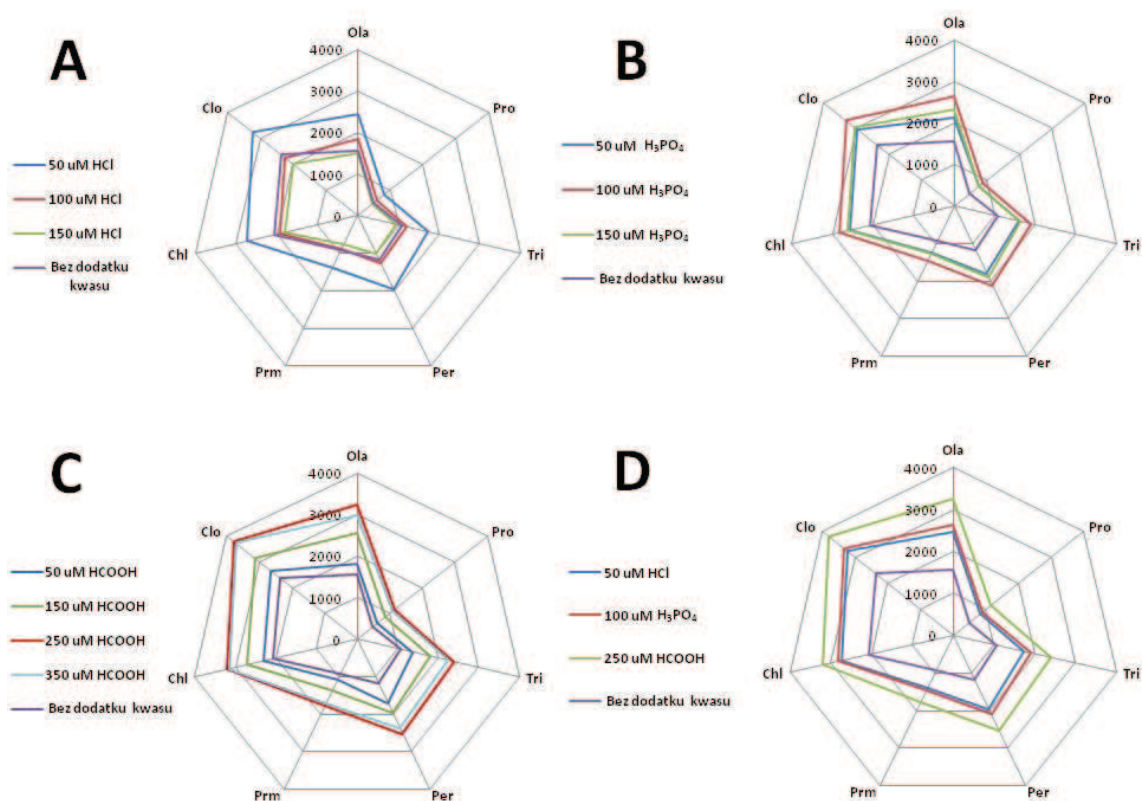
(Rysunek 26). Najniższe sygnały uzyskano przy użyciu wody jako matrycy analitycznej próbki, podczas gdy dodatek rozpuszczalnika organicznego znacznie poprawił czułość metody. Mniejszą czułość w przypadku użycia iPrOH w stosunku do pozostałych rozpuszczalników organicznych może tłumaczyć wyższa lepkość tego alkoholu. Dodatek acetonu, ACN i MeOH miał z kolei różnorodny wpływ na uzyskiwaną wysokość poszczególnych analitów. Oprócz sygnału pochodzącego od kломipraminy, dla której najlepszym rozpuszczalnikiem okazał się ACN, najwyższe sygnały obserwowano w obecności MeOH i z tego względu 90% dodatek tego rozpuszczalnika został użyty do dalszych eksperymentów.



Rys. 26. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika w matrycy analitycznej próbki na wysokość uzyskiwanych sygnałów [141]. Warunki: BGE, 45 mM Tris, pH 2,20; próbka, 0,25 mM HCOOH w wodzie lub 90% (v/v) roztworze iPrOH, acetonu, ACN lub MeOH; kapilara, średnica wewnętrzna 50 μ m x całkowita długość 57 cm; napięcie, 22 kV; parametry dozowania, 3 s (3,45 kPa) 0,25 mM HCOOH, następnie 70 s (5 kV) próbka, następnie 3 s (3,45 kPa) BGE; detekcja UV (200 nm). Oznaczenia: Ola – olanzapine, Pro – prochlorperazyna, Tri – trifluoperazyna, Per – perfenazyna, Prm – promazyna, Chl – chlorprotiksen, Clo – kломipramina.

Dozowanie elektrokinetyczne substancji o charakterze słabych zasad organicznych umożliwia wprowadzanie dużej ich ilości do kapilary, głównie za sprawą elektroforetycznej migracji oznaczanych związków. W tej sytuacji stopień jonizacji analitów odgrywa kluczową rolę w procesie dozowania elektrokinetycznego. Z tego względu testowano wpływ dodatku rodzaju i ilości kwasu na efekt wzmocnienia siły sygnału (Rysunek 27). Dodanie każdego spośród testowanych kwasów (HCl, HCOOH i H₃PO₄) może skutkować przyrostem lub spadkiem siły sygnału analitów (Rysunek 27A – C), co znajduje potwierdzenie w literaturze naukowej [23; 140].

W przypadku kwasu solnego znaczna poprawa czułości była obserwowana przy stężeniu 50 μM , podczas gdy dalsze zwiększenie stężenia powodowało odwrotny efekt. Stężenia przebadanych kwasów wykazujące największą poprawę czułości metody zestawiono na Rysunku 27D. Uzyskane wyniki wskazują na podobny efekt wzmocnienia w przypadku stosowania 50 μM HCl i 100 μM H₃PO₄, a także wyższość 250 μM HCOOH nad pozostałymi kwasami.



Rys. 27. Wpływ rodzaju i stężenia (A) HCl, (B) H₃PO₄, (C) HCOOH na wysokość uzyskiwanych sygnałów [141]. Na rysunku (D) zestawiono optymalne stężenia poszczególnych kwasów. Przed próbką dozowano wodą (3 s, 3,45 kPa). Pozostałe warunki dozowania takie same jak na Rysunku 26 z 90% dodatkiem MeOH.

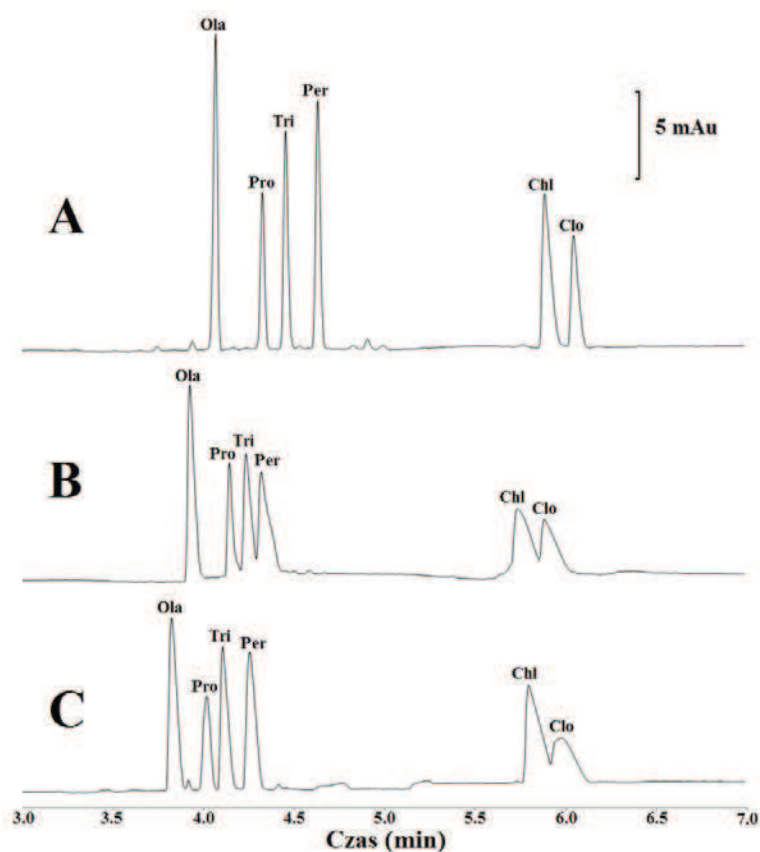
Claude i współ. wykazali, iż dodatek kwasu do matrycy analitycznej próbki, a także do roztworu dozowanego bezpośrednio przed próbką (ang. head-column injection) wpływa na powtarzalność uzyskiwanych wyników [142]. Mając na uwadze wspomniane doniesienie oszacowano wpływ poszczególnych kwasów jako dodatków do matrycy analitycznej próbki na precyzję wyników (Tabela 4). W tym zestawieniu to 50 μM HCl umożliwił bardziej precyzyjne dozowanie większości analitów do kapilary. Także zastosowanie 100 μM H₃PO₄ skutkowało mniejszym rozrzutem wyników aniżeli 250 μM HCOOH. Niemniej jednak, w przypadku kwasu mrówkowego uzyskany efekt wzmocnienia był zdecydowanie wyższy (Rysunek 27D). Co więcej,

dozowanie 0,25 mM roztworu HCOOH przed próbką zamiast wody pozwoliło na poprawę precyzji uzyskiwanych wyników (Tabela 4). Z uwagi na satysfakcjonującą precyzję w omawianym przypadku ($RSD < 1,80\%$) 0,25 mM roztwór HCOOH został wybrany jako optymalny zarówno w matrycy analitycznej próbki, jak i w roli roztworu dozowanego bezpośrednio przed nią do kapilary.

Tab. 4. Wpływ rodzaju i stężenia kwasu w matrycy analitycznej próbki na względne odchylenie standardowe uzyskiwane dla poszczególnych substancji. Przed próbką dozowano wodę (3 s, 3,45 kPa). Pozostałe warunki dozowania takie same jak na Rysunku 26 z 90% dodatkiem MeOH. * Przed próbką, zamiast wody, dozowano 250 μ M roztwór HCOOH (3 s, 3,45 kPa).

Analit	Bez dodatku kwasu	50 μ M HCl	100 μ M H ₃ PO ₄	250 μ M HCOOH	250 μ M HCOOH*
RSD (A_{rel}) % (n=3)					
Ola	4.03	0.80	1.93	2.35	1.38
Pro	7.09	2.86	3.15	0.50	0.46
Tri	3.31	0.68	3.90	3.66	0.36
Per	7.16	1.87	4.39	4.12	1.56
Chl	4.26	1.29	0.63	3.87	1.06
Clo	3.42	2.89	0.81	4.25	1.80

Poprawa czułości metody przy dodatku niewielkiej ilości kwasów jest wynikiem uzyskiwania większego ładunku poszczególnych substancji. Dalszy wzrost siły jonowej roztworu działa niekorzystnie na efekt spiętrzania próbki poprzez zmniejszenie różnicy w przewodności próbki i roztworu BGE. Ponieważ stopień dysocjacji kwasów użytych w badaniu rośnie w następującej kolejności $HCOOH < H_3PO_4 < HCl$, dlatego też optymalne stężenia były najniższe dla kwasu najlepiej zdysocjowanego. Stopień dysocjacji kwasów tłumaczy również precyzję uzyskiwanych wyników. Najlepszą stabilizację natężenia prądu podczas dozowania próbki uzyskiwano z użyciem najbardziej zdysocjowanego elektrolitu. W swojej pracy Anres i współ. zwrócili uwagę na ten fakt zalecając dozowanie elektrokinetyczne próbki prowadzone przy stałym natężeniu prąd zamiast stałego napięcia [95]. Niestety, ze względu na ograniczenia technologiczne stosowanego urządzenia (aparat P/ACE 5000) w prezentowanej pracy dozowanie próbki prowadzono przy stałej różnicy potencjałów. Niemniej jednak, dodatek niewielkiej ilości elektrolitu do roztworu dozowanego bezpośrednio przed próbką zapewnił satysfakcjonującą powtarzalność wyników.



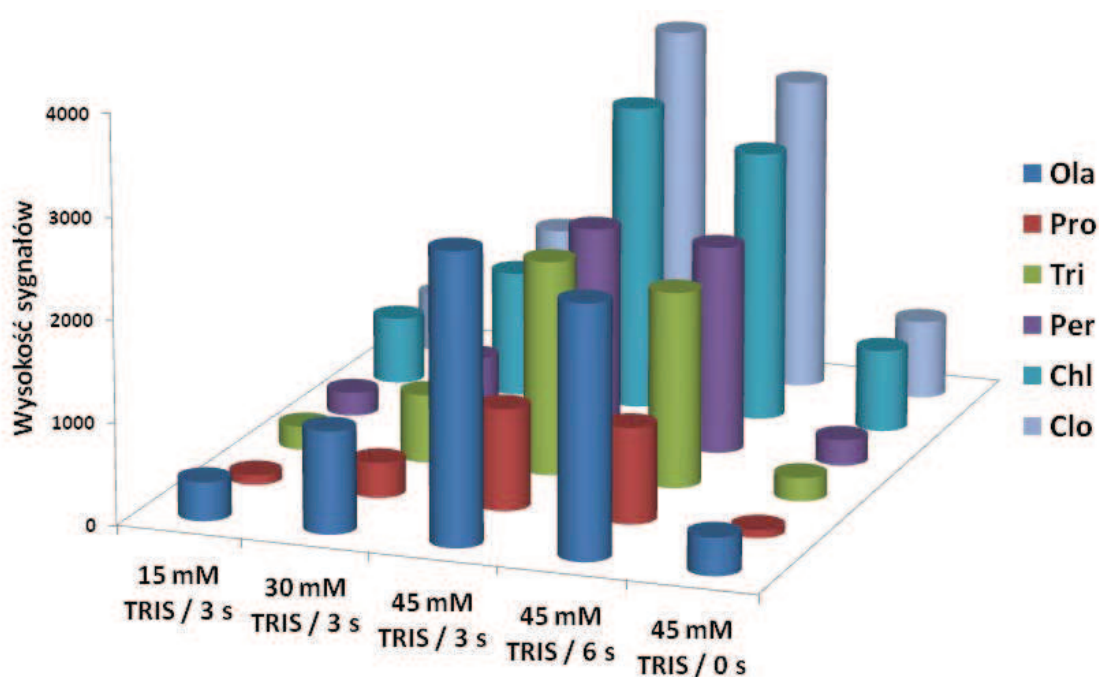
Rys. 28. Elektroferogramy uzyskane przy użyciu BGE o różnym składzie: (A) 45 mM Tris/HCl, pH 2,20; (B) 40 mM H_3PO_4 , pH 2,20; (C) NaCl/HCl, pH 2,20 [141]. Pozostałe warunki i oznaczenia takie same jak na Rysunku 26 z 90% dodatkiem MeOH.

Również skład użytego BGE poddano procesowi optymalizacji. W celu eliminacji efektu poszerzenia uzyskiwanych sygnałów na skutek obecności EOF testowano roztwory o niskiej wartości pH (pH 2,20 – 2,30) [118]. Rysunek 28 przedstawia wpływ składu BGE na uzyskiwane elektroferogramy. Początkowo użyty roztwór Tris o stężeniu 45 mM z dodatkiem HCl o pH 2,20 zapewnił wysoką sprawnością układu i rozdzielanie analitów do linii podstawowej (Rysunek 28A). Znaczący spadek sprawności rozdzielania odnotowano przy zastosowaniu 40 mM H_3PO_4 (Rysunek 28B). Z uwagi na podobne wartości pH elektrolitów, różnice w badanych roztworach BGE dotyczyły użytych przeciwjonów (fosforan i chlorek) i kofionów. Weryfikację tych czynników przeprowadzono przy użyciu trzeciego BGE, złożonego z roztworu chlorku sodu i kwasu solnego o przewodności i pH zbliżonej do pozostałych dwóch testowanych roztworów (Rysunek 28C). W przedstawionym trzecim przypadku obserwowano poprawę symetrii sygnałów w porównaniu z 40 mM H_3PO_4 , jednakże sprawność rozdzielania była nadal znacznie niższa niż dla pierwszego z testowanych BGE. O ile korzystniejsze parametry rozdzielania można

tłumaczyć zmianą użytego przeciwjonu, co znajduje potwierdzenie w literaturze naukowej [143], o tyle ciekawszy był fakt wyższości BGE zawierającego Tris nad elektrolitem sodowo – chlorkowym. Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być dynamiczne powlekane jonami Tris^+ ujemnie naładowanej ściany kapilary, co przeciwdziałało adsorpcji oznaczanych związków do ściany kapilary [123]. Jednakże niskie pH używanych roztworów BGE w znaczący sposób ograniczało dysocjację grup silanolowych na wewnętrznej powierzchni kapilary, co w znacznym stopniu ograniczało poszerzenie sygnałów w wyniku procesów adsorpcyjnych [20]. Z tego względu wyjaśnieniem uzyskanych wyników jest obecność procesu izotachforetycznego, a dokładniej p-ITP [144]. Rozpuszczalnik organiczny w matrycy analitycznej próbki pełni w tym układzie rolę TE, podczas gdy LE stanowi stosowany kjon w BGE. Porównując ruchliwości elektroforetyczne jonu Tris^+ ($29,5 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) i Na^+ ($51,9 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), a także uwzględniając stosowany przeciwjon Cl^- ($-79,1 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), po podstawieniu do Równania 8 uzyskujemy wyższą wartość współczynnika K dla BGE zawierającego jony Tris^+ aniżeli Na^+ , a tym samym silniejszy efekt spiętrzenia analitów dla elektrolitu o składzie 45 mM Tris/HCl (pH 2,20).

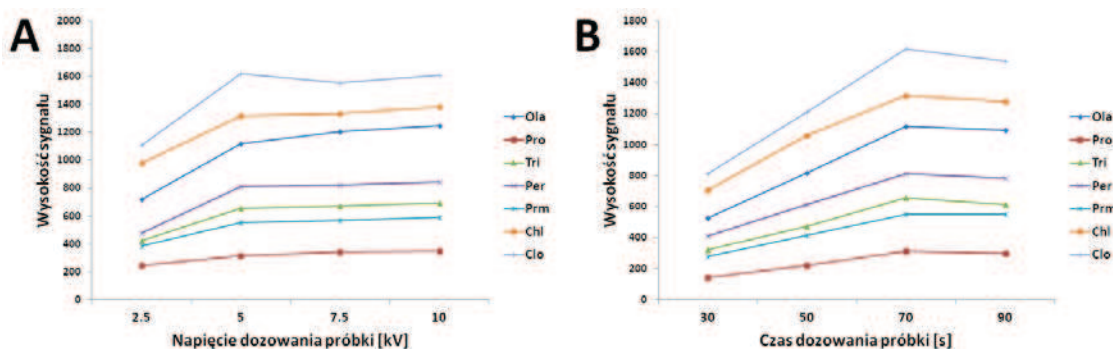
Na Rysunku 29 przedstawiono zależność stężenia użytego BGE od wysokości otrzymanych sygnałów. Obserwowany efekt wzmocnienia siły sygnału wraz ze wzrostem stężenia elektrolitu jest wypadkową wyższego natężenia prądu podczas dozowania próbki w warunkach stałego napięcia 5 kV w obecności BGE o wyższej przewodności i procesów wzbogacania analitów. Ze względu na ograniczenia aparaturowe zastosowanie wyższych stężeń niż 45 mM Tris skutkowało niestabilnością przewodzenia prądu w trakcie rozdzielania elektroforetycznego.

Rysunek 29 przedstawia także wpływ czasu dozowania małej objętości roztworu 0,25 mM HCOOH przy ciśnieniu 3,45 kPa. Znacznie niższe sygnały obserwowane w przypadku eliminacji tej procedury w stosunku do jej stosowania (3 lub 6 s) były najprawdopodobniej wynikiem dyfundowania analitów z powrotem do naczynka anodowego po etapie dozowania próbki. Nieznacznie wyższe piki uzyskano przy zastosowaniu 45 mM roztworu Tris i trzysekundowego czasu dozowania 0,25 mM HCOOH bezpośrednio przed próbką i te parametry użyto w dalszych etapach badań.



Rys. 29. Wpływ stężenia elektrolitu w BGE i czasu dozowania 0,25 mM HCOOH (0, 3 lub 6 s) na wysokość uzyskiwanych pików [141]. Pozostałe warunki i oznaczenia takie same jak na Rysunku 26 z 90% dodatkiem MeOH.

Warunki dozowania próbki mają bezpośredni wpływ na ilość cząsteczek analitów wprowadzanych do kapilary. Na Rysunku 30 przedstawiono zależność stosowanego napięcia i czasu od wysokości uzyskiwanych pików. Podczas gdy zwiększenie napięcia z 2,5 kV do 5 kV skutkowało znaczącą poprawą czułości metody, wyższe potencjały wykazywały niewielki wpływ na uzyskiwaną wysokość sygnałów jednocześnie powodując poszerzenie pików (Rysunek 30A). W przypadku czasu dozowania próbki obserwowano liniowy wzrost siły sygnałów w zakresie od 30 do 70 s (Rysunek 30B). Przedłużenie tego etapu prowadziło do spadku intensywności pików i utraty sprawności układu. Uwzględniając wyniki uzyskane w testowanym zakresie przykładanego napięcia i czasu dozowania próbki, za optymalne warunki przyjęto 5 kV i 70 s.



Rys. 30. Wpływ (A) napięcia i (B) czasu dozowania próbki na wysokość uzyskiwanych sygnałów [141]. Pozostałe warunki i oznaczenia takie same jak na Rysunku 26 z 90% dodatkiem MeOH.

4.3.2. Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz

Technika DLLME jest jedną z najważniejszych technik mikroekstrakcyjnych. Jej duża popularność wynika przede wszystkim z ekstremalnie krótkiego czasu prowadzenia procesu (nawet kilka sekund), dużego współczynnika wzbogacenia próbki (nierzadko tysiąckrotnego), prostoty wykonania i niewielkiego zużycia rozpuszczalników organicznych [145; 146]. Ze względu na wymienione zalety, technika DLLME została użyta w celu ekstrakcji i dodatkowego wzbogacenia analitów z próbek biologicznych na przykładzie moczu ludzkiego.

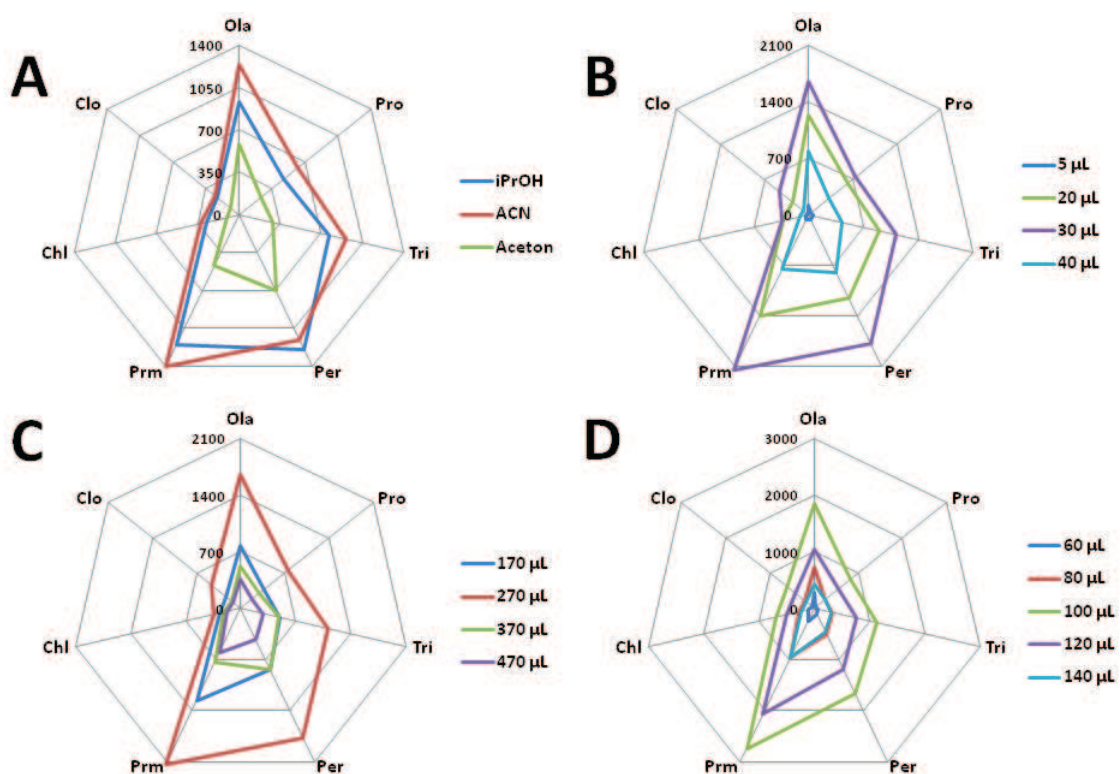
Podstawowym parametrem wpływającym na wydajność ekstrakcji w technice DLLME jest rodzaj użytego układu ekstrakcyjnego. Jako czynnik ekstrahujący standardowo stosuje się rozpuszczalniki organiczne o gęstości większej od gęstości wody [146]. W ramach przeprowadzonych doświadczeń testowano użycie di-, tri- i tetrachlorometanu. Stosunkowo wysoka rozpuszczalność pierwszych dwóch rozpuszczalników w wodzie wymagała zastosowania tych odczynników w objętości > 100 μ l podczas każdorazowej ekstrakcji. Z tego względu w eksperymentach używano CCl_4 .

Spośród badanych rozpuszczalników dyspergujących najwyższą wydajność wykazało użycie ACN (Rysunek 31A). Zapewnił on nie tylko najlepszą dyspersję CCl_4 w próbce, ale także największą objętość kropli ekstrahenta po procesie wirowania. Nieznacznie wyższy sygnał dla perfenazyny uzyskano z użyciem iPrOH. Jakkolwiek, różnica ta była niewielka i w dalszym etapie badań stosowano ACN, jako rozpuszczalnik dyspergujący.

Badano także wpływ objętość stosowanych faz na proces ekstrakcji analitów (Rysunek 31B i C). Najwyższe sygnały uzyskano przy użyciu 30 μ l CCl_4 w 270 μ l ACN. W technice DLLME objętość stosowanego ekstrahenta zwykle nie

przekracza 10 μL [146 - 148]. Jakkolwiek, większość z publikowanych prac dotyczy zastosowania techniki DLLME do ekstrakcji próbek o niskiej zawartości soli. Jednocześnie efekt wysalania próbki miał negatywny wpływ na proces wymiany masy. Z tego względu większa objętość CCl_4 prawdopodobnie pozwoliła na przezwycięzenie stosunkowo dużej siły jonowej badanych próbek.

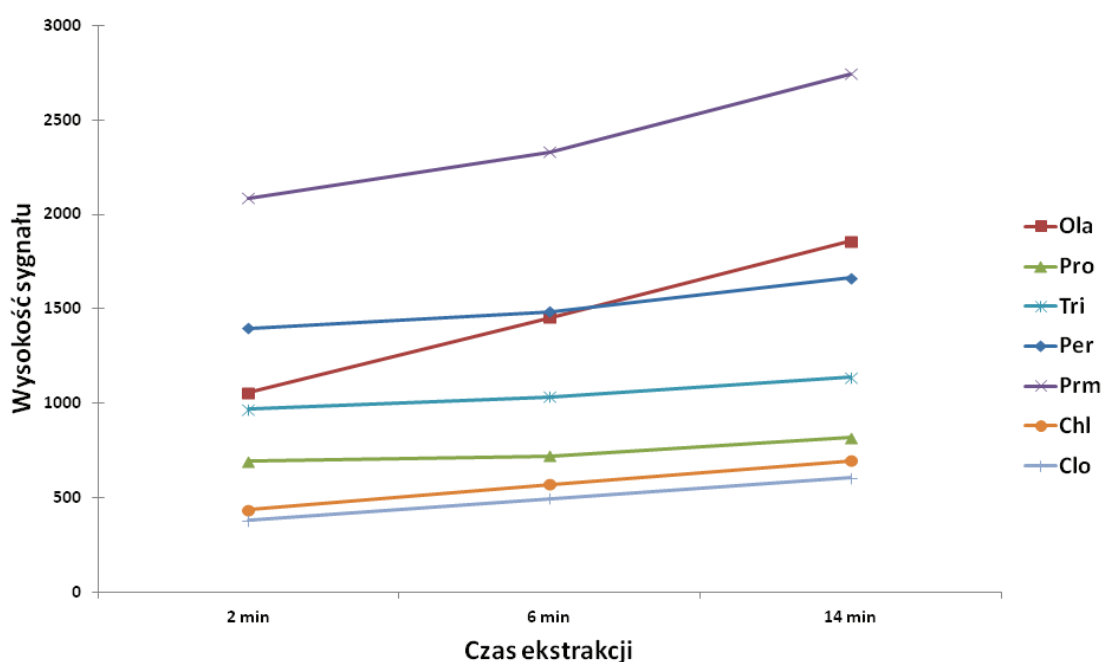
Ze względu na charakter chemiczny oznaczanych substancji, kluczowa dla procesu ekstrakcji była alkalizacja moczu. Wpływ dodatku różnej objętości (60 – 140 μL) 1 M NaOH do próbki na wysokość pików przedstawiono na Rysunku 30D. 100 μL roztworu zasady wykazało najkorzystniejszy wpływ na uzyskiwane wyniki. Objętość ta odpowiada końcowej wartości pH próbki równej 12, co zapewniło całkowite przejście analitów w postać wolnych zasad. Dalszy zwiększanie ilości NaOH skutkowało jedynie zwiększaniem siły jonowej próbki wpływając niekorzystnie na wydajność procesu.



Rys. 31. Wpływ (A) rodzaju rozpuszczalnika dyspergującego, (B) objętości rozpuszczalnika ekstrahującego, (C) objętości rozpuszczalnika dyspergującego, (D) objętości dodatku 1 M roztworu NaOH, na wysokość uzyskiwanych sygnałów [141]. Warunki: czas ekstrakcji: 2 min; rozpuszczalnik organiczny: CCl_4 ; rozpuszczalnik dyspergujący: ACN; objętość rozpuszczalnika organicznego: (A) 20 μL , (C, D) 30 μL ; objętość dodanego 1 M roztworu NaOH: 100 μL ; całkowita objętość mieszaniny ekstrahującej: 300 μL ; detekcja UV (254 nm). Pozostałe warunki elektroforetyczne i oznaczenia takie same jak na Rysunku 26 z 90% dodatkiem MeOH.

Ostatni etap optymalizacji techniki DLLME dotyczył czasu prowadzenia ekstrakcji. Na Rysunku 31 przedstawiono wpływ tego parametru na wysokość

sygnałów. Zaskakujący był fakt liniowej zależności ilości wyekstrahowanych substancji od czasu, charakterystyczny dla klasycznej LLE, podczas gdy jedną z zalet techniki DLLME jest szybkość procesu i brak wspomianej zależności [145]. Co więcej, zastosowanie mieszania przy pomocy wirówki punktowej lub ultradźwięków nie wpływało w istotny sposób na szybkość ekstrakcji. Uzyskane wyniki może tłumaczyć fakt stosunkowo dużej siły jonowej próbki i objętości rozpuszczalnika ekstrahującego, a także obecnością substancji matrycowych w próbce utrudniających proces wymiany masy. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż prowadzenie ekstrakcji przez 14 min pozwala na uzyskanie satysfakcjonującej wydajności w stosunkowo krótkim czasie.



Rys. 32. Wpływ czasu prowadzenia procesu ekstrakcji na wysokość uzyskiwanych sygnałów [141]. Warunki ekstrakcji takie same jak na Rysunku 31D przy użyciu 100 µl 1 M NaOH. Warunki elektroforetyczne i oznaczenia takie same jak na Rysunku 26 z 90% dodatkiem MeOH.

4.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody

Zoptymalizowana technika DLLME wraz z opracowaną metodą elektroforetyczną poddano częściowej walidacji na przykładzie oznaczania wybranych substancji czynnych w moczu ludzkim. Wyznaczone parametry walidacyjne zestawiono w Tabeli 5.

Selektywność metody została oceniona na podstawie analizy sześciu próbek moczu pochodzących od 6 zdrowych ochotników. W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono interferencji pochodzących z matrycy próbki z oznaczanymi substancjami.

Tab. 5. Zestawienie wybranych parametrów walidacyjnych wyznaczonych dla opracowanej metody DLLME-FASI.

	Ola	Pro	Tri	Per	Chl	Clo
Zakres liniowości metody	LOQ – 100 ng/ml					
Współczynnik kierunkowy prostej (a)	0.0639	0.0332	0.0451	0.0605	0.0294	0.0204
Współczynnik przesunięcia prostej (b)	0.0438	0.0518	-0.0099	-0.0396	0.0092	-0.0226
Współczynnik korelacji (R^2)	0.9943	0.9982	0.9986	0.9994	0.9982	0.9992
LOD (ng/mL)	0,30	0,50	0,50	0,30	0,75	0,60
LOQ (ng/mL)	1,0	1,5	1,5	1,0	2,5	2,0
EF (FASI)	850	889	481	594	976	1127
EF (DLLME)	14	15	18	19	8	10
EF (DLLME – FASI)	11 910	13 410	8 760	11 550	8 080	11 200
Powtarzalność metody (n = 6)						
Precyzja (% RSD)						
LOQ	10,2	9,7	10,5	9,6	8,5	9,3
4 x LOQ	7,2	6,8	8,8	7,6	6,8	9,1
50 ng/ml	5,2	4,6	3,4	2,8	4,3	4,2
80 ng/ml	4,1	3,9	4,0	3,1	3,5	3,8
Dokładność (%)						
LOQ	87,3	91,2	89,5	111,1	90,2	91,7
4 x LOQ	104,7	94,1	91,1	105,9	108,4	108,8
50 ng/ml	96,6	97,2	94,0	103,7	97,5	102,8
80 ng/ml	95,1	94,7	97,6	98,2	96,8	101,3
Odtwarzalność metody (n = 9)						
Precyzja (% RSD)						
LOQ	12,1	9,3	11,2	9,9	9,0	9,5
4 x LOQ	8,6	7,8	9,8	8,9	8,1	10,0
50 ng/ml	5,5	6,1	5,0	4,7	5,8	5,1
80 ng/ml	5,3	4,9	6,2	3,0	4,5	5,2
Dokładność (%)						
LOQ	85,8	86,6	88,4	109,4	90,3	89,7
4 x LOQ	106,8	91,3	88,9	112,3	110,0	111,2
50 ng/ml	96,8	94,1	92,5	104,6	93,3	98,1
80 ng/ml	97,4	96,2	99,1	95,9	97,7	98,6

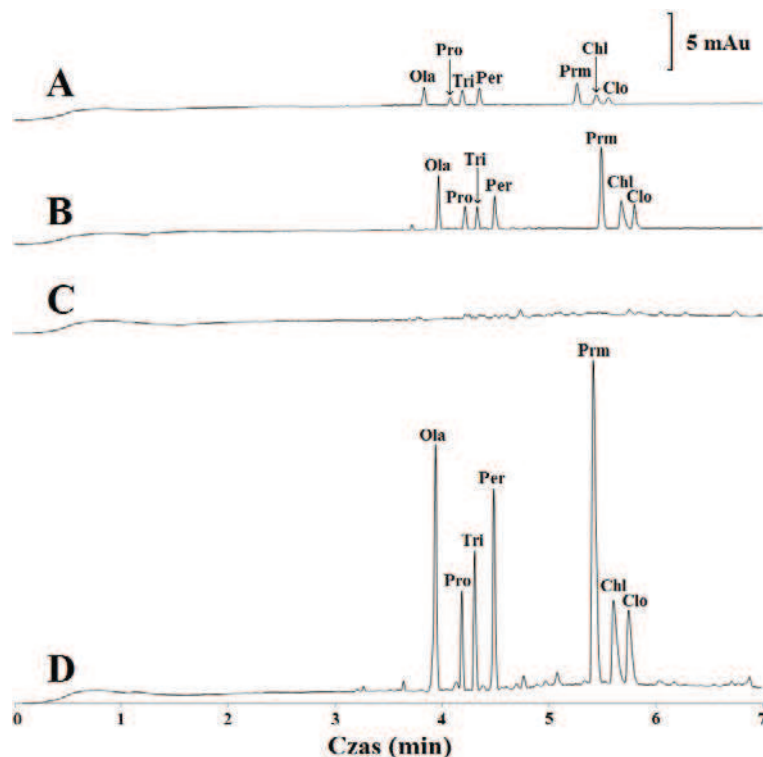
Liniowość metody oceniano w zakresie od LOQ wyznaczonego dla danego analitu do 100 ng/ml. Testowany zakres stężeń wykazywał dobrą zgodność z założonym modelem liniowym ($R^2 > 0,994$).

Wartości LOD i LOQ wyznaczono dla poszczególnych analitów na podstawie $S/N = 3$ (dla LOD) i $S/N = 10$ (dla LOQ). Wyznaczony współczynnik LOD wahał się w

zakresie od 0,30 do 0,75 ng/ml, podczas gdy LOQ oznaczono w przedziale od 1,0 do 2,5 ng/ml.

Powtarzalność metody oceniona na podstawie analizy sześciu niezależnie przygotowanych próbek moczu wzbogaconych mieszaniną oznaczanych substancji czynnych w czterech różnych stężeniach (LOQ, 4 x LOQ, 50 i 80 ng/ml) w ciągu jednego dnia. Wyznaczone wartości precyzji mieściły się w zakresie od 3,1 do 10,5% RSD, a dokładność wyników wynosiła od 87,3 do 108,8%.

Podobną procedurę stosowano w przypadku oceny odtwarzalności metody. W tym celu analizowano po trzy próbki na dzień przez trzy kolejne dni w czterech różnych stężeniach (LOQ, 4 x LOQ, 50 i 80 ng/ml). Uzyskane odchylenia mieściły się w zakresie od 3,0 do 12,1 % RSD, podczas gdy dokładność wynosiła od 85,8 do 112,3%.



Rys. 33. Porównanie elektroferogramów uzyskanych z użyciem: (A) standardowego dozowania próbki (5 s, 3,45 kPa), anality w BGE w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$; (B) techniki FASI, anality w stężeniu 40 ng/ml; (C) techniki DLLME – FASI, próbka moczu bez dodatku wzorców; (D) techniki DLLME – FASI, anality w moczu w stężeniu 10 ng/ml [141]. Detekcja UV (254 nm). Pozostałe warunki: (A, B) takie same jak na Rysunku 26 z 90% dodatkiem MeOH; (C, D) same jak na Rysunku 32 z czternastominutowym czasem ekstrakcji.

Efekt wzmocnienia sygnału oszacowano w odniesieniu do techniki CZE z użyciem standardowego dozowania próbki (5 s, 3,45 kPa) przez porównanie wysokości sygnałów uzyskiwanych dla poszczególnych metod z uwzględnieniem różnicy stężeń (Równanie 9). W celu niwelacji efektu spiętrzenia próbki, w metodzie

referencyjnej matrycę analityczną stanowił BGE, a anality oznaczano w stężeniu 10 µg/ml. Efekt wzmocnienia dla techniki FASI oceniano przy stężeniu wzorców równym 40 ng/ml. Łączny efekt techniki FASI i DLLME oceniano po ekstrakcji oznaczanych substancji z próbek moczu uprzednio wzbogaconych analitami do stężenia 10 ng/ml. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, iż użycie opracowanej techniki FASI umożliwia poprawę czułości metody w zakresie od 481 do 1127 razy w stosunku do standardowego dozowania próbki (Tabela 5). Wzbogacanie analitów przed analizą elektroforetyczną z użyciem opracowanej techniki DLLME umożliwia wzrost siły sygnału o kolejny rząd wielkości (8 – 19-krotny efekt wzmocnienia), co w rezultacie daje sumaryczny EF w przedziale od 8 080 – 11 910. Przykładowe elektroferogramy uzyskane przy użyciu technik CZE ze standardowym dozowaniem próbki, techniki FASI oraz DLLME – FASI próbek moczu przedstawiono na Rysunku 33.

5. Spiętrzanie analitów we wzmocnionym polu elektrycznym, a efekt zmiatania próbki w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii

5.1. Wstęp

Jednym z najbardziej przełomowych osiągnięć technik elektromigracyjnych było opracowanie metody jednoczesnego rozdzielania składników jonowych i obojętnych elektrycznie [78]. Wydarzenie to w znacznym stopniu przyczyniło się do dynamicznego rozwoju CE, a technika MEKC jest obecnie jedną z najczęściej wykorzystywanych technik elektromigracyjnych [149]. Wykorzystanie fazy pseudostacjonarnej w procesie wzbogacania analitów na drodze akumulacji (zmiatanie) postrzegane jest jako następny milowy krok w krótkiej historii CE [80]. Jakkolwiek, dopiero dalsze badania i analiza mechanizmu wymienionych zjawisk pozwoliły na wyznaczenie zakresu praktycznego wykorzystania tych przełomowych odkryć.

Spośród poruszanych zagadnień na przestrzeni ostatnich piętnastu lat, dyskusja nad doбором matrycy analitycznej próbki, najkorzystniejszej dla efektu zmiatania, odznacza się szczególnie mocno [82 - 85; 150]. Dopiero badania zespołu naukowego profesor Pyell wyjaśniły złożony i wieloetapowy mechanizm procesu zmiatania próbki w warunkach niehomogenego pola elektrycznego [82; 85], co zostało opisane w Rozdziale I.2.1. Niemniej jednak, eksperymenty przeprowadzone w celu wyjaśnienia zależności pomiędzy składem próbki i oddziaływań analitu z fazą pseudostacjonarną zakładały zerowy ładunek elektryczny oznaczanych substancji, niwelując tym samym udział spiętrzania próbki w procesie wzmacniania siły sygnału [82; 85]. Założenie to, jakkolwiek słuszne na etapie badania mechanizmu zmiatania próbki, w praktyce jest rzadko spotykane.

Dodatkowym zagadnieniem dotyczącym technik wzbogacania analitów w kapilarze w CE, istotnym z praktycznego punktu widzenia, jest jednoczesne wzbogacanie analitów o ładunku różnoimiennym i/lub substancji neutralnych. Podczas gdy zastosowanie większości technik spiętrzania umożliwia w stosunkowo nieskomplikowany sposób oznaczanie substancji drobnocząsteczkowych na poziomie ng/ml (Tabela 1), wzmacnianie siły sygnału dla cząsteczek o różnej strukturze chemicznej ogranicza się do techniki zmiatania i stanowi niemałe wyzwanie analityczne.

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, podjęto próbę opracowania metody jednoczesnego wzbogacania i rozdzielania substancji o różnej strukturze chemicznej

i ładunku elektrycznym (kationy, aniony i substancje obojętne). Celem przeprowadzonych doświadczeń była ocena efektów spiętrzania i zmiatania w kontekście skuteczności poprawy czułości detekcji wybranych związków chemicznych. Jako substancje modelowe wykorzystano pięć witamin z grupy B (tiamina, pirydoksyna, ryboflawina, nikotynamid i kwas foliowy). Opracowaną metodę poddano częściowej walidacji, a jej zastosowanie wykazano na przykładzie oznaczania wybranych witamin w pożywkach mikrobiologicznych i ekstraktach roślinnych (*Ilex paraguariensis*, yerba mate).

5.2. Część eksperymentalna

5.2.1. Przygotowanie roztworów

Roztwory elektrolitów przygotowano przez odważenie, a następnie rozpuszczenie w odpowiedniej objętości wody redestylowaną do uzyskania stężenia 0,2 M (SDS) lub 0,1 M (NaH_2PO_4). Wodne roztwory wzorcowe witamin (tiamina, ryboflawina, nikotynamid, pirydoksyna, kwas foliowy) przygotowano w stężeniu 1 mg/ml. W celu zwiększenia rozpuszczalności ryboflawiny i kwasu foliowego, jej roztwór wzorcowy zawierał dodatkowo tetraboran disodowy w stężeniu 10 mM. Ze względu na niestabilność ryboflawiny, roztwór wzorcowy przygotowywano każdego dnia przed przystąpieniem do eksperymentów. Pożądaną wartość pH uzyskano przy pomocy 1 M roztworu NaOH i 85% kwasu fosforowego.

Hodowle bakteryjne prowadzono na podłożu BD Mueller Hinton II Broth o następującym składzie: ekstrakt wołowy (3,0 g/l), kwaśny hydrolyzат kazeiny (17,5 g/l) i skrobia (1,5 g/l). Wymienione składniki w odpowiedniej ilości rozpuszczano w gorącej wodzie, roztwór doprowadzano do wrzenia, a następnie wyjaławiano w autoklawie.

Yerba mate zakupiono w lokalnym sklepie spożywczym.

Po procesie optymalizacji BGE składał się z 80 mM SDS i 10 mM NaH_2PO_4 (pH 7,25), a matryca analityczna próbki zawierała 10 mM NaH_2PO_4 (pH 4,60).

5.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne

Wszystkie eksperymenty elektroforetyczne przeprowadzono przy użyciu krzemionkowych kapilar niemodyfikowanych o średnicy wewnętrznej 50 μm i całkowitej długości 67 cm (60 cm efektywnej długości kapilary), termostatowanych w temperaturze 22 °C.

Każdą nową kapilarę i na początku każdego dnia roboczego kapilarę kondycjonowano przez przepłukanie kolejno MeOH (20 min), 0,1 M NaOH (10 min), wodą redestylowaną (10 min) i BGE (5 min).

Procedura analityczna obejmowała wstępne kondycjonowanie kapilary kolejno 0,1 M roztworem NaOH (2 min), wodą redestylowaną (2 min) i BGE (1,5 min), a następnie dozowanie próbki i rozdzielanie elektroforetyczne (22 kV przez 15 min). Końcowa procedura obejmowała przemycie kapilary roztworem BGE (2 min). Standardowe dozowanie próbki prowadzono przy ciśnieniu 3,45 kPa przez 2 s, podczas gdy dużą objętość próbki wprowadzano przez 10 lub 30 s (3,45 kPa). Wszystkie procedury przemywania kapilary przeprowadzano z użyciem ciśnienia 138 kPa.

5.2.3. Procedura przygotowania próbki do analizy

Dwa szczepy bakterii – *Staphylococcus ureus* (ATCC6538) i *Escherichia coli* (ATCC8739) – inkubowano na podłożach płynnych przez 24 h (inokulum o stężeniu około 10^9 CFU/ml). Równolegle podłoża bez dodatku inokulum inkubowano w tych samych warunkach. Po 24 h hodowle poddawano filtracji (średnica porów 0,22 μ m), supernatant zbierano do probówek typu eppendorf i zamrażano w temperaturze -20 °C. Przed analizą próbki rozmrażano w temperaturze pokojowej, wirowano (14 000 obr./min przez 5 min) i trzydziestokrotnie rozcieńczano wodą i roztworem NaH_2PO_4 do końcowego stężenia fosforanu równego 10 mM. Do 100 μ l tak przygotowanej próbki dodawano 1 μ l I.S. (baklofen w stężeniu 100 μ g/ml) i poddawano analizie elektroforetycznej.

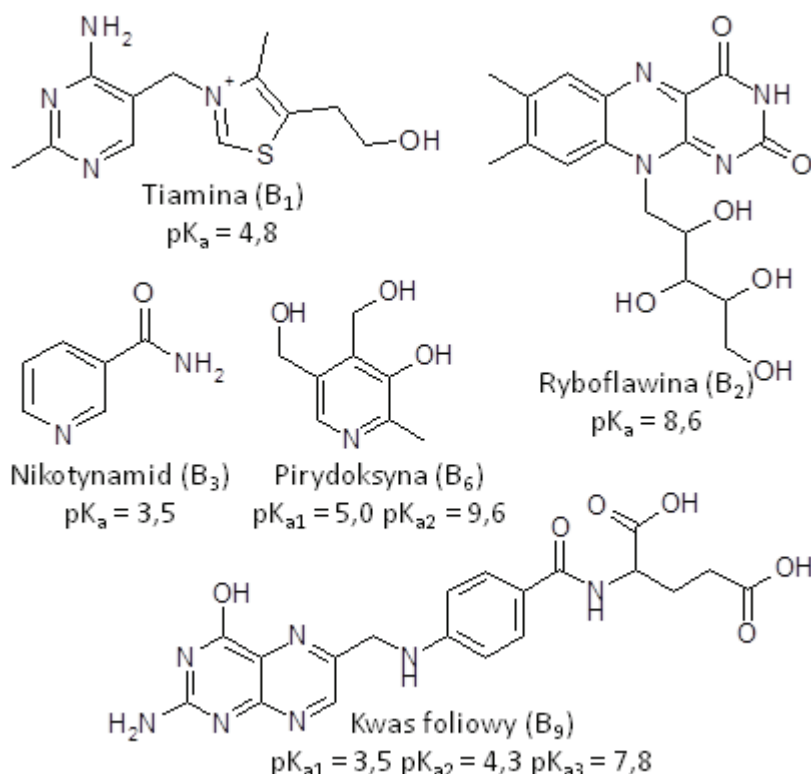
Ekstrakt liści *Ilex paraguariensis* (yerba mate) przygotowywano przez zawieszenie 0,1 g suszonych liści w 50 ml wody redestylowanej i mieszanie na mieszadle magnetycznym przy 1000 obr./min przez 45 min. Ekstrakt wirowano przy 14000 obr./min przez 5 min, a supernatant rozcieńczano 2,5-krotnie roztworem NaH_2PO_4 do końcowego stężenia fosforanu 10 mM. 100 μ l ekstraktu mieszano z 1 μ l roztworu I.S. i poddawano analizie z użyciem CE.

5.3. Wyniki i dyskusja

Struktury chemiczne oznaczanych substancji zostały przedstawione na Rysunku 34. Związki te wykazują charakter słabych zasad lub kwasów organicznych. Biorąc pod uwagę podane wartości pK_a niemożliwa jest jednoczesna jonizacja wszystkich wymienionych witamin, co pozwoliłoby na rozdzielenie tych

substancji przy pomocy CZE. Jedynie w przypadku użycia BGE o wysokim pH ($> 9,0$) cztery spośród pięciu substancji uzyskałyby ładunek pozwalający na elektroforetyczne rozdzielanie z użyciem techniki CZE, podczas gdy prędkość migracji witaminy B₃ byłaby równa wartości EOF, co stwarza znaczne ryzyko interferencji z innymi niejonizowanymi składnikami matrycy próbki. Z tego względu MEKC wydaje się być techniką z wyboru dla elektroforetycznego rozdzielania tej grupy związków.

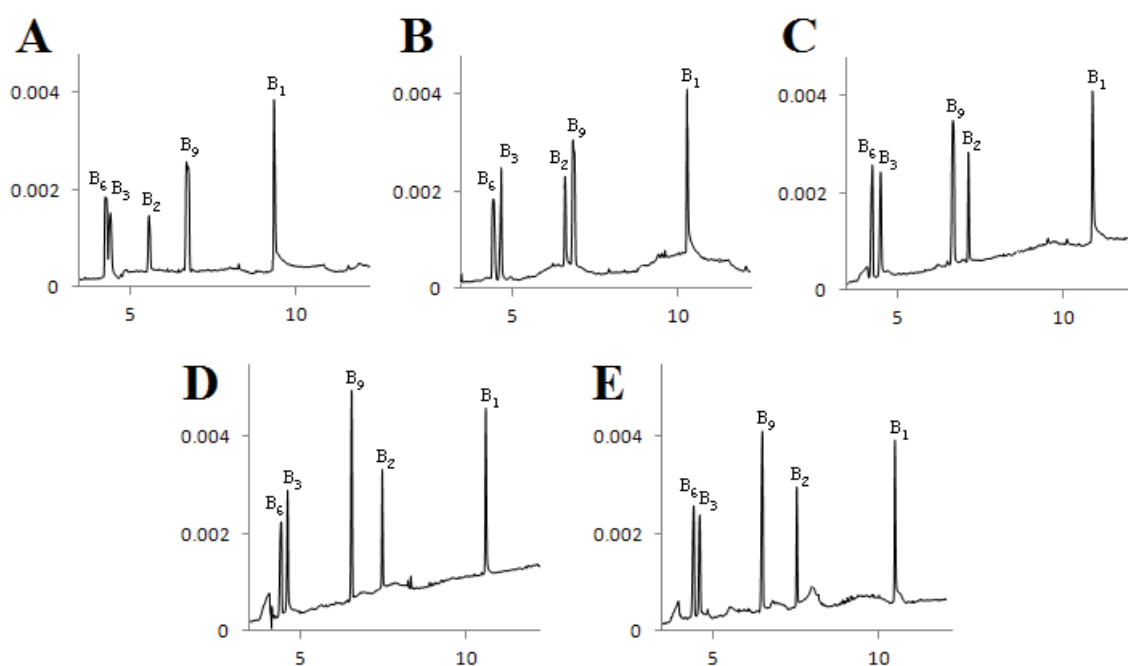
Optymalizacja buforu rozdzielającego z dodatkiem surfaktantu anionowego (SDS) wykazała, iż rozdzielanie wszystkich pięciu substancji możliwe jest przy użyciu BGE o następującym składzie: 80 mM SDS, 10 mM NaH₂PO₄ (pH 7,25). W tych warunkach obserwuje się dodatnią jonizację witaminy B₁, obojętną elektrycznie cząsteczkę witamin B₃ i B₆, a także anionową postać ryboflawiny i kwasu foliowego. Z uwagi na różnice w stopniu jonizacji, wzbogacenie w kapilarze tych związków wymagało zastosowania zmiatania przy użyciu miceli obecnych w buforze rozdzielającym.



Rys. 34. Struktury chemiczne wraz z obliczonymi wartościami pK_a oznaczanych witamin.

Wpływ stężenia surfaktantu w BGE na rozdzielanie elektroforetyczne został przedstawiony na Rysunku 35. Początkowe użycie 20 mM roztworu SDS nie tylko nie umożliwiło rozdzielania witamin B₃ i B₆, ale także skutkowało stosunkowo niską sprawnością układu i niesymetrycznym kształtem piku tiaminy prawdopodobnie

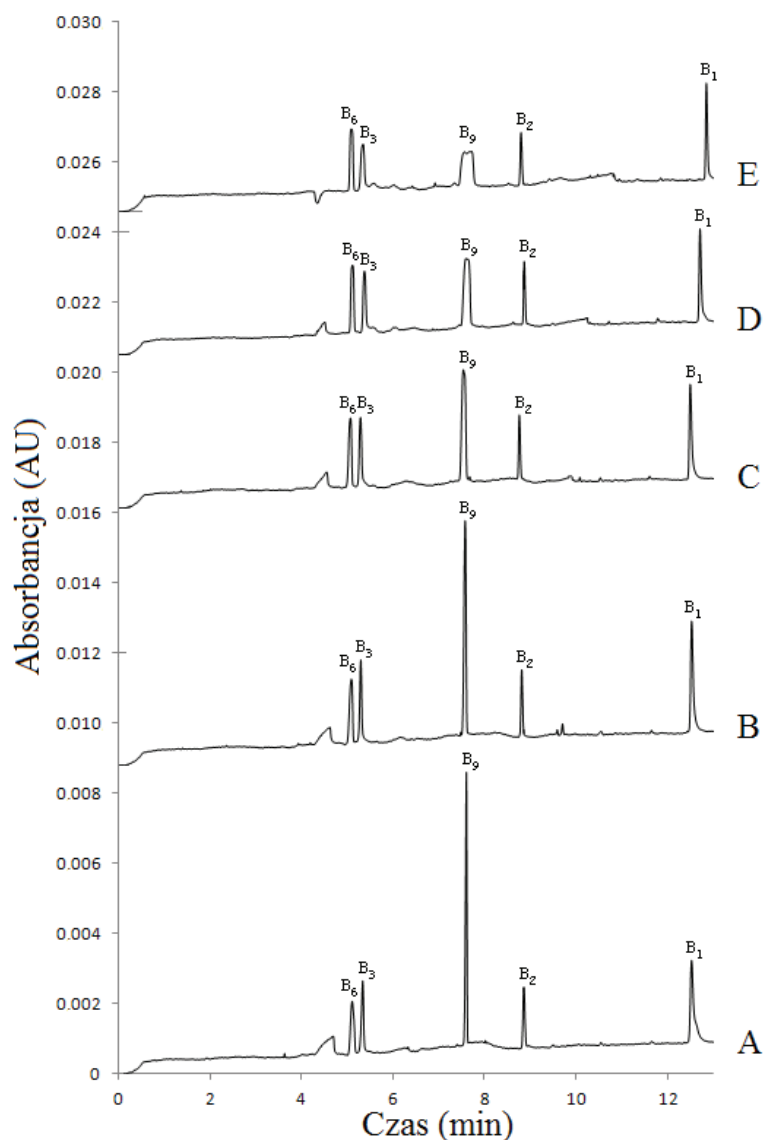
na skutek adsorpcji analitu na wewnętrznej ścianie kapilary (Rysunek 35A). Dwukrotny wzrost stężenia SDS pozwolił na rozdzielenie nikotynamidu i pirydoksyny (Rysunek 35B), podczas gdy dalszy dodatek surfaktantu znacznie usprawnił proces rozdzielania, poprawił symetrię pików i znacząco zredukował adsorpcję witaminy B₁ (Rysunki 35C – E). Zawartość SDS w BGE na poziomie 80 mM wybrano jako optymalne stężenie z uwagi na najkorzystniejsze parametry rozdzielania, a także niestabilność linii podstawowej w przypadku 100 mM SDS (prawdopodobnie na skutek zbyt wysokiego natężenia prądu elektrycznego i nieefektywnego odprowadzania ciepła z kapilary), dla którego uzyskano zbliżone wyniki (Rysunki 35D i E).



Rys. 35. Wpływ stężenia SDS w buforze rozdzielającym na efekt zmiatania próbki [151]. Warunki: BGE, (A) 20 mM SDS, (B) 40 mM SDS, (C) 60 mM SDS, (D) 80 mM SDS, (E) 100 mM SDS, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,25; matryca analityczna próbki, 10 mM NaH₂PO₄, pH 4,60; kapilara, średnica wewnętrzna 50 μm x całkowita długość 67 cm; napięcie, 22 kV; parametry dozowania, 30 s (3,45 kPa); detekcja UV (200 nm), temp. 22 °C. Pozioma oś na elektroferogramach to czas analizy wyrażony w minutach, podczas gdy oś pionowa przedstawia absorbancję wyrażoną w jednostkach bezwymiarowych.

Jak już wspomniano w Rozdziale I.2.1, optymalizacja procesu zmiatania powinna obejmować również skład matrycy analitycznej próbki. W tym celu badano wpływ stężenia NaH₂PO₄ w matrycy analitycznej próbki na parametry uzyskiwanych sygnałów (Rysunek 36). Na przedstawionych elektroferogramach szczególnie mocno zaznacza się poszerzenie sygnału witaminy B₉ wraz ze wzrostem siły jonowej, podczas gdy dodatek soli nie wykazywał tak silnego wpływu na pozostałe sygnały. Anionowy charakter kwasu foliowego w warunkach prowadzenia analizy sugeruje istotny udział

spiętrzania w procesie wzbogacania tej substancji. Przy użyciu wody jako matrycy analitycznej próbki obserwowano również niższy i mniej symetryczny sygnał dla tiaminy (Rysunek 36A), niż w pozostałych przypadkach (Rysunki 36B – E). Z tego względu jako optymalny skład matrycy analitycznej próbki wybrano 10 mM NaH_2PO_4 .

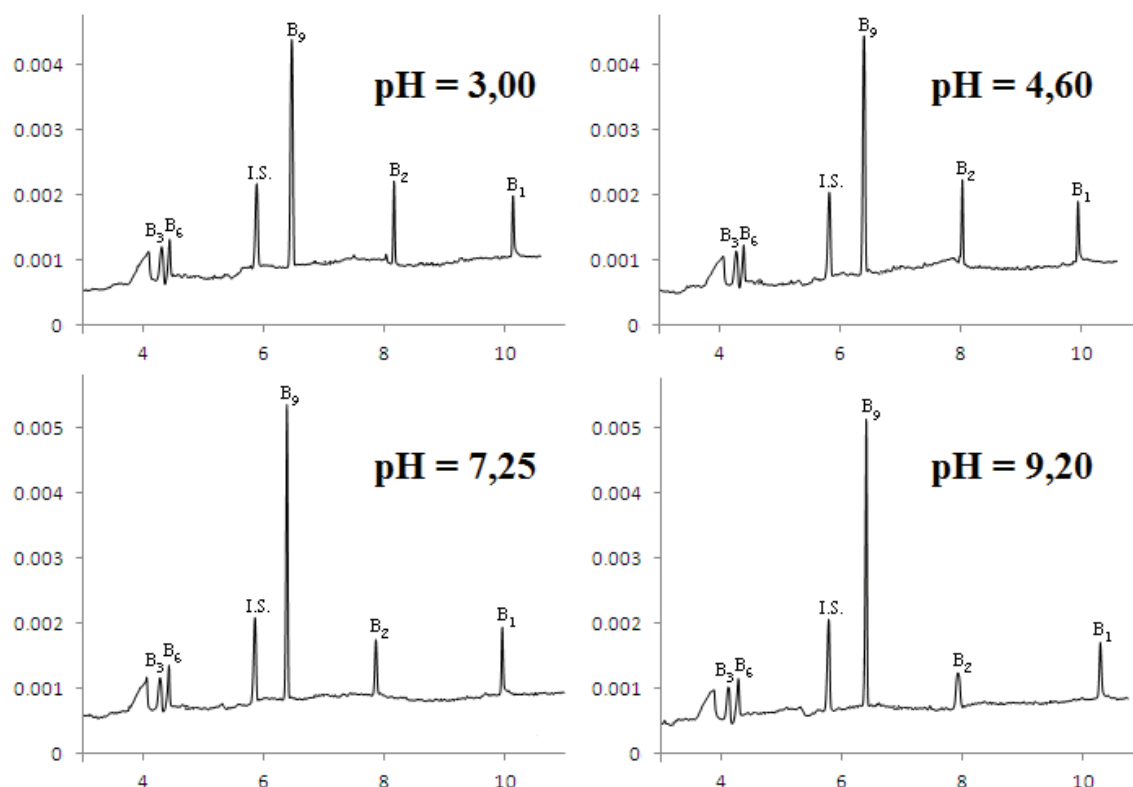


Rys. 36. Wpływ dodatku NaH_2PO_4 do matrycy analitycznej próbki na efekt wzmocnienia siły sygnału [151]. Warunki: próbka, (A) woda, (B) 10 mM NaH_2PO_4 , (C) 20 mM NaH_2PO_4 , (D) 40 mM NaH_2PO_4 , (E) 60 mM NaH_2PO_4 . Pozostałe warunki takie same jak na Rysunku 35D.

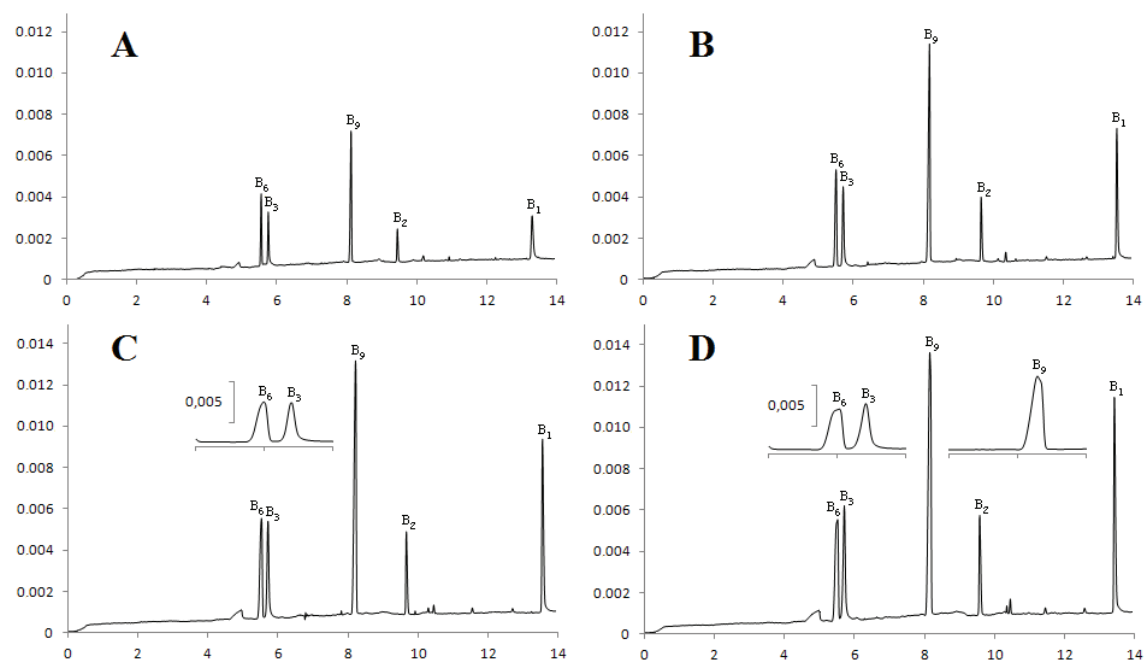
Współczynnik opisujący powinowactwo analitów do fazy pseudostacjonarnej w strefie próbki (k_s) nie jest zależny jedynie od przewodności matrycy analitycznej próbki, ale także od stopnia i ładunku jonizacji, co ma bezpośrednie przełożenie na efektywność zmiatania [85; 89]. Na Rysunku 37 przedstawiono wpływ wartości pH

dozowanej próbki na wysokość uzyskiwanych sygnałów. W testowanym zakresie pH (3,00 – 9,20) nie zaobserwowano istotnych różnic w wysokości pików pochodzących od witamin B₃, B₆ i B₁. W przypadku dwóch pierwszych związków obserwacje wynikają z obojętnego charakteru tych cząsteczek. Z uwagi na podane wartości pK_a nikotynamidu i pirydoksyny (Rysunek 34), możliwa jest jedynie nieznaczna jonizacja tych związków w skrajnych (spośród testowanych) warunkach. Brak różnicy w parametrach sygnału tiaminy można z kolei tłumaczyć stałym ładunkiem dodatnim tej cząsteczki i silną retencją tego związku w całym zakresie pH. Istotną redukcję pików ryboflawiny obserwowano natomiast w wyniku alkalizacji matrycy analitycznej próbki. Podwyższenie wartości pH ośrodka spowodowało przejście tej substancji z formy obojętnej do anionowej, obniżając tym samym powinowactwo witaminy B₂ do anionowych miceli buforu rozdzielającego. Odwrotną zależność odnotowano w przypadku kwasu foliowego. Niższe wartości pH roztworu próbki zredukowały stopień dysocjacji witaminy B₉, co w przypadku zmiatania powinno skutkować wzmocnieniem siły sygnału. Jakkolwiek, wynik ten potwierdza wcześniejsze założenia, iż wzbogacanie tego związku w opracowanej metodzie zachodzi na drodze spiętrzenia we wzmocnionym polu elektrycznym, przez co mniejszy ładunek jonu nie pozwalał na uzyskanie efektu wzmocnienia siły sygnału.

Ostatnim parametrem testowanym w ramach optymalizacji metody był czas dozowania próbki do kapilary. Jako że ilość analitów dozowanych do kapilary ma bezpośrednie przełożenie na wysokość uzyskiwanych sygnałów, parametr ten ma największy wpływ na czułość opracowywanej metody analitycznej. Elektroferogramy uzyskiwane z analizy próbek przy różnym czasie dozowania (10 – 40 s) zostały przedstawione na Rysunku 38. Wydłużenie czasu dozowania od 10 do 20 s skutkowało wprost proporcjonalnym wzrostem siły sygnałów (Rysunki 38A i B), jednakże już przy 30 s obserwowano zaburzenie symetrii sygnału pochodzącego od pirydoksyny (Rysunek 38C). Dalsze przedłużanie czasu wprowadzania próbki skutkowało znacznym poszerzeniem i zaburzeniem symetrii sygnałów witamin B₆ i B₉, podczas gdy w przypadku pozostałych analitów nadal obserwowano wzrost intensywności pików przy ich zachowanej szerokości (Rysunek 38D). Ze względu na różnice w sprawności rozdzielania i uzyskiwany efekt wzmocnienia siły sygnału, częściowej walidacji poddano dwie metody: z użyciem czasu dozowania równego 10 i 30 s.



Rys. 37. Wpływ wartości pH matrycy analitycznej próbki na uzyskiwane elektroferogramy [151]. Warunki: próbka, 10 mM NaH_2PO_4 , pH 3,00 – 9,20. Pozostałe warunki takie same jak na Rysunku 35D. Pozioma oś na elektroferogramach to czas analizy wyrażony w minutach, podczas gdy oś pionowa przedstawia absorbancję wyrażoną w jednostkach bezwymiarowych.



Rys. 38. Wpływ czasu dozowania próbki na uzyskiwane elektroferogramy [151]. Warunki: dozowanie próbki, 3,45 kPa, (A) 10 s, (B) 20 s, (C) 30 s, (D) 40 s. Pozostałe warunki takie same jak na Rysunku 35D. Pozioma oś na elektroferogramach to czas analizy wyrażony w minutach, podczas gdy oś pionowa przedstawia absorbancję wyrażoną w jednostkach bezwymiarowych.

5.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody

Hydrodynamiczne dozowanie próbki przez 30 s pozwala na uzyskanie od 1,5- do 3-razy wyższej czułości metody niż w przypadku 10 s. Jakkolwiek, z uwagi na wyższą sprawność rozdzielania przy użyciu mniejszej objętości dozowania próbki, metodę tą stosowano w przypadku oznaczania witamin w pożywkach bakteryjnych (bardziej złożona matryca próbki). Z kolei fakt uzyskiwania niższych granic wykrywalności i oznaczalności dla czasu dozowania 30 s wykorzystano dla oznaczania wybranych witamin z grupy B w wodnym ekstrakcie liści *Ilex paraguariensis* (yerba mate).

Ze względu na brak matrycy próbki pozbawionej oznaczanych składników, walidację metody prowadzono dla roztworów wodnych, a identyfikację analitów przeprowadzano na podstawie względnych czasów migracji witamin (stosunek t_m analitu do t_m wzorca wewnętrznego). Do raz analizowanych próbek dodawano także wzorców witamin w celu potwierdzenia tożsamości sygnałów w badanych próbkach.

Dla obydwu metod liniowość metody badano w zakresie od LOQ do 10 $\mu\text{g/ml}$, dla której uzyskane wyniki wykazywały dobrą zgodność z założonym modelem liniowym (dla obu metod $R^2 > 0,9990$).

Granice wykrywalności ($S/N = 3$) dla metody opartej o dozowanie próbki przez 10 s wyznaczono w zakresie od 0,1 do 0,3 $\mu\text{g/ml}$. Niższe liczbowo wartości LOD uzyskano z użyciem 30 s czasu dozowania i wynosiły od 0,05 do 0,10 $\mu\text{g/ml}$.

Wartości LOQ wyznaczono na podstawie $S/N = 10$ w zależności od czasu dozowania próbki mieściły się w zakresie (10 s) od 0,3 do 0,9 $\mu\text{g/ml}$ i (30 s) od 0,25 do 0,35 $\mu\text{g/ml}$.

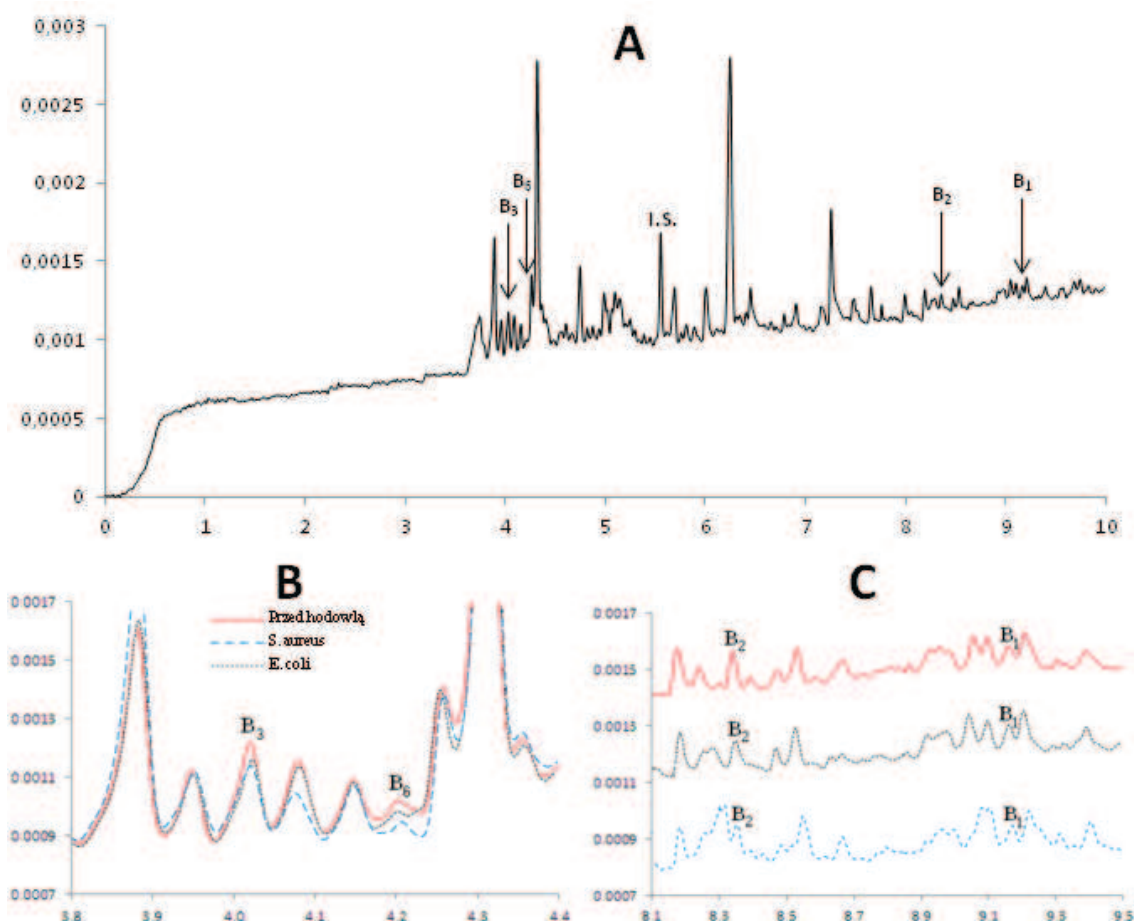
Powtarzalność metod badano poprzez analizę sześciu niezależnie przygotowanych próbek w trzech różnych stężeniach (0,5, 1 i 2 $\mu\text{g/ml}$). Odtwarzalność metod oszacowano dla tych samych stężeń, analizując po 3 niezależnie przygotowane próbki dla każdego z wymienionych stężeń, przez trzy następujące po sobie dni. Jedynie w przypadku metody z 10 s czasem dozowania dla ryboflawiny powtarzalność i odtwarzalność wyznaczono dla następujących stężeń: 0,9, 1 i 2 $\mu\text{g/ml}$. Wszystkie uzyskane wyniki względnych odchyłeń standardowych wynosiły $< 9,1 \%$, podczas gdy wyznaczono dokładność metod mieściła się w przedziale od 88,6 – 105,6 %.

Tab. 6. Zestawienie parametrów walidacyjnych dla opracowanej metody FASS-zmiatanie z użyciem 10 s czasu dozowania próbki. * Współczynnik wzmocnienia wyznaczono na podstawie różnicy stosunku LOD opracowanej metody do LOD metody opartej o standardowe dozowanie próbki (2 s, 3,45 kPa). ** Podane wartości wyznaczono dla stężenia 0,9 µg/ml.

	B ₁	B ₂	B ₃	B ₆	B ₉
Zakres liniowości metody	LOQ – 10 µg/ml				
Współczynnik kierunkowy prostej (a)	0,334	0,148	0,247	0,183	0,334
Współczynnik przesunięcia prostej (b)	0,047	0,025	0,052	0,060	0,016
Współczynnik korelacji (R ²)	0,9999	0,9997	0,9990	0,9998	0,9996
LOD (ng/mL)	0,10	0,30	0,15	0,15	0,12
LOQ (ng/mL)	0,3	0,9	0,5	0,4	0,4
EF*	20	6	6	6	8
Powtarzalność metody (n = 6)					
Precyzja (% RSD)					
0,5 µg/mL	4,91	7,44**	5,26	4,88	6,61
1 µg/mL	3,88	4,31	3,81	3,13	2,47
2 µg/mL	3,19	4,14	2,78	2,58	5,31
Dokładność (%)					
0,5 µg/mL	92,7	101,7**	91,5	89,2	98,0
1 µg/mL	104,3	96,3	97,4	103,1	98,6
2 µg/mL	99,9	103,5	103,4	104,9	99,9
Odtwarzalność metody (n = 9)					
Precyzja (% RSD)					
0,5 µg/mL	7,60	8,98**	7,15	6,90	8,00
1 µg/mL	5,12	6,52	5,02	5,54	7,36
2 µg/mL	4,63	5,90	4,63	4,09	6,12
Dokładność (%)					
0,5 µg/mL	93,2	103,6**	89,2	88,8	95,7
1 µg/mL	104,8	95,2	94,2	103,9	94,3
2 µg/mL	97,6	104,9	105,0	105,6	92,9

Tab. 7. Zestawienie parametrów walidacyjnych dla opracowanej metody FASS-zmiatanie z użyciem 30 s czasu dozowania próbki. * Współczynnik wzmocnienia wyznaczono na podstawie różnicy stosunku LOD opracowanej metody do LOD metody opartej o standardowe dozowanie próbki (2 s, 3,45 kPa).

	B ₁	B ₂	B ₃	B ₆	B ₉
Zakres liniowości metody	LOQ – 10 µg/ml				
Współczynnik kierunkowy prostej (a)	0,425	0,193	0,209	0,225	0,364
Współczynnik przesunięcia prostej (b)	0,078	0,015	0,022	0,052	0,036
Współczynnik korelacji (R ²)	0,9993	0,9997	0,9998	0,9996	0,9994
LOD (ng/mL)	0,05	0,10	0,08	0,08	0,07
LOQ (ng/mL)	0,25	0,35	0,25	0,25	0,25
EF*	40	20	12	12	14
Powtarzalność metody (n = 6)					
Precyzja (% RSD)					
0,5 µg/mL	5,26	5,66	8,13	3,94	6,89
1 µg/mL	4,58	5,65	4,80	3,06	5,92
2 µg/mL	5,05	3,22	5,14	3,22	5,90
Dokładność (%)					
0,5 µg/mL	89,1	103,6	96,0	97,7	103,7
1 µg/mL	97,4	101,4	94,3	103,3	93,7
2 µg/mL	104,0	94,4	104,5	104,6	94,8
Odtwarzalność metody (n = 9)					
Precyzja (% RSD)					
0,5 µg/mL	8,18	8,50	8,65	5,18	8,08
1 µg/mL	7,53	7,85	6,40	4,96	7,37
2 µg/mL	6,98	6,02	5,95	3,60	6,45
Dokładność (%)					
0,5 µg/mL	88,6	103,9	95,2	95,8	104,9
1 µg/mL	96,1	103,1	93,8	104,4	92,1
2 µg/mL	104,5	95,5	105,2	104,8	93,8

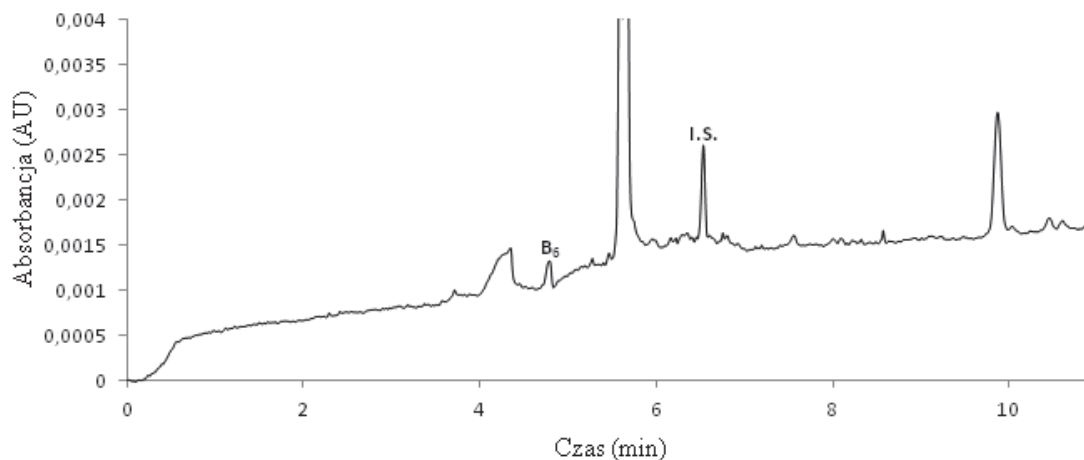


Rys. 39. Przykładowe elektroferogramy uzyskane w wyniku analizy elektroforetycznej podłoży płynnych BD Mueller Hinton II Broth. (A) Elektroferogram pożywki po 24 godzinnej hodowli szczepu *E. coli*. (B, C) Elektroferogramy uzyskane w wyniku analizy pożywki przed i po hodowli wybranych szczepów bakterii [151]. Warunki analizy takie same jak na Rysunku 35D. Pozioma oś na elektroferogramach to czas analizy wyrażony w minutach, podczas gdy oś pionowa przedstawia absorbancję wyrażoną w jednostkach bezwymiarowych.

Opracowaną metodę z użyciem 10 s czasu dozowania próbki zastosowano do oznaczania wybranych witamin z grupy B w podłożach płynnych do hodowli bakterii po inkubacji ze szczepami *S. aureus* i *E. coli*, a także w pożywkach nieszczepionych tymi bakteriami. Na Rysunku 39A przedstawiono przykładowy elektroferogram uzyskany w wyniku analizy płynu pochodzącego. Pomimo rozcieńczenia próbki pierwotnej na załączonej rycinie widoczna jest duża ilość substancji matrycowych. Z kolei na Rysunku 39B i C zestawiono przykładowe elektroferogramy z oznaczania wybranych witamin w pożywce przed hodowlą mikroorganizmów, a także po hodowli szczepów *S. aureus* i *E. coli*.

Zastosowanie metody opartej o 30 s dozowanie próbki wykazano na przykładzie oznaczania zawartości witamin w wodnym ekstrakcie liści *I. paraguariensis*, powszechnie stosowanych w celach konsumpcyjnych pod nazwą yerba mate.

Przykładowy elektroferogram uzyskany w wyniku analizy wymienionego ekstraktu został przedstawiony na Rysunku 40.



Rys. 40. Elektroferogram uzyskane z analizy wodnego ekstraktu liści *I. paraguariensis* [151]. Warunki analizy takie same jak na Rysunku 35D.

W Tabeli 8 zestawiono wyniki uzyskane w toku analiz. W przypadku analizy pożywek bakteryjnych odnotowano znaczące zmniejszenie stężenia witaminy B₃ po hodowli bakterii w stosunku do pożywki wyjściowej, co jest zrozumiałe ze względu na intensywny okres wzrostu mikroorganizmów. Pomimo wykrycia witamin B₁, B₂ i B₆, stężenia tych substancji było poniżej granicy oznaczalności metody. Analiza ekstraktu roślinnego wykazała obecność jedynie witaminy B₆ na poziomie 429 ppm w przeliczeniu na suchą masę. W żadnej próbce nie wykryto witaminy B₉, prawdopodobnie ze względu na zbyt niskie stężenie tego składnika.

Tab. 8. Zestawienie wyników uzyskanych w analizie elektroforetycznej podłoży płynnych przed i po hodowli wybranych szczepów bakterii (µg/ml) oraz wodnych ekstraktów yerba mate (µg/g).

Próbka	B ₁	B ₂	B ₃	B ₆	B ₉
Przed hodowlą	< LOQ	< LOQ	51,1	< LOQ	-
<i>S. aureus</i>	< LOQ	< LOQ	41,9	< LOQ	-
<i>E. coli</i>	< LOQ	< LOQ	33,6	< LOQ	-
Yerba mate	-	-	-	429	-

6. Indukowane kwasem pH-spiętrzenie próbki poddanej reakcji upochadniania w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii

6.1. Wstęp

Problem zbyt niskiej czułości detekcji, w przypadku technik elektromigracyjnych, dotyczy przede wszystkim analizy próbek biologicznych, w których spodziewane stężenie oznaczanych substancji jest bardzo często niższe od wartości LOD uzyskiwanych przy pomocy podstawowego detektora UV i standardowych objętości dozowania próbki do kapilary. Z tego względu zastosowanie technik wzbogacania analitów w kapilarze jest szeroko wykorzystywane w badaniach płynów ustrojowych, żywności, analizach toksykologicznych i wielu innych [125].

Zastosowanie uniwersalnej detekcji UV do oznaczania substancji nieposiadających w swojej strukturze silnych podstawników chromoforowych, możliwe jest poprzez detekcję pośrednią analitów, dynamiczne kompleksowanie związków w kapilarze lub chemiczne łączenie cząsteczek z podstawnikami wykazującymi silną absorpcję promieniowania UV [114]. Reakcja upochadniania analitów jest jedną z najczęściej stosowanych metod także w przypadku detektora fluorescencyjnego, pozwalającą na czułe i selektywne oznaczanie wybranych substancji w nawet bardzo złożonych matrycach [152]. Proces kowalencyjnego łączenia analitu i odczynnika upochadniającego wymaga z reguły właściwego środowiska reakcji, które uzyskuje się poprzez dodatek buforu do mieszaniny reakcyjnej. Wzrost siły jonowej próbki jest zjawiskiem niekorzystnym z punktu widzenia technik wzbogacania analitu w kapilarze i jedynie kilka z nich cechuje się dobrą odpornością na zasolenie próbki (Tabela 1).

Z tego względu podjęto próbę opracowania techniki wzmacniania siły sygnału cząsteczek poddanych procesowi upochadniania. Jako substancji modelowych w eksperymentach wykorzystano mieszaninę 20 aminokwasów biogennych poddanych sprzęganiu z DNFB w obecności roztworu tetraboranu disodowego. W ramach przeprowadzonych badań wyznaczono kluczowe parametry dla procesu wzbogacania oznaczanych związków, które następnie poddano optymalizacji, a zastosowanie metody wykazano na przykładzie analizy próbek moczu ludzkiego.

6.2. Część eksperymentalna

6.2.1. Przygotowanie roztworów

0,2 M roztwory SDS i Tris, a także 0,1 M roztwór boraksu, sporządzono przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości substancji w wodzie dejonizowanej. Roztwór DNFB, stosowany podczas upochadniania próbki, przygotowano w MeOH w stężeniu 25 mg/ml. Roztwory wzorcowe aminokwasów sporządzono w wodzie dejonizowanej w stężeniu 50 mM. Jedynie kwas asparaginowy i tyrozyna, z uwagi na niedostateczną rozpuszczalność w wodzie w tym stężeniu, rozpuszczono w mieszaninie odpowiednio 1 M roztworu NaOH i wody (1:5, v/v) oraz 1 M roztworu NaOH, wody i MeOH (1:3:2, v/v/v).

Zoptymalizowany bufor rozdzielający składał się z 140 mM SDS, 20 mM Tris i 10 mM HCl (pH 8,20). Optymalne stężenie boraksu w próbce wynosiło 10 mM.

6.2.2. Stosowane procedury elektroforetyczne

Eksperymenty elektroforetyczne prowadzono z użyciem krzemionkowych kapilar niemodyfikowanych o średnicy wewnętrznej 50 μm i całkowitej długości 80 cm (70 cm długości efektywnej) termostatowanej w temperaturze 25 °C.

Każdą nową kapilarę przepłukiwano 0,1 M NaOH (30 min), wodą dejonizowaną (30 min) i BGE (10 min), podczas gdy każdy dzień roboczy rozpoczynano od kondycjonowania obejmującego płukanie kapilary 0,1 M NaOH (10 min), wodą dejonizowaną (10 min) i BGE (10 min), a następnie kondycjonowanie prądem (30 kV przez 10 min).

Procedura analityczna obejmowała: (i) przepłukanie kapilary BGE (2 min); (ii) dozowanie próbki (40 s przy ciśnieniu 13,8 kPa); (iii) elektrokinetyczne dozowanie 0,1 M HCl (20 s przy napięciu 10 kV); (iv) rozdzielanie elektroforetyczne (25 min stosując napięcie 30 kV); (v) końcowe płukanie kapilary (BGE przez 2 min). Pomiędzy poszczególnymi etapami dozowania próbki, końce kapilary zanurzano we fiolce z wodą w celu przemycia zewnętrznych ścianek kapilary. Procedury płukania prowadzono przy ciśnieniu 482,6 kPa (70 psi).

6.2.3. Oznaczanie zawartości ACN przy użyciu chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC – FID)

Program temperaturowy obejmował zastosowanie izotermi początkowej na poziomie 40 °C przez 5 minut, następnie wzrostu temperatury do 260 °C

z prędkością 20 °C/min i izotermie końcowej przez 5 minut. Zastosowano dozowanie w trybie z dzieleniem strumienia gazu (split) 1:100. Temperatura detektora i dozownika wynosiła 280 °C. Jako gazu nośnego użyto helu (1,1 ml/min). Objętość dozowanej próbki wynosiła 1 µl.

6.2.4. Procedura przygotowania próbek do analizy

Próbki moczu pobrane od zdrowych ochotników przechowywano w temperaturze -17 °C. Przed analizą próbki rozmrażano w temperaturze pokojowej i wirowano przez 5 min przy 10000 obr./min. 200 µl supernatantu mieszano z 2 µl roztworu I.S. (homoarginina w stężeniu 500 µM), a następnie dodawano 600 µl ACN. Po wymieszaniu i ponownym wirowaniu (5 min, 10000 obr./min) roztwór schładzano w zamrażarce laboratoryjnej (-17 °C przez co najmniej 20 min). Po schłodzeniu próbki wyjmowano, górną fazę usuwano przy użyciu pipety automatycznej, a dolną poddawano procedurze upochadniania.

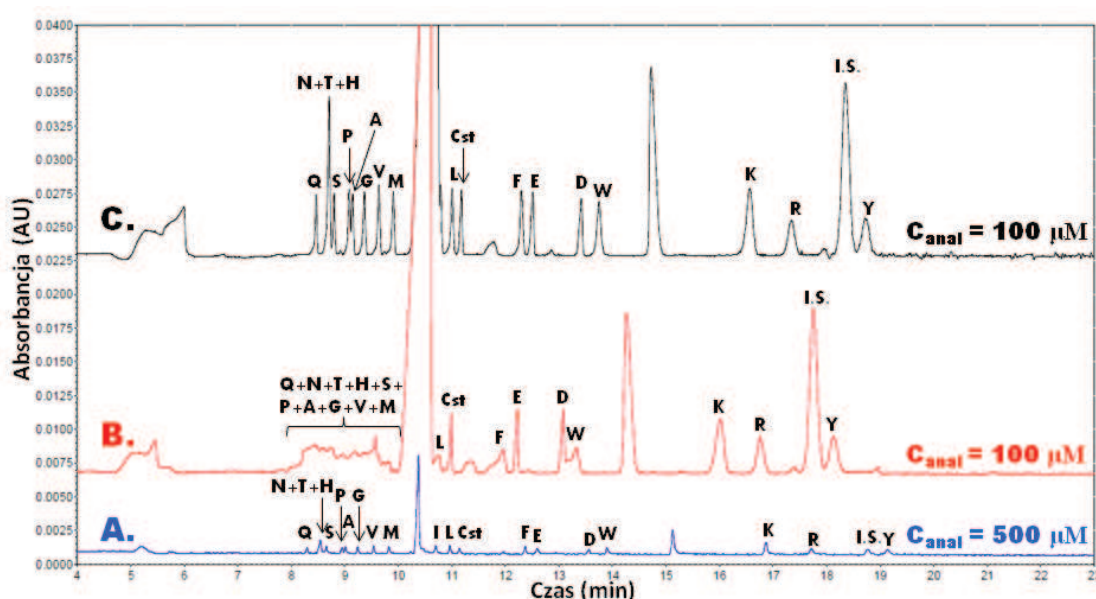
6.2.5. Procedura upochadniania próbek

Zastosowana procedura z niewielkimi modyfikacjami została zaczerpnięta z publikacji naukowych [153; 154]. 10 µl mieszaniny wzorców lub odpowiednio przygotowanej próbki moczu, 10 µl roztworu boraksu o stężeniu 100 mM, 78 µl wody dejonizowanej i 2 µl roztworu DNFB o stężeniu 25 mg/ml dokładnie mieszano, a następnie inkubowano w temperaturze 60 °C przez okres 40 min. Po reakcji roztwór mieszano, odwirowywano i przechowywano w temperaturze 4 °C w lodówce przez co najmniej 15 min w celu zahamowania reakcji. Próbkę poddawano analizie elektroforetycznej po uprzednim ogrzaniu w temperaturze pokojowej.

6.3. Wyniki i dyskusja

Obecność silnego elektrolitu w matrycy analitycznej próbki wykazuje niekorzystny wpływ na proces spiętrzania analitów [6]. Przy standardowym dozowania hydrodynamicznym (3,45 kPa przez 5 s; $\approx$ 3,7 nl) wpływ siły jonowej próbki na kształt uzyskiwanych sygnałów jest stosunkowo niewielki i w tych warunkach obserwowano wysoką sprawność rozdzielania (Rysunek 41A). Zwiększenie objętości dozowanej próbki (40 s przy ciśnieniu 13,8 kPa; $\approx$ 117 nl) skutkowało jednakże drastyczną utratą symetrii sygnałów i rozdzielczości większości substancji (Rysunek 41B). Efektu tego nie odnotowano dla substancji o najwyższym współczynniku retencji (lizyna, arginina, tyrozyna i homoarginina), co można tłumaczyć efektem ich zmiatania przez fazę

pseudostacjonarną. Także w przypadku cystyny oraz kwasów asparaginowego i glutaminowego nie obserwowano pogorszenia parametrów rozdzielania, pomimo zbliżonej retencji tych związków do innych aminokwasów takich, jak tryptofan, fenyloalanina czy leucyna. Dla tych substancji, posiadających w swojej strukturze dwie grupy karboksylowe, na skutek oddziaływania tych podstawników z jonami boranowymi obecnymi w matrycy analitycznej próbki, obserwowano wzrost współczynnika k_S i wyższą skuteczność zjawiska zmiatania niż w przypadku aminokwasów obojętnych. Spiętrzanie oznaczanych związków indukowano poprzez elektrokinetyczne dozowanie 0,1 M roztworu HCl (Rysunek 41C). W tym przypadku wysoką sprawność rozdzielania uzyskano dla wszystkich badanych substancji.

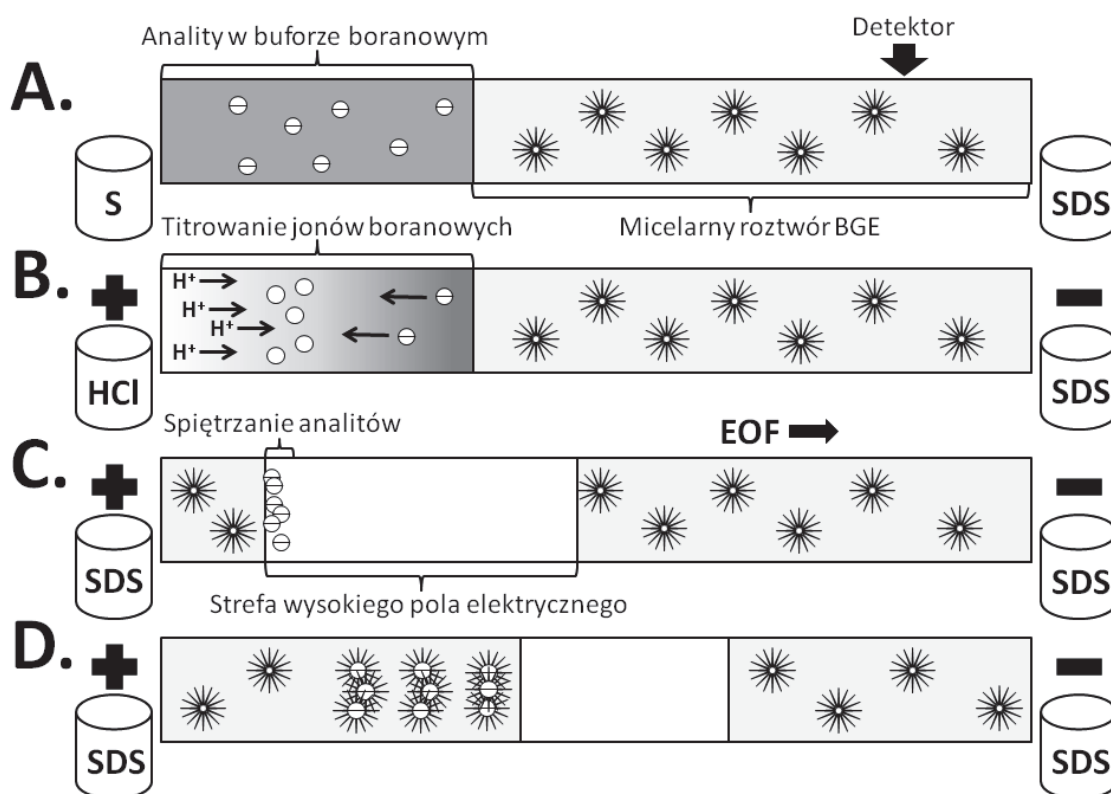


Rys. 41. Porównanie elektroferogramów uzyskanych przy użyciu: (A) standardowego dozowania hydrodynamicznego (5 s, 3,45 kPa); (B) dozowania dużej objętości próbki (40 s, 13,8 kPa); (C) dużej objętości próbki (40 s, 13,8 kPa), a następnie elektrokinetycznego dozowania 0,1 M roztworu HCl (20 s, 10 kV) [155]. Pozostałe warunki: BGE, 140 mM SDS, 20 mM Tris, 10 mM HCl; kapilara, średnica wewnętrzna 50 μm x całkowita długość 80 cm; napięcie, 30 kV; detekcja UV ($\lambda=360$ nm); temperatura, 25 $^{\circ}\text{C}$. Dwa sygnały o dużej intensywności o czasach migracji około 10,5 min i 14,5 min pochodziły od DNFB. Oznaczenia: Q – glutamina, N – asparagina, T – treonina, H – histydyna, S – seryna, P – prolina, A – alanina, G – glicyna, V – walina, M – metionina, I – izoleucyna, L – leucyna, Cst – cystyna, F – fenyloalanina, E – kwas asparaginowy, D – kwas glutaminowy, W – tryptofan, K – lizyna, R – arginina, Y – tyrozyna, I.S. – wzorec wewnętrzny (homoarginina).

Schemat mechanizmu tej techniki został przedstawiony na Rysunku 42. Anality w buforze boranowym dozowane do kapilary wypełnionej micelnym roztworem BGE (Rysunek 42A) ulegały spiętrzaniu na granicy stref próbka – BGE w efekcie elektrokinetycznego dozowania mocnego kwasu solnego (Rysunki 42B i C). Migracja jonów hydroniowych przez strefę próbki na skutek różnicy potencjałów prowadziła do

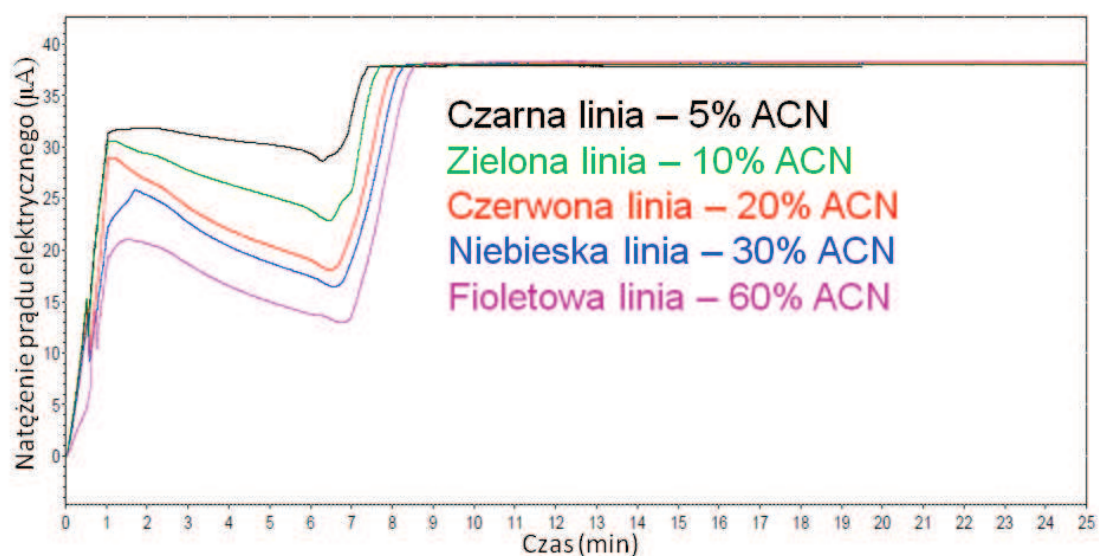
titrowania jonów boranowych i lokalnego wzrostu siły pola elektrycznego (Rysunki 42B i C). Ostatecznie anality ulegały rozdzielaniu przy pomocy MEKC.

Istnieje także alternatywna dla zaproponowanego mechanizmu opracowanej techniki. Elektrokinetyczne dozowanie kwasu, oprócz zmniejszania przewodności dozowanej próbki, skutkowało cofaniem dysocjacji oznaczanych substancji. Z uwagi na fakt, iż związki chemiczne w formie obojętnej wykazują większe powinowactwo do anionowych miceli niż ich postać anionowa [85], zmiatanie próbki przez fazę pseudostacjonarną mogło odgrywać decydującą rolę w procesie wzbogacania analitów. Jakkolwiek, wyższą sprawność i większą intensywność pików obserwowano dla niższego stężenia boranu w próbce. Zastosowanie 1 mM boraksu jako matrycy analitycznej próbki umożliwiło uzyskanie efektu spiętrzenia bez konieczności dozowania kwasu. Fakt ten potwierdza zaproponowany mechanizm techniki.



Rys. 42. Schemat mechanizmu pH-spiętrzenia próbki indukowanego kwasem [155]. (A) Do kapilary wypełnionej micelnym roztworem BGE dozowano dużą objętość próbki. Matryca analityczna próbki zawierała stosunkowo duże stężenie tetraboranu disodowego. (B) Następnie do kapilary elektrokinetycznie dozowano mocny kwas HCl, co skutkowało titrowaniem boranu w strefie próbki. (C) W efekcie uzyskano lokalny wzrost siły pola elektrycznego i spiętrzenie analitów na granicy ośrodków o różnej przewodności elektrycznej. (D) Po etapie spiętrzenia anality ulegały rozdzielaniu przy użyciu MEKC.

Protokoły upochadniania próbek z użyciem DNFB obejmują dodatek ACN do mieszaniny reakcyjnej w celu zwiększenia rozpuszczalności tego odczynnika w roztworze wodnym [153; 154]. Na Rysunku 43 przedstawiono wartość natężenia prądu elektrycznego przepływającego przez kapilarę w czasie analizy. Wzrost zawartości ACN w próbce skutkował stopniowym spadkiem wartości prądu elektrycznego w początkowym etapie analiz, co sugerowało udział procesu p-ITP. w mechanizmie wzbogacania analitów [122; 123; 156]. Jednakże w ramach przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono niekorzystny wpływ stężenia tego rozpuszczalnika w próbce powyżej 5% objętościowych nie tylko na przyrost siły sygnałów, ale także powtarzalność wyników i sprawność rozdzielania. Było to prawdopodobnie efektem destabilizacji miceli w buforze rozdzielającym w kontakcie z ośrodkiem o względnie dużej zawartości rozpuszczalnika organicznego. Z tego względu zrezygnowano z dodatku ACN do mieszaniny reakcyjnej podczas upochadniania próbek. Należy zaznaczyć, iż nie zaobserwowano negatywnego wpływu tego parametru na proces sprzęgania aminokwasów z DNFB.



Rys. 43. Wpływ zawartości ACN (v/v) w matrycy analitycznej próbki na natężenie prądu elektrycznego w czasie analizy. Pozostałe warunki takie same jak na Rysunku 41C.

Jak już wspomniano, jednym z kluczowych parametrem uzyskiwanego efektu wzbogacania analitów było stężenie soli boranowej w próbce. Jego zawartość była dedykowana skutecznością procesu upochadniania próbek, jako że substancja ta miała zapewnić optymalne pH środowiska prowadzonej reakcji. Przeprowadzone badania wykazały, iż minimalne stężenie boranu zapewniające stabilne warunki procesu sprzęgania analitów i DNFB wynosiło 5 mM. W celu zwiększenia pojemności

buforowej oraz z uwagi na fakt, iż skuteczność spiętrzania rosła wraz ze spadkiem stężenia boranu w próbce, 10 mM stężenie boraksu zostało wybrane jako optymalne.

Elektrokinetyczne dozowanie mocnego kwasu w opracowanej metodzie było czynnikiem indukującym proces spiętrzania. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, iż ilość dozowanego kwasu była zależna od objętości wprowadzanej do kapilary próbki i stężenia zawartego w niej buforu boranowego. Z tego względu czas i napięcie dozowania zoptymalizowano względem wymienionych parametrów. Ostatecznie 0,1 M HCl dozowano przez 20 s przy napięciu 10 kV. Należy jednak zaznaczyć, iż zbyt krótkie lub zbyt długie dozowanie kwasu skutkowało nieefektywnym procesem spiętrzania analitów, poszerzeniem uzyskiwanych sygnałów i spadkiem sprawności rozdzielania.

Ze względu na udział efektu zmiatania we wzbogacaniu niektórych z użytych substancji, stężenie SDS w roztworze BGE również uznano za czynnik podlegający optymalizacji. Ponieważ ilość użytego surfaktantu ma bezpośredni wpływ na rozdzielczość w MEKC, nie przeprowadzono badania wpływu tego parametru na efekt zmiatania próbki. Niemniej jednak, optymalne dla procesu rozdzielania składników stężenie było stosunkowo wysokie (140 mM SDS), prawdopodobnie dostateczne dla efektywnego zmiatania oznaczanych związków.

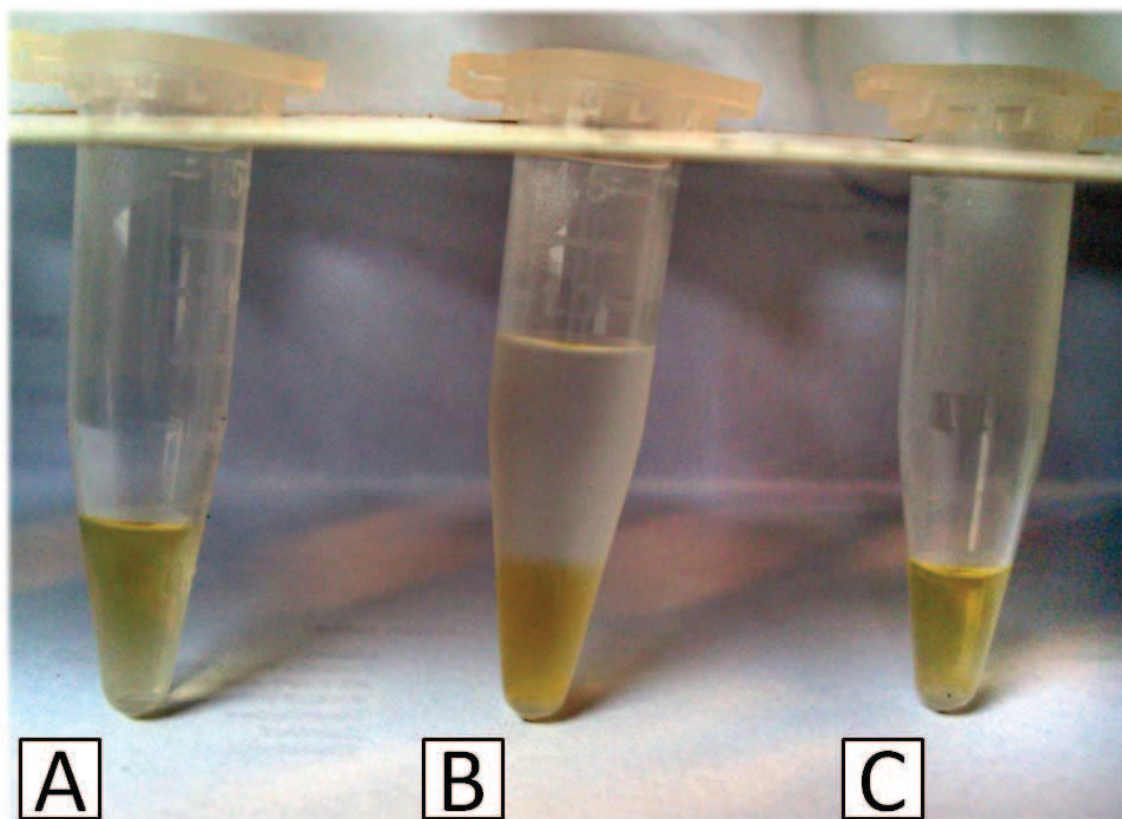
Opracowane warunki umożliwiły efektywne spiętrzanie około 118 nl próbki (dozowanie przez 40 s przy ciśnieniu 13,8 kPa), co odpowiadało 60,4 mm długości dozowanej strefy. Wydłużenie czasu wprowadzania próbki skutkowało niestabilnością natężenia prądu podczas analizy w związku z obecnością zbyt długiego odcinka kapilary wypełnionego roztworem o niskiej przewodności.

6.4. Walidacja i zastosowanie opracowanej metody

Zoptymalizowaną metodę poddano częściowej walidacji, a jej zastosowanie wykazano na przykładzie oznaczania aminokwasów biogennych w próbkach moczu ludzkiego. Próbki moczu przed analizą poddawano procedurze oczyszczania, a następnie upochadniania według procedur opisanych w Rozdziałach III.6.2.4 i III.6.2.5.

Zastosowana procedura przygotowania próbki do analizy, z uwagi na brak skutecznych metod ekstrakcji aminokwasów z próbek biologicznych, obejmowała dodanie do próbek moczu ACN w celu wytrącenia substancji balastowych. Jednakże z uwagi na niekorzystny wpływ tego rozpuszczalnika na efekt wzbogacania próbki

w opracowanej metodzie elektroforetycznej, dalsze etapy przygotowania próbki miały na celu zredukowanie zawartości ACN. Zabieg ten został przedstawiony na Rysunku 44. Próbkę moczu o objętości 200 μl (Rysunek 44A) mieszano z 600 μl ACN, wirowano i przechowywano w temperaturze $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$, co skutkowało rozwarstwieniem się roztworu (Rysunek 44B). Górną warstwę, o dużej zawartość rozpuszczalnika organicznego, usuwano przy pomocy pipety automatycznej (Rysunek 44C). Dolną warstwę roztworu, zawierającą około 30% (v/v) ACN, poddawano dalszej analizie. Ponieważ w ramach procedury upochadniania, próbka ulega dziesięciokrotnemu rozcieńczeniu, końcowe stężenie ACN nie przekraczało 3% objętościowych, co umożliwiało skuteczną analizę elektroforetyczną z użyciem opracowanej metodologii.



Rys. 44. Procedura przygotowania próbki moczu do analizy elektroforetycznej [155]. (A) 200 μl moczu z dodatkiem wzorca wewnętrznego umieszczono w probówce z tworzywa sztucznego. (B) Po wymieszaniu próbki z 600 μl ACN i wirowaniu, probówkę schładzano do temperatury $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ w celu rozwarstwienia roztworu. (C) Górną warstwę mieszaniny, bogatą w rozpuszczalnik organiczny, usuwano pipetą automatyczną, podczas gdy pozostałość wykorzystywano w dalszych etapach procedury analitycznej.

Z uwagi na brak możliwości pozyskania próbek moczu pozbawionych aminokwasów, ocenę walidacyjną metody prowadzono poprzez oznaczanie tych związków w płynie Ringera (147,2 mM Na^{+} , 155,7 mM Cl^{-} , 4 mM K^{+} i 2,2 mM Ca^{2+}).

Z uwagi na fakt, iż CE jest techniką analityczną, w której siła jonowa próbki ma duży wpływ na parametry rozdzielania, a roztwór Ringera wykazuje stosunkowo dużą siłę jonową, jego użycie jako zastępczej matrycy próbki umożliwiło uwzględnienie wpływu tego parametru na uzyskiwane wyniki.

Walidacji poddano 15 z 20 testowanych aminokwasów, ponieważ nie wszystkie substancje ulegały rozdzielaniu w opracowanych warunkach elektroforetycznych, a w przypadku cysteiny stwierdzono częściowe utlenianie do cystyny. Ponieważ celem prowadzonych doświadczeń było opracowanie techniki umożliwiającej wzbogacanie próbek uprzednio poddanych procesowi upochadniania, a oznaczane substancje były jedynie związkami modelowymi w tym doświadczeniu, uzyskane rozdzielanie składników było satysfakcjonujące.

Tab. 9. Zestawienie wybranych parametrów walidacyjnych. Liczbę pól teoretycznych wyznaczono ze średniej dla trzech pomiarów wykonanych dla stężenia wzorców równego 100 μM .

	Zakres liniowości metody	Współczynnik kierunkowy prostej (a)	Współczynnik przesunięcia prostej (b)	Współczynnik korelacji (R^2)	Sprawność (N/m $\times 1000$)	EF
Gln (Q)	10 – 200 μM	474,35	0,0055	0,9994	274,1	25
Ser (S)		540,74	-1,0807	0,9989	172,1	24
Pro (P)		425,45	2,9922	0,9998	158,2	27
Ala (A)		627,02	-3,9044	0,9985	186,5	24
Gly (G)		432,20	0,4238	0,9995	174,7	24
Val (V)		421,67	1,0987	0,9998	193,8	24
Met (M)		476,38	3,0066	0,9999	198,2	24
Leu (L)		446,65	2,6677	0,9998	202,2	23
Phe (F)		461,91	4,9675	0,9993	117,4	22
Glu (D)		492,15	-1,914	0,9991	219,6	31
Asp (E)		507,18	-1,7482	0,9997	236,6	32
Trp (W)		558,78	1,756	0,9989	129,9	21
Lys (K)		255,71	0,3797	0,9999	137,1	20
Arg (R)		491,92	0,2299	0,9996	115,8	21
Tyr (Y)		487,68	2,3525	0,9996	97,6	24

W badaniu walidacyjnym wykazano dobrą zgodność wyników z założonym modelem liniowym odpowiedzi do stężenia ($R^2 > 0,998$) w zakresie od 10 do 200 μM (Tabela 9). Kalibrację prowadzono przez sześciokrotną analizę niezależnie przygotowanych próbek dla sześciu różnych stężeń (10, 20, 50, 100, 150 i 200 μM) aminokwasów.

Wartości LOD i LOQ, wyznaczone na podstawie stosunku S/N równego odpowiednio 3 i 10, wyznaczono na poziomie odpowiednio 3 i 10 μM dla wszystkich substancji oprócz lizyny, która ulegała podwójnemu sprzęganiu z DNFB. Dla tego aminokwasu wartości LOD i LOQ wynosiły odpowiednio 1,5 i 10 μM ($S/N = 20$).

Powtarzalność metody sprawdzano na podstawie analizy sześciu niezależnie przygotowanych próbek w czterech różnych stężeniach: 10, 40, 80 i 160 μM (Tabela 10). Względne odchylenie standardowe uzyskanych wyników mieściło się w zakresie od 0,54 do 11,47%, podczas gdy dokładność uzyskanych wyników oszacowano w granicach od 84,9 do 116,0%.

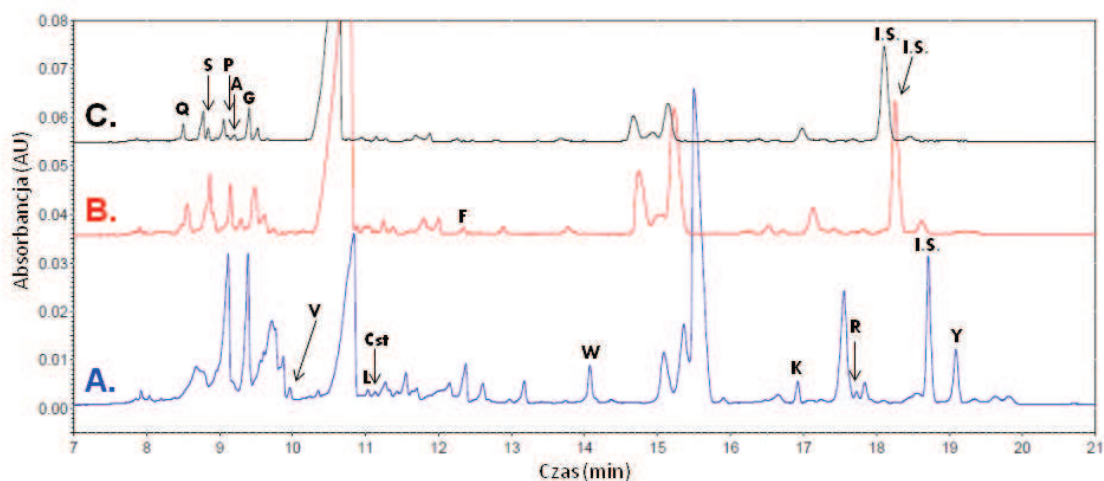
Tab. 10. Zestawienie wyników uzyskanych w wyniku oceny powtarzalności i odtwarzalności metody dla poszczególnych stężeń wzorców aminokwasów (10, 40, 80 i 160 μM).

C [μM]	Gln	Ser	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Leu	Phe	Glu	Trp	Asp	Lys	Arg	Tyr
Powtarzalność metod: precyzja (% RSD, n=6)															
160	2,05	2,29	2,26	3,99	2,20	3,14	4,36	2,24	0,54	5,21	2,42	4,86	0,84	0,67	1,70
80	3,45	2,05	1,03	2,87	3,12	5,10	1,93	2,29	1,19	2,70	3,03	6,48	2,49	3,31	2,07
40	7,42	5,43	4,81	3,15	3,57	5,47	7,50	1,88	2,88	1,58	4,51	4,51	0,85	2,67	2,13
10	11,47	2,89	6,00	8,59	4,03	6,83	9,90	4,10	5,67	5,90	7,26	8,42	5,13	4,70	5,23
Odtwarzalność metody: precyzja (% RSD, n=9)															
160	3,92	1,54	3,12	4,11	2,13	2,59	3,91	1,59	1,37	3,67	3,44	4,48	2,79	2,96	2,03
80	5,89	6,47	5,22	7,04	3,25	4,59	6,99	2,41	3,50	6,46	6,56	7,45	5,09	3,86	4,89
40	5,57	5,24	4,59	7,33	4,21	6,22	8,20	7,47	3,90	3,78	3,72	5,26	2,15	3,34	3,04
10	9,91	5,38	11,07	8,85	9,65	6,15	9,90	8,50	5,15	9,31	4,96	9,87	4,15	4,54	5,03
Powtarzalność metod: dokładność (n=6)															
160	93,0	93,0	93,3	96,3	97,4	95,0	93,8	90,4	89,6	96,9	92,5	96,8	98,1	97,5	93,3
80	96,2	98,4	100,3	101,3	107,0	100,6	96,5	95,8	96,9	100,2	96,7	94,7	100,1	100,0	97,8
40	99,1	96,5	106,3	98,5	110,8	108,4	97,4	104,7	105,4	91,8	88,8	108,2	93,8	96,2	103,5
10	95,4	108,1	111,1	88,8	94,0	101,2	116,0	102,5	114,9	84,9	90,4	107,7	92,3	92,3	114,1
Odtwarzalność metody: dokładność (n=9)															
160	94,0	92,7	94,7	95,0	96,5	95,5	92,2	90,4	88,8	95,6	93,8	87,3	95,0	94,2	92,3
80	92,1	97,5	105,4	94,5	110,3	105,5	102,9	96,8	100,2	93,7	90,4	95,9	95,2	97,6	102,8
40	100,8	96,6	109,6	92,2	112,6	109,0	96,7	103,5	108,4	89,0	86,8	110,3	92,0	95,5	105,7
10	95,9	112,1	114,1	86,7	96,8	102,2	116,0	102,5	116,9	84,2	90,1	117,2	92,0	91,6	115,6

Odtwarzalność metody badano poprzez oznaczanie dziewięciu niezależnie przygotowanych próbek w czterech różnych stężeniach: 10, 40, 80 i 160 μM (Tabela 10), oznaczając ich zawartość przez trzy kolejne dni (po 3 próbki z każdego stężenia na dzień). Precyzja tych oznaczeń zawierała się w granicach od 1,54 do 11,07%, podczas gdy dokładność wynosiła od 84,2 do 117,2%.

Effektu wzmocnienia siły sygnału obliczono na podstawie wyników analizy mieszaniny wzorców o stężeniu 500 μM z użyciem standardowego dozowania próbki (5 s, 3,45 kPa) i oznaczenia próbki o zawartości aminokwasów na poziomie 100 μM z wykorzystaniem opracowanej metody. Porównując wysokość sygnałów w obu metodach i uwzględniając różnice stężeń, na podstawie Równania (9) wartość EF wyznaczono w zakresie od 20 do 32 (Tabela 9). Poprawa czułości metody większości substancji mieściła się między 20 a 27, podczas gdy dla kwasów asparaginowego i glutaminowego uzyskano wyższy efekt wzbogacenia (odpowiednio 32 i 31). Wynik ten przemawia za słusznością założenia, iż te dwa związki ulegają dodatkowemu procesowi zmiatania.

Na Rysunku 45 przedstawiono przykładowe elektroferogramy próbki moczu ludzkiego. Zbyt wysokie stężenie części oznaczanych składników, a także substancji matrycowych, wymagało zastosowania dalszego rozcieńczenia próbki. Widoczne na Rysunku 45 przesunięcie w czasach migracji kompensowano poprzez zastosowanie wzorca wewnętrznego i wyznaczanie względnych czasów migracji dla każdego analitu.



Rys. 45. Elektroferogramy uzyskane w wyniku analizy: (A) próbek moczu ludzkiego; (B) próbek moczu ludzkiego po czterokrotnym rozcieńczeniu; (C) próbek moczu ludzkiego po ośmiokrotnym rozcieńczeniu [155]. Warunki analiz takie same jak na Rysunku 41C. Oznaczone sygnały użyto w analizie ilościowej.

Uzyskane wyniki analiz sześciu próbek moczu ludzkiego zestawiono w Tabeli 11.

Tab. 11. Zestawienie uzyskanych wyników próbek moczu ludzkiego (n = 6).

Aminokwas	Oznaczony zakres stężeń [μM]
Gln	272 – 619
Ser	156 – 404
Pro	70 – 148
Ala	156 – 293
Gly	430 – 990
Val	12 – 53
Met	Nie wykryto
Leu	23 – 59
Phe	57 – 99
Glu	< LOQ – 46
Trp	39 – 161
Asp	Nie wykryto
Lys	34 – 128
Arg	37 – 246
Tyr	101 – 197

7. Podsumowanie

W ramach pracy eksperymentalnej opracowano pięć metod analitycznych, w których wykorzystano techniki wzbogacania analitu w kapilarze w celu wzmocnienia siły sygnału oznaczanych substancji modelowych. Optymalizacja metod umożliwiła poprawę czułości detekcji wszystkich substancji o co najmniej rząd wielkości. Uzyskany współczynnik EF zależał nie tylko od zastosowanej techniki, ale także od właściwości fizyko-chemicznych oznaczanych substancji, podczas gdy na wyznaczone wartości LOD miała także wpływ użyta metoda przygotowania próbki i parametry detekcji (analityczna długość fali).

W Rozdziale III.2 przedstawiono zastosowanie techniki MSS. W ramach optymalizacji metody analitycznej uwzględniono wpływ zawartości rozpuszczalnika organicznego w roztworze BGE, stężenia SDS w matrycy analitycznej próbki oraz czasu dozowania próbki. Uzyskane wyniki potwierdziły istotność tych parametrów, a optymalne wartości poszczególnych składników były zbliżone do rezultatów badań innych zespołów naukowych [32; 157; 158]. W przypadku techniki MSS na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż matryca analityczna próbki wykazuje zbliżoną przewodność do buforu rozdzielającego, co pozwala na dozowanie większych objętości próbki niż w przypadku techniki FASS [18]. Obecność surfaktantu w strefie próbki dodatkowo zwiększa rozpuszczalność analitów słabo rozpuszczalnych w roztworach wodnych, a także zapobiega adsorpcji oznaczanych związków do wewnętrznej ściany kapilary. Jakkolwiek, ograniczenia dotyczące objętości dozowania próbki w tej technice skutkowały około 50-krotną poprawą siły sygnałów w stosunku do standardowego dozowania hydrodynamicznego (5 s, 3,45 kPa). Niemniej jednak, możliwość spiętrzania analitów w obecności miceli jest niekwestionowaną zaletą techniki MSS i pozwala na jej wykorzystanie w analizie dwuwymiarowej [37].

Technika MSS umożliwia efektywne spiętrzanie większych objętości próbki w stosunku do techniki FASS z uwagi na wielokrotnie omawiany już problem niehomogenności roztworów wprowadzanych do kapilary i zjawiska elektrodyspersji. Problem ten został poruszony w Rozdziale III.3. Z jednej strony przeprowadzone badania wykazały, iż zastosowanie wielokrotnego dozowania próbki w technice FASS pozwala na uzyskanie podobnych wartości LOD podczas oznaczania wybranych substancji biologicznie czynnych w moczu ludzkim (2,23 – 6,21 ng/ml),

co w przypadku techniki MSS (6 ng/ml). Z drugiej jednak strony, wyższe liczbowo wartości EF otrzymano w przypadku techniki MSS. Jednakże rozbieżność ta jest uzasadniona z uwagi na różnice w sposobie ekstrakcji analitów (trójstopniowa dla techniki FASS, jednostopniowa dla techniki MSS) i stosowaną analityczną długość fali (FASS – 200 nm, MSS – 254 nm). Warty nadmienia jest również fakt, że istnieją jedynie dwa doniesienia dotyczące wielokrotnego dozowania próbki i wzbogacania analitów obojętnych elektrycznie przy pomocy techniki LVSS w połączeniu ze zmiataniem próbki [15; 16]. Z tego względu opracowana technika FASS z użyciem wielokrotnego dozowania próbki jest podejściem innowacyjnym, a jej zastosowanie nie zostało wcześniej opublikowane w literaturze naukowej. Spośród parametrów poddanych optymalizacji interesujące wyniki uzyskano podczas badania wpływu napięcia przykładanego w czasie procesu spiętrzania próbki (Rysunek 23). Stosowanie stosunkowo niskiego napięcia (2 kV) na tym etapie analizy utrzymywało oznaczane substancje na granicy roztworów próbka – BGE i zapobiegało ich migracji w głąb buforu rozdzielającego. Z uwagi na rezultat tego eksperymentu i wcześniejsze doniesienia literaturowe [22; 139], wielce prawdopodobnym wydaje się być udział oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy kationowymi analitami i anionowymi składnikami buforu w procesie spiętrzania składników próbki. Zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań.

Najwyższą czułość detekcji dla substancji o charakterze słabych zasad organicznych uzyskano poprzez zastosowanie dozowania elektrokinetycznego (Rozdział III.4). Przeprowadzona optymalizacja metody analitycznej w połączeniu z DLLME umożliwiła wykrywanie wybranych związków w próbkach moczu ludzkiego w stężeniu poniżej wartości 1 ng/ml. Kluczowym dla efektu wzmocnienia siły sygnału okazał się rodzaj i ilość dodanego rozpuszczalnika organicznego do matrycy analitycznej próbki (Rysunek 26), co znalazło potwierdzenie w literaturze naukowej [23; 140]. Najwyższe sygnały uzyskano w przypadku 90% MeOH, w obecności którego obserwowano nieliniowy przyrost wysokości pików w miarę zwiększania stężenia BGE (Rysunek 29). Poczynione obserwacje pozwoliły na wyodrębnienie dodatkowego mechanizmu spiętrzania (p-ITP), którego obecność potwierdzono w kolejnym eksperymencie (Rysunek 28). Uzyskane wyniki zwracają uwagę na istotny aspekt optymalizacji składu BGE stosowanego w przypadku technik wzbogacania analitu w kapilarze. Należy również zaznaczyć, iż użyta technika mikroekstrakcyjna nie dała

spodziewanego błyskawicznego efektu wymiany masy, a jej zastosowanie w przypadku próbek moczu nastręczyło wielu trudności związanych z obecnością składników pochodzących z matrycy próbki. Technika DLLME pozwoliła jednak na stosunkowo szybkie (< 14 min) i skuteczne ($EF = 8 - 19$) wzbogacenie oznaczanych związków przed analizą elektroforetyczną. Jednoczesne stosowanie techniki DLLME i FASI umożliwiło uzyskanie współczynników EF w zakresie od 8080 do 13410.

Przeprowadzone badania wykazały, iż zastosowanie technik spiętrzania pozwala na bardzo skuteczne wzbogacanie analitów jednoimiennych. Jednoczesne wzmacnianie siły sygnału dla cząsteczek o charakterze słabych zasad i kwasów organicznych jest zagadnieniem rzadko poruszonym. Takim przykładem związków mogą być witaminy z grupy B, do oznaczania których zaproponowano metodę opartą o technikę FASS i zmiatanie w MEKC (Rozdział III.5). Opracowana metodologia odznaczała się najniższymi wartościami EF, które dla większości substancji mieściły się w zakresie od 12 do 20. Wyjątek stanowiła tiamina, dla której odnotowano 40-krotną poprawę czułości metody. Jakkolwiek, zważywszy na fakt, iż metoda referencyjna wykorzystywała krótszy czas dozowania próbki (2 s, 3,45 kPa) w porównaniu do pozostałych metod opisanych w Rozdziale III (5 s, 3,45 kPa), wynik ten jest daleki od satysfakcjonującego. Powodem tego stanu rzeczy były różnice we właściwościach fizykochemicznych oznaczanych związków. W efekcie wielokrotnie odnotowywano wzrost siły sygnału dla kilku substancji z jednoczesnym spadkiem intensywności pozostałych przy zmianie danego parametru (Rysunki 36 – 38), co narzucało konieczność wyboru rozwiązań kompromisowych. Jak już wspomniano, najwyższą wartość współczynnika EF uzyskiwano dla witaminy B₁, której wysoka retencja tego związku w istotny sposób zniwelowała wpływ pozostałych współczynników na efekt wzmocnienia sygnału. Przeprowadzone badanie pokazało, iż zmiatanie substancji o zróżnicowanym ładunku i powinowactwie do fazy pseudostacjonarnej wykazuje niewielką skuteczność, a dodatkowe zastosowanie techniki FASS nie stanowi rozwiązania tego problemu. Należy zaznaczyć, iż uzyskane wyniki wykazały dobrą zgodność teoretyczną z modelem zmiatania zaproponowanym później przez El-Awady i współl. [82; 85].

Przeważająca większość technik wzbogacania analitu w kapilarze jest wysoce podatna na zmiany siły jonowej próbki (Tabela 1). Z tego względu procedury analityczne z użyciem tych technik obejmują zazwyczaj ekstrakcję analitów

z jednoczesnym procesem odsalania próbek biologicznych [125]. Podobny zabieg zastosowano w przypadku metod opisanych w Rozdziałach III.2 – 4, podczas gdy oznaczanie witamin w podłożach płynnych stosowanych do hodowli bakterii wymagało rozcieńczenia próbki z uwagi na wysokie stężenie dodatkowych substancji obecnych w matrycy próbki (Rozdział III.5). Jakkolwiek i w tym przypadku wysokie zasolenie było czynnikiem niekorzystnym. Z kolei rozcieńczanie próbki wodą, a następnie wzbogacanie analitów w kapilarze jest zabiegiem sprzecznym. Problem ten jest spotykany w przypadku braku ugruntowanej i rzetelnej metody ekstrakcji analitów takich, jak na przykład aminokwasy biogenne. Studium szczegółowej pracy przeglądowej poświęconej tematyce wzbogacania w kapilarze tej grupy związków [159] wskazuje jedynie na dwie prace dotyczące oznaczania dużej liczby aminokwasów (> 13) przy użyciu detekcji spektrofotometrycznej [160; 161]. W obu przypadkach spiętrzanie dużej objętości próbki było możliwe jedynie po jej uprzednim rozcieńczeniu z uwagi na stosunkowo duże stężenie elektrolitu dodawanego w procesie upochadniania analitów. Rozwiązanie tego problemu zostało zaproponowane w Rozdziale III.6, w którym wykazano użyteczność opracowanej techniki do wzbogacania analitów w obecności soli boranowej. Wartym nadmienienia jest fakt, iż jest to pierwsze doniesienie na temat skuteczności pH-spiętrzania indukowanego kwasem we wzbogacania analitów anionowych. Dodatkowo, w doświadczeniach odnotowano wyższą skuteczność zmiatania analitów o strukturze kwasów di karboksylowych w obecności boraksu (Rysunek 41B), co również nie zostało odnotowane w literaturze naukowej. Z uwagi na brak sprawdzonych metod ekstrakcji aminokwasów biogennych zaproponowano metodę oczyszczania próbki poprzez dodatek ACN, a następnie jego efektywne i proste usunięcie na drodze dekantacji po uprzednim ochłodzeniu roztworu. Umożliwiło to oznaczenie fizjologicznych stężeń aminokwasów biogennych w próbkach moczu ludzkiego z użyciem opracowanej metodologii.

Wyniki pracy wskazują na duży potencjał technik wzbogacania analitu w kapilarze, które umożliwiają oznaczenie niskich stężeń (nawet kilku ng/ml) substancji drobnocząsteczkowych w szybki i stosunkowo prosty sposób. Stanowią też nieodłączny element technik elektromigracyjnych, pozwalający na lepsze zrozumienie natury procesów elektroforetycznych.

Wnioski

1. Użycie techniki MSS z hydrodynamicznym dozowaniem próbki umożliwia około pięćdziesięciokrotną poprawę czułości metody analitycznej w stosunku do drobnocząsteczkowych substancji o charakterze słabych zasad organicznych.
2. Metoda wielokrotnego dozowania i spiętrzania próbki z użyciem techniki FASS pozwala na uzyskanie niższych wartości LOD i LOQ w stosunku do jednokrotnego dozowania próbki.
3. Spiętrzanie próbki w warunkach homogennego rozkładu pola elektrycznego w kapilarze (technika MSS) wykazuje większą skuteczność w stosunku do techniki FASS w przypadku dozowania hydrodynamicznego.
4. Największy efekt wzmocnienia siły sygnałów uzyskano przez zastosowanie techniki FASI, dla której wartość EF mieściła się w zakresie od 481 do 1127.
5. Użycie techniki DLLME na etapie przygotowania próbki pozwala na dodatkowe wzbogacenie analitów przed analizą elektroforetyczną, jednakże metoda ta odznacza się znacznie niższym potencjałem wdrożeniowym w przypadku próbek biologicznych w stosunku do szeroko opisanych w literaturze naukowej przykładów użycia techniki DLLME w analizie próbek wody.
6. Dozowanie elektrokinetyczne substancji jednoimiennych w obecności dodatku rozpuszczalnika organicznego znacząco poprawia czułość metody nie tylko z uwagi na wyższą różnicę przewodności ośrodków próbka – BGE, ale także udział mechanizmu p-ITP. Z tego względu istotny jest właściwy dobór stosowanego kjonu w BGE.
7. Podczas gdy proces spiętrzanie substancji jednoimiennych wykazywał wysoką efektywność, zaproponowana metoda wzbogacania substancji o charakterze słabych kwasów i zasad organicznych, oparta o technikę FASS w połączeniu ze zmiataniem w MEKC, odznaczała się stosunkowo niską skuteczność.
8. pH-spiętrzanie indukowane kwasem z MEKC pozwala na wzbogacanie analitów anionowych w obecności jonów boranowych w matrycy analitycznej próbki.
9. Zmiatanie aminokwasów dikarboksylowych przy użyciu miceli anionowych jest procesem wysoce efektywnym w obecności tetraboranu disodowego.

Piśmiennictwo

- [1] H. Haglund, A. Tiselius, Zone electrophoresis in a glass powder column, *Acta Chimica Scandinavica*, 1950, pp. 957-962.
- [2] S. Hjertén, S. Jerstedt, A. Tiselius, Some aspects of the use of “continuous” and “discontinuous” buffer systems in polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 11 (1965) 219-223.
- [3] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T. Verheggen, Concentration distributions in free zone electrophoresis. *Journal of Chromatography* 169 (1979) 1-10.
- [4] D.S. Burgi, R.L. Chien, Optimization in sample stacking for high-performance capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 63 (1991) 2042-2047.
- [5] J.R. Boyack, J.C. Giddings, Zone and boundary diffusion in electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* 235 (1960) 1970-1972.
- [6] J.P. Quirino, S. Terabe, Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 902 (2000) 119-135.
- [7] D.S. Burgi, Large-volume stacking of anions in capillary electrophoresis using an electroosmotic flow modifier as a pump. *Analytical Chemistry* 65 (1993) 3726-3729.
- [8] R.L. Chien, D.S. Burgi, Sample stacking of an extremely large injection volume in high-performance capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 64 (1992) 1046-1050.
- [9] G. McGrath, W.F. Smyth, Large-volume sample stacking of selected drugs of forensic significance by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* 681 (1996) 125-131.
- [10] T. Kawai, J. Ito, K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka, Electrophoretic analysis of cations using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump using capillaries coated with neutral and cationic polymers. *Journal of Chromatography A* 1267 (2012) 65-73.
- [11] T. Kawai, M. Ueda, Y. Fukushima, K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka, Toward 10000-fold sensitivity improvement of oligosaccharides in capillary electrophoresis using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump combined with field-amplified sample injection. *Electrophoresis* 34 (2013) 2303-2310.
- [12] P. Tůma, Large volume sample stacking for rapid and sensitive determination of antidiabetic drug metformin in human urine and serum by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Chromatography A* 1345 (2014) 207-211.

- [13] F. Oukacine, M. Taverna, Suppression of apparent fluid flow in capillary isotachopheresis without recourse to capillary coating. *Analytical Chemistry* 86 (2014) 3317-3322.
- [14] N.E. Baryla, C.A. Lucy, pH-independent large-volume sample stacking of positive or negative analytes in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 22 (2001) 52-8.
- [15] P.L. Urban, C. Garcia-Ruiz, M.A. Garcia, M.L. Marina, Separation and online preconcentration by multistep stacking with large-volume injection of anabolic steroids by capillary electrokinetic chromatography using charged cyclodextrins and UV-absorption detection. *Journal of Separation Science* 28 (2005) 2200-9.
- [16] C.C. Wang, J.L. Chen, Y.L. Chen, H.L. Cheng, S.M. Wu, A novel stacking method of repetitive large volume sample injection and sweeping MEKC for determination of androgenic steroids in urine. *Analytica Chimica Acta* 744 (2012) 99-104.
- [17] X. Huang, M.J. Gordon, R.N. Zare, Bias in quantitative capillary zone electrophoresis caused by electrokinetic sample injection. *Analytical Chemistry* 60 (1988) 375-377.
- [18] R.L. Chien, D.S. Burgi, On-column sample concentration using field amplification in cze. *Analytical Chemistry* 64 (1992) A489-A496.
- [19] R.L. Chien, J.C. Helmer, Electroosmotic properties and peak broadening in field-amplified capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 63 (1991) 1354-1361.
- [20] C. Huhn, U. Pyell, Diffusion as major source of band broadening in field-amplified sample stacking under negligible electroosmotic flow velocity conditions. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 4476-4486.
- [21] M. Dawod, M.C. Breadmore, R.M. Guijt, P.R. Haddad, Electrokinetic supercharging for on-line preconcentration of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples. *Journal of Chromatography A* 1189 (2008) 278-284.
- [22] Y.L. Feng, J.P. Zhu, On-line enhancement technique for the analysis of nucleotides using capillary zone electrophoresis/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 78 (2006) 6608-6613.
- [23] C.-X. Zhang, W. Thormann, Head-column field-amplified sample stacking in binary system capillary electrophoresis: a robust approach providing over 1000-fold sensitivity enhancement. *Analytical Chemistry* 68 (1996) 2523-2532.

- [24] J.P. Quirino, S. Terabe, Approaching a million-fold sensitivity increase in capillary electrophoresis with direct ultraviolet detection: Cation-selective exhaustive injection and sweeping. *Analytical Chemistry* 72 (2000) 1023-1030.
- [25] Z. Xu, K. Kawahito, X. Ye, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Electrokinetic supercharging with a system-induced terminator and an optimized capillary versus electrode configuration for parts-per-trillion detection of rare-earth elements in CZE. *Electrophoresis* 32 (2011) 1195-200.
- [26] T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gas, High-sensitive capillary zone electrophoresis analysis by electrokinetic injection with transient isotachophoretic preconcentration: Electrokinetic supercharging. *Electrophoresis* 24 (2003) 498-504.
- [27] J.P. Quirino, P.R. Haddad, Online sample preconcentration in capillary electrophoresis using analyte focusing by micelle collapse. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 6824-6829.
- [28] J.P. Quirino, Neutral analyte focusing by micelle collapse in micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 1214 (2008) 171-177.
- [29] J.P. Quirino, Analyte focusing by micelle collapse in CZE: Nanopreparation of neutrals. *Electrophoresis* 30 (2009) 875-882.
- [30] J.P. Quirino, P.R. Haddad, Neutral analyte focusing by micelle collapse in partial-filling MEKC with UV and ESI-MS detection. *Electrophoresis* 30 (2009) 1670-1674.
- [31] A.M. Guidote, Jr., J.P. Quirino, On-line sample concentration of organic anions in capillary zone electrophoresis by micelle to solvent stacking. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 6290-6295.
- [32] J.P. Quirino, Micelle to solvent stacking of organic cations in capillary zone electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 294-299.
- [33] H.D. Zhu, W.J. Lu, H.H. Li, Y.H. Ma, S.Q. Hu, H.L. Chen, X.G. Chen, Micelle to solvent stacking of two alkaloids in nonaqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 5867-5871.
- [34] J.P. Quirino, A.T. Aranas, Micelle to solvent stacking of organic cations in micellar electrokinetic chromatography with sodium dodecyl sulfate. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 7377-7383.

- [35] H.R. Rabanes, A.T. Aranas, N.L. Benbow, J.P. Quirino, Synergistic effect of field enhanced sample injection on micelle to solvent stacking in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1267 (2012) 74-79.
- [36] R.M. Tubaon, P.R. Haddad, and J.P. Quirino, High-sensitivity analysis of anionic sulfonamides by capillary electrophoresis using a synergistic stacking approach. *Journal of chromatography. A* 1349 (2014) 129-34.
- [37] C. Kukusamude, S. Srijaranai, and J.P. Quirino, Stacking and separation of neutral and cationic analytes in interface-free two-dimensional heart-cutting capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 86 (2014) 3159-3166.
- [38] J.P. Quirino, Two-step stacking in capillary zone electrophoresis featuring sweeping and micelle to solvent stacking: I. Organic cations. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 7776-7780.
- [39] J.P. Quirino, A.M. Guidote, Jr., Two-step stacking in capillary zone electrophoresis featuring sweeping and micelle to solvent stacking: II. Organic anions. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 1004-1010.
- [40] Z. Zhang, X. Du, X. Li, Sweeping with electrokinetic injection and analyte focusing by micelle collapse in two-dimensional separation via integration of micellar electrokinetic chromatography with capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* 83 (2011) 1291-1299.
- [41] H. Cottet, J.P. Biron, and J. Taillades, Heart-cutting two-dimensional electrophoresis in a single capillary. *Journal of Chromatography A* 1051 (2004) 25-32.
- [42] C. Schwer, F. Lottspeich, Analytical and micropreparative separation of peptides by capillary zone electrophoresis using discontinuous buffer systems. *Journal of Chromatography* 623 (1992) 345-355.
- [43] N.-S. Hong, L.H. Shi, J.S. Jeong, I. Yang, S.-K. Kim, S.-R. Park, Rapid and accurate determination of deoxyribonucleoside monophosphates from DNA using micellar electrokinetic chromatography with a cationic surfactant additive. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011) 2131-2140.
- [44] E.E.K. Baidoo, P.I. Benket, C. Neuss, M. Pelzing, G. Kruppa, J.A. Leary, J.D. Keasling, Capillary electrophoresis-Fourier transform ion cyclotron resonance mass Spectrometry for the identification of cationic metabolites via a pH-mediated stacking-transient isotachophoretic method. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 3112-3122.

- [45] I. Kohler, J. Schappler, S. Rudaz, Highly sensitive capillary electrophoresis-mass spectrometry for rapid screening and accurate quantitation of drugs of abuse in urine. *Analytica Chimica Acta* 780 (2013) 101-109.
- [46] O.A. Mayboroda, C. Neususs, M. Pelzing, G. Zurek, R. Derks, I. Meulenbelt, M. Kloppenburg, E.P. Slagboom, A.M. Deelder, Amino acid profiling in urine by capillary zone electrophoresis - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1159 (2007) 149-53.
- [47] R. Ramautar, O.A. Mayboroda, R.J.E. Derks, C. van Nieuwkoop, J.T. van Dissel, G.W. Sornsen, A.M. Deelder, G.J. de Jong, Capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry using noncovalently bilayer-coated capillaries for the analysis of amino acids in human urine. *Electrophoresis* 29 (2008) 2714-2722.
- [48] C. Neususs, M. Pelzing, M. Macht, A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 23 (2002) 3149-3159.
- [49] S. Wang, P. Yang, X. Zhao, Amino acid profile determination in the urine of bladder cancer patients by ce-ms with on-line ph-mediated stacking and pattern recognition. *Chromatographia* 70 (2009) 1479-1484.
- [50] S. Bachmann, R. Bakry, C.W. Huck, F. Polato, D. Corradini, G.K. Bonn, Peptide mapping using capillary electrophoresis offline coupled to matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 32 (2011) 2830-2839.
- [51] J.P. Quirino, Base-induced transient isotachophoretic stacking of acidic drugs in capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science* 34 (2011) 1020-1026.
- [52] J.P. Quirino, M.C. Breadmore, Acid-induced transient isotachophoretic stacking of basic drugs in co-electroosmotic flow capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science* 35 (2012) 60-65.
- [53] M.E. Hadwiger, S.R. Torchia, S. Park, M.E. Biggin, C.E. Lunte, Optimization of the separation and detection of the enantiomers of isoproterenol in microdialysis samples by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis using electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* 681 (1996) 241-249.
- [54] S. Park, C.E. Lunte, On-column sample concentration of high-ionic-strength samples in capillary electrophoresis. *Journal of Microcolumn Separations* 10 (1998) 511-517.

- [55] Y. Xiong, S.R. Park, H. Swerdlow, Base stacking: pH mediated on-column sample concentration for capillary DNA sequencing. *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3605-3611.
- [56] Y.P. Zhao, C.E. Lunte, pH mediated field amplification on-column preconcentration of anions in physiological samples for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 71 (1999) 3985-3991.
- [57] D.J. Weiss, K. Saunders, C.E. Lunte, pH-Mediated field-amplified sample stacking of pharmaceutical cations in high-ionic strength samples. *Electrophoresis* 22 (2001) 59-65.
- [58] J.A. Gillogly, C.E. Lunte, pH-mediated acid stacking with reverse pressure for the analysis of cationic pharmaceuticals in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 26 (2005) 633-639.
- [59] Y.-W. Wu, J.-F. Liu, Z.-L. Deng, J. Zhang, F. Jiang, K. Xiong, H. Zhang, MEKC determination of IgG in human serum via a pH-mediated acid stacking method. *Journal of Separation Science* 33 (2010) 3068-3074.
- [60] S.D. Arnett, C.E. Lunte, Enhanced pH-mediated stacking of anions for CE incorporating a dynamic pH junction. *Electrophoresis* 28 (2007) 3786-3793.
- [61] E.M. Ward, M.R. Smyth, R. O'Kennedy, C.E. Lunte, Application of capillary electrophoresis with pH-mediated sample stacking to analysis of coumarin metabolites in microsomal incubations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32 (2003) 813-822.
- [62] S.D. Arnett, D.M. Osbourn, K.D. Moore, S.S. Vandaveer, C.E. Lunte, Determination of 8-oxoguanine and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the rat cerebral cortex using microdialysis sampling and capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* 827 (2005) 16-25.
- [63] M.E. Hoque, S.D. Arnett, C.E. Lunte, On-column preconcentration of glutathione and glutathione disulfide using pH-mediated base stacking for the analysis of microdialysis samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* 827 (2005) 51-7.
- [64] R. Aebersold, H.D. Morrison, Analysis of dilute peptide samples by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr* 516 (1990) 79-88.

- [65] P. Britz-McKibbin, A.R. Kranack, A. Paprica, D.D.Y. Chen, Quantitative assay for epinephrine in dental anesthetic solutions by capillary electrophoresis. *Analyst* 123 (1998) 1461-1463.
- [66] C.-X. Cao, Moving chemical reaction boundary and isoelectric focusing: I. Conditional equations for Svensson–Tiselius' differential equation of solute concentration distribution in idealized isoelectric focusing at steady state. *Journal of Chromatography A* 813 (1998) 153-171.
- [67] C.X. Cao, S.L. Zhou, H. You-Zhao, X.Y. Zheng, W.K. Chen, Y.A. Qian, Experimental study on moving neutralization reaction boundary created with the strong reactive electrolytes of HCl and NaOH in agarose gel. *Journal of Chromatography A* 891 (2000) 337-47.
- [68] C.X. Cao, S.L. Zhou, Y.Z. He, Y.T. Qian, L. Yang, Q.S. Qu, W.E. Gan, L. Dong, Y.Q. Zhao, W.K. Chen, Corrections to moving chemical reaction boundary equation for weak reactive electrolytes under the existence of background electrolyte KCl in large concentrations. *Journal of Chromatography A* 907 (2001) 347-52.
- [69] P. Britz-McKibbin, D.D.Y. Chen, Selective focusing of catecholamines and weakly acidic compounds by capillary electrophoresis using a dynamic pH junction. *Analytical Chemistry* 72 (2000) 1242-1252.
- [70] C.X. Cao, Y.Z. He, M. Li, Y.T. Qian, M.F. Gao, L.H. Ge, S.L. Zhou, L. Yang, Q.S. Qu, Stacking ionizable analytes in a sample matrix with high salt by a transient moving chemical reaction boundary method in capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* 74 (2002) 4167-74.
- [71] R. Lee, A.S. Ptolemy, L. Niewczas, P. Britz-McKibbin, Integrative metabolomics for characterizing unknown low-abundance metabolites by capillary electrophoresis-mass spectrometry with computer simulations. *Analytical Chemistry* 79 (2007) 403-415.
- [72] P. Britz-McKibbin, G.M. Beaulieu, D.D.Y. Chen, Velocity-difference induced focusing of nucleotides in capillary electrophoresis with a dynamic pH junction. *Analytical Chemistry* 72 (2000) 1729-1735.
- [73] A.A. Kazarian, E.F. Hilder, M.C. Breadmore, Online sample pre-concentration via dynamic pH junction in capillary and microchip electrophoresis. *Journal of Separation Science* 34 (2011) 2800-21.

- [74] J. Horakova, J. Petr, V. Maier, E. Tesarova, L. Veis, D.W. Armstrong, B. Gas, J. Sevcik, On-line preconcentration of weak electrolytes by electrokinetic accumulation in CE: experiment and simulation. *Electrophoresis* 28 (2007) 1540-7.
- [75] C.A. Nesbitt, J.T.M. Lo, K.K.C. Yeung, Over 1000-fold protein preconcentration for microliter-volume samples at a pH junction using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1073 (2005) 175-180.
- [76] P. Britz-McKibbin, K. Otsuka, S. Terabe, On-line focusing of flavin derivatives using Dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 74 (2002) 3736-43.
- [77] Z.X. Zhang, M.Z. Zhang, S.S. Zhang, Online preconcentration and two-dimensional separation of cationic compounds via hyphenation of capillary zone electrophoresis with cyclodextrin-modified micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis* 30 (2009) 1958-66.
- [78] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry* 56 (1984) 111-113.
- [79] J.P. Quirino, S. Terabe, Electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 856 (1999) 465-482.
- [80] J.P. Quirino, S. Terabe, Exceeding 5000-fold concentration of dilute analytes in micellar electrokinetic chromatography. *Science* 282 (1998) 465-468.
- [81] J.P. Quirino, S. Terabe, Sweeping with an enhanced electric field of neutral analyte zones in electrokinetic chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* 22 (1999) 367-372.
- [82] M. El-Awady, C. Huhn, U. Pyell, Processes involved in sweeping under inhomogeneous electric field conditions as sample enrichment procedure in micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 1264 (2012) 124-36.
- [83] J.P. Quirino, S. Terabe, P. Bocek, Sweeping of neutral analytes in electrokinetic chromatography with high- salt-containing matrixes. *Analytical Chemistry* 72 (2000) 1934-1940.
- [84] B.C. Giordano, C.I.D. Newman, P.M. Federowicz, G.E. Collins, D.S. Burgi, Micelle stacking in micellar electrokinetic chromatography. *Analytical Chemistry* 79 (2007) 6287-6294.

- [85] M. El-Awady, U. Pyell, Sweeping as a multistep enrichment process in micellar electrokinetic chromatography: The retention factor gradient effect. *Journal of Chromatography A* 1297 (2013) 213-225.
- [86] M. Gilges, Determination of impurities in an acidic drug substance by micellar electrokinetic chromatography. *Chromatographia* 44 (1997) 191-196.
- [87] W. Shi, C.P. Palmer, On-column sample preconcentration in electrokinetic chromatography by sweeping with polymeric pseudo-stationary phases. *Journal of Separation Science* 25 (2002) 215-221.
- [88] P. Britz-McKibbin, M.J. Markuszewski, T. Iyanagi, K. Matsuda, T. Nishioka, S. Terabe, Picomolar analysis of flavins in biological samples by dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analytical Biochemistry* 313 (2003) 89-96.
- [89] M. El-Awady, F. Belal, U. Pyell, Robust analysis of the hydrophobic basic analytes loratadine and desloratadine in pharmaceutical preparations and biological fluids by sweeping-cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 1309 (2013) 64-75.
- [90] A.T. Aranas, A.M. Guidote, Jr., J.P. Quirino, Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (2009) 175-185.
- [91] C.M. Shih, C.H. Lin, Full-capillary sample stacking/sweeping-MEKC for the separation of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde-derivatized tryptophan and isoleucine. *Electrophoresis* 26 (2005) 3495-9.
- [92] J.-B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe, Anion selective exhaustive injection-sweep-micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 932 (2001) 129-137.
- [93] P. Anres, N. Delaunay, J. Vial, P. Gareil, A chemometric approach for the elucidation of the parameter impact in the hyphenation of field-enhanced sample injection and sweeping in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 33 (2012) 1169-81.
- [94] J.P. Quirino, S. Terabe, On line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. 5. Field enhanced sample injection with reverse migrating micelles. *Analytical Chemistry* 70 (1998) 1893-1901.

- [95] P. Anres, N. Delaunay, J. Vial, W. Thormann, P. Gareil, Influence of high-conductivity buffer composition on field-enhanced sample injection coupled to sweeping in CE. *Electrophoresis* 34 (2013) 353-362.
- [96] K. Isoo, S. Terabe, Analysis of metal ions by sweeping via dynamic complexation and cation-selective exhaustive injection in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 75 (2003) 6789-98.
- [97] H.Y. Huang, W.C. Lien, I.Y. Huang, Anion-selective exhaustive injection-sweeping microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 27 (2006) 3202-3209.
- [98] Z. Zhang, X. Zhang, F. Li, The multi-concentration and two-dimensional capillary electrophoresis method for the analysis of drugs in urine samples. *Science China Chemistry* 53 (2010) 1183-1189.
- [99] J.B. Kim, J.P. Quirino, K. Otsuka, S. Terabe, On-line sample concentration in micellar electrokinetic chromatography using cationic surfactants. *Journal of Chromatography A* 916 (2001) 123-30.
- [100] J.P. Quirino, S. Terabe, K. Otsuka, J.B. Vincent, G. Vigh, Sample concentration by sample stacking and sweeping using a microemulsion and a single-isomer sulfated β -cyclodextrin as pseudostationary phases in electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 838 (1999) 3-10.
- [101] M.R.N. Monton, J.P. Quirino, K. Otsuka, S. Terabe, Separation and on-line preconcentration by sweeping of charged analytes in electrokinetic chromatography with nonionic micelles. *Journal of Chromatography A* 939 (2001) 99-108.
- [102] K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka, On-line sample preconcentration and separation technique based on transient trapping in microchip micellar electrokinetic chromatography. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1255-62.
- [103] K. Sueyoshi, K. Hashiba, T. Kawai, F. Kitagawa, K. Otsuka, Hydrophobic labeling of amino acids: transient trapping-capillary/microchip electrophoresis. *Electrophoresis* 32 (2011) 1233-40.
- [104] M. Gong, K.R. Wehmeyer, P.A. Limbach, W.R. Heineman, Unlimited-volume electrokinetic stacking injection in sweeping capillary electrophoresis using a cationic surfactant. *Analytical Chemistry* 78 (2006) 6035-6042.

- [105] H.-g. Zhang, J.-h. Zhu, S.-d. Qi, N. Yan, X.-g. Chen, extremely large volume electrokinetic stacking of cationic molecules in mekc by eof modulation with strong acids in sample solutions. *Analytical Chemistry* 81 (2009) 8886-8891.
- [106] X. Zhang, Z. Zhang, Sweeping under controlled electroosmotic flow and micellar electrokinetic chromatography for on-line concentration and determination of trace phlorizin and quercitrin in urine samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56 (2011) 330-335.
- [107] K. Otsuka, S. Terabe, Effects of pH on electrokinetic velocities in micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Microcolumn Separations* 1 (1989) 150-154.
- [108] J.P. Quirino, S. Terabe, Sweeping of neutral analytes via complexation with borate in capillary zone electrophoresis. *Chromatographia* 53 (2001) 285-289.
- [109] M.J. Markuszewski, P. Britz-McKibbin, S. Terabe, K. Matsuda, T. Nishioka, Determination of pyridine and adenine nucleotide metabolites in *Bacillus subtilis* cell extract by sweeping borate complexation capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 989 (2003) 293-301.
- [110] X. Cahours, Y. Daali, S. Cherkaoui, J.L. Veuthey, Simultaneous analysis of polyhydroxylated alkaloids by capillary electrophoresis using borate complexation and evaluation of sweeping technique for sensitivity improvement. *Chromatographia* 55 (2002) 211-216.
- [111] A.H. Rageh, A. Kaltz, U. Pyell, Determination of urinary nucleosides via borate complexation capillary electrophoresis combined with dynamic pH junction-sweeping-large volume sample stacking as three sequential steps for their on-line enrichment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014).
- [112] J.P. Quirino, P.R. Haddad, Separation and sweeping of metal ions with EDTA in CZE-ESI-MS. *Journal of Separation Science* 34 (2011) 2872-2878.
- [113] X. Jiang, Z. Xia, W. Wei, and Q. Gou, Direct UV detection of underivatized amino acids using capillary electrophoresis with online sweeping enrichment. *Journal of Separation Science* 32 (2009) 1927-33.
- [114] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski, *Techniki elektromigracyjne: teoria i praktyka*, Wydawnictwo MALAMUT, 2012.
- [115] F. Foret, E. Szoko, B.L. Karger, On-column transient and coupled column isotachophoretic preconcentration of protein samples in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 608 (1992) 3-12.

- [116] A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Recent advances of transient isotachopheresis-capillary electrophoresis in the analysis of small ions from high-conductivity matrices. *Electrophoresis* 27 (2006) 323-340.
- [117] Z. Xu, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, High-sensitivity capillary and microchip electrophoresis using electrokinetic supercharging preconcentration. Insight into the stacking mechanism via computer modeling. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 660-670.
- [118] B. Jung, R. Bharadwaj, J.G. Santiago, On-chip millionfold sample stacking using transient isotachopheresis. *Analytical Chemistry* 78 (2006) 2319-2327.
- [119] M. Dawod, M.C. Breadmore, R.M. Guijt, P.R. Haddad, Counter-flow electrokinetic supercharging for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 3380-6.
- [120] M.M. Meighan, M. Dawod, R.M. Guijt, M.A. Hayes, M.C. Breadmore, Pressure-assisted electrokinetic supercharging for the enhancement of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6750-5.
- [121] M.C. Breadmore, J.P. Quirino, 100 000-fold concentration of anions in capillary zone electrophoresis using electroosmotic flow controlled counterflow isotachopheretic stacking under field amplified conditions. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 6373-6381.
- [122] Z.K. Shihabi, Sample matrix effects in capillary electrophoresis. 2. Acetonitrile deproteinization. *Journal of Chromatography A* 652 (1993) 471-475.
- [123] Z.K. Shihabi, Stacking and discontinuous buffers in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 21 (2000) 2872-2878.
- [124] Z.K. Shihabi, Transient pseudo-isotachopheresis for sample concentration in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23 (2002) 1612-1617.
- [125] S.L. Simpson, Jr., J.P. Quirino, S. Terabe, On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A* 1184 (2008) 504-541.
- [126] L.S. Foteeva, Z. Huang, A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Focusing of anionic micelles using sample-induced transient isotachopheresis: computer simulation and experimental verification in MEKC. *Journal of Separation Science* 33 (2010) 637-42.
- [127] M. Matczuk, L.S. Foteeva, M. Jarosz, M. Galanski, B.K. Keppler, T. Hirokawa, A.R. Timerbaev, Can neutral analytes be concentrated by transient isotachopheresis in

micellar electrokinetic chromatography and how much? *Journal of Chromatography A* 1345 (2014) 212-218.

[128] B.C. Giordano, D.S. Burgi, S.J. Hart, A. Terray, On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: A review. *Analytica Chimica Acta* 718 (2012) 11-24.

[129] L. Bykova, L.A. Holland, Stacking enhanced determination of steroids by CE. *Electrophoresis* 29 (2008) 3794-3800.

[130] M. Molina, S.K. Wiedmer, M. Jussila, M. Silva, M.-L. Riekkola, Use of a partial filling technique and reverse migrating micelles in the study of N-methylcarbamate pesticides by micellar electrokinetic chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 927 (2001) 191-202.

[131] P.G. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe, On-line coupling of partial-filling micellar electrokinetic chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 802 (1998) 3-15.

[132] M.C. Breadmore, Capillary and microchip electrophoresis: Challenging the common conceptions. *Journal of Chromatography A* 1221 (2012) 42-55.

[133] J.P. Quirino, P. Anres, J. Sirieix-Plenet, N. Delaunay, P. Gareil, Potential of long chain ionic liquids for on-line sample concentration techniques: Application to micelle to solvent stacking. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 5718-5724.

[134] C. Kukusamude, S. Srijaranai, J.P. Quirino, Anionic microemulsion to solvent stacking for on-line sample concentration of cationic analytes in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 35 (2014) 1478-1483.

[135] A. Plenis, T. Baczek, Modern chromatographic and electrophoretic measurements of antidepressants and their metabolites in biofluids. *Biomedical Chromatography* 25 (2011) 164-98.

[136] S. Dziomba, P. Kowalski, T. Baczek, Micelle to solvent stacking of tricyclic psychiatric drugs in capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62 (2012) 149-154.

[137] D.S. Burgi, R.L. Chien, Application of sample stacking to gravity injection in capillary electrophoresis. *Journal of Microcolumn Separations* 3 (1991) 199-202.

[138] S. Dziomba, M. Biernacki, I. Oledzka, E. Skrzydlewska, T. Baczek, P. Kowalski, Repetitive injection field-amplified sample stacking for cationic compounds determination. *Talanta* 125 (2014) 1-6.

- [139] H. Zhang, J. Gavina, Y.L. Feng, Understanding mechanisms of pressure-assisted electrokinetic injection: application to analysis of bromate, arsenic and selenium species in drinking water by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 3095-104.
- [140] Z.K. Shihabi, Organic solvent high-field amplified stacking for basic compounds in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1066 (2005) 205-210.
- [141] S. Dziomba, P. Kowalski, A. Slominska, T. Baczek, Field-amplified sample injection coupled with pseudo-isotachopheresis technique for sensitive determination of selected psychiatric drugs in human urine samples after dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta* 811 (2014) 88-93.
- [142] B. Claude, R. Nehme, P. Morin, Analysis of urinary neurotransmitters by capillary electrophoresis: Sensitivity enhancement using field-amplified sample injection and molecular imprinted polymer solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 699 (2011) 242-248.
- [143] K. Michalska, G. Pajchel, S. Tyski, Determination of linezolid and its achiral impurities using sweeping preconcentration by micellar capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 321-330.
- [144] Z.K. Shihabi, Stacking by electroinjection with discontinuous buffers in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 23 (2002) 2394-2398.
- [145] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R.M. Hosseinia, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* 1116 (2006) 1-9.
- [146] A. Zgola-Grzeskowiak, T. Grzeskowiak, Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011) 1382-1399.
- [147] A.V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges, M. Angel Rodriguez-Delgado, Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 728-751.
- [148] M.S. El-Shahawi, H.M. Al-Saidi, Dispersive liquid-liquid microextraction for chemical speciation and determination of ultra-trace concentrations of metal ions. *Trends in Analytical Chemistry* 44 (2013) 12-24.
- [149] S. Terabe, Capillary separation: micellar electrokinetic chromatography. *Annual Reviews in Analytical Chemistry* 2 (2009) 99-120.

- [150] J.F. Palmer, High-salt stacking principles and sweeping: Comments and contrasts on mechanisms for high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1036 (2004) 95-100.
- [151] S. Dziomba, P. Kowalski, T. Baczek, Field-amplified sample stacking-sweeping of vitamins B determination in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1267 (2012) 224-230.
- [152] H.A. Bardelmeijer, H. Lingeman, C. de Ruiter, W.J.M. Underberg, Derivatization in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 807 (1998) 3-26.
- [153] Z.J. Shen, Z.M. Sun, L. Wu, K. Wu, S.Q. Sun, Z.B. Huang, Rapid method for the determination of amino acids in serum by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 979 (2002) 227-232.
- [154] D. Li, Z. Wang, L. Wang, C. Qu, H. Zhang, Separation and determination of amino acids by ce using 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquid as background electrolyte. *Chromatographia* 70 (2009) 825-830.
- [155] S. Dziomba, A. Bekasiewicz, A. Prahl, T. Bączek, P. Kowalski, Improvement of derivatized amino acid detection sensitivity in micellar electrokinetic capillary chromatography by means of acid-induced pH-mediated stacking technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014) 1-9.
- [156] Z.K. Shihabi, Sample stacking by acetonitrile-salt mixtures. *Journal of Capillary Electrophoresis* 2 (1995) 267-271.
- [157] S. Zhang, R. Ma, X. Yang, C. Wang, Z. Wang, On-line sample concentration and determination of cationic alkaloids in human plasma by micelle to solvent stacking in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B* 906 (2012) 41-47.
- [158] X. Yang, S. Zhang, J. Wang, C. Wang, Z. Wang, On-line two-step stacking in capillary zone electrophoresis for the preconcentration of strychnine and brucine. *Analytica Chimica Acta* 814 (2014) 63-68.
- [159] T.C. Chiu, Recent advances in on-line concentration and separation of amino acids using capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 7919-30.
- [160] D.L. Kirschner, M. Jaramillo, T.K. Green, Enantioseparation and stacking of cyanobenz[f]isoindole-amino acids by reverse polarity capillary electrophoresis and sulfated β -cyclodextrin. *Analytical Chemistry* 79 (2006) 736-743.

[161] T.C. Chiu, H.T. Chang, Stacking and separation of fluorescent derivatives of amino acids by micellar electrokinetic chromatography in the presence of poly(ethylene oxide). *Journal of Chromatography A* 1146 (2007) 118-24.